

(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2006-520896

(P2006-520896A)

(43) 公表日 平成18年9月14日(2006.9.14)

(51) Int.CI.	F 1	テーマコード (参考)
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	D 4B024
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543	597 4H045
C07K 14/00 (2006.01)	GO1N 33/53	N
C07K 16/00 (2006.01)	C07K 14/00	
C12N 15/09 (2006.01)	C07K 16/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁) 最終頁に続く

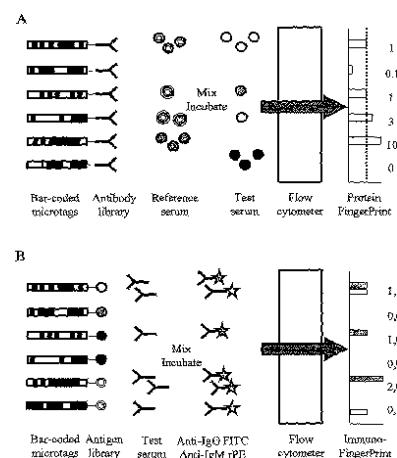
(21) 出願番号	特願2006-505940 (P2006-505940)	(71) 出願人	505343022 ティーシーピー イノベーションズ リミテッド
(86) (22) 出願日	平成16年3月10日 (2004.3.10)		
(85) 翻訳文提出日	平成17年11月7日 (2005.11.7)		
(86) 國際出願番号	PCT/GB2004/001016		
(87) 國際公開番号	W02004/081025		
(87) 國際公開日	平成16年9月23日 (2004.9.23)		
(31) 優先権主張番号	0305448.3	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成15年3月10日 (2003.3.10)	(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(33) 優先権主張国	英國 (GB)	(72) 発明者	グレーンジャー テイビッド ジョン イギリス国 ケンブリッジ デュックスフ ォード セント ジョンズ ストリート 9 ティーシーピー イノベーションズ リミテッド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】イムノアッセイ

(57) 【要約】

本発明は、試験試料中のタンパク質または抗体のレベルをアッセイする方法に関する。特に、本発明は、参照試料と比較した、試験試料中の複数のタンパク質の相対量を決定する方法に関する。本方法は、(a)複数の標識タンパク質を含む参照試料を提供する段階; (b)参照試料の成分に結合することができる複数のタグ化抗体を、(i)標識参照試料と試験試料の混合物および(ii)参照試料のみと共に、抗体とその標的の結合に適した条件下でインキュベーションする段階; (c)試験試料の存在下で個々の抗体タグに結合した標識タンパク質の量と、試験試料の非存在下で個々の抗体タグに結合した標識タンパク質の量を比較する段階を含む。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

参照試料と比較して、試験試料中の複数のタンパク質の相対量を決定する方法であり、以下の段階を含む方法：

(a)複数の標識タンパク質を含む参照試料を提供する段階；

(b)参照試料の成分に結合することができる複数のタグ化抗体を、(i)標識参照試料と試験試料の混合物および(ii)参照試料のみと共に、該抗体とその標的の結合に適した条件下でインキュベーションする段階；

(c)試験試料の存在下で個々の抗体タグに結合した標識タンパク質の量と、試験試料の非存在下で個々の抗体タグに結合した標識タンパク質の量を比較する段階。

10

【請求項 2】

試験試料および参照試料が同体積で混合される、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

抗体がアルミニウムバーコードまたは色素含浸ビーズでタグ化されている、請求項1または2記載の方法。

【請求項 4】

それぞれのタグが1種類の抗体種に取り付けられる、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

それぞれのタグが2種類以上の抗体種に取り付けられる、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 6】

1種類のタグに取り付けられたそれぞれの抗体種が同じタンパク質に結合する、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

複数の種類のそれぞれのタグ化抗体が異なるタンパク質に結合する、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

$10^{11} \sim 10^{15}$ 個のそれぞれの抗体分子がタグに結合している、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 9】

参照試料が試験試料と同じ組織および/または生物から得られる、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

参照試料が複数の試験試料をプールすることによって形成される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

参照試料中のタンパク質が1種類またはそれ以上の蛍光色素で標識される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 12】

結合がフローサイトメトリーによって定量される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 13】

それぞれのペプチドが長さnのアミノ酸および以下の式：

$X_1 - X_2 - X_3 - \dots - X_n$

のペプチドである、ペプチド混合物であり、

式中、

-それぞれのXは、多数のアミノ酸群の1つより独立して選択されるアミノ酸であり、

-それぞれのアミノ酸群は20種類未満のアミノ酸からなり、

-nは、混合物中に存在する全てのペプチドについて同じであり、

50

-以下のアミノ酸:アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、システイン、セリン、スレオニン、トリプトファン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、アスパラギン、フェニルアラニン、チロシン、およびグルタミンの全てが少なくとも1つの群に存在し、

-混合物中のそれぞれのペプチドについて、同じ位置にあるアミノ酸が同じ群より選択される、ペプチド混合物。

【請求項 14】

アミノ酸が2つ以上のアミノ酸群に存在せず、および/またはそれぞれのアミノ酸群が同数の異なるアミノ酸を含む、請求項13記載のペプチド混合物。

【請求項 15】

それぞれのXが、5種類のアミノ酸からなる4つの群、または10種類からなるアミノ酸の2つの群より独立して選択されるアミノ酸であり、アミノ酸が2つ以上の群に存在しない、請求項14記載のペプチド混合物。

【請求項 16】

それぞれのXは、以下のように定義される2つの群:

- (i)アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、システイン、セリン、スレオニン、トリプトファン;
- (ii)グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、アスパラギン、フェニルアラニン、チロシン、グルタミンのうちの1つより独立して選択されるアミノ酸である、請求項13～15のいずれか一項記載のペプチド混合物。

【請求項 17】

nが8である、請求項13～16のいずれか一項記載のペプチド混合物。

【請求項 18】

混合物がそれぞれnについて同じ値を有し、同じアミノ酸群がライプラリの全ての混合物に適用され、(a)ペプチドが2つ以上の該混合物に存在せず、および/または(b)混合物は、ペプチドを得るために選択される群の組み合わせが混合物間で異なることによって異なる、請求項13～17のいずれか一項記載の複数の混合物を含むライプラリであり、任意に、群の可能性のある全ての組み合わせである混合物を含む、ライプラリ。

【請求項 19】

それぞれの混合物が異なるタグを含む、請求項18記載のライプラリ。

【請求項 20】

長さnの可能性のある全てのペプチドを含む、請求項18または19記載のライプラリ。

【請求項 21】

アミノ酸群が、以下:

- (i)アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、システイン、セリン、スレオニン、トリプトファン;
- (ii)グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、アスパラギン、フェニルアラニン、チロシン、グルタミンのように定義される、請求項18～20のいずれか一項記載のライプラリ。

【請求項 22】

試験試料中の複数の免疫グロブリンを検出する方法であり、以下の段階を含む方法:

(a)複数のタグ化抗原を提供する段階;

(b)(a)の該タグ化抗原と該試験試料を、該試験試料に存在する全ての免疫グロブリンとその標的の結合に適した条件下でインキュベーションする段階;

(c)(b)の混合物と、免疫グロブリンに特異的に結合することができる1種類またはそれ以上の標識抗体をインキュベーションする段階;

(d)それぞれのタグ化抗原に結合した標識抗体の量を測定する段階。

【請求項 23】

複数の抗原がオリゴペプチドおよび/またはオリゴ糖を含む、請求項22記載の方法。

【請求項 24】

10

20

30

40

50

それぞれの抗原が異なるタグを含む、請求項22または23記載の方法。

【請求項25】

抗原が混合物に細分され、それぞれの混合物が異なるタグを含む、請求項22～24のいずれか一項記載の方法。

【請求項26】

抗原が、そのアミノ酸配列に基づいて混合物に分けられたペプチドである、請求項25記載の方法。

【請求項27】

混合物が、請求項13～17のいずれか一項記載の混合物である、請求項26記載の方法。

【請求項28】

複数の抗原が、請求項18～26のいずれか一項記載のライブラリである、請求項26記載の方法。

【請求項29】

標識抗体が、2つ以上の免疫グロブリンサブクラスに特異的な抗体を含む、請求項22～28のいずれか一項記載の方法。

【請求項30】

それぞれの免疫グロブリンサブクラスに特異的な抗体が異なる標識を含む、請求項29記載の方法。

【請求項31】

免疫グロブリンサブクラスがIgG1、IgG2、IgG3、IgA、IgD、IgE、およびIgMより選択される、請求項29または30記載の方法。

【請求項32】

それぞれのタグ化抗原またはタグ化抗原混合物に結合する、それぞれの免疫グロブリンサブクラスの量を定量する段階をさらに含む、請求項22～31のいずれか一項記載の方法。

【請求項33】

それぞれのタグ化抗原またはタグ化抗原混合物に結合した標識抗体の量がフローサイトメトリーによって測定される、請求項22～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項34】

疾患もしくは他の医学的状態の存在、または疾患もしくは他の医学的状態に対する感受性を検出する方法であり、以下の段階を含む方法：

(v)個体から得られた試験試料中の複数の免疫グロブリンを検出する段階；および

(vi)該個体からの試料中に検出された免疫グロブリンと、疾患の存在または非存在に関連した既知の免疫グロブリンパターンを比較する段階、従って、該個体が該疾患を有するか、または該疾患に対して感受性があるかどうかを確かめる段階。

【請求項35】

疾患に関連した免疫グロブリンパターンが、以下：

(i)疾患状態が既知である個体から得られた試験試料中の複数の免疫グロブリンを検出する段階；

(ii)疾患有する個体で検出された免疫グロブリンと、疾患有さない個体で検出された免疫グロブリンを比較し、疾患の存在または非存在に関連した任意のパターンを特定する段階を含む方法によって確かめられる、請求項34記載の方法。

【請求項36】

疾患もしくは他の医学的状態の存在、または疾患もしくは他の医学的状態に対する感受性を検出する方法であり、以下の段階を含む方法：

(i)疾患状態が既知である個体から得られた試験試料中の複数の免疫グロブリンを検出する段階；

(ii)疾患有する個体で検出された免疫グロブリンと、疾患有さない個体で検出された免疫グロブリンを比較し、疾患の存在または非存在に関連した任意のパターンを特定する段階；

(vii)パート(i)で用いられた同じ方法によって、個体から得られた試験試料中の複数の

10

20

30

40

50

免疫グロブリンを検出する段階；および

(viii)該個体からの試料中に検出された免疫グロブリンと、段階(ii)で特定されたパターンを比較する段階、従って、該個体が該疾患を有するか、または該疾患に対して感受性があるかどうかを確かめる段階。

【請求項 37】

検出が、請求項22～33のいずれか一項記載の方法によって実施される、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項 38】

比較が、主成分分析(PCA)、部分的最小二乗判別分析(PLS-DA)、ジェネティックコンピューティング、サポートベクトルマシン、線形判別分析、変数選択アルゴリズム、およびウェーブレット分解より選択されるパターン認識法を用いて行われる、請求項34～37のいずれか一項記載の方法。

【請求項 39】

個体における疾患の診断、将来の疾患の予測、疾患の重篤度の評価、疾患の進行もしくは後退のモニタリング、または疾患の治療のモニタリングの助けとなる、請求項34～38のいずれか一項記載の方法。

【請求項 40】

疾患が冠状動脈性心疾患である、請求項34～39のいずれか一項記載の方法。

【請求項 41】

(iii)それぞれの抗原または抗原混合物がタグを含む、複数の抗原または抗原混合物；および

(iv)免疫グロブリンに特異的に結合することができる1種類またはそれ以上の標識抗体を含む、請求項22または40のいずれか一項記載の方法において使用するのに適したキット。

【請求項 42】

抗原が、請求項23または28のいずれか一項記載の抗原である、請求項40記載のキット。

【請求項 43】

標識抗体が、請求項29または31のいずれか一項記載の標識抗体である、請求項41または42記載のキット。

【請求項 44】

(i)それぞれの抗原群がアルミニウムバーコードでタグ化されている、請求項21記載のペプチドライプラリ；および

(ii)ヒトIgGを特異的に検出することができる標識抗体を含む、請求項41記載のキット。

【請求項 45】

抗体発現ファージライプラリの重複性および偏りを減らす方法であり、以下の段階を含む方法：

(a)抗原試料が結合した2種類の表面を提供する段階であり、該抗原は第1の表面より第2の表面に高密度で結合される段階；

(b)抗体結合に適した条件下でファージディスプレイライプラリを(a)の第1の表面に曝露し、該表面に結合したファージを選択する段階；

(c)抗体結合に適した条件下で(b)の選択されたファージを(a)の第2の表面に曝露し、該表面に結合しなかったファージを選択する段階；

(d)任意に、(c)のファージを段階(b)および(c)に従って1回またはそれ以上さらに選択し、それによって、最初のライプラリと比較して重複性および/または偏りの特性が低下した抗体発現ファージのライプラリを得る段階。

【請求項 46】

複数の抗体が、請求項45記載の方法に従って作成された抗体発現ライプラリである、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】**【0001】**

本発明は、試験試料中のタンパク質または抗体のレベルをアッセイする方法に関する。より詳細には、一対の試料における多くのタンパク質の相対濃度を迅速に確かめることができる方法が提供される。さらに、試験試料に存在する抗体アレイのプロファイルを作成する方法が提供される。

【背景技術】**【0002】****発明の背景**

科学の進歩および技術の応用は、生細胞などの複雑系の多種類のパラメータを同時に測定する能力にますます依存してきている。このような「全体論的(holistic)」分析の生物学において広く利用できるようになった最初の例は、数百個または数千個の遺伝子の遺伝子発現レベルを同時に分析することができる「遺伝子チップ」の導入から始まった。ゲノミクス分野(生物における全ての遺伝子の協調的な調節の研究)を支えるこの技術は今では広く普及し、科学技術に対して多くの恩恵をもたらした。

【0003】

しかしながら、ゲノミクスは唯一の「オミクス」ではない。この用語「オミクス」は、複雑系内での複数のパラメータの同時調節の研究に向けられた科学分野を示す。プロテオミクスは、細胞、組織、または生物学的試料に存在する全てのタンパク質の調節の研究を示す用語である。メタボノミクスは、細胞、組織、または生物学的試料における全ての非タンパク質(通常、低分子量)代謝産物(例えば、糖および脂肪)の類似研究である。プロテオミクスおよびメタボノミクスは両方とも、たった数個の候補疾患マーカーを測定する(例えば、心疾患の存在を診断するためにコレステロール濃度を測定する)従来のアプローチよりかなり強力にヒトの疾患を診断するのに有用であることが分かっている。

【0004】

複雑系(例えば、ヒト)を理解する「オミクス」法の有用性は、基礎となる技術の容易さおよび堅牢性によって制限される。例えば、ゲノミクスの研究および技術の現在の急増を招いたのは市販の遺伝子チップの導入であった。

【0005】

ゲノミクスでは、現在利用可能な遺伝子アレイツールは比較的使いやすいが、設置および整備が必要な装置の特定の小さく比較的安価な専門部品を必要とする。残念なことに、得られた結果は特に堅牢であるというだけでなく、反復測定の変動係数は25%を超えることが多い。このような不正確は、全てではないが多くの応用分野における遺伝子アレイ技術の使用をひどく妨げている。

【0006】

逆に、メタボノミクスでは、現在利用可能なツール(例えば、NMRおよび赤外分光法または質量分析)は本質的に堅牢であり、多くの場合、2%未満の反復測定変動係数が得られる。しかしながら、これらは、かなりの資本投資を必要とするだけでなく(例えば、NMR機械の値段は50万ポンドを超えることがある)、有效地に操作するために広範囲の専門知識も必要とする本質的に複雑な技術である。

【0007】

プロテオミクスは、現在、これらの2つの両極端の間にある。すなわち、この技術はいくらか分かりやすく、いくらか堅牢である。現在、プロテオミクス法は2つの広い群:分離法(separation based technique)および全試料法(whole sample technique)に分類される。

【0008】

まず分離法を考えると、最も一般的に用いられる2つの分離法はゲル電気泳動およびタンデム液体クロマトグラフィーである。2つの場合とも、タンパク質混合物は成分に分離され、次いで、成分を同定するために、成分は電気スプレータンデム質量分析によって分析される。これらの技法は比較的専門的で資本集約型の設備を必要とし、反復測定変動係

10

20

30

40

50

数が10%までのデータを生じる。しかしながら、どちらの技法もハイスループット用途には適しておらず、多くの場合、1つの試料に必要とされるデータ処理量はかなり多い。

【0009】

全試料法は、臨床診断などのハイスループット用途に本質的に適しているという利点を有する。残念なことに、現在の方法(このうち最も確立しているものは、試料全体を断片化し、次いで、各断片の配列を決定するショットガンタンデム質量分析法である)は、試料混合物中の最も豊富なタンパク質以外のものを検出および定量できないという欠点を有する。関心対象の分析物の濃度が6桁以上異なることがある多くの生物学的標本について、現在のアプローチは本質的に役に立たない。構成プロテオームの1%以上をサンプリングするためにヒト血清標本から分析しなければならないタンパク質断片の数は、実現不可能なくらいに大きい。全てのタンパク質の中で最も豊富なタンパク質(例えば、血清アルブミン)が分析前に選択的に除去される前調製段階を導入しても、性能はわずかに改善するだけである。原則的に、このようなアプローチは、プロテオームの少量成分および中量成分のリッチサンプリング(rich sampling)をもたらす可能性は非常に低い。

10

【0010】

別の全試料法は、プロテインチップ(マイクロアレイ)法の使用である。この原理は、(試験試料中のDNAまたはRNAとチップ表面上のDNAプローブとの相互作用を検出する)遺伝子チップゲノミクスと同じである。DNAプローブの代わりに、抗体分子がマイクロアレイ上にコーティングされ、抗原と抗体の結合を定量することができる。このようなアプローチを使用すると他の全試料法の制限が避けられる。すなわち、DMIのように、原則的に、試験試料中の相対量に関係なくタンパク質を定量することができる。残念なことに、このアプローチには多くの制限があり、最も重大なものは、マイクロアレイ検出法における量的堅牢性が本質的に欠如していることである。マイクロアレイに基づくゲノミクスにおいて繰り返し精度を減らす同じ制限もまた、マイクロアレイに基づくプロテオミクスの幅広い普及を妨げている。

20

【0011】

結果として、このような技術の望ましい特徴を全て組み合わせた新たなプロテオミクス技術が必要とされている。すなわち、このような技術は、技術的に特殊な手順も資本集約型設備も必要とせず、存在する成分の絶対量に関係なくプロテオームの偏りのないサンプリングを提供し、かつ日常的な実験条件下で量的に堅牢な、迅速ハイスループット法であるべきである。

30

【発明の開示】

【0012】

発明の概要

本発明は、一対の試料において多くのタンパク質の相対濃度を迅速に確かめることができる方法を提供する。試験試料および参照試料の混合物にタグ化抗体ライブラリが曝露される。この場合、参照試料は何らかの方法で標識されている。ある特定の抗体について、結合した標識の量は、試験試料に存在するコグネイト抗原の量と反比例する。それぞれのタグ化抗体に結合した標識の量が読み取られ、その結果として、2つの試料における相対タンパク質濃度パターンを示すベクトルが得られる。

40

【0013】

従って、本発明は、参照試料と比較して、試験試料中の複数のタンパク質の相対量を決定する方法を提供する。この方法は、(a)複数の標識タンパク質を含む参照試料を提供する段階、(b)参照試料の成分に結合することができる複数のタグ化抗体を、(i)標識参照試料と試験試料の混合物および(ii)参照試料のみと共に、抗体とその標的の結合に適した条件下でインキュベーションする段階、(c)試験試料の存在下で個々の抗体タグに結合した標識タンパク質の量と、試験試料の非存在下で個々の抗体タグに結合した標識タンパク質の量を比較する段階を含む。

【0014】

この態様に当てはまる方法は、プロテオミクス(大きなタンパク質集団を同時に研究す

50

る科学)に有用であり得る。このようなプロテオミクス用途の一例は臨床診断であり、これによって、生物学的標本中の多くのタンパク質の濃度の同時測定を用いて、疾患または状態を診断することができる。

【0015】

同じ原理が、試料に存在する抗体アレイ(例えば、異なる個体によって産生された抗体アレイ)のプロファイリングにも適用することができる。このようなプロファイルは、試料が得られた個体の免疫状態の指標となる可能性がある。

【0016】

本発明はまた試験試料中の複数の免疫グロブリンを検出する方法を提供する。この方法は、(a)複数のタグ化抗原を提供する段階、(b)(a)のタグ化抗原と試験試料を、試験試料に存在する全ての免疫グロブリンとその標的の結合に適した条件下でインキュベーションする段階、(c)(b)の混合物と、免疫グロブリンに特異的に結合することができる1種類またはそれ以上の標識抗体をインキュベーションする段階、(d)それぞれのタグ化抗原に結合した標識抗体の量を測定する段階を含む。

【0017】

本発明はまた、このような方法に用いられる抗原(特に、ペプチド)の群およびライプラリに関する。特に、本発明は、それぞれのペプチドが長さnのアミノ酸および以下の式:

$X_1 - X_2 - X_3 - \dots - X_n$

のペプチドである、ペプチド混合物を提供する。

式中、

- それぞれのXは、多数のアミノ酸群の1つより独立して選択されるアミノ酸であり、
- それぞれのアミノ酸群は20種類未満のアミノ酸からなり、
- nは、混合物中に存在する全てのペプチドについて同じであり、
- 以下のアミノ酸:アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、システイン、セリン、スレオニン、トリプトファン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、アスパラギン、フェニルアラニン、チロシン、およびグルタミンの全てが少なくとも1つの群に存在し、
- 混合物中のそれぞれのペプチドについて、同じ位置にあるアミノ酸は同じ群より選択される。

【0018】

複数のこのような混合物を含むライプラリも提供される。ここで、混合物はそれぞれnについて同じ値を有し、同じアミノ酸群がライプラリの全ての混合物に適用され、(a)2つ以上の混合物にペプチドは存在せず、および/または(b)混合物は、ペプチドを得るために選択される群の組み合わせが混合物間で異なることによって異なり、任意に、ライプラリは群の可能性のある全ての組み合わせである混合物を含む。

【0019】

本発明はまた、疾患および他の医学的状態を診断する方法を提供する。特に、疾患もしくは他の医学的状態の存在、または疾患もしくは他の医学的状態に対する感受性を検出する方法を提供する。この方法は、

- (i)個体から得られた試験試料中の複数の免疫グロブリンを検出する段階;および
- (ii)個体からの試料中に検出された免疫グロブリンと、疾患の存在または非存在に関する既知の免疫グロブリンパターンを比較する段階、従って、個体が疾患を有するか、または疾患に対して感受性があるかどうかを確かめる段階を含む。

【0020】

疾患もしくは他の医学的状態の存在、または疾患もしくは他の医学的状態に対する感受性を検出する方法も提供される。この方法は、

- (i)疾患状態が既知である個体から得られた試験試料中の複数の免疫グロブリンを検出する段階;
- (ii)疾患を有する個体で検出された免疫グロブリンと、疾患を有さない個体で検出された免疫グロブリンを比較し、疾患の存在または非存在に関する任意のパターンを特定する

10

20

30

40

50

段階；

(iii)パート(i)で用いられた同じ方法によって、個体から得られた試験試料中の複数の免疫グロブリンを検出する段階、および

(vi)個体からの試料中に検出された免疫グロブリンと、段階(ii)で特定されたパターンを比較する段階、従って、個体が疾患を有するか、または疾患に対して感受性があるかどうかを確かめる段階を含む。

【0021】

本発明は、本発明のイムノアッセイ法における使用に適したキットをさらに提供する。特に、

(i)それぞれの抗原または抗原混合物がタグを含む、複数の抗原または抗原混合物；および
(ii)免疫グロブリンに特異的に結合することができる1種類またはそれ以上の標識抗体を含む、キットが提供される。

【0022】

さらなる局面において、本発明は、抗体発現ファージライプラリの重複性および偏りを減らす方法を提供する。この方法は、

(a)抗原試料が結合した2種類の表面を提供する段階であり、抗原は第1の表面より第2の表面に高密度で結合される段階；

(b)抗体結合に適した条件下でファージディスプレイライプラリを(a)の第1の表面に曝露し、表面に結合したファージを選択する段階；

(c)抗体結合に適した条件下で(b)の選択されたファージを(a)の第2の表面に曝露し、表面に結合しなかったファージを選択する段階；

(d)任意に、(c)のファージを段階(b)および(c)に従って1回またはそれ以上さらに選択し、それによって、最初のライプラリと比較して重複性および/または偏りの特性が低下した抗体発現ファージのライプラリを得る段階を含む。このような方法によって得られた抗体ライプラリはタグ化され、本発明のスクリーニング方法において使用することができる。

【0023】

定義

「(ライプラリ)成分」：固有のコードを有するタグプールに取り付けられた、1種類の抗体、タンパク質、もしくは他の抗原、または抗体、タンパク質、もしくは抗原の混合物。このような成分を構成する多くの個々のタグがあってもよいが、これらは全て同じコードを有する。同様に、抗体、タンパク質、または抗原の多くの分子があってもよいが、これらは同一であるか、または全てが同じ混合物に由来する。

【0024】

「ライプラリ」：前記の複数の個々の成分。ライプラリ内のそれぞれの成分は異なるタグを含んでもよく、従って、ライプラリ内の成分は識別することができる。

【0025】

「マスターライプラリ」：DMIライプラリより非常に大きく複雑な成分ライプラリ。DMIライプラリは、マスターライプラリに由来する成分のごく一部をサブセレクトすることによって作成することができる。一般的に、このようなマスターライプラリは1000万個を超える成分からなる。

【0026】

「DMIライプラリ」：DMIに適した成分からなるライプラリ。一般的に、このようなライプラリは10～100万個の成分からなり、より一般的には100～10,000個の成分からなる。

【0027】

「タグ」：タグを有する抗体、タンパク質、または他の抗原の正体を迅速かつ容易に確かめる任意の方法。タグは、その分類特性によって「標識」(以下を参照のこと)とは区別される。すなわち、タグは、呼称情報(タグ1、タグ2、タグ3など)を含むことだけ必要とし、連続した情報(0～無限大の変数)を含むことを必ずしも必要としない。

【0028】

10

20

30

40

50

「標識」:標識を有する抗体、タンパク質、または他の抗原の量を迅速かつ容易に確かめる任意の方法。標識は、その量的特性によって「タグ」(前記を参照のこと)とは区別される。すなわち、標識は、連続した情報(0~無限大の変数)を含むことだけ必要とし、呼称情報(標識1、標識2、標識3など)を含むことを必ずしも必要としない。

【0029】

「特異的結合」:抗体は、特異的なタンパク質または抗原に対して高い親和性で結合する時、タンパク質または抗原に特異的に結合するが、他のタンパク質には結合しないか、または低い親和性でしか結合しない。例えば、抗体は、ランダムに作成されたポリペプチドまたは他の分子より5倍、10倍、20倍、それ以上の親和性で、特異的なタンパク質または抗原に結合することがある。

10

【0030】

発明の詳細な説明

本発明の方法は、本明細書において一般的に「ディファレンシャルメガプレックスイムノアッセイ(Differential Megaplex Immunoassay)」法(DMI)と呼ばれる。このストラテジーを用いると、参照試料と比較したプロテオーム内のそれぞれのタンパク質成分の相対量が得られる(以下、用語「ディファレンシャル」)。本発明の方法によって、何千個のタンパク質または何百万個のタンパク質でさえ同時に分析することができる(以下、用語「メガプレックス」、これは従来の用語マルチプレックスを高度に発展させたものである)。使用される重要な分析法は競合イムノアッセイ(以下、用語「イムノアッセイ」)である。

【0031】

20

1. プロテオームプロファイリング用のDMI

一般的に、プロテオームプロファイリングのためのDMI実験を行うためには、抗体ライブラリ、抗体を固有に特定できるように抗体をタグ化する方法、参照試料、参照試料を標識する方法、およびそれぞれのタグ化抗体に結合した標識の量を読み取るストラテジーが必要である。DMI実験のいずれかの成分または全ての成分がパブリックドメインにおいて既に知られている可能性があるが、プロテオーム分析を実施するために、これらの技法を組み合わせる原理は新規であり、本明細書に記載の発明に相当する。

【0032】

DMI実験の一般原理は以下の通りである(図1Aを参照のこと)。

1. 標識DMI参照試料と試験試料を、好ましくは等量で混合する。

30

2. タグ化抗体ライブラリを添加し、一緒にインキュベーションする。

3. それぞれのタグ化抗体に結合した標識の量を読み取る。

【0033】

まず最初に、実験の重要な各構成要素の必要条件が述べられ、その後に、前記で説明された一般的なDMI実験が例示される。

【0034】

A:抗体ライブラリ

DMIに役立つように、使用しようとする抗体ライブラリは、分析しようとする試料に存在するエピトープタンパク質をコグネイトとして有する、かなりの数の抗体を含まなければならない。例えば、DMIを用いてヒト血清試料に対してプロテオームスクリーニングを行うには、抗体ライブラリのかなりの割合がヒト血清試料に存在するタンパク質を認識する抗体ライブラリが必要であろう。

40

【0035】

理想的には、このようなライブラリは高度の複雑さも有する。すなわち、ライブラリを構成する個々の抗体種の全てではないにしても大部分が、異なるタンパク質を認識しなければならない。従って、1つの態様において、本発明の方法に用いられる複数の抗体はそれぞれ異なるタンパク質を認識し、異なるタンパク質に結合する。それぞれの抗体は異なるタンパク質を認識し、異なるタンパク質に特異的に結合してもよい。対照的に、高度の重複性を有するライブラリ(抗体成分の多くが同じタンパク質を認識するライブラリ)はDMI法の能力を低下させるだろう。

50

【0036】

理想的には、ライプラリは多数の抗体を含まなければならない。DMIに有用な抗体ライプラリは10~1億個の抗体、より一般的には100~100万個の抗体を含んでもよい。

【0037】

ライプラリは、異なるタンパク質に対する抗体が物理的に分離された形式で、または物理的に分離できる形式で存在しなければならない。これによって確実に、ライプラリのそれぞれの個々の抗体成分を固有に特定することができる。

【0038】

これらの特性を有する抗体ライプラリは多くのやり方で構築することができる。例えば、調べようとする試料のプロテオームの成分を認識することが分かっている抗体を、商業的な抗体販売業者から個々に購入するか、または当技術分野において周知の標準法によって個々に製造することができる。このようなやり方でまとめられたライプラリは、DMIに有用なサイズの下限である可能性が高い(一般的に、100個以下の抗体)。

【0039】

または、ライプラリはファージディスプレイ技術によって作成することができる。DMIによって後で分析しようとする試料を代表する試料が表面にコーティングされ、非常に広く一般的な用途のライプラリ(例えば、ケンブリッジアンチボディテクノロジー(Cambridge Antibody Technology Limited)および類似会社が所有および製造するライプラリ)から抗体を正の選択にかけるのに用いられてもよい。しかしながら、このように作成された抗体ライプラリは、いくつかの点でDMI抗体ライプラリの理想的な特徴に従わないことがある。すなわち、重複性が比較的高いことがあり、集団は、正の選択混合物に存在するそれぞれのタンパク質の量に偏りがあることがある。

【0040】

従って、本発明は、存在する抗原の量の偏りが比較的少ない低重複性ライプラリを開発することが可能なファージディスプレイライプラリから選択を行うための当技術分野において周知の手順に対する改善をもたらす。

【0041】

選択混合物中の豊富な種にライプラリが偏らないために、選択表面に適用される総タンパク質濃度を調節して、正の選択および負の選択の回が繰り返される。第1回の正の選択では、選択混合物は、非常に低い総タンパク質濃度(例えば、 $0.1\text{ }\mu\text{g} \sim 100\text{ }\mu\text{g/cm}^2$)で非常に大きな表面積に適用される。これによって確実に、試料中の全タンパク質が表面に効率的に曝される。ファージは正の選択にかけられ、放出され、元の数まで増殖される。次いで、この選択された集団は負の選択の回にかけられる。負の選択では、第1回に用いられたのと同じ選択混合物が、非常に小さな表面積の上に、非常に高い総タンパク質濃度(例えば、 1mg/cm^2 以上)で表面に適用される。結果として、豊富な抗原に対するファージの多くは表面に結合し、集団から除かれるが、確率論的に、極めて少ないタンパク質は、タンパク質が結合するための表面積に制限がある負の選択表面に曝されることはほとんどない。負の選択後の上清中のファージ集団は再度増殖され、正の選択および負の選択の回を交互に行うことでのこのプロセスを繰り返すことができる。

【0042】

好ましくは、高タンパク質密度選択は、低タンパク質密度選択より10~10,000倍高いタンパク質密度で行われ、より好ましくは、100~1,000倍高い密度で行われる。これらの範囲は、市販の高タンパク質容量プラスチック表面(例えば、ELISAプレートウェルを作成するのに用いられるヌンクロン(Nunclon)プラスチック)の使用をベースとしているが、総タンパク質結合能力が異なる他の支持体の場合、それに応じて調節される必要があるかもしれない。一般的に、低タンパク質密度選択は、支持体の公称タンパク質結合能力の1~1/100の密度で、好ましくは約1/10の密度で行われなければならない。高タンパク質密度選択は、支持体の公称タンパク質結合能力の1~100倍の密度で、好ましくは約10倍の密度で行われなければならない。支持体の公称タンパク質結合能力に対して高タンパク質密度コーティング濃度が高いほど、ライプラリの偏りの変化は極端なものになるだろう。

10

20

30

40

50

【0043】

ライプラリの偏りは以下のように評価することができる。関心対象の試料において非常に豊富であることが知られている2種類のプロテオーム成分(血清の場合、例えば、アルブミンおよびフィブリノゲンでもよい)に結合する個々のライプラリ成分の数が求められる。同様に、極めて少ない2種類のプロテオーム成分に結合するライプラリ成分の数も求められる(TGF およびMCP-1などのサイトカインがヒト血清に適したマーカーである)。これらの4種類のマーカータンパク質のそれぞれに結合する総ライプラリ要素の割合を定量するために、直接ELISAを使用することができる。ライプラリの偏りは(A+B)/(C+D)として計算される。式中、AおよびBは、豊富なタンパク質マーカーに結合するライプラリ要素の数であり、CおよびDは、極めて少ないタンパク質マーカーに結合するライプラリ要素の数である。最初、第1回の正の選択の後、このバイアス因子(Bias Factor)は1,000以上であることがある。数回繰り返した後のバイアス因子は1に近いだろう。

10

【0044】

選択回の数が繰り返されるにつれて、正の選択間の選択表面上のタンパク質密度と負の選択間の選択表面上のタンパク質密度の比が段階的に小さくなれば、結果として得られるライプラリのバイアス因子は急速に小さくなることがある。このような選択プロトコールの一例を図4に示す。

【0045】

ファージディスプレイ法によって作成されたDMI抗体ライプラリは10,000~1000万個の異なる抗体成分を含んでいる可能性が高く、従って、DMIに有用なライプラリサイズの上限にある可能性が高い。

20

【0046】

それぞれの抗体成分を固有にタグ化するために、DMT抗体ライプラリは、ライプラリ成分を物理的に分離するようにフォーマットされる必要があるかもしれない。それぞれの成分が個々に作成されたライプラリの場合、成分は、例えば、既知の抗体濃度で、1個ずつマルチウェルプレートに分配することができる。ファージディスプレイ法によって作成されたライプラリの場合、複数の個々のファージクローニングを、例えば、マルチウェルプレートにおいて増殖させ、各ウェルの抗体濃度を標準化することができる。

【0047】

B:抗体ライプラリをタグ化する方法

30

DMIでは、ライプラリのそれぞれの抗体成分が混合物中にある時に特定できるように固有にタグ化されることが必要である。抗原に特異的に結合する能力を保持しながら抗体を特定することができる任意のタグ化方法がDMIでの使用に適している。

【0048】

適切なタグ化方法の例として以下が挙げられる。

【0049】

アルミニウムバーコード(例えば、センテック(Sentec Ltd)によって開発されたアルミニウムバーコード)

これらのバーコードは、穴が開けられた $100\mu\text{m} \times 10\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ のアルミニウム細片である。この穴によって、数百万個の固有のコードをアルミニウム細片に刻印することができる。これらのバーコードは半導体チップ製造技術を用いて設計書どおりに製造される。それぞれのタグコードは、例えば、マルチウェルプレートの異なるウェルの中で別々に扱われる。タグおよび抗体は、ヘテロ二官能性架橋を含む当業者に自明の任意の方法によって、またはタグに適用される電荷コーティング(charge coating)によって結合することができる。抗体を変性させることなく、タグを抗体に不可逆的に結合するどんな方法でも十分である。

40

【0050】

色素含浸ビーズ(例えば、ルミネックス(Luminex)によって開発された色素含浸ビーズ)

ビーズには、ビーズを明確に特定するのに使用することができる固有のスペクトル特性を有する色素が含浸されている。色素-ビーズ技術は、十分に異なる適切な色素の入手が

50

限られているために、小さなDMI抗体ライブラリ(約100個未満の抗体成分)にのみ有用である可能性が高い。ビーズおよび抗体は、ヘテロ二官能性架橋を含む当業者に自明な任意の方法によって、またはビーズに適用される電荷コーティングによって結合することができる。

【0051】

それぞれのタグは1つまたはそれ以上の抗体種に連結することができる。1つの態様において、ライブラリ内のそれぞれの抗体種は、それぞれの抗体の結合が別々に評価できるよう異なるタグに連結される。または、2種類以上の抗体種を1種類のタグに連結することができる。例えば、標的タンパク質の同じエピトープまたは異なるエピトープに結合する異なる抗体種をプールし、1種類のタグに連結することができる。このように、タグに結合した標識を評価することによって、標的タンパク質に結合している全ての抗体を確かめることができる。

【0052】

使用されるタグ化技術に関係なく、抗体とタグの比は、選択された結合化学に応じて制御することができる。DMI用途の場合、タグ上の抗体密度が増加するにつれて、結合標識を読み取るためのシグナル対ノイズ比が増加するので、1個のタグに多数の抗体分子(タグ1個あたり $10^{11} \sim 10^{15}$ 個以上の抗体分子)が取り付けられることが望ましい。

【0053】

C:参考試料

DMIはディファレンシャルなアッセイ法である。すなわち、試験試料中の分析物の絶対レベルを測定せず、試験試料中の分析物の量と参照との比を評価する。結果として、それぞれのDMI実験は参考試料を必要とする。参考試料は、結果として得られるタンパク質プロファイルデータが比較される全てのDMI実験について同じでなければならない。

【0054】

参考試料は、試験試料と組成全体が類似している試料でなければならない。すなわち、参考試料は、試験試料とほぼ同じ濃度の同じ分析物を含まなければならない。例えば、参考試料は試験試料と同じ組織から得られてもよい。参考試料は試験試料と同じ種から得られてもよい。好ましくは、参考試料は、試験試料と同じ種の同じ組織から得られる。DMIは、分析物の比が(およそ0.1~10の範囲で)1に近い優れた定量分解能(quantitative resolution)を示すが、これらの範囲外では、シグナル勾配は急激に低下する。結果として、結果として得られるタンパク質プロファイルにおいて最高のデータ密度を得るためにには、参考試料中のそれぞれの分析物の濃度は、理想的には、全ての試験試料の分析物濃度の平均に等しい。

【0055】

このような参考試料を作成する1つの方法は、試験しようとする全ての試料を少量採取し、それらをプールし、十分に混合することである。結果として得られたプールはDMIにとって理想的な参考試料特性を有する。

【0056】

参考試料を作成する別の方法は、試験試料と起源が類似しているが、試験試料を実際に含まない試料のプールを作成することである。プールされた参考試料を使用すると、(a)試験試料に存在する全ての分析物が参考試料で見られる可能性が高くなり、(b)参考試料中のそれぞれの分析物の濃度が全ての試験試料の平均値に近づく可能性が高くなる。

【0057】

一例として、ヒト血清試料を調べるDMI実験用の参考試料を作成するために、多くの異なるヒト被験者から血清のアリコートを採取し、プールすることができる。培養肝細胞を調べるDMI実験用の参考試料を作成するためには、多くの異なる肝細胞培養物からタンパク質抽出物が採取され、プールされる。ヒト血清試料を調べるDMI実験用の参考試料としてヒト肝細胞抽出物のプールを使用するのは適切でない。

【0058】

標識(以下を参照のこと)の後、参考試料は、試験試料の平均とほぼ同じ総タンパク質濃

度でなければならない。必要に応じて、DMI実験を始める前に、標識参照試料の総タンパク質濃度を調節しなければならない。

【0059】

D:参照試料を標識する方法

参照試料は、試料中の複数のタンパク質が標識を有するように標識される。好ましい様において、参照試料は、試料中の全てのタンパク質成分がある程度まで標識されるように標識される。それぞれの異なるタンパク質が他の全てのタンパク質と同じ程度まで標識されてもよく、標識されなくてもよい。

【0060】

タグ化抗体に結合したら、容易かつ迅速に読み取ることができる任意の標識を使用することができる。例えば、標識は、タグ化抗体をレーザーで質問し、光検出器で定量可能な蛍光を発生させることによって読み取ることができる蛍光色素でもよい。

【0061】

適切な蛍光色素として、フルオレセイン、オレゴングリーン、GFP、ローダミン、r-フイコエリトリン、Cy3、Cy5、クマリン、AMCA、テキサスレッド、アレキサフルオル(Alexa Fluor)色素シリーズ(350、430、488、532、546、555、568、594、および633)、ならびにボディピィ(BODIPY)シリーズ(493/503、FL、R6G、530/550、TMR、558/568、564/570、576/589、581/591、TR、630/650-X、および650-655-X)が挙げられる。(当技術分野において周知の)適切な処理後段階が用いられれば、ランタニドキレート(例えば、ユーロピウムキレート)を標識として使用することができる。ランタニドキレートは寿命が非常に長いレーザー発生蛍光を用いて読み取られ、これにより、シグナル対ノイズ比を改善する時間分解蛍光測定が可能である。または、非蛍光標識を使用することができる。適切な非蛍光標識として、放射性崩壊(例えば、トリチウム、ヨウ素-125、リン-32、硫黄-35標識;適切なシンチレーションカウンターを用いて読み取られる)、様々な大きさの金粒子(顕微鏡(好ましくは、粒子を特定および計数する自動画像分析ソフトウェアを備えた顕微鏡)を用いて読み取られる)、ならびに化学発光プローブ(例えば、ルシフェラーゼ標識、ルミノメーターにおいてルシフェラーゼ標識をルミノール含有緩衝液に曝露することによって読み取られる)が挙げられる。

【0062】

標識を参照試料のタンパク質成分に結合するのに用いられる化学反応は、以下の3つの基準を満たさなければならない:(a)標識をタンパク質に不可逆的に結合しなければならない、(b)このプロセスによってタンパク質が変性してはならない、および(c)結合反応後でもなお標識は検出できなければならない。これらの基準を満たした任意の化学反応を使用することができる。例えば、フルオレセインイソチオシアネートを参照試料のタンパク質画分と反応させることができる。結合しなかったフルオレセインを(例えば、カラムクロマトグラフィーによって)除去した後に、標識された試料を、試験試料の近似平均に等しい総タンパク質濃度に再構成することができる。

【0063】

標識比(タンパク質分子1個あたりの標識の数)はDMI参照試料の妥当な範囲内で異なってよい。標識比は、一般的にはタンパク質1個あたり0.1~50個の標識の範囲であり、より一般的には1~5の範囲である。小さな標識比は検出系の感度を低下させ、ノイズを増大させるのに対して、高い標識比は、標識タンパク質がタグ化抗体ライプラリのコグネイト抗体に結合する能力に影響を及ぼすことがある。

【0064】

E:それぞれのタグに結合した標識の量を読み取るストラテジー

それぞれのタグに結合した標識の量を読み取るストラテジーは、タグおよび標識の性質に左右される。データリッチなタンパク質プロファイルを作成するためには、読み取り方法は比較的高い処理能力がなければならない。しかしながら、小さなDMI抗体ライプラリ(例えば、数百個未満の抗体成分)の場合、標識は手作業で読み取ることができる。例えば、次に、顕微鏡を用いて、それぞれのタグ化抗体を特定し、タグを読み取り、次いで、標識

10

20

30

40

50

の量を決定することができる。タグの読み取りは、例えば、タグ化色素のスペクトルの測定、または透過照明の下でのアルミニウムバーコードの読み取りを含んでもよい。標識の読み取りは、例えば、結合した金粒子の計数または発生した蛍光の光電子倍増管による捕捉を含んでもよい。

【0065】

より大きなDMI抗体ライプラリ(数千個または数百万個の抗体成分を含む)の場合、それぞれのタグ化抗体成分を自動的に読み取るストラテジーが必要とされる。例えば、タグ化抗体成分を、標準的なフローサイトメーターに一度に通すことができる。タグがアルミニウムバーコードであり、標識が蛍光色素である例では、(適切なソフトウェアを備えた)フローサイトメーターがタグと結合標識の両方を読み取ることができる。

10

【0066】

DMIの成功には、タグおよび結合標識の読み取りが高い忠実度および再現性で行われることが必要である。例えば、バーコードタグ化抗体上の結合標識を確かめるために、標準的なフローサイトメーターはタグを正確に10,000個につき1個未満のエラー率で読み取ることができると同時に、結合蛍光標識は5%未満の反復測定変動係数で評価することができる。これらの特徴により、DMI法は、遺伝子アレイ技術の容易さ、速度およびコストの利益を保持しながらも、NMRに基づくメタボノミクスなどの方法の堅牢性に近づく。

【0067】

F:手順

次いで、試験試料の平均と同じ総タンパク質濃度に調節された標識参照試料は、チューブまたはマイクロタイタープレートウェルに適切な体積で分配される。一般的に、1μl～200μlの体積が用いられる。

20

【0068】

次に、それぞれの試験試料が1つのウェルに一度に添加される。試験試料の体積は、好みしくは、標識参照試料の体積に等しい。次いで、確実に試験試料および参照試料が均一に分布するように、プレートは十分に混合しなければならない。

【0069】

次いで、適切な体積の混合抗体ライプラリを添加しなければならない。一般的に、1μl～100μlのライプラリが添加される。添加される個々のタグの数は、ライプラリの複雑さ、ならびにその重複性およびバイアス因子に左右される。一般的に、ライプラリの非重複成分の10～20倍の個々のタグが添加される。ライプラリを添加した後、反応チューブまたはプレートを十分に混合し、抗体とその標的の結合に適した条件下で(例えば、試験試料および参照試料中の抗原がそのコグネイトタグ化抗体に結合する期間にわたって)インキュベーションしなければならない。一般的に、これは10～180分である。確実にタグが液体中でランダムに懸濁されたままになるように、一般的に、反応物はインキュベーションの間ずっと連続攪拌される。一般的に、インキュベーションは4～37で行われる。抗原に結合する抗体の特異性および選択性を改善するために、適宜、他の成分が反応物に添加されてもよい。一般的に、0%～1%体積/体積の濃度の非イオン性界面活性剤(例えば、0.1%v/vのトゥイーン(Tween)20)が添加される。同様に、塩濃度を変更することができる。一般的に、総塩濃度を0mM～250mM上げるために、塩化ナトリウム溶液が添加される。同様に、二価陽イオン濃度を変更することができる。一般的に、必要に応じてカルシウムイオンまたはマグネシウムイオンの濃度を0mM～10mM上げるために、塩化カルシウムまたは塩化マグネシウムが添加される。または、必要に応じてカルシウムおよびマグネシウムの濃度を下げるために、EGTAが添加される。同様に、反応物のpHを変更することができる。一般的に、反応物のpHを0～3単位下げるまたは上げるために、それぞれ、1M塩酸または1M水酸化ナトリウムが添加される。

30

【0070】

反応の終わりに、一般的に、抗原と抗体の相互作用が止められる。いくつかの方法を使用することができる。例えば、反応物をかなり(一般的に、緩衝食塩水で5～50倍に)希釈してもよい。または、反応物を(一般的に、4に)急速冷却してもよい。または、架橋剤

40

50

を添加してもよい(一般的に、ホルマリンが3%最終濃度まで添加される)。

【0071】

反応を止めた後に、タグ化抗体が直接読み取られてもよく、穏やかな限外濾過によって洗浄され、次いで、適切な濃度で再懸濁された後に、読み取りが行われてもよい。タグ化の前にタグ化抗体を洗浄する必要があるかどうかは、読み取り方法に左右される。一般的に、蛍光顕微鏡またはフローサイトメーターを使用する場合、洗浄段階は必要でない。

【0072】

次いで、それぞれのタグに結合した標識の量を求めなければならない。読み取らなければならぬタグの数は、ライプラリの複雑さ、ならびにその重複性および偏りに応じて異なる。一般的に、ライプラリのそれぞれの非重複成分について、2~200個のタグが読み取られる。ライプラリが小さいほど、読み取ることができる1成分あたりのタグの数が多くなる。非常に大きなライプラリの場合、読み取られる1成分あたりのタグの数が少なければ、最終ベクトルにおけるかなりの数の成分がデータ欠測値として記録しなければならないだろう。同じ成分を表す2つ以上のタグが読み取られた場合、一般的に、それぞれに結合した標識の量が平均された後に、最終ベクトルが報告される。

【0073】

次いで、結果として得られた出力ベクトルは多くのやり方で分析することができる。一般的に、PCA、PLS-DA、およびOSCを含む様々なメガ変量(megavariate)統計解析用のX行列を構築するために、異なる個体に由来する多数のベクトルが用いられる。このような方法を用いると、いくつかの既存の表現型(例えば、疾患状態)に従って個体を分類することができる。表現型状態が既知の個体を分類するモデルが構築されたら、そのモデルを用いて、状態が未知の個体の表現型を予測することができる。これは、DMIプロテオームプロファイリングを医療診断に適用する基礎である。

【0074】

DMI法には、現行のプロテオミクスプラットフォームを超える多くの利点がある。特に、既存の方法は感度が、混合物中の比較的豊富な成分に限定されることがある。例えば、血清に適用された場合、試料中の非常に高濃度のアルブミンが従来のアプローチを妨げることがある。しかしながら、アルブミンに対する抗体がタグ化DMIライプラリに一回しか存在しなければ、アルブミンは1つのデータポイントしかタンパク質プロファイルに付与しない。DMIはまた量的に堅牢であり、ほとんどの抗体について変動係数は5%未満であり、従って、マイクロアレイに基づくプロテオミクスプラットフォームより実質的に優れている。

【0075】

2. イムノミクス用DMI

少なくとも従来のプロテオミクス法が用いられた場合、ゲノム、プロテオーム、およびメタボノームプロファイルの「有効範囲(coverage)」における大きな溝の1つは哺乳動物免疫系の構築である。例えば、抗体(適応免疫系の重要なエフェクターアーム(effect arm)の1つ)は、従来のどのマルチオミクスプロファイルでも抗原特異性に基づいて効率的に分離されない。特定の重鎖クラスの抗体は全て、従来のプロテオームプロファイルでは1種類のタンパク質として重複しているように見られ、このために、異なる抗体クローン間の抗原特異性の非常に大きなバリエーションが隠されていた。

【0076】

イムノミクスは、プロテオミクスの極めて特殊な例の新造語であり、すなわち、ある特定の個体によってある特定の時期に產生された抗体分子の集団の分析である。この情報は、通常、(DMIによって作成されても古典的方法によって作成されても)プロテオームプロファイル内にコード化されない。ゲノム、トランスクリプトーム、またはメタボノームデータセットにも存在しない。結果として、イムノームレパートリーのハイスループット分析を行うためは、特殊な技法が必要とされる。今日まで、イムノミクスを行うための公的に開示された方法は無い。結果として、DMI原理のもう1つの重要な用途は、イムノームデータセットを得るためにハイスループットで、堅牢で、かつ再現可能な初めての方法とし

10

20

30

40

50

ての用途である。

【0077】

本発明は、血清などの生物学的標本における抗体ポートフォリオ全体のプロファイルを作成するストラテジーを設計および実行することによって、この問題に対処している。このプロファイルは、ある特定の個体における免疫系の現在の状態の全体像をつかめるようしてくれるので「イムノーム」プロファイルと呼ばれる。原則的に、免疫系の他の局面を調べるイムノミクスの実施も想定することができる。すなわち、抗原特異的T細胞クローニングを調べる既に確立された方法があるが、今まで、一個体のT細胞レパートリー全体のプロファイルを作成しようとする試みは発表されていない。このような免疫細胞プロファイルもまたイムノミクスの実施である。

10

【0078】

一般的に、イムノミクスのためにDMI実験を行うには、抗原ライプラリ、抗原を固有に特定することができるよう抗原をタグ化する方法、1種類またはそれ以上の標識抗免疫グロブリン抗体、およびそれぞれのタグ化抗体に結合した標識の量を読み取るストラテジーが必要とされる。DMI実験のいずれかの成分または全ての成分がパブリックドメインにおいて既に知られている可能性があるが、イムノーム分析を行うために、これらの技法を組み合わせる原理は新規であり、本明細書に記載の発明に相当する。

20

【0079】

DMI実験の一般原理は以下の通りである。

1. タグ化抗原ライプラリと試験試料を混合する。
2. 標識抗免疫グロブリン抗体パネルを用いて、結合した抗体を検出する。
3. それぞれのタグ化抗体に結合した標識の量を読み取る。

【0080】

まず最初に、実験の重要な各構成要素の必要条件が述べられ、その後に、前記で説明された一般的なDMI実験が例示される。

【0081】

A:抗原ライプラリ

イムノミクス用の抗原ライプラリの必要条件は、プロテオームプロファイリング用の抗体ライプラリの必要条件と非常に似ている。すなわち、ライプラリは可能な限り大きく、重複性が低くなければならない(好ましくは、どの抗原もライプラリの1種類の成分によってのみ表される)。

30

【0082】

適切な抗原ライプラリはオリゴペプチドおよび/またはオリゴ糖を含んでもよい。抗原の供給源は、個々のライプラリ成分として精製タンパク質および非タンパク質抗原を用いたライプラリの手動アセンブリ(精製抗体を用いた抗体ライプラリの手動アセンブリと似ている)によるものでもよく、コンビナトリアルケミストリーによって作成されてもよい。例えば、ペプチド抗原ライプラリは、当技術分野において周知の方法を用いて標準的な固相化学によって作成することができる。

【0083】

抗体ライプラリと同様に、抗原ライプラリの成分は、タグ化するために(例えば、マイクロタイタープレートへ)個々に分配できるように、分離することができなければならない(または別々に作成しなければならない)。

【0084】

大まかなイムノームプロファイルを得る1つのアプローチは、抗原ライプラリを作成し、次いで、抗体含有試料(通常、血清)に曝露し、次いで、それぞれのライプラリ要素に結合している抗体の量を決定することに基づいている。このアプローチに関する問題は、可能性のある抗原が本質的に無数にあるので、ライプラリサイズを制限するために、いくつかの基準を取り入れなければならないことである。

【0085】

1つの解決法は、ライプラリをペプチド抗原に限定することである。なぜなら、ペプチ

40

50

ドライブラリは、コンビナトリアルケミストリー法によって容易に合成できるからである。このようにペプチド抗原ライブラリを使用すると、結果として得られるプロファイルは、単純な直線状の抗原を認識する抗体に限定される(詳細に述べると、より大きなポリペプチド鎖の別個の部分からの寄与を受けている構造エピトープが除かれる)。それにもかかわらず、単純な直線状のペプチド抗原に対する抗体はポリクローナル血清によく見られることが知られているが、このクラスに分類される一般的な個体における抗体クローンの全プールの画分は評価されたことがない。

【0086】

任意の長さのペプチド配列を抗原ライブラリにおいて使用することができる。例えば、4、5、6、7、8、9、10、12、15、18、20、またはそれ以上のアミノ酸長からなるペプチドを使用することができる。しかしながら、抗ペプチド抗血清によって強く認識される最短のペプチド配列は約8アミノ酸長である。従って、好ましいライブラリは、少なくとも8アミノ酸長(例えば、8以上、10以上、15以上、20以上、30以上、40以上、または50以上のアミノ酸長)のペプチドからなる。

【0087】

可能性のある全てのオクタペプチド配列のライブラリは 20^8 個(すなわち、約250億個)の要素を有し、実際には扱うことができない。ライブラリサイズを小さくする2つの選択肢は、可能性のある全てのライブラリ要素のサブセットを選択することによって(もはや包括的にならないように)複雑さを小さくするか、または扱いやすい数のサプライブラリを作成するようにライブラリ要素をプールし、それによってライブラリの包括性を保持しているが、結果として得られるプロファイルの分解能(resolving power)を小さくすることである。

【0088】

プール法の場合、任意の数のプールを使用することができる。選択されるプールの数は、ライブラリ要素の総数、必要とされるサプライブラリの数、および必要とされるサプライブラリ1個あたりの要素の数に左右される。例えば、前記の可能性のある全てのオクタペプチド配列のライブラリでは、262,000個のサプライブラリ(それぞれほぼ200万個の配列を含む)を作成することができる。簡素化されたライブラリは、約5000万個の配列からなる512個のサプライブラリを含んでもよい。または、256個のオクタペプチドサプライブラリ(それぞれ約1億個の異なる配列を含む)からなる、さらに簡単なライブラリを作成することができる。

【0089】

このように大きなライブラリをサプライブラリに分けることによって、本発明の方法を実施することができる。ここで、それぞれ個々のライブラリメンバーがタグ化されているのではなく、ライブラリメンバーのそれぞれの群またはサプライブラリに異なるタグが与えられている。これは、アッセイ中に結合した特定のライブラリメンバーを直接評価することができないが、必要とされる個々のタグの数を劇的に減らすことができる。ライブラリメンバー(例えば、ペプチド)の個々にタグ化された群または混合物を含むライブラリを用いて有用なイムノームプロファイルを得ることが依然として可能である。

【0090】

ライブラリの個々のメンバーは任意の基準によってまたはランダムに群に細分することができる。例えば、ペプチドライブラリの場合、サプライブラリは、ペプチドのアミノ酸配列に基づいて選択されたペプチド混合物を含んでもよい。従って、このようなライブラリを用いて、アッセイにおいて結合しているペプチドについての基本的なアミノ酸配列情報を得ることができるかもしれないが、結合している特定の配列を直接決定することはできない。もちろん、関心対象の特定の混合物またはサプライブラリの成分を採取し、さらにアッセイすることによって(例えば、成分をさらに小さな群に分けることによって、またはそれぞれのペプチドを個々にタグ化することによって)、このようなアッセイの結果をさらに正確にすることができます。

【0091】

10

20

30

40

50

本発明の方法における使用に適したペプチドの混合物または混合物のライプラリを作成するために、任意の適切な方法を使用することができる。例えば、適切な混合物は、それぞれのペプチドが長さnのアミノ酸および以下の式:

$X_1 - X_2 - X_3 - \dots - X_n$

のペプチドである、ペプチド混合物でもよい。式中、

-それぞれのXは、多数のアミノ酸群の1つより独立して選択されるアミノ酸であり、

-それぞれのアミノ酸群は20種類未満のアミノ酸からなり、

-nは、混合物中に存在する全てのペプチドについて同じであり、

-以下のアミノ酸:アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、システイン、セリン、スレオニン、トリプトファン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、アスパラギン、フェニルアラニン、チロシン、およびグルタミンの全てが少なくとも1つの群に存在し、

-混合物中のそれぞれのペプチドについて、同じ位置にあるアミノ酸が同じ群より選択される。

【0092】

このような混合物を使用すると、混合物中の全てのペプチドについて、それぞれのアミノ酸位置がどのアミノ酸群から選択しなければならないかが分かる。従って、全てのアミノ酸位置で変化が生じる可能性があるので、混合物は多種多様な個々のペプチドを含んでいる可能性があるが、一定の配列情報は入手することができる。

【0093】

このようなペプチド混合物では、アミノ酸が2つ以上のアミノ酸群に存在しない、すなわち、特定の位置においてアミノ酸群が選択された時にだけ、それぞれのアミノ酸が現れると述べることができる。さらに、それぞれのアミノ酸群が同数の異なるアミノ酸を含むと述べることもできる。従って、前記の20種類のアミノ酸の場合、20種類のアミノ酸を、10種類のアミノ酸からなる2つの群、5種類のアミノ酸からなる4つの群、または4種類のアミノ酸からなる5つの群に分けることが想定される。

【0094】

例えば、20種類のアミノ酸は以下のようにタイプによって細分することができる。群1 Arg、Lys、His、Asp、Glu(荷電アミノ酸);群2 Gly、Ala、Leu、Ile、Val(小さな疎水性アミノ酸);群3 Met、Phe、Pro、Tyr、Trp(大きな疎水性アミノ酸)、および群4 Ser、Thr、Asn、Gln、Cys(親水性アミノ酸)。

【0095】

別の群分けを以下の表5に示す。表5には、アミノ酸が群「I」および「B」に割り当てられている。「I」群は、抗原構造および抗体結合親和性に最も重大な影響を及ぼす可能性が高いアミノ酸の大部分を含んでいる。結果として、このようにアミノ酸を2つのプールに分類すると、1種類の混合物またはサプライラリの中の配列への特定の抗体の特異的結合が最大限になるはずである。

【0096】

このように、このようなペプチド混合物からなるライラリを作成することができる。例えば、ライラリに含まれる全てのペプチドが同じアミノ酸長を有するライラリを作成することができる。適切なライラリは、ペプチドが2つ以上のライラリに存在しない(すなわち、ライラリの全てのメンバーが、例えば、アミノ酸配列に基づいて群に分けられている)ライラリでもよい。ライラリが前記のような多数の混合物からなる場合、好ましくは、ライラリ中の混合物はそれぞれ、同じアミノ酸群分けを用いて作成されており、そのために、アミノ酸群分けに基づいて混合物を直接比較することができる。好ましくは、ライラリ中の混合物は、ペプチドを得るために選択される群の組み合わせが混合物間で異なることによって異なる。従って、ライラリは、群の可能性のある全ての組み合わせである混合物を含んでもよい。例えば、20種類のアミノ酸が10種類のアミノ酸からなる2つの群に分けられる場合、ペプチドのそれぞれのアミノ酸位置において、一方または他方の群からのアミノ酸が存在してもよい。従って、このように構築されるライ

10

20

30

40

50

ラリは、それぞれの位置での、群のそれぞれの可能な組み合わせであるペプチドの混合物を含んでもよい。従って、ライラリは、ペプチド配列の長さがnである 2^n 個の混合物を含んでもよい。従って、ペプチドが8アミノ酸長であれば、アミノ酸を2つの群に分けたことに基づいて、256個のペプチド混合物からなるライラリを使用することが想定される。従って、ライラリは、それぞれのペプチドが1つの混合物にしか存在しない、長さnの可能性のある全てのペプチドを含んでもよい。

【0097】

サプライラリは、任意の従来法によって(例えば、アフィニティリサーチプロダクツ(Affiniti Research Products Ltd)による標準的な固相ペプチド合成法の改良版によって)合成することができる。ほとんどの合成法では、可能性のある全てのアミノ酸結合について同じ収量は得られない。特に、疎水性アミノ酸(主に「B」群を構成する)の含有量が高い配列は親水性配列より低い収量で合成される可能性が高い。従って、ある特定の配列が、容易に測定できない程度まで、それぞれのサプライラリにおいて過剰にまたは過小に示される可能性が高い。しかしながら、この合成法は極めて厳密に制御され、その結果、(同じ合成配列の偏りを有する)同じサプライラリを繰り返し合成することができるが、個々のサプライラリ中の偏りの性質および程度は未知であることに留意することが重要である。同様に、サプライラリを構成する異なる配列は水性緩衝液中での溶解度が異なり、これもまた、サプライラリ中での異なる配列の偏った提示をもたらすことがある。これを最小限にするために、それぞれのサプライラリを100%DMSOなどの溶媒に溶解することができる。以下に示した実施例では、サプライラリを100%DMSOに溶解して10mM保存液を生成し、その後に、10mM保存液を水性緩衝液に希釈した。

【0098】

サプライラリが設計および合成されたら、それぞれの抗原プールに結合する抗体の量を決定するために、様々な方法を使用することができる。最も直接的な方法は固相イムノアッセイである。すなわち、それぞれのサプライラリがELISAプレートウェル上にコーティングされ、次いで、ヒト血清試料に曝露される。洗浄後、結合した抗体は、標識抗ヒトIgG検出抗体を用いて検出および定量される。どの種類の固相イムノアッセイ法を使用しても、それぞれの抗原サプライラリにおいて異なるクラスの抗体(および全く異なるクローン)が競合する。結果として、それぞれの免疫グロブリンサブクラスが別々に検出されるプロファイルを作成することができる。例えば、IgM検出抗体、IgE検出抗体、IgD検出抗体、IgA検出抗体、ある特定のIgG検出抗体(例えば、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、もしくはIgG4検出抗体)、全てのIgGサブタイプを検出することができるpan-IgG検出抗体、またはこれらの抗体サブクラスおよびサブタイプの2つ以上もしくは全てを検出することができる抗体を使用することができる。使用される検出抗体に応じて、特定のサプライラリに対する低いシグナルは、検出抗体が特異性を有する抗体の特定のサブクラスまたはサブタイプの低い優勢(prevalence)を示している可能性があるか、または異なるサブクラスの抗体の非常に高い優勢を反映している可能性があると認識することが重要である。これに関連して、表面結合抗原における抗体間の競合が、競合抗体プールの相対的な優勢、親和性、およびアビディティを含む様々な要因に左右されることを記憶にとどめておくことが重要である。

【0099】

ライラリが設計されたら、イムノームプロファイルを得るために、多数の免疫学的方法のいずれか1つを使用することができる。これらは、以下の2つの群:それぞれのライラリ要素に結合する抗体が別々に測定され、次いで、組み合わされて、プロファイルが得られる「ユニプレックス(uniplex)」法、およびそれぞれのライラリ要素に結合する抗体が同じチューブ内で測定され、1回の反応から完全なプロファイルが得られる「マルチプレックス(multiplex)」法に大別することができる。明らかに、マルチプレックス法は簡便という利点を有し(実際に、ライラリ要素の数が数百個を超える場合に、現在実行可能な唯一の選択肢である)、また試料をほとんど必要としないが、解釈するのに簡単でない場合もある。すなわち、一連の範囲の異なるライラリ要素に結合することができる

10

20

30

40

50

抗体は、実際には、比較的ゆるい抗原特異性を有する同じ抗体プールである可能性がある。このような場合、マルチプレックス法ではライプラリ要素間の結合において競合が起こるが、ユニプレックス法では起こらない。このような競合は個体間の差異を増幅することも、最小限にすることもあり、マルチプレックスプロファイルまたはユニプレックスプロファイルが、ある特定の用途に最も有用であるかどうかは経験的研究でしか確かめることができない。

【0100】

代表的なユニプレックス方法は固相イムノアッセイである。個々のライプラリ要素が高タンパク質結合ウェル(例えば、ヌンクマキシソープ(Nunc Maxisorp))にコーティングされ、次いで、非特異的結合がブロックされた後に、それぞれのライプラリ要素が分析中の血清試料に曝露される。結合しなかった抗体は洗い流され、結合した免疫グロブリンは、適切に標識された検出試薬(例えば、動物抗ヒトIgG結合体)を用いて検出される。発色基質への曝露の後、それぞれのライプラリ要素からの吸光度(緩衝液のみでコーティングされたウェルからのバックグラウンド吸光度を引いた吸光度)をプロットして、イムノームプロファイルを得る。

【0101】

代表的なマルチプレックス法では、抗体とそれぞれのライプラリ要素との結合が1回の反応で同時にアッセイできるように、それぞれのライプラリ要素を別々に標識するためにタグ化方法が用いられる。このようなタグ化技術の例は、本明細書に記載される、スマートビーズ(SmartBead)によって開発されたアルミニウムバーコードを有する粒子(ウルトラプレックス(UltraPlex)粒子と呼ばれる)またはルミネックスによって開発された色素含浸ビーズである。どちらの場合でも、(バーコードまたは色素のスペクトル特性によって固有に特定される)個別にコード化された粒子は特定のライプラリサブ要素でコーティングされた後、一緒に混合され、分析中の血清試料に曝露される。固相アッセイで用いられるものと同一の抗体の結合段階、洗浄段階、および検出段階の後、それぞれのコード化粒子に結合した抗体の量が別々に求められる。実際には、信頼性の高いプロファイルを構築するために、それぞれのコードの多数の粒子に結合した量が求められ、平均される。

【0102】

B:抗原ライプラリをタグ化する方法

前記の抗体ライプラリをタグ化する時に適用される同じ考慮事項の全てが抗原ライプラリのタグ化に当てはまり、同じ方法が有用である可能性が高い。ライプラリ成分がタンパク質であれば、抗原ライプラリは抗体ライプラリであるかのように正確に処理することができる。ライプラリがオリゴペプチドからなれば、抗原を作成するのに用いられる合成化学反応にタグ化の考慮事項を組み込むことができる。例えば、合成中に化学リンカーを全てのペプチドに付加することができ、このリンカーを用いて、ペプチドをタグに取り付けることができる。リンカーの正確な性質はタンパク質の性質に応じて異なる。色素含有ラテックスビーズの場合、例えば、二官能性スクシンアミド架橋剤を使用することができる。ライプラリがオリゴ糖からなれば、糖鎖を担体タンパク質に取り付け、次いで、ライプラリをタンパク質ライプラリと同様に処理してもよく、ペプチドと同様に、合成中に適切な架橋剤を糖鎖に付加してもよい。

【0103】

C:適切に標識された抗免疫グロブリンパネル

プロテオームプロファイリングの場合は、標識は参照試料に適用され、試験試料中のそれぞれのタンパク質の量が標識参照試料との競合によって間接的に測定されるのに対して、イムノミクスの場合は、それぞれのタグ化抗原に結合する抗体が直接検出される。このために、抗免疫グロブリン、または高い親和性および特異性で免疫グロブリンに結合する等価な試薬のパネルが必要とされる。

【0104】

抗免疫グロブリンは、試験試料に存在する可能性の高い種類の免疫グロブリンに特異的でなければならない。例えば、抗免疫グロブリンは、試験試料と同じ種に由来する免疫グ

10

20

30

40

50

ロブリンに特異的であってもよい(例えば、試料がヒトに由来する場合、抗ヒト免疫グロブリン)。

【0105】

適切な免疫グロブリンパネルは商業的供給者から容易に入手することができる。例えば、ヒト免疫グロブリン検出用のWHO規格抗体を使用することができる。理想的な実験では、1種類またはそれ以上のこのような抗体(必要とされる種に見られる免疫グロブリンの重鎖クラスのそれぞれに特異的な抗体)のパネルが検出試薬として用いられる。例えば、ヒトの重鎖サブクラスの1つまたはそれ以上に特異的な抗体パネル(IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgE、およびIgM)を使用してもよい。適切な種類の検出抗体を前記で説明した。WHO規格抗体はマウスモノクローナル抗体であり、従って、同一の特性を有する検出試薬を多量かつ本質的に無尽蔵に入手することができる。

10

【0106】

次いで、プロテオミクスにおける参考試料の標識に関して前記で説明したように、選択された検出試薬はハイスループット検出に適した任意の方法を用いて標識しなければならない。例えば、WHO規格抗体を蛍光色素で標識することができる。それぞれの異なる検出試薬に対して異なる試薬を使用してもよい。(例えば、抗ヒトIgG1をフルオレセインで標識することができるのに対して、抗ヒトIgMをr-フィコエリトリンで標識することができる)。9種類全てのWHO規格抗体を別々に定量するのに使用することができる、スペクトル識別が可能な多くの蛍光色素がある。

20

【0107】

タンパク質プロファイリング用の参考試料の標識と同様に、標識の他の唯一の必要条件は、標識が適用されたら検出試薬の検出特性に影響を及ぼさないことと、標識が検出試薬に結合してもなお読み取りが可能なことである。同じ必要条件がこの場合に当てはまる。

【0108】

D: タグ化抗原ライプラリに結合した標識を読み取るためのストラテジー

DMIプロテオームプロファイリング用のタグ化抗体ライプラリの読み取りに適用された考慮事項の全てが、DMIイムノームプロファイリング用のタグ化抗原ライプラリの読み取りにも全く同様に適用される。

【0109】

E: 手順

30

試験試料(例えば、血清試料)は、それぞれの適切な体積(一般的に、1μl～200μl)を分配して、1個のウェルに一度に添加される。

【0110】

次いで、混合抗原ライプラリの適切な体積が添加される。一般的に、1μl～100μlのライプラリが添加される。添加される個々のタグの数は、ライプラリの複雑さに左右される。一般的に、ライプラリの成分の10～200倍の個々のタグが添加される。ライプラリを添加した後、反応チューブまたはプレートを十分に混合し、試験試料に存在する抗体とその標的の結合に適した条件下で(例えば、試験血清がそのコグネイトタグ化抗原に結合する期間にわたって)インキュベーションしなければならない。一般的に、これは10～180分である。確実にタグが液体中でランダムに懸濁されたままになるように、一般的に、反応物はインキュベーションの間ずっと連続攪拌される。一般的に、インキュベーションは4～37で行われる。抗原に結合する抗体の特異性および選択性を改善するために、適宜、他の成分が反応物に添加されてもよい。一般的に、0%～1%体積/体積の濃度の非イオン性界面活性剤(例えば、0.1%v/vのトウイーン20)が添加される。同様に、塩濃度を変更することができる。一般的に、総塩濃度を0mM～250mM上げるために、塩化ナトリウム溶液が添加される。同様に、二価陽イオン濃度を変更することができる。一般的に、必要に応じてカルシウムイオンまたはマグネシウムイオンの濃度を0mM～10mM上げるために、塩化カルシウムまたは塩化マグネシウムが添加される。または、必要に応じてカルシウムおよびマグネシウムの濃度を下げるために、EGTAが添加される。同様に、反応物のpHを変更することができる。一般的に、反応物のpHを0～3単位下げるまたは上げるために、それぞれ、

40

50

1M塩酸または1M水酸化ナトリウムが添加される。

【0111】

反応の終わりに、タグは穏やかな限外濾過によって(一般的に、リン酸緩衝食塩水で)洗浄される。抗原に結合する抗体の特異性および選択性を改善するために、他の成分(例えば、非イオン性界面活性剤)を洗浄緩衝液に添加することができる。一般的に、トウイーン20が0% ~ 1% 体積/体積の最終濃度で添加される。

【0112】

洗浄後、タグは、標識検出試薬パネルを含む緩衝液に再懸濁される。例えば、試験試料がヒト供給源に由来する場合、それぞれの個々の抗体について0.05 ~ 50 μ /ml(より一般的には、0.5 ~ 5 μ /ml)の濃度の抗ヒト免疫グロブリン抗体が検出試薬として用いられる。タグ上の捕捉抗体に結合している検出試薬の特異性を改善するために、インキュベーション緩衝液にさらなる成分を添加することができる。これらは、ライプラリと試験試料の最初の反応の間に添加することができる同じ成分である。次いで、標識検出試薬は、一般的に、10 ~ 80分間、タグ化ライプラリとインキュベーションされる。タグが液体中でランダムに懸濁されたままになるように、一般的に、反応物はインキュベーションの間に攪拌される。一般的に、インキュベーションは4 ~ 37 で行われる。

【0113】

反応の終わりに、タグは穏やかな限外濾過によって(一般的に、リン酸緩衝食塩水で)洗浄することができる。抗原に結合する抗体の特異性および選択性を改善するために、他の成分(例えば、非イオン性界面活性剤)を洗浄緩衝液に添加することができる。一般的に、トウイーン20が0% ~ 1% 体積/体積の最終濃度で添加される。タグ化の前にタグ化抗体を洗浄する必要があるかどうかは読み取り方法に左右される。一般的に、蛍光顕微鏡またはフローサイトメーターを使用する場合、洗浄段階は必要でない。

【0114】

次いで、それぞれのタグに結合した標識の量を求めなければならない。読み取らなければならないタグの数は、ライプラリの複雑さ、ならびにその重複性および偏りに応じて異なる。一般的に、ライプラリのそれぞれの非重複成分について、2 ~ 200個のタグが読み取られる。ライプラリが小さいほど、読み取ることができる1成分あたりのタグの数が多くなる。それぞれのタグについて、それぞれの異なる標識(異なる重鎖クラスの免疫グロブリンのそれぞれに相当する)の量は別々に読み取られる。別々に検出された免疫グロブリンクラスの数に応じて、出力ベクトルは、ライプラリに対する非重複成分の1 ~ 9倍の値を有するだろう。非常に大きなライプラリの場合、読み取られる1成分あたりのタグの数が少なければ、最終ベクトルのかなりの数の成分はデータ欠測値として記録しなければならないだろう。同じ成分を表す2つ以上のタグが読み取られた場合、一般的に、それとに結合した標識の量が平均された後に、最終ベクトルが報告される。

【0115】

次いで、結果として得られた出力ベクトルは多くのやり方で分析することができる。一般的に、PCA、PLS-DA、およびOSCを含む様々なメガ変量統計解析用のX行列を構築するために、異なる個体に由来する多数のベクトルが用いられる。このような方法を用いると、いくつかの既存の表現型(例えば、疾患状態)に従って個体を分類することができる。表現型状態が既知の個体を分類するモデルが構築されたら、そのモデルを用いて、状態が未知の個体の表現型を予測することができる。これは、DMIプロテオームプロファイリングを医療診断に適用する基礎である。

【0116】

F:プロファイルの解釈

それぞれのサプライプラリに結合する免疫グロブリンの量は、サプライプラリ要素の配列組成に応じて異なる。緩衝液のみでコーティングされた前記アッセイにおける対照ウェル間のシグナル変化は、サプライプラリ組成によるシグナル変化の信頼限界の適用を可能にする。多くのサプライプラリ要素は、非コーティングウェルについて予想された範囲内の抗体結合を示す。このことは、サプライプラリ中の配列に結合するどの抗体もアッセイ

10

20

30

40

50

の検出感度より低いことを示唆している。しかしながら、ウェルの中には非コーティングウェルよりシグナルが著しく低いものもあることがある。すなわち、検出されているサブクラスに対して異なるサブクラスの非常に高い濃度の免疫グロブリンが存在し、コーティングされたサプライラリに結合し、さらに、非特異的免疫グロブリン結合をロックしているというのが、このことの最も可能性の高い解釈である。例えば、IgGが検出されている場合、阻止抗体はIgMサブクラスの抗体である可能性が最も高い。IgMサブクラスの抗体は5量体構造を有するので、固相結合のためのアビディティが高い。他のウェルについて、非コーティングウェルよりシグナルが著しく高い場合がある。これは、サプライラリを構成する関連配列の少なくとも一部への特異的な免疫グロブリン結合を示唆している。

10

【0117】

最終的には、(恐らく、シグナルが特定の疾患の存在の診断となるために)特別関心のあることが判明した、サプライラリにおけるシグナルの原因となった特定の配列を特定することができる。この場合、全てのライラリ要素は、マスターライラリに由来する関心対象の1つのサプライラリと同じパターン(例えば、「I」群アミノ酸および「B」群アミノ酸パターン)を有する。または、サプライラリ中の配列(例えば、1億個の配列)を、クロマトグラフィーによって電荷などの物理的性質に基づいて自明に分画することができる。両方のアプローチとも、繰り返して用いられれば、最終的に、最初の広範囲のイムノームプロファイルにおける特定のシグナルの原因となった特定の配列を特定することができる。

20

【0118】

講じることが可能なさらなるアプローチは、既知のオクタペプチド配列に対するモノクローナル抗体のイムノームプロファイルを確かめることによって、サプライラリ配列との抗体反応性の特異性を証明することである。

【0119】

しかしながら、最終的には、イムノームプロファイルを解釈する主要なツール(例えば、本明細書で示されたツール)は、プロファイル中の特定のシグネチャと関心対象の表現型を結びつけようとするパターン認識ツールを適用することであろう。

30

【0120】

適切なパターン認識ツールの1つが主成分分析(PCA)である。PCAは、観察(n)よりさらに多くの測定パラメータ(k)を有するデータセット中のクラス特異的シグネチャの認識に最適なメガ変量統計法である。PCAは、非監督(unsupervised)パターン認識法(これは、得られるモデルが、どの個体の疾患状態の知識もなく作成されることを意味する)であり、結果として、オーバーフィッティングに対して堅牢であり、外部バリデーションを必要としない。監督パターン認識法(例えば、部分的最小二乗判別分析(Partial Least Squares Discriminant Analysis:PLS-DA)を適用することができ、これもまた群をうまく分離する。しかしながら、このようなモデルは外部バリデーションを必要とし、これによって、モデルを作成するのに用いられなかったプロファイルが、そのモデルに対して質問される。モデルが堅牢であれば、これらの外部バリデーションプロファイルを正しく予測するが、モデルがオーバーフィットされれば、外部予測は内部予測よりかなり悪い。

40

【0121】

当技術分野において周知の他の一連のパターン認識法を本発明の方法に適用することができる。パターン認識法として、ジェネティックコンピューティング(genetic computing)、サポートベクトルマシン、線形判別分析、変数選択アルゴリズム(variable selection algorithm)、およびウェーブレット分解が挙げられるが、これに限定されない。さらに、パターン認識アルゴリズムを適用する前に、当技術分野において周知の一連の前処理フィルターをデータに適用することができる。前処理フィルターとして、直交シグナル補正(orthogonal signal correction)、 binning、適応 binning (adaptive binning)、スケーリング、およびフーリエ変換が挙げられるが、これに限定されない。それぞれの場合

50

において、利用可能な様々な技法と一緒にまたは組み合わせて実験的に適用することによって、どの方法が、疾患個体のイムノームプロファイルと健常個体のイムノームプロファイルを最もよく分離するかを確かめることが必要である。

【0122】

本明細書に記載のパターン認識ツールは、ある特定の状態についてまだ医学的に診断されていない個体の疾患状態を予測するのに使用することができる。個体のイムノームプロファイルは本明細書に記載の方法によって得られ、そのプロファイルは本明細書に記載のように得られたモデルと比較して用いられる。新たなプロファイルの位置に応じて、個体の疾患状態を予測することができる。このような予測(例えば、クーマンプロット(Cooman's Plot))を行うために、当技術分野において周知の多数の任意の方法を使用することができる。

10

【0123】

診断目的のイムノミクスプロファイルの有用性は多くの要因に左右される。最も重要なことは、特定の疾患が発症する時間尺度と同様の時間尺度で、ある特定の個体のプロファイルに対する安定した要素がなければならず、この安定したプロファイル要素に個体間の差がなければいけない。その場合には、ある特定の疾患の存在の診断となるシグネチャを見発見することができる。

【0124】

G:イムノームプロファイルを改善するためのストラテジー

前記の基本的な方法は多くのやり方で変更することができる。例えば、サプライプラリの数およびサイズを変更することができる。

20

【0125】

この技法の簡単な変更は、異なる免疫グロブリンサブクラスと、同じサプライプラリとの結合を測定することである。これは、識別可能な標識でタグ化された検出試薬を使用することによって可能になるかもしれない。すなわち、マルチプレックス法では、異なるヒト免疫グロブリンサブクラスに対する検出抗血清は異なる蛍光標識でタグ化することができる。異なる蛍光標識を使用すると、それぞれのサプライプラリに結合した、例えば、IgM、IgG1、IgG2、およびIgDの量を同じ反応において求めることができる。このような方法の実施は基本的なIgGイムノミクスベクトルのデータ密度を4倍に増やすが、情報量の増加はある特定の抗原に対する抗体サブクラスの量と高度に相關する場合があるので(特に、これらの結合が競合して起こるので)、予測を難しくするかもしれない。

30

【0126】

別のアプローチは、例えば、オリゴ糖サプライプラリを加えることによって、オリゴペプチドとの構造的な関連性のないライプラリ要素を導入することである。オリゴ糖抗原に対する低親和性天然抗体は豊富にあり、時間的に安定であり、(単純な炭水化物構造である)血液抗原群に対する抗体への多くの働きのために個体間で異なることが知られている。従って、オリゴ糖抗原のサプライプラリを加えると、ライプラリの複雑さの増加を最小限にして、イムノームプロファイルの情報量を増やすことができる。他の化学抗原(例えば、脂質、芳香族など)も含めることができるが、これらの抗原に対する天然抗体の優勢は現在あまり理解されていない。

40

【0127】

ライプラリ設計の適切な変更は、最も関心のあることが分かっている広範囲のプロファイルの領域をさらに分解するライプラリ要素(例えば、下記の実施例における、親水性アミノ末端を有する最初の8個のサプライプラリの要素)を加えることであるかもしれない。

【0128】

ライプラリ構築中に用いられるアミノ酸プールを変更することによって、結果として得られるプロファイルからさらなる情報が得られるかもしれない。例えば、「I」群からのアミノ酸のうちの5つを「B」群に切り替え、次いで、さらに256個のサプライプラリ(ある意味では、最初のライプラリと組成が「直交(orthogonal)」する)を合成することによって、ライプラリ複雑さが許容可能に増加して、イムノームプロファイルに情報量を加える

50

ことができるが、このような増加は全て実験により証明されなければならない。

【0129】

H. 診断方法

個体のイムノームプロファイルは診断にも使用することができる。イムノームプロファイル(例えば、本明細書に記載のDMI法を用いて得られたプロファイル)は、疾患の存在を診断するのに使用することができる異なる個体の高密度記述ベクトル(*high density descriptive vector*)を得るのに使用することができる。ほとんどの医学的状態または疾患は、特定の状態に対する免疫系の応答のために個体のイムノームプロファイルの変化につながる。イムノームプロファイルの一部の局面はある特定の疾患または状態と関連することがあり、例えば、疾患もしくは状態の原因またはその影響の原因を示すことがある。従って、個体のイムノームプロファイルの分析は個体の疾患診断に、または将来の疾患もしくはある特定の疾患に対する個体の感受性を予測するのに使用することができる。イムノームプロファイルはまた、個体における疾患の重篤度または予想重篤度を評価するのに使用することもできる。本明細書に記載の方法はまた、疾患に罹患していることが分かっている個体の疾患をモニタリングするのに使用することもできる。例えば、疾患の進行もしくは後退をモニタリングしてもよく、疾患の治療効果をモニタリングしてもよい。

【0130】

このような診断は、疾患状態が既知の個体の標準的なプロファイルを得ることによって達成することができる。次いで、疾患または状態の存在に固有かつ再現可能に関連しているイムノームプロファイル中のシグネチャを特定するために、パターン認識法を使用することができる。次いで、この情報を用いて、疾患状態が未知の他の試験個体の疾患状態の予測を行うことができる。

【0131】

このように、疾患の存在または疾患に対する感受性は、個体から得られた試験試料中の複数の免疫グロブリンを検出する段階、次いで、試料中に検出された免疫グロブリン(すなわち、個体のイムノームプロファイル)と、疾患の存在または非存在に関連した既知の免疫グロブリンパターンまたは既知のイムノームプロファイルパターンを比較する段階を含む方法によって確かめることができる。このような比較を行うことによって、個体が、問題になっている疾患を有するかどうか、または発症する可能性が高いかどうかを確かめることができる。

【0132】

個体は、診断が望まれるどのようなヒトでも動物でもよい。検出段階および個体のイムノームプロファイルの作成は、任意の適切な方法によって(例えば、本明細書に記載のDMI法を用いて)行うことができる。比較段階は任意の適切な方法によって行うことができる。場合によっては、イムノームプロファイルの検査によって手作業でこれを行うことができるかもしれない。または、任意のパターン認識法(例えば、本明細書に記載のパターン認識法)を使用することができる。適切なパターン認識法として、主成分分析、部分的最小二乗判別分析、ジェネティックコンピューティング、サポートベクトルマシン、線形判別分析、変数選択アルゴリズム、およびウエーブレット分解を挙げることができる。

【0133】

疾患状態とイムノームプロファイルとの間で相関関係が見られた任意の疾患または状態をこのように診断することができる。適切な疾患は、免疫系が重要な役割を果たしている疾患でもよく、様々な要因がこの状態の一因となっている可能性のある疾患でもよい。

【0134】

このような診断に適した疾患として、例えば、感染症(例えば、細菌、菌類、寄生生物、ウイルス、またはブリオンによって引き起こされる感染症)、寄生虫病(例えば、原生動物または寄生虫によって引き起こされる寄生虫病)、炎症性疾患、自己免疫疾患、遺伝病、中毒疾患(例えば、環境毒素への曝露によって引き起こされる中毒疾患)、損傷、奇形、または身体の一部の不使用によって引き起こされる状態、栄養病または栄養障害、神経障害、癌、アレルギー、および心疾患を挙げることができる。本明細書に記載の方法が診断

10

20

30

40

50

に有用であり得る特定の疾患として、冠状動脈性心疾患、癌(例えば、肺癌および腸癌)、変形性関節症、骨粗鬆症、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、ならびに子宮内膜症が挙げられる。

【0135】

本発明の方法は、侵襲的な処置を使用しなければ正確に診断することが難しい疾患または状態の診断に特に有用であるかもしれない。

【0136】

本発明の診断方法は、患者から得られた試験試料において行うことができる。イムノグロビン(immunoglobulin)を含む任意の試験試料をこのような方法において使用することができる。例えば、試験試料は、血液、血清、血漿、組織試料、または脳脊髄液でもよい。

10

【0137】

本明細書に記載の方法に使用するための(例えば、個体のイムノームプロファイルの入手に使用するための、または診断方法において使用するための)キットも想定される。適切なキットは、このような方法において用いられる成分を含む。例えば、キットは、それぞれの抗原または抗原混合物がタグを含む複数の抗原または抗原混合物と、免疫グロブリンに特異的に結合することができる1種類またはそれ以上の標識抗体を含んでもよい。本明細書に記載の任意の抗原、抗原混合物、または抗原ライブラリを、このようなキットにおいて使用することができる。同様に、本明細書に記載の任意の標識抗体を使用することができる。好ましいキットは、以下の表5に示したアミノ酸群分けを用いて本明細書に記載のように作成されたペプチドライブラリを含んでもよい。この場合、ライブラリ中のそれぞれのペプチド混合物はアルミニウムバーコードでタグ化されている。好ましいキットはまた、IgGを特異的に検出することができる標識抗体を含んでもよい。

20

【0138】

実施例

実施例1:小さな抗体ライブラリ、アルミニウムバーコードタグ、およびフルオレセイン標識参照試料を用いたヒト血清のプロテオーム分析

第1の段階では、DMIでの使用に適した抗体ライブラリを作成した。本発明のこの試験証明のために、一連の製造業者からヒト血清成分に対する多数の精製抗体入手することによって、ライブラリを構築した。試験しようとするそれぞれの抗原は一度だけライブラリに含められ、結果として、ライブラリは、重複性が非常に低いというDMIライブラリに理想的な特徴を有した。

30

【0139】

この実験のために、38種類の抗体を選択した。34種類は異なる血清成分に対する抗体であった(表1を参照のこと)。残りの4種類は、34種類の抗体と同じ種であるが、参照試料には存在しないように選択されたエピトープを有する対照抗体であった。この実験で検出しようとする34種類の血清成分は存在量がアルブミン(約30mg/ml)~IL-1b(100pg/ml)に及んでいた。しかしながら、存在量が最も少ない成分に対する抗体の3種類(抗HIVp24gag、抗可溶性セレクチン、および抗IL1b)については、シグナルは参照試料において検出されず、結果として、これらのタグからデータは得られなかった。本発明者らの実験において堅牢に検出しようとする、存在量が最も少ないタンパク質はTGF- β (約30ng/ml)であった。これは、約100万倍のDMIの動作ダイナミックレンジ(working dynamic range)に相当する。それぞれの抗体を個別に購入したので、38個の異なる容器に入れて使用することができ、このために、抗体を、リン酸緩衝食塩水に溶解して1mg/mlの抗体濃度でマイクロタイプレートウェルに分配することができた。

40

【0140】

【表1】

タグ	抗原	抗体	種	CVar
1	α2-マクログロブリン	Biogenesis 5850-0004	ヒツジ IgG	3.8
2	α1-アンチトリプシン	Calbiochem 178260	マウス IgG2a	2.1
3	ApoAI	Calbiochem 178422	ウサギ IgG	7.2
4	ApoB	Calbiochem 178426	ウサギ IgG	11.4
5	ApoE	Biogenesis 0650-2054	マウス IgG1	6.8
6	β2-マイクログロブリン	Sigma M7398	マウス IgG1	2.3
7	CICP	Quidel 1M0622	ウサギ IgG	2.2
8	フィブリノゲン	Biogenesis 4440-8004	ヒツジ IgG	3.0
9	HIV1p24gag	ARP ARP313	マウス IgG	-
10	ICAM-1	Serotec MCA532	マウス IgG1	17.6
11	IgκC	Bionostics M03010	マウス IgG1	2.6
12	IgA	Bionostics M26012	マウス IgG1	2.4
13	IgD	Bionostics M01014	マウス IgG1	2.9
14	IgE	Bionostics M38041	マウス IgG1	8.1
15	IGF-1	Serotec MCA520	マウス IgG1	2.3
16	IL1β	R&D Systems	マウス IgG1	-
17	Lp(a)	Immunoscientific	ヒツジ IgG	4.5
18	MMP9	Chemicon AB805	ウサギ IgG	3.5
19	ミエロペルオキシダーゼ	NeoRX NR-ML-5	マウス IgG	2.6
20	オステオポンチン	Hoyer 1826-1283	ウサギ IgG	3.3
21	PAI-1(遊離)	Progen TC21173	マウス IgG1	6.9
22	PAI-1(複合体)	Mol Innovations MA14D5	マウス IgG1	2.5
23	PAI-2	American Diagnostic #3750	マウス IgG2a	2.7
24	PDGFAA/AB	UBI #06-130	ウサギ IgG	4.6
25	セレクチンE/P	R&D Systems BBA1	マウス IgG1	-
26	血清アルブミン	Calbiochem 126582	ウサギ IgG	3.8
27	SHBG	Biogenesis 8280-0108	マウス IgG1	2.6
28	TGF-β1	R&D Systems BDA19	ニワトリ IgG	5.0
29	TGF-LTBP	R&D Systems Mab39	マウス IgG	4.7
30	トロンボスポンジン	Biogenesis 8835-0004	マウス IgG1	2.3
31	TIMP-2	Biogenesis 9013-2609	ヒツジ IgG	3.3
32	TPA	American Diagnostic #387	ヤギ IgG	2.4
33	UPA	Accurate YMPS75	ヤギ IgG	2.9
34	VWF	Dako A082	ウサギ IgG	4.6
35	コラーゲン-II	NIHDHSB CII-C1	マウス IgG	-
36	NR58-3.14.3	Affiniti ARP063/AF	ウサギ IgG	-
37	サリチル酸塩	Cortex CR1041SP	ヒツジ IgG	-
38	PPAR-α	Santa Cruz sc1985	ヤギ IgG	-

10

20

30

40

表1:手作業による小さなDMIライブラリを作成するために選択された抗体を上記に示す。

「タグ」の数字は、出力ベクトルにおけるライブラリ成分の位置を示す(タグのコードではない。タグはさらに複雑である)。「抗原」は、抗体が結合する既知の血清成分を示す。「抗体」は、使用する特定の抗体の供給者を示す。「種」は、使用する免疫グロブリン画分の種である。「Cvar」は、同じ実験における同じコードの複数のタグの読み取りの変動係数である。HIVp24gag、ICAM-1、またはセレクチンE/Pは本発明者らの参考試料におけるアッセイの検出限界未満であったので、これらの抗原のCvarは示していない。

【0141】

次いで、この小さい抗体ライブラリを、アルミニウムバーコードタグを用いてタグ化した。タンパク質の非共有結合を促進するためにタグを活性化し、次いで、抗体と混合した

50

。すなわち、異なるバーコードを、抗体ライブラリのそれぞれの成分と混合した。タグおよび抗体を密封し、バーコードタグが抗体分子で完全に覆われるよう一晩インキュベーションした。次いで、全てのタグ化抗体を1個のチューブにプールし、過剰量のリン酸緩衝食塩水を用いた穏やかな限外濾過によって洗浄し、既知のタグ濃度(例えば、1mlあたり100万個の個々のタグ)で再懸濁した。

【0142】

第2の段階では、標識参照試料を調製した。15人の健常ボランティアからプールした約2mlの血清を、(タンパク質とフルオレセインイソチオシアネート(FITC)との反応を妨げる遊離アミノ酸を除去し、pHをFITC標識に最適な値に調節するために)100mM炭酸ナトリウム緩衝液(pH9)に対して大規模に透析した。次いで、DMSOに溶解したFITCを透析血清に約10:1のモル比で添加した。(血清は70mg/mlのタンパク質(平均分子量50,000Da)を含み、これは約1.4mMの濃度に相当する。従って、FITCは最終濃度15mMで添加した。本発明者らは、血清2mlに、DMSOに溶解した150mM FITC保存液200μlを添加した)。

【0143】

一定に混合しながら、標識反応を4で一晩行った。次いで、1/10体積(220μl)の1Mグリシン(pH7)を添加することによって、反応を止めた。過剰なグリシンは、残存している遊離FITCと急速に反応し、従って、反応を終了させる。次いで、結果として得られたタンパク質混合物を、カラムクロマトグラフィーによって、未反応フルオレセイン:グリシン結合体から分離した。セファデックス(sephadex)G25カラム(10mlカラム体積)をリン酸緩衝食塩水で平衡化し、次いで、カラムに標識血清試料をロードした。タンパク質成分はカラムを素早く通過し、収集および保持されるのに対して、低分子量塩(フルオレセインを含む)はカラムを非常にゆっくりと通過し、捨てられる。分離は、カラム溶出液を、280nm(タンパク質観察用)および490nm(フルオレセイン観察用)に設定された2波長分光光度検出器に流すことによってモニタリングすることができる。記録を図2に示す。

【0144】

次いで、カラムからの標識タンパク質溶出液を、遠心超濃縮器(centrifugal ultraconcentrator)(ミリポア(Millipore))と公称3kDaカットオフフィルターメンブレンを用いて、約1ml(プール血清の最初の体積の半分)まで体積が減少するまで濃縮した。次いで、この試料の総タンパク質濃度を、クマシープラス(Coomassie Plus)タンパク質アッセイ(ピアス(Pierce))と標準として血清アルブミンを用いて試験した。本発明者らの実験では、タンパク質濃度は121mg/mlであった。これは、標識段階およびクロマトグラフィー段階の間に86%が回収されたことに相当する。次いで、標識参照試料の総タンパク質濃度を最初のプール血清の総タンパク質濃度に戻すために、適切な体積のリン酸緩衝食塩水を添加した。本発明者らの実験では、総タンパク質濃度を70mg/mlに戻すために、730μlの緩衝液を添加した。この手順によって、約100回の異なるアッセイに十分な標識参照試料1.73mlが調製された。しかしながら、同じ手順を用いて、さらに多量の参照試料を調製することができる。

【0145】

第3の段階では、本発明者らは実際のDMI法を行った。V底マイクロタイタープレートに、標識参照試料アリコート20μlを分配した。次に、それぞれの試験試料20μlを各ウェルに添加した。試験試料は、参照試料プールを作成するためにプールされた15個の試料を含む非希釈ヒト血清試料であった。プレートを密封し、混合した。次に、10μlのタグ化DMI抗体ライブラリ(約10,000個の個々のタグを含む。本発明者らは、全てのタグのうちの少なくとも1つが混合物に含まれる可能性を高めるために、別個の成分の10~200倍の個々のタグをライブラリに添加することをねらっている)を各ウェルに分配した。プレートを再度密封し、混合し、次いで、一定に攪拌しながら室温で15分間インキュベーションした。実験の終わりに、希釈によって反応を止めるために、150μlのリン酸緩衝食塩水を添加した。

【0146】

最後の段階において、それぞれの反応物を次々にフローサイトメーターに通した。大規

10

20

30

40

50

模なDMI実験の場合、これはロボットオートサンプラーを用いて行うことができるが、このような小規模の試験実験の場合、各反応物を次々にFACSチューブ(ベクトンディキンソン(Becton-Dickinson))に移し、手作業でサンプリングした。各チューブについて、5,000の事象を捕捉した(5,000の異なる個々のタグに相当する)。それぞれのタグをレーザービームに通した時に、前方散乱光パルスの時間プロファイルがデコードされて、タグコードの2進表示が得られる。同時に、タグ化抗体に結合した標識タンパク質の量を表すために、入射ビームに対して90度で読み取られたFL1波高を測定した。5,000の事象全てについて、それぞれの数字の対(タグコード、結合標識)を記録した。その後、事象をタグコードによって群分けし、同一コードの各群の平均結合標識を計算した。この実験からの出力は、分析された各試料のタグコードの順番の38の値を有するベクトルであった。結果を表2および図3に示す。これらのプロファイルは、試験された各個体のプロテオームプロファイルに相当し、様々な調査または分析目的に使用することができる。

10

20

【0147】

本実施例では、本発明者らは、数人の個体においてタグ8および21に結合したタンパク質濃度が高いことに気づいた(高濃度のタンパク質が試験試料中にすると、タグ化抗体に結合する参照試料の標識タンパク質の量が減少するので、これは表2の低い値によって表される)。これらのタグは、それぞれ、フィブリノゲンに対する抗体およびPAI-1に対する抗体を有した。これらのタンパク質は両方とも陽性急性期反応物質であることが知られているので(すなわち、感染中に濃度が上昇することが知られているので)、本発明者らは、これらの個体が血液試料の採取時に軽度の感染症(例えば、風邪)に罹患していた可能性が高いと結論付けている。

20

30

【0148】

本発明者らは、得られたデータベクトル(表1および2)における変動原因の詳細分析を行った。最初に、本発明者らは、同じ実験において同じコードを有する異なるタグからの蛍光読み取りの範囲から計算された、この方法の分析再現性(Cvar(anal))を評価した。分析再現性は非常に良い(ほとんどのタグについて5%未満であり、個々のイムノアッセイより優れている)。さらに、Cvar(anal)は抗原存在量の影響を受けず、アルブミンおよびフィブリノゲン:TGF- α およびPAI-1についてほぼ同じである。

30

【0149】

さらに、試験試料のうちの5つは同じ採血からの複製アリコート(PI~P5,表2の陰をつけた部分)であった。これを用いると、反復測定再現性(Cvar(rm))を評価することができる。Cvar(rm)は分析変動(Cvar(anal))が差し引かれて報告されている。参照試料においてシグナルが検出された31種類全ての抗体のCvar(rm)中央値は2.7%(範囲2.1%~17.6%)であった。この値は、最も堅牢な分析方法(例えば、メタボノミクス用のNMR(1~2%))よりもわずかに劣っているが、2Dゲル電気泳動またはプロテインチップマイクロアレイを含む既存のどのプロテオミクス方法(10~20%)よりも優れている。

30

【0150】

【表2】

	1 a2M	2 a1AT	3 ApoAI	4 ApoB	5 ApoE	6 b2M	7 C1CP	8 Fib	9 HTVp24 _{gag}	10 ICAM1
A	1.105	1.118	1.012	1.470	0.574	1.007	1.698	1.000	-	1.588
B	0.906	0.859	0.957	0.428	0.947	0.914	3.601	0.991	-	1.741
C	0.958	0.951	0.974	1.232	1.524	1.207	0.782	1.235	-	0.121
D	1.287	1.078	0.796	10.096	1.635	1.018	1.156	0.961	-	1.722
E	1.003	0.956	0.622	0.847	1.310	0.923	1.243	1.130	-	1.515
F	0.938	0.982	0.946	7.935	0.775	0.856	0.650	1.465	-	1.544
G	0.967	1.006	2.346	0.759	2.016	0.973	0.600	0.754	-	0.568
H	0.952	0.892	0.949	0.446	0.446	0.960	2.079	1.042	-	1.885
I	1.078	0.844	1.079	0.445	1.171	0.964	4.650	1.065	-	0.963
J	1.113	1.004	1.315	0.738	1.147	1.000	0.636	1.297	-	2.209
K	0.898	1.009	0.770	1.332	1.728	1.040	0.623	1.322	-	0.892
L	0.982	1.133	0.760	4.255	0.943	1.086	2.057	1.009	-	2.602
M	0.942	0.896	0.853	1.123	1.272	0.984	1.496	1.155	-	2.387
N	0.998	0.896	1.009	2.610	1.705	1.006	1.412	0.705	-	0.264
O	1.045	1.095	1.018	1.449	1.098	1.003	0.767	1.015	-	2.560
P1	0.923	0.867	1.315	1.732	1.151	0.992	2.203	0.787	-	0.917
P2	1.070	0.976	1.276	1.239	0.998	1.053	2.261	0.721	-	1.052
P3	0.967	0.933	1.529	1.555	1.123	0.938	2.258	0.753	-	0.522
P4	0.983	1.008	1.338	1.717	1.315	0.973	1.738	0.752	-	0.899
P5	0.972	0.954	1.221	1.698	1.067	1.001	2.207	0.702	-	0.611
平均	1.011	1.104	1.027	2.344	1.219	0.984	1.563	1.229	-	1.512
Cvar(anal)	3.8	2.1	7.2	11.4	6.8	2.3	2.2	3.0	-	17.6
Cvar(rm)	1.665	3.485	1.540	1.670	3.673	1.943	8.239	1.404	-	10.344
Cvar(indiv)	4.571	3.996	30.131	111.085	26.140	3.805	64.576	14.377	-	24.914

10

20

	11 Ig _κ C	12 IgA	13 IgD	14 IgE	15 IGF1	16 IL1b	17 Lp(a)	18 MMP9	19 MPO	20 OPN
A	0.952	1.224	0.007	1.074	0.866	-	0.109	1.019	0.552	1.054
B	1.067	1.005	12.412	0.958	1.027	-	0.146	0.938	1.406	0.951
C	0.906	1.236	0.037	0.899	1.012	-	27.492	0.984	2.505	1.081
D	1.165	0.997	0.365	1.411	1.061	-	2.432	1.072	1.839	0.996
E	0.949	0.882	0.039	1.122	0.986	-	26.119	1.019	0.736	1.017
F	1.085	1.117	1.304	1.366	1.042	-	22.278	1.066	2.551	0.994
G	0.947	0.907	10.272	0.050	0.933	-	0.149	1.013	0.361	0.911
H	1.030	0.952	11.782	1.267	0.882	-	3.427	1.017	1.632	1.045
I	0.940	0.921	1.974	1.280	0.946	-	0.281	1.031	1.480	1.067
J	1.198	1.088	25.121	1.033	0.938	-	0.106	1.100	0.612	0.857
K	1.164	1.026	0.239	0.881	0.994	-	0.349	0.963	0.936	1.033
L	0.973	0.924	0.004	0.812	0.964	-	31.546	1.136	1.604	1.020
M	1.141	1.672	4.080	0.989	1.054	-	27.395	1.111	1.241	1.085
N	1.007	0.889	0.193	0.925	1.118	-	4.536	1.050	0.341	1.157
O	1.274	1.025	0.525	1.410	1.091	-	1.734	1.050	0.576	0.800
P1	1.006	1.068	10.353	1.388	0.992	-	0.112	1.028	0.672	1.056
P2	1.094	1.100	9.768	0.974	0.979	-	0.128	0.978	0.658	0.973
P3	0.935	1.171	11.951	1.228	0.956	-	0.117	1.067	0.662	1.004
P4	1.067	1.005	13.207	1.401	0.938	-	0.141	1.093	0.667	0.966
P5	1.038	1.094	10.966	1.339	0.996	-	0.112	1.029	0.790	1.062
平均	1.053	1.058	4.557	1.029	1.026	-	9.873	1.081	1.225	1.005
Cvar(anal)	2.6	2.4	2.9	8.1	2.3	-	4.5	3.5	2.6	3.3
Cvar(rm)	3.379	3.109	9.194	5.872	0.239	-	5.721	0.707	5.556	1.156
Cvar(indiv)	4.769	13.728	147.527	18.759	4.854	-	118.443	1.031	50.726	4.767

10

20

30

40

	21 PAII(f)	22 PAII(c)	23 PAJ2	24 PDGF	25 セレクチン	26 アルブミン	27 SHBG	28 TGFb1	29 LTBP	30 TSP
A	1.396	0.678	1.021	1.163	-	0.871	0.986	1.152	1.208	1.562
B	0.857	0.692	0.990	1.135	-	1.109	1.060	1.230	1.226	1.489
C	0.908	0.999	1.004	0.944	-	1.018	0.986	0.927	0.980	1.167
D	1.480	0.691	0.964	0.576	-	0.853	1.172	0.579	0.533	0.787
E	1.288	0.954	1.004	1.413	-	1.223	1.008	1.206	1.403	1.609
F	1.323	0.510	0.993	0.667	-	0.896	0.889	0.592	0.621	1.035
G	0.478	0.370	1.034	0.646	-	0.713	1.042	0.638	0.622	0.348
H	1.608	1.292	0.969	0.614	-	0.973	0.905	0.823	0.670	0.982
I	1.163	0.730	1.006	0.784	-	0.768	0.964	0.901	0.952	0.494
J	1.360	1.300	1.092	1.413	-	1.257	0.927	1.585	1.603	1.623
K	1.059	0.415	1.063	1.700	-	0.992	0.960	1.933	1.798	1.155
L	1.575	0.869	0.984	0.985	-	1.229	0.884	1.008	0.927	1.002
M	1.979	1.065	0.999	0.719	-	1.054	1.039	0.722	0.700	0.585
N	0.636	0.534	0.960	1.779	-	0.822	1.024	2.014	1.856	1.730
O	1.859	0.733	1.035	1.266	-	1.086	1.011	1.189	1.264	0.749
P1	0.758	0.800	1.033	0.852	-	0.853	1.027	1.323	1.407	1.971
P2	0.803	0.931	1.007	0.801	-	0.890	0.959	1.379	1.268	1.826
P3	0.772	0.951	1.001	0.959	-	0.968	1.038	1.221	1.398	1.760
P4	0.837	0.938	1.079	0.867	-	0.987	1.068	1.400	1.422	1.950
P5	0.630	0.876	1.056	0.888	-	0.924	1.011	1.383	1.219	1.800
平均	1.267	0.789	0.994	1.054	-	0.964	1.088	1.100	1.091	1.088
Cvar(anal)	6.9	2.5	2.7	4.6	-	3.8	2.6	5.0	4.7	2.3
Cvar(rm)	3.466	4.440	0.475	1.997	-	2.150	1.343	0.455	2.202	2.737
Cvar(indiv)	23.146	29.619	0.447	31.065	-	11.261	3.655	35.520	32.960	35.679

	31 TIMP2	32 tPA	33 uPA	34 vWF	35 マウスIg	36 ウサギIg	37 ヒツジIg	38 ヤギIg
A	1.018	1.077	0.510	2.489	-	-	-	-
B	1.028	1.189	0.713	0.943	-	-	-	-
C	0.776	1.116	0.751	1.583	-	-	-	-
D	1.219	0.686	1.069	1.415	-	-	-	-
E	1.044	0.997	1.067	0.910	-	-	-	-
F	0.992	1.127	0.828	0.874	-	-	-	-
G	0.806	0.872	1.146	0.409	-	-	-	-
H	0.982	0.978	1.007	1.937	-	-	-	-
I	1.369	1.019	1.119	1.263	-	-	-	-
J	0.779	1.388	0.921	0.964	-	-	-	-
K	0.769	0.969	0.829	1.760	-	-	-	-
L	1.176	0.893	1.288	1.002	-	-	-	-
M	0.670	0.944	1.165	0.578	-	-	-	-
N	0.875	0.831	1.457	0.423	-	-	-	-
O	0.685	0.998	0.861	0.659	-	-	-	-
PI	0.969	0.885	0.827	0.723	-	-	-	-
P2	1.133	0.831	0.954	0.877	-	-	-	-
P3	1.007	0.837	0.881	0.723	-	-	-	-
P4	1.068	0.809	0.990	0.762	-	-	-	-
P5	1.034	0.824	0.923	0.610	-	-	-	-
平均	0.946	0.779	1.307	1.147	-	-	-	-
Cvar(anal)	3.3	2.4	2.9	4.6	-	-	-	-
Cvar(rm)	2.687	1.027	4.036	8.366	-	-	-	-
Cvar(indiv)	15.686	12.983	17.825	38.778	-	-	-	-

10

20

30

40

表2: 「A」～「O」と表示した15人の健常ドナー(男性7人および女性8人、23～27歳)の静脈血から調製した血清試料のDMIによるプロテオームデータを示す。別の個体(男性、35歳)からの1つの血清試料を5つの複製アリコート(PI～P5)に分け、同様にアッセイした。それぞれのタグについて、標準化された平均蛍光を示す(小数第3位まで)。参照試料のみでも蛍光が検出されなかった場合、-を示す。それぞれのタグの変動成分が分析され、示される。すなわち、「Cvar(anal)」は同じ実験におけるタグ間の分析変動である。「Cvar(rm)」は5つの複製アリコートの反復測定変動であり、分析変動を差し引いて示される。「Cvar(indiv)」は個体間の分散であり、分析変動と反復測定変動の両方を差し引いて示される。Cvar(indiv)値が高いタンパク質は最も大きな診断情報を含む。点線の囲みは、アッセイの較正範囲(約0.1～10の任意の単位)外の値を示す。黒色の囲みは本文において言及された値を強調している。

【0151】

実施例2:有効範囲が非常に広い非選択ファージディスプレイライブラリからの大規模DMI抗体ライブラリの作成

実施例1では、本発明者らは、DMI法の原理を説明するために、手作業で構築した小さなDMI抗体ライブラリを使用した。しかしながら、数千の分析物を同時に扱うことができるメガプレックス技術とも同じように、このアプローチの能力はライブラリサイズと共に増加する。100個程度の成分より大きなライブラリを、手作業による方法で構築することはできないので、大きなライブラリを得るために別の方法が必要とされる。さらに、手作業で構築されたライブラリは「既知の」抗原(すなわち、試験試料に存在することが既

50

に知られている抗原または試験試料に存在すると考えられる抗原)しか示さない。対照的に、ファージディスプレイライプラリからのサブセレクションによって作成されたライプラリは非常に大きく、かつ以前に特定されたことのない試験試料成分に対する抗体を含んでいる可能性が高い。

【0152】

大きなDMIライプラリを首尾よく作成する前提条件は、有効範囲が非常に広いマスター・ファージディスプレイライプラリである。マスター・ライプラリを構成する独立クローンの数が多ければ多いほど、マスター・ライプラリからサブセレクションすることができる、結果として得られるDMIライプラリが良くなる。マスター・ライプラリは当技術分野において周知の任意の方法によって構築することができる。例として、ヒト被検体免疫多様性の少なくとも10倍に相当する約 10^{13} 個の独立クローンを含むCATライプラリが挙げられる。

10

【0153】

大きなDMIライプラリを調製するために、参考試料(本発明者らの場合では、15人の健常個体からのプール血清)に存在する全てのタンパク質またはほぼ全てのタンパク質が確実に結合するように、参考試料の非標識アリコートを、低タンパク質密度(約 $10\mu\text{g}$ タンパク質/ cm^2)で組織培養プラスチック(高タンパク質結合性プラスチック)にコーティングした。このように(10mg総タンパク質を用いて)、約 $1,000\text{cm}^2$ の総表面積を調製した。次いで、マスター・ファージライプラリを増殖させ、プレート表面に室温で30分間広げた。結合しなかったファージを、0.1%トウイーン20含有リン酸緩衝食塩水で洗い流した。

20

【0154】

次いで、正の選択を受けたファージを放出させ、その集団を再増殖させた。第2の段階では、参考試料タンパク質を、非常に高いタンパク質密度度(10mgタンパク質/ cm^2)で組織培養プラスチックにコーティングした。プラスチック上でのタンパク質結合部位の数は非常に限られているので、極めて少ないタンパク質の多くはプレート上に全く示されないのでに対して、豊富なタンパク質は高度に示される。次いで、この表面に、選択されたファージを室温で30分間曝露し、この時に、結合しなかったファージは保持され、結合したファージは捨てられた。

20

【0155】

ファージ集団を増殖させ、次いで、正の選択をかけ、その集団を増殖させ、負の選択を行うなど、このプロセスを何回も繰り返した。プロセスが続くにつれて、ライプラリの重複性は低下し、参考試料中の豊富な抗原への偏りも低下する。選択プロセスを繰り返すときに、偏りをモニタリングした。すなわち、4種類の精製抗原(2種類の豊富な精製抗原(フィブリノゲンおよびアルブミン)ならびに2種類の極めて少ない精製抗原(TGF- α およびPAI-1))を100mM炭酸ナトリウム(pH9)に溶解して4℃で一晩ELISAプレートウェルにコーティングし、次いで、洗浄し、5%スクロース/5%トウイーンを含むリン酸緩衝食塩水を用いてブロックした。ウェルを(リン酸緩衝食塩水+0.1%トウイーン)で再度洗浄した後、選択されたライプラリの連続希釈液を各抗原に適用した。これを室温で30分間結合させ、次いで、ウェルを洗浄し、結合したファージを、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ファージコートタンパク質抗体で検出した。さらに洗浄した後、結合した酵素の量を、基質K-BLUEを用いて定量した。次いで、それぞれの抗原に対して最大半量シグナルを生じたライプラリの希釈液を決定した(非希釈ライプラリを1単位の任意濃度とした)。ライプラリの偏りを、2種類の豊富な抗原の平均を2種類の極めて少ない抗原の平均で割った値として計算した。本発明者らが4回の正の選択および負の選択を行った時の、選択されたDMIライプラリの偏りを図4に示す。

30

【0156】

本実施例は、重複性が低く偏りが少ない大きなDMIライプラリを作成することができるることを証明する。このようなDMIライプラリは、実施例1で用いられたものと同様のタグ化ライプラリを作成するためにマイクロタイタープレートにクローニングされた限界希釈液でもよいが、10,000～100,000個の成分を含む。

40

【0157】

50

実施例3:小規模炭水化物抗原ライプラリを用いたイムノミクス

第1段階として、抗原ライプラリを組み立てなければならない。このパイロット規模の実験のために、個々に合成され、精製された炭水化物抗原を96ウェルプレートのウェルに分配することによって、ライプラリを手作業で構築した。血清アルブミンに結合した24種類のオリゴ糖配列が市販されている(グリコレックス(Glycorex))(表3)。炭水化物が結合していない血清アルブミン(ウシまたはヒト由来)を対照ライプラリ成分として使用し、さらに2つのウェルに分配した。それぞれのウェルに、約100 μgのタンパク質/オリゴ糖結合体を分配した。

【0158】

【表3】

タグ	抗原	結合体	担体	CVar
1	Glc β -O-スペーサー	B-1001	BSA	2.1
2	Gal β -O-スペーサー	B-1002	BSA	2.3
3	Man α -O-スペーサー	B-1003	BSA	1.9 (M)
4	Gal β 1-4Glc β -O-スペーサー	B-1004	BSA	4.8
5	Gal β 1-4GlcNAc β -O-スペーサー	B-1005	BSA	3.0
6	Glc α 1-6Glc α 1-4Glc β 1-4Glc β -O-スペーサー	B-1007	BSA	-
7	Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -O-スペーサー	B-1017	BSA	2.2
8	Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β -O-スペーサー	B-1010	BSA	2.6
9	Gal α 1-4Gal β -O-スペーサー	B-1011	BSA	2.1
10	Gal β 1-3GlcNAc β -O-スペーサー	B-1012	BSA	2.4
11	Di-Man α 1-6(α 1-3)Man α -O-スペーサー	B-1014	BSA	-
12	GalNAc β 1-3Gal α -O-スペーサー	B-1015	BSA	2.7
13	GalNAc β 1-4Gal β -O-スペーサー	B-1016	BSA	2.2
14	GalNAc β -O-スペーサー	B-1018	BSA	2.1
15	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -O-スペーサー	B-1019	BSA	6.1
16	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β -O-スペーサー	B-1020	BSA	4.4
17	Gal α 1-3Gal-O-スペーサー	B-1008	BSA	2.4
18	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -O-スペーサー	B-1009	BSA	2.5
19	Gal α -O-スペーサー	H-1021	HSA	3.3
20	Gal α 1-2Gal-O-スペーサー	H-1022	HSA	3.2
21	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-O-スペーサー	H-1025	HSA	2.3
22	Gal α 1-4Gal-O-スペーサー	H-1026	HSA	2.8
23	Gal α 1-3GalNAc α -O-スペーサー	H-1030	HSA	3.7
24	Gal β 1-3GalNAc α -O-スペーサー	H-1031	HSA	3.2
25	なし	Glycorex	BSA	6.9 (M)
26	なし	Glycorex	HSA	-

表3:イムノミクス用の手作業の小さなDMIライプラリを作成するために選択した複合糖質抗原を上記に示す。「タグ」の数字は出力ベクトルにおけるライプラリ成分の位置を示す(タグのコードではない。タグはさらに複雑である)。「抗原」は結合体における炭水化物配列を示す。「結合体」は、使用した特定の結合体の供給者を示す。カタログコードは全てグリコレックスカタログを参照している。「担体」は、炭水化物抗原が結合している担体タンパク質を示す。この場合、BSAはウシ血清アルブミンを示し、HSAはヒト血清アルブミンを示す。これらのタンパク質の同じバッチの非結合アリコートをタグ25および26にある対照として使用した。「Cvar」は、同じ実験における同じコードの複数のタグの読み取りの変動係数である。Cvarは、pan-IgG(FITC)ベクトルおよびIgM(rPE)ベクトルのCvarの平均である(IgGの抗原結合が少なすぎて定量できなかったことを明記してある場合を除く)。-は、どちらのIgクラスも有意な程度で抗原に結合しなかったことを示す。個体間での

10

20

30

40

50

分析Cvarの変化をもたらす、それぞれのタグに結合したシグナルの変化を反映するために、報告されたCvarは15人の個体からの平均であることに留意のこと(表1とは対照的に、この場合、分析Cvarは、参照試料によって示される全ての個体からの平均シグナルに左右される)。

【0159】

次いで、抗体ライブラリについて実施例1で説明したのと全く同様に、アルミニウムバーコードタグを用いて抗原ライブラリをタグ化した。オリゴ糖抗原はタンパク質骨格に付着して運ばれるので、抗体タンパク質とアルミニウムを結合するのに用いられた同じ化学作用によって、オリゴ糖/タンパク質結合体も取り付けられる。アルミニウムバーコードの付いたタグの異なるプールを各ウェルに分配した(各プールにおいて約 10^4 個の個々のタグ)。タグ化反応の終わりに、タグを回収し、穏やかな限界濾過によってリン酸緩衝食塩水で洗浄し、ウェル1個当たり $100\mu\text{l}$ のリン酸緩衝食塩水に再懸濁した。次いで、ウェルを全て一緒にして、 $100,000\text{タグ}/\text{ml}$ で合計 2×10^5 個の個々のタグを含む約 2ml のライブラリを得た。

【0160】

第2の段階では、15人の健常ボランティアからの血清試料を、試料1個あたり $20\mu\text{l}$ でV底マイクロタイタープレートウェルに直接分配した。次いで、 $20\mu\text{l}$ のライブラリを添加した(約2,000個の個々のタグ、ライブラリの個々の成分の数の100倍過剰量に相当する)。抗体結合の特異性を改善し、バックグラウンドを下げるために、非イオン性界面活性剤(最終濃度0.1%体積/体積のトワイーン20)も反応混合物に添加した。次いで、プレートを密封し、反応物を徹底的に混合し、15分間連続攪拌しながら室温でインキュベーションした。

【0161】

インキュベーションの終わりに、タグを回収し、バキュームマニホールド上で穏やかな限界濾過によって洗浄し、0.1%トワイーン20含有リン酸緩衝食塩水を洗浄液として一貫して使用した。次いで、ビーズを、0.1%トワイーン20と、異なる蛍光色素で標識したW HO規格マウスモノクローナル抗ヒトIgGクラス特異的抗体のそれぞれを含有するリン酸緩衝食塩水 $50\mu\text{l}$ に再懸濁した。この実験のために、本発明者らは、FITC標識抗pan-IgG抗体およびTRITC標識抗IgM抗体を使用した。それぞれの検出抗体は $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 最終濃度で存在した。次いで、プレートを密封および混合した後に、15分間連続攪拌しながら室温でインキュベーションした。

【0162】

第3の段階として、抗体を検出するために、蛍光顕微鏡を使用した。次いで、各ウェルからの反応物を、標準的なガラス顕微鏡スライドにパップペン(PAP pen)で書かれた直径1cmのウェルに分配した。カバーガラスをスライドの上に置き、蒸発しないように透明なマニキュア液を用いて密封した。次いで、スライドを蛍光顕微鏡の下に置き、直接照明の下でバーコード付きタグの位置を1つずつ突き止めた。それぞれのタグの場所を突き止めた時に、その2進コードを読み取り、記録した。次いで、フルオレセインチャンネルおよびローダミンチャンネルにおける蛍光量を、自動フィルターウィールチェンジャー(automated filterwheel changer)を用いて求めた。次いで、2つの別々の蛍光読み取り値を、それぞれのタグのバーコードと共に記録した。同じ2進コードを有する2つ以上のタグが各反応物にあった場合、2つ(またはそれ以上の)同一のタグからの蛍光読み取り値を平均した後に、イムノームプロファイルベクトルを報告した。各反応物について、約500個の個々のタグを読み取った。手動顕微鏡装置を使用すると、これは、分析試料1個あたり約1時間を要する。しかしながら、顕微鏡下で、それぞれのバーコード付きタグに結合した蛍光を読み取る自動装置が存在する。または、適切なフローサイトメーターを用いて、タグを読み取ることができる(実施例1を参照のこと)。

【0163】

10

20

30

40

【表4】

	1	2	3	4	5	Nac-lacA	6	GlvStor	7	Pk				
A	3	141	2	0	0	0	10	35	23	0	0	140	103	
B	21	116	1	1	0	13	1	6	24	57	0	0	2	7
C	14	30	6	39	0	0	4	13	40	108	0	0	107	410
D	13	45	2	42	0	0	0	2	36	7	0	0	119	125
E	11	20	6	33	0	0	3	7	48	43	0	0	0	68
F	1	113	3	14	0	3	282	44	35	151	0	0	1	31
G	22	52	4	552	1	2	25	15	53	52	33	244	75	134
H	7	30	8	2	0	0	4	15	55	70	0	0	142	99
I	23	43	3	1	0	1	0	10	73	189	0	0	53	86
J	2	94	2	10	3	1	1	27	35	68	0	0	238	113
K	21	32	1	11	0	0	96	27	101	200	0	1	62	321
L	5	48	2	15	0	0	94	54	20	84	0	0	201	231
M	5	39	2	12	0	0	0	11	97	43	0	0	137	371
N	11	34	4	6	0	0	68	43	28	42	0	0	142	122
O	6	37	4	6	0	0	1	31	28	46	0	0	221	960
P1	3	33	6	13	0	1	4	2	37	68	0	0	53	2
P2	3	42	5	15	0	0	3	1	42	60	0	0	68	2
P3	4	47	5	19	0	2	3	2	44	68	0	0	17	2
P4	3	37	5	15	0	1	3	2	42	61	0	1	69	2
P5	4	39	5	16	0	1	4	2	38	67	0	0	60	2
中央値	11	43	3	11	0	0	3	15	36	57	0	0	119	122
Cvar(anal)	2.2	2.1	2.1	2.5	-	11.9	5.5	4.1	3.3	2.7	-	-	2.2	2.2
Cvar(rm)	13.9	11.2	6.5	11.5	-	49.5	10.6	9.0	4.0	3.4	-	-	37.8	8.2
Cvar(indiv)	54	52	52	267	-	185	180	63	46	68	-	-	30	103
	8	9	10	11	12	13	14							
	P1	EColiR												
A	29	32	87	454	3	4	0	0	6	8	5	9	1	4
B	136	242	6	59	3	8	0	1	5	10	2	19	13	4
C	62	87	41	0	1	6	0	3	8	153	6	5	21	32
D	94	109	15	5	6	3	0	0	5	33	7	9	1	2
E	211	581	5	15	2	20	0	0	4	6	4	22	2	2
F	176	146	46	5	1	2	0	0	6	9	3	14	0	3
G	74	102	2	3	7	3	0	0	4	29	5	17	1	4
H	33	78	65	41	2	4	0	0	4	23	4	7	3	2
I	71	32	7	363	4	6	0	0	4	16	5	8	15	20
J	41	293	45	361	2	3	0	0	6	12	5	13	3	4
K	27	32	4	4	8	36	0	0	14	12	4	13	1	2
L	63	93	13	150	1	6	0	0	8	9	4	8	1	6
M	91	57	96	18	11	7	0	0	10	13	2	9	3	10
N	60	178	12	1	9	4	0	0	4	51	3	5	4	20
O	100	68	0	1	1	21	0	0	2	9	0	2	3	1
P1	103	143	56	21	3	6	0	0	4	38	1	10	4	13
P2	97	157	52	16	3	5	0	0	3	32	2	10	3	17
P3	104	155	48	18	1	5	0	0	4	40	1	12	5	14
P4	109	155	47	21	3	7	0	0	4	31	1	13	5	11
P5	102	160	46	18	2	3	0	0	3	33	1	11	3	16
中央値	71	93	13	15	3	6	0	0	5	12	4	9	3	4
Cvar(anal)	2.2	3.0	2.0	2.3	2.7	2.1	-	-	3.0	2.5	2.1	2.2	2.1	2.1
Cvar(rm)	2.0	1.2	6.3	9.2	34.6	26.4	-	-	12.2	8.9	35.2	9.9	22.9	14.7
Cvar(indiv)	59	97	100	149	44	78	-	-	35	130	7	40	106	101

10

20

30

40

	15 A		16 B		17 Di-aGal		18 Tri-aGal		19		20		21 Pentagal	
A	252	557	293	296	81	133	108	92	3	26	6	59	77	68
B	198	1098	461	607	119	62	830	456	4	10	14	21	465	696
C	1	127	569	113	67	31	46	30	1	22	84	32	43	881
D	438	231	213	458	33	29	138	44	2	37	25	13	18	324
E	0	15	147	1436	47	39	1160	124	4	467	146	148	436	245
F	0	38	336	209	82	108	32	161	5	34	5	54	58	89
G	69	1664	0	3	16	19	40	67	6	40	26	12	34	58
H	7	11	289	469	46	72	242	287	2	20	3	34	82	39
I	552	208	119	991	13	84	161	132	5	11	27	99	65	218
J	1	4	460	526	35	127	149	536	4	30	3	12	12	94
K	0	46	238	672	12	27	67	87	6	16	30	38	29	475
L	297	794	301	219	104	75	553	148	5	44	2	102	25	264
M	0	43	262	816	10	127	69	1317	5	27	6	54	24	405
N	0	3	290	655	64	40	81	562	3	12	1	44	45	78
O	360	288	452	200	422	135	409	589	7	17	335	422	5	482
P1	278	462	221	627	64	117	162	442	13	20	5	49	70	268
P2	256	398	292	556	82	109	178	409	11	23	7	42	73	242
P3	292	450	165	691	73	102	155	471	11	27	6	27	66	209
P4	291	426	244	603	79	116	159	477	12	26	6	46	71	253
P5	258	511	268	617	89	92	177	504	10	26	5	48	84	257
中央値	7	127	290	469	47	72	138	148	4	26	14	44	43	245
Cvar(anal)	5.5	6.7	4.2	4.6	2.3	2.4	2.4	2.6	3.6	3.0	3.2	3.3	2.3	2.4
Cvar(rm)	0.8	2.7	16.2	3.3	9.9	7.3	4.0	5.3	6.4	8.8	11.2	18.0	7.0	6.8
Cvar(indiv)	125	134	30	66	120	48	116	103	31	200	172	114	146	77

10

20

30

40

	22		23		24		25 BSA		26 HSA	
A	37	311	4	17	19	177	0	0	0	0
B	14	135	9	39	32	31	0	3	0	0
C	13	1915	51	194	51	31	0	17	0	0
D	4	7	37	50	7	16	0	2	0	0
E	107	608	68	552	92	166	0	1	0	0
F	20	6	13	318	14	20	0	9	0	0
G	74	12	16	47	97	14	0	2	0	0
H	22	15	5	104	39	8	0	3	0	0
I	40	4	147	38	33	144	46	191	0	0
J	34	299	22	113	107	307	0	1	0	0
K	11	10	18	53	39	59	0	0	0	0
L	19	1	12	65	29	39	0	3	0	0
M	4	4	11	76	53	35	0	1	0	0
N	29	2	109	262	126	34	0	1	0	0
O	22	54	154	175	84	126	0	0	0	0
P1	4	14	38	209	26	172	0	3	0	0
P2	3	11	46	248	22	174	0	2	0	0
P3	4	10	52	238	19	188	0	2	0	0
P4	3	13	59	258	25	169	0	3	0	0
P5	4	12	54	250	23	170	0	4	0	0
中央値	22	12	18	76	39	35	0	2	0	0
Cvar(anal)	2.7	2.9	2.8	4.6	3.4	3.0	-	6.9	-	-
Cvar(rm)	12.5	10.3	13.4	3.3	8.5	1.4	-	23.0	-	-
Cvar(indiv)	77	208	98	95	56	102	-	282	-	-

表4: 「A」～「O」と表示した15人の健常ドナー(男性7人および女性8人、23～37歳)の静脈血から調製した血清試料のDMIによるイムノームデータを示す。別の個体(男性、35歳)からの1つの血清試料を5つの複製アリコート(P1～P5)に分け、同様にアッセイした。それぞれのタグについて、左側の列にpan-IgG(FITC)の平均結合蛍光、右側の列にIgM(rPE)の平均結合蛍光を示す。それぞれのタグの変動成分が分析され、示される。すなわち、「Cvar(a

50

nal)」は、同じ実験におけるタグ間の分析変動である。「Cvar(rm)」は5つの複製アリコートの反復測定変動であり、分析変動を差し引いて示される。「Cvar(individ)」は個体間の変動であり、分析変動と反復測定変動の両方を差し引いて示される。Cvar(individ)値が高いタンパク質は最も大きな診断情報を含む。タグの多くはおおよそ対数正規分布を示し、より正確な変動成分計算前の適切なデータ対数変換であったことに留意のこと。さらに、データはアウトライナーの影響を大きく受けている。これらのアウトライナーの影響は変換によって弱められたが、より大きなイムノームデータセットが集められたら、ワインゾライジング(WinZorising)が適切であるかもしれない。

【0164】

結果として得られた15人の個体のベクトルを表4に示す。それぞれの抗原タグについて、2つの列がある。左側の列はpan-IgGパラメータを含み、右側の列はIgMパラメータを含む。これらのベクトルは試験された各個体の(炭水化物抗原に焦点が合わせられた)IgG/Mイムノームプロファイルに相当し、様々な調査または分析目的に使用することができる。

【0165】

本実施例において、本発明者らは、個体の約半分においてタグ15に結合したIgG抗体が高濃度であり、IgM抗体も高濃度であることに気づいた(表4の囲みを付けた値)。このタグには、A血液型抗原に相当する炭水化物構造が結合している。抗体濃度が低い個体はA抗原を発現しているはずであり、A血液型またはAB血液型である。抗体濃度が高い個体はA抗原を発現しているはずではなく、O血液型またはB血液型である。実際に、同じ理由を、B血液型抗原に相当する炭水化物構造が結合しているタグ16からのデータに当てはまることができる。これらの2つの列から、個体Fは血液型Aであるのに対して、個体Gは血液型Bであり、個体Lは血液型Oであると決定することができる。試験された全ての個体に対して、同じ演繹法を適用することができる。

【0166】

プロテオミクス(実施例1)におけるDMIの使用と同様に、本発明者らはイムノームデータセット(表3および4)の中での変動原因の詳細分析を行った。最初に、本発明者らは、同じ実験において同じコードを有する異なるタグからの蛍光読み取りの範囲から計算された、この方法の分析再現性(Cvar(anal))を評価した。プロテオーム分析とは異なり、シグナルの絶対レベルが個体間で変化するので、Cvar(anal)は個体間で変化する。従って、報告されたCvar(anal)値は15人の試験個体の平均値である。分析再現性は非常に良い(ほとんどのタグについて5%未満であり、個々のイムノアッセイより優れている)。

【0167】

さらに、試験試料のうちの5つは同じ採血からの複製アリコート(PI～P5,表4の陰をつけた部分)であった。これを用いると、反復測定再現性(Cvar(rm))を評価することができる。Cvar(rm)は、分析変動(Cvar(anal))が差し引かれて報告されている。2つ以上の試験試料においてシグナルが検出された22種類全ての抗原タグのCvar(rm)中央値は9%(範囲0.8%～49.5%)であった。この値はプロテオミクスへのDMIの適用よりわずかに劣っている。しかしながら、この理由は、1つには、多くの個体について多くのタグにおいて得られる非常に低いシグナルにある。すなわち、この技法の検出限界に近い低いシグナルが、低い反復測定再現性で常に検出される。しかしながら、真の個体間変動成分であるCvar(individ)はプロテオームベクトルよりイムノームベクトルの方が大きい(表4と表2を比較せよ)。これは、診断モデリングに有用な変動成分である。結果として、Cvar(rm)/Cvar(individ)で概算される、この試験の真の診断有用性は2種類のDMI用途において非常に似ている。

【0168】

それぞれのタグのシグナルは対数正規分布に近く、データセットに多数の極端なアウトライナーもあることに留意することが重要である。結果として、さらに徹底した分析には、X行列のさらなる調査の前のデータセットの対数変換(恐らく、ワインゾライジング(WinZorising))が必要である。

【0169】

実施例4:DMIに基づくイムノミクス用の大きなペプチド抗原ライブラリの調製

10

20

30

40

50

大規模ペプチド抗原ライプラリを作成するために、以下のストラテジーを採用した。すなわち、マスターライプラリに相当する9アミノ酸ペプチドを選択した。しかしながら、このマスターライプラリを構成する 20^9 (約 5×10^{11})個の配列バリエントがあり、これらを全てDMI抗原ライプラリにおいて固有に示すには数が多すぎる。従って、扱いやすい大きさのライプラリを作成するために、アミノ酸を、特性の類似性(主に、荷電および疎水性)に基づいて5個ずつ4つの群に分けた。選択された群は以下の通りであった。群1(荷電アミノ酸)Arg、Lys、His、Asp、Glu、群2(小さな疎水性アミノ酸)Gly、Ala、Leu、Ile、Val、群3(大きな疎水性アミノ酸)Met、Phe、Pro、Tyr、Trp、および群4(親水性アミノ酸)Ser、Thr、Asn、Gln、Cys。別の群分けも採用することができ、イムノミクスにお適切なわざかに異なるライプラリを生じさせる。次いで、コンビナトリアル固相合成のために、群内の5種類のアミノ酸の等モル混合物を1つの試薬として処理した。従って、ライプラリに対してちょうど 4^9 個の可能な成分(262,144個の成分)がある。しかしながら、それぞれの「成分」は1種類のペプチド配列でなく、 5^9 (160万)個の可能な配列バリエントの混合物であることに留意のこと。しかしながら、アミノ酸の群分けのために、関連配列は同じ成分プールにある可能性が高い。

10

20

30

40

【0170】

当技術分野において周知の方法を用いた固相合成によって、262,144個の成分プールを合成した。簡単に述べると、それぞれのアミノ酸群を固相樹脂のバッチに結合させた。次いで、結合樹脂バッチそれぞれを4つに分け、適切に保護されたアミノ酸を用いて4つのアミノ酸群のうちの1つと反応させた。次いで、合計262,144個の樹脂バッチが作成されるまで、このプロセスを繰り返した。次いで、それぞれの樹脂バッチを同時に切断および脱保護して、それぞれが約1mgのペプチドを含む690個のマイクロタイープレート(プレート1個あたり384ウェル)を得た。

【0171】

それぞれの個々のウェルに、異なるアルミニウムバーコードタグプールを添加し(それぞれの場合で、約 10^6 個の同一の個々のタグ)、ペプチドをタグに結合させた。次いで、タグを取り出し、穏やかな限外濾過によって洗浄し、 $100 \mu\text{l}$ のリン酸緩衝食塩水に再懸濁した。次いで、ライプラリの全ての成分を一緒にして、約 10^{12} 個の個々のタグを含む26リットルのプールライプラリ(約 10^7 タグ/ml)を得た。次いで、このライプラリを穏やかな限外濾過によって250mlの最終体積まで濃縮した(10^8 タグ/ml)。この最終体積は、実施例3の場合のように試料1個あたり $20 \mu\text{l}$ で使用するのに適した(このライプラリを用いて、合計12,500以上の試料を測定することができる)。

30

【0172】

本実施例は、可能性のある全ての9アミノ酸ペプチド抗原を認識する抗体についての情報を含む高データ密度イムノームベクトルを作成することができる非常に大きな抗原ライプラリの作成が可能なことを証明する(全ての抗原が別個のライプラリ成分として個々に識別できるとは限らないが、全ての抗原が存在する)。このライプラリは、実施例3において小さな炭水化物抗原ライプラリについて説明したのと全く同様に、30分を要する手順において各個体の2,359,296個の個々のデータポイントを含むイムノームプロファイルベクトルを得るのに使用することができる。

【0173】

実施例5:冠状動脈性心疾患を診断するためのDMIによるイムノームプロファイルの使用

本願において述べられたDMI法を用いてイムノームプロファイルを得る1つの目的は、疾患の存在を診断するのに使用することができる、様々な個体の高データ密度記述ベクトルを得ることである。このアプローチは、疾患を診断するための、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、またはメタボノミクスの使用と全く似ている(例えば、Brindle et al.(2002)Nature Medicine 8:1439を参照のこと)。

【0174】

第1の段階では、疾患状態が既知の一連の個体のDMIによるイムノームプロファイル入手する。本実施例では、本発明者らは、半分が重篤な冠状動脈疾患(血管造影によって確

50

認された)を有し、半分が正常な冠状動脈を有することが分かっている30人の個体からの血清試料を使用した。これらの30人の個体は、以前に述べられた個体のコホートの無作為に選択されたサブセットであった(Brindle et al.(2002)Nature Medicine 8:1439)。

【0175】

第2の段階では、疾患の存在と固有にかつ再現可能に関連している、イムノームプロファイル内の任意のシグネチャを特定するために、パターン認識法を使用する。

【0176】

第3の段階では、疾患状態が未知の個体からのイムノームプロファイルを作成し、予測を行った後に、最も有用であると広く認められている血管造影法を用いて疾患状態を確かめることによって、この試験の診断能力を評価する。

10

【0177】

A:イムノームプロファイルの作成

本研究のために、本発明者らは、可能性のある全てのオクタペプチド配列(約250億個の配列)からなるオリゴペプチド抗原ライプラリを使用することにした。広範囲にわたる配列有効範囲を保持しながら、このライプラリを扱いやすい項目数に減らすために、本発明者らは、実施例4に記載の縮重サブライプラリを調製する原理を採用した。実施例4では26,000個以上のサブライプラリ(それぞれ、ほぼ200万個の配列を含む)からなるライプラリを説明したが、ここでは、本発明者らは、256個のサブライプラリ(それぞれ1億個の配列)からなるより簡単なライプラリを作成した。これを行うために、実施例4で使用した4つの群とは反対に、20種類のタンパク質新生アミノ酸を、表5に示したように2つだけの群に分けた。

20

【0178】

【表5】

群1	群2
関心あり([I])	関心なし([B])

アルギニン	グリシン
リジン	アラニン
ヒスチジン	バリン
グルタミン酸	ロイシン
アスパラギン酸	イソロイシン
プロリン	メチオニン
システイン	アスパラギン
セリン	フェニルアラニン
スレオニン	チロシン
トリプトファン	グルタミン

30

40

【0179】

次いで、ライプラリを標準的な固相合成化学を用いて合成し、各サブライプラリにおいて約50mgのペプチドを得た。次いで、(疎水性配列および親水性配列が等しく確実に溶解するように)それぞれのサブライプラリをDMSO 1mLに溶解し、次いで、希釈して、想像(notional)10mM保存液(ライプラリを構成するオクタペプチドの平均分子量が880であることに基づく)を得た。

【0180】

50

次いで、2種類の方法:(a)固相イムノアッセイおよび(b)マルチプレックス溶液アッセイのうちの1つによって、イムノームプロファイルを得た。

【0181】

固相イムノアッセイを行うために、サプライプラリを100mM炭酸ナトリウム(pH9.6)で個々に希釈して、50μlに0.86pmoleのペプチドを得た。次いで、高タンパク質結合ELISAプレート(ヌンクマキシソープ)を希釈サプライプラリで一晩コーティングした(264ウェル、それぞれのサプライプラリでコーティングされた1個のウェルと、炭酸ナトリウム緩衝液のみでコーティングされたさらに8個のウェルが、1つの血清試料のイムノームプロファイルを測定することができる1つの実験を構成した)。

【0182】

コーティングの後、ウェルを徹底的に吸引することによって、溶液を捨て、次いで、ウェルを洗浄緩衝液(0.05%トウィーン20を含むダルベッコPBS)で3回洗浄した。次いで、最初に、ウェルを、5%スクロースおよび5%トウィーン20を含むダルベッコPBS(第1のブロック緩衝液)とインキュベーションし、次いで、1%免疫グロブリンを含まず、ウシ血清アルブミンを含むダルベッコPBS(第2のブロック緩衝液)とインキュベーションすることによって、非特異的結合をブロックした。次いで、ウェルをさらに3回洗浄した。

【0183】

分析しようとする血清試料を第2のブロック緩衝液で1:3.3に希釈し、100μlを264個のコーティングウェルのそれぞれに分配した。血清中の抗体と抗原サプライプラリが結合するように試料を振盪しながらウェル内で室温で2時間インキュベーションした。インキュベーションの終わりに、残っている試料を捨て、結合しなかった抗体を全て除去するために、ウェルを5回洗浄した。次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたヒト免疫グロブリン-G(IgG)特異的ロバ抗体(ジャクソンイムノサイエンティフィック(Jackson ImmunoScientific))を用いて、捕捉抗体を検出した。この抗体は、IgMを含む他のどのヒト免疫グロブリンクラスも認識せず、ほぼ等しい親和性で5種類のIgGサブクラス(IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、およびIgG4)を認識する。検出抗体を第2のブロック緩衝液で1:5000に希釈し、200μlを各ウェルに分配した。次いで、プレートを振盪しながら室温で1時間インキュベーションした。

【0184】

このインキュベーションの終わりに、検出抗体溶液を捨て、ウェルを3回洗浄した。次いで、K-Blue(西洋ワサビペルオキシダーゼ基質)を添加し、(酸性化の後の)黄色生成物の量を分光光度法によって測定することによって、結合抗体の量を定量した。発色基質の吸光度は、特定の抗原サプライプラリに結合することができる血清試料中のIgG抗体の量に比例した。サプライプラリでコーティングされたウェルの各吸光度から、炭酸ナトリウム緩衝液のみでコーティングされたウェルの平均吸光度を差し引き、次いで、結果として得られた、サプライプラリ番号に対する正味の吸光度をプロットすることによって、イムノームプロファイルをプロットした。一般的に、I群アミノ酸(表5)に富む親水性配列は、プロファイルの左側にある小さな番号のサプライプラリにあるのに対して、B群アミノ酸(表5)に富む疎水性配列はプロファイルの右側にある。

【0185】

液相マルチプレックスアッセイを行うために、サプライプラリをPBSで個々に希釈して、500μlに86pmolのペプチドを得た。100万個のAPTESコーティングウルトラプレックス(UltraPlex)アルミニウムバーコード(スマートビーズリミテッド)を遠心分離(10,000×g;10秒)によってペレット化し、次いで、それぞれのサプライプラリに対して異なるバーコードを用いて、それぞれのサプライプラリに添加した。次いで、回転シェーカー(1分につき約10回チューブを反転させる)において、溶液を4℃で一晩インキュベーションした。

【0186】

コーティングの後、バキュームマニホールドでフィルタープレートを用いてバーコードをペレット化し、洗浄緩衝液(0.05%トウィーン20含有ダルベッコPBS)で3回洗浄した。次いで、バーコードを、1%免疫グロブリンを含まずウシ血清アルブミンを含むダルベッコP

10

20

30

40

50

BS(ブロック緩衝液)と室温で1時間インキュベーションすることによって、非特異的結合をブロックした。次いで、バーコードをさらに3回洗浄した。最後の洗浄の後に、それぞれのサプライラリを100 μ lのPBSに再懸濁し、256個全てのサプライラリを一緒にし、25.6mlのライラリ溶液を得た。次いで、ライラリをペレット化し、1mlのPBSに再懸濁した。

【0187】

分析しようとする血清試料を希釈することなく、フィルター底マイクロタイプレートに200 μ l/ウェルで分配した。10 μ lのライラリ溶液(バーコードの付いた要素が十分に混合され、1mLストックに徹底的に懸濁されるように注意する)をそれぞれの血清試料に添加し、血清中の抗体が抗原サプライラリに結合するように回転シェーカーにおいてウェルを室温で2時間インキュベーションした。インキュベーションの終わりに、ライラリ要素をペレット化し、結合しなかった抗体を全て除去するために、バキュームマニホールドを用いて5回洗浄した。次いで、アレキサ(Alexa)488蛍光色素で標識されたヒト免疫グロブリン-G(IgG)特異的ロバ抗体(ジャクソンイムノサイエンティフィック)を用いて、捕捉抗体を検出した。この抗体は、IgMを含む他のどのヒト免疫グロブリンクラスも認識せず、ほぼ等しい親和性で5種類のIgGサブクラス(IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、およびIgG4)を認識する。検出抗体をブロック緩衝液で1:500に希釈し、200 μ lを各ウェルに分配した。次いで、プレートを振盪しながら室温で1時間インキュベーションした。

【0188】

このインキュベーションの終わりに、ライラリ要素をペレット化し、バキュームマニホールドを用いてウェルを3回洗浄した。それぞれのバーコード付き要素に関連したアレキサ488蛍光量を測定するために、蛍光顕微鏡を用いて結合抗体の量を定量した。256個のサプライラリコードのそれぞれの少なくとも10個のバーコード付きビーズの蛍光(相対蛍光単位, RFU)を測定し、平均蛍光は、特定の抗原サプライラリに結合することができる血清試料中のIgG抗体の量に比例するとみなした。サプライラリでコーティングされたウェルの各吸光度から、炭酸ナトリウム緩衝液のみでコーティングされたウェルの平均吸光度を差し引き、次いで、結果として得られた、サプライラリ番号に対する正味の吸光度をプロットすることによって、イムノームプロファイルをプロットした。一般的に、I群アミノ酸(表5)に富む親水性配列は、プロファイルの左側にある小さな番号のサプライラリにあるのに対して、B群アミノ酸(表5)に富む疎水性配列はプロファイルの右側にある。

【0189】

冠状動脈性心疾患を有する個体からの代表的なイムノームプロファイル(上左パネル)および正常冠状動脈を有する個体からの代表的なイムノームプロファイル(下左パネル)を図5に示す。示したプロファイルは固相イムノアッセイ法によって作成されたが、溶液マルチプレックスアッセイを用いて、非常に良く似たプロファイルが得られる(256個のサプライラリ要素全体にわたって $r=0.742$)。

【0190】

ほとんどの健常個体について、最初の8個のサプライラリ(「I」群アミノ酸に富む親水性アミノ末端配列を含む)ならびに範囲120~180にあるライラリに対する抗体結合が優勢であるように見られる。この「ベースライン」パターンの上に、非常に強力なシグナルを示す(場合によっては、アッセイのダイナミックレンジを上回る)多数の(約10個の)個々のサプライラリがある。予備分析から、「ベースライン」パターンは経時的にかつ個体間で比較的安定であるのに対して、「ピーク」はかなり変化することが示唆されている。これは、恐らく、病原体攻撃に反応して目下増殖している抗体クローニングの特異性を反映している。

【0191】

B:パターン認識法の適用

重篤な冠状動脈疾患を有する15人の個体および正常冠状動脈を有する15人の個体からのイムノームプロファイルを、疾患特異的パターンについて主成分分析(PCA)を用いて分析

10

20

30

40

50

した。PCAは、観察(n)よりさらに多くの測定パラメータ(k)を有するデータセット中のクラス特異的シグネチャの認識に最適なメガ変量統計法である。本発明者らのデータセット($k=256, n=30$)の場合、PCAによって、第1主成分において2つの群が完全に分離することが明らかになった(図5,右パネル)。

【0192】

PCAは、非監督パターン認識法(これは、図5に示したモデルが、どの個体の疾患状態の知識もなく作成されたことを意味する)であり、結果として、オーバーフィッティングに対して堅牢であり、外部バリデーションを必要としない。監督パターン認識法(例えば、部分的最小二乗判別分析(PLS-DA))を適用することができ、これもまた2つの群をうまく分離する。しかしながら、このようなモデルは外部バリデーションを必要とし、これによって、モデルを作成するのに用いられなかったプロファイルが、そのモデルに対して質問される。モデルが堅牢であれば、これらの外部バリデーションプロファイルを正しく予測するが、モデルがオーバーフィットされれば、外部予測は内部予測よりかなり悪い。

10

【0193】

図5に示したPCAモデルを用いて、冠動脈造影をまだ受けていない個体の疾患状態を予測することが可能である。個体のイムノームプロファイルを前記のAに記載の方法によって入手し、そのプロファイルを図5に示したモデルと比較して使用する。新たなプロファイルの位置に応じて、本発明者らは個体の疾患状態を明確に予測することができる。このような予測を行うために、当技術分野において周知の多数の任意の方法(例えば、クーマンプロット)を使用することができる。図5に示したモデルは、冠状動脈疾患の存在についての感度の高くかつ特異的な診断試験であるように、高い陽性反応予測値および陰性反応予測値(>95%と見積もられる)を有する。

20

【0194】

当技術分野において周知の一連の他のパターン認識法を、本発明者らがここで作成したイムノームデータセットに適用することができる。パターン認識法として、ジェネティックコンピューティング、サポートベクトルマシン、線形判別分析、変数選択アルゴリズム、およびウエーブレット分解が挙げられるが、これに限定されない。さらに、パターン認識アルゴリズムを適用する前に、当技術分野において周知の一連の前処理フィルターをデータに適用することができる。前処理フィルターとして、直交シグナル補正、ビンニング、適応ビンニング、スケーリング、およびフーリエ変換が挙げられるが、これに限定されない。それぞれの場合において、利用可能な様々な技法を一緒にまたは組み合わせて実験的に適用することによって、どの方法が、疾患個体のイムノームプロファイルと健常個体のイムノームプロファイルを最もよく分離するかを確かめることが必要である。

30

【0195】

イムノームプロファイルの使用を冠状動脈疾患の診断に適用する本発明の方法は既存の疾患診断法より優れている。本発明の方法は非侵襲的試験であり、従って、合併症のリスク、さらには、最も有用であると広く認められている血管造影検査に付随する死亡を防ぐ。本発明の方法の感度および特異性は、既存のユニパラメトリック(uniparametric)血清マーカー(例えば、コレステロール、LDL、HDL、トリグリセリド、CRP、フィブリノゲン、またはPAI-1)と比較して、これらの尺度がマルチパラメトリックモデル(例えば、PROCAMモデル)において別々に考えられても一緒に考えられても、かなり優れている。

40

【0196】

本発明の方法はまた、現在開発されている他の高データ密度診断プラットフォームより優れている。これらのうち、パブリックドメインにおいて述べられた最も感度の高くかつ特異的な試験は、Brindleおよび同僚のNMRに基づくメタボノミクス試験(Brindle et al.(2002)Nature Med.8:1439)である。NMRに基づく試験および本発明のイムノミクス試験は両方とも>95%の感度および特異性を報告しているが、2つの群の分離は、メタボノミクスデータセットよりイムノミクスデータセットの方が優れている。これは、メタボノミクスデータセットでは、相関のないノイズをデータ行列から除去するために直交シグナル補正フィルターを適用した後にしか2つの群が完全に分離されないという事実によって証明され

50

る。イムノミクスデータ行列の場合にはこのようなOSCの適用は必要とされず、フィルターにかけられていないPCAモデルの第1主成分において2つの群が完全に分離される。この数学的な議論は目視検査によって完全に裏付けられる。すなわち、対応するNMRによる代謝プロファイルより大きな程度で、疾患個体のイムノームプロファイルは健常個体のイムノームプロファイルとは異なる(図5,左パネルと、Brindle et al.(2002)Nature Med.8:1439)の図1aを比較のこと)。

【0197】

DMIによるイムノミクスには、同等の感度および特異性のある他の任意の方法(メタボノミクス、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、またはプロテオミクスでも)より実質的に低いコストで診断を行うというさらなる利点がある。メタボノミクス(値段が50万ポンド以上の特殊なNMR分光計を必要とする)、ゲノミクス(遺伝子チップ技術を必要とする)、およびプロテオミクス(従来法では、質量分析を備えた2Dゲル電気泳動または液体クロマトグラフィーを必要とする)とは対照的に、DMIによるイムノミクスは、標準的な臨床診断室に存在する装置を使用し、容易に調製される試薬を用いて行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【0198】

【図1】本発明の2つの態様の模式図。A:関心対象のタンパク質に対する抗体のライブラリが構築される。このようなライブラリは、試験されている試料中のタンパク質を高度に代表するものであり、(ライブラリ全体において、同じタンパク質に対する抗体が全体でわずかな回数しか生じないように)低度の重複性を有さなければならない。次いで、このライブラリは、半導体製造技術によって作成されたアルミニウムバーコードタグを使用するスマートビーズプラットフォームなどの一連の市販タグ化技術の1つを用いてタグ化される。次いで、試験標本は、適切な標識(例えば、蛍光マーカー)で標識されている参照標本と混合される。次いで、試験試料および参照試料の混合物はタグ化抗体ライブラリとインキュベーションされ、そのコグネイト抗体に結合する標識タンパク質の量は、非標識試験試料に存在する同じタンパク質の量の影響を受ける。試験試料中のタンパク質濃度が高ければ、タグ化抗体に結合する標識の量は減少するのに対して、試験試料中のタンパク質濃度が低ければ、タグ化抗体に結合する標識の量は増加する。次いで、ライブラリは、タグとバーコードの両方を読み取り、結合した蛍光標識の量を定量することができる研究用フローサイトメーターに通される。このアプローチは、15分で100万までのデータポイントを作成することができる場合がある。抗体ライブラリの重複性が非常に低くければ、これは言い換えると、10万個のタンパク質の濃度が相対的に測定されるということである。作成されたタンパク質プロファイル(それぞれのタグ化抗体に結合した蛍光の相対レベルに相当する多くの数値を含むベクトル)は従来のメガ変量パターン認識法によって分析することができ、試験されている試料クラスのタンパク質「フィンガープリント(fingerprint)」をもたらす。B:抗原ライブラリが作成され、Aのタグと同様のタグに結合される。次いで、このライブラリはヒト血清試験試料に曝露され、血清中の抗体が抗原ライブラリに結合する。次いで、異なるフルオロフォアで標識された抗Ig抗体の標準化溶液を添加することによって、結合した全てのヒト免疫グロブリンが検出される。例えば、緑色フルオロフォアであるフルオレセインで標識された抗Igおよび赤色フルオロフォアであるローダミンで標識された抗IgMを使用することによって、それぞれの抗原に結合したそれぞれの免疫グロブリンサブクラスの量を同時に定量することができる。

【図2】本文に記載のようにフルオレセインイソチオシアネートでタンパク質を標識した後の代表的な参考試料のクロマトグラム。標識試料はセファデックス(Sephadex)G25カラムにアプライされ、溶出液が280nm(A280)および450nm(A450)でモニタリングされる。標識タンパク質は最初に溶出し(約10~20ml)、A280およびA450が高い。遊離標識はもっと後になつて広いピークで溶出し、A480よりA450が非常に高い。

【図3】表2から得られたデータに基づく、個体AのDMIによるプロテオームプロファイルのグラフ図。起点からのバーの高さは、この個体によって示される母分散のパーセントを表す。色の濃さは1任意単位からのシグナルの絶対偏差を表す。大きな濃い色の囲みは個

10

20

30

40

50

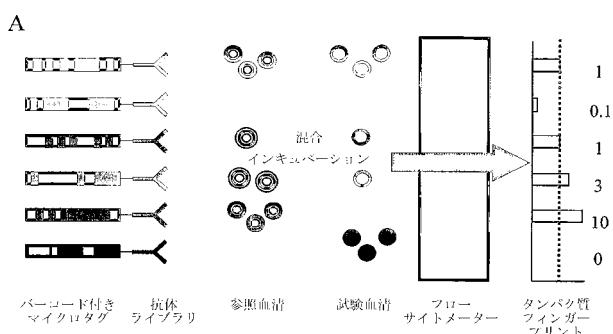
体の診断情報の大部分を含んでいる。

【図4】正の選択(選択表面のタンパク質密度が低い)を行った後に、負の選択(選択表面のタンパク質密度が高い)を行った反復実験の、ファージライブリの偏りに及ぼす影響。血清アルブミン(A)もしくはフィブリノゲン(B)またはPAI-1(C)もしくはTGF-P(D)へのファージ結合の直接ELISAによって、式 $(A+B)/(C+D)$ (範囲0~1の小数部としての直接ELISA結果を表し、最大半量シグナルを得るのに必要な総ファージ濃度に相当する)に従って、偏りを計算した。エラーバーは、AおよびBと同じパラメータの推定値であると仮定し、CおよびDと同じパラメータの推定値であると仮定することによって計算されたSEDである。4回のこの選択プロトコールによって、このライブリのバイアス因子が約1/8に減少した。

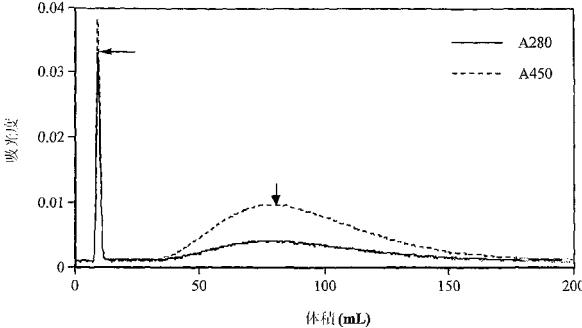
【図5】代表的な健常個体からの256ポイントタイムノームプロファイルを上左パネルに示す。この試料中の抗体の大部分は、プロファイルのかなり左側で抗原と反応している(サプライブリ1-8)。対照的に、代表的な心疾患患者からの256ポイントタイムノームプロファイル(下左パネル)は、プロファイルの右側で多くのサプライブリとの反応性を示す。パターン認識分析(PLS-DA;右側パネル、=疾患、=健常)は、2つの群が第1主成分において完全に分離されているので、これらの違いによって心疾患の存在が完全に診断されるこ

10

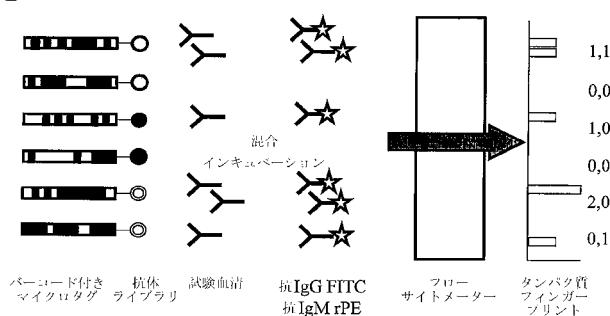
【図1】



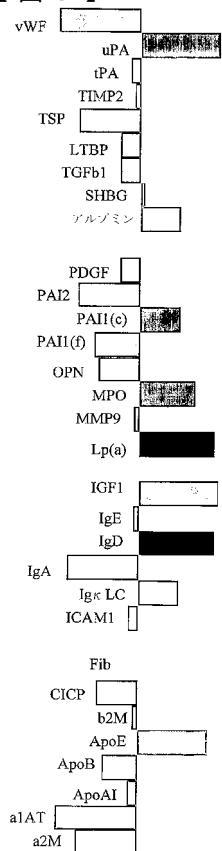
【図2】



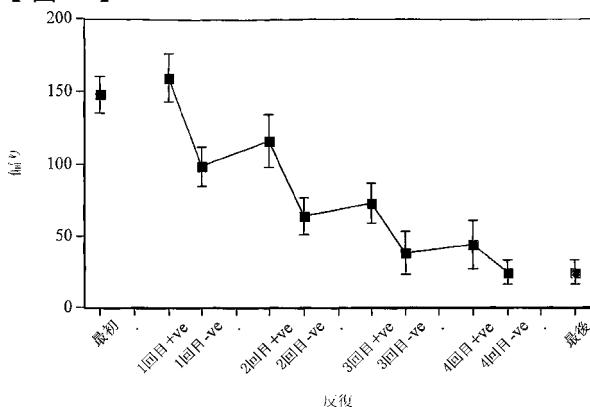
B



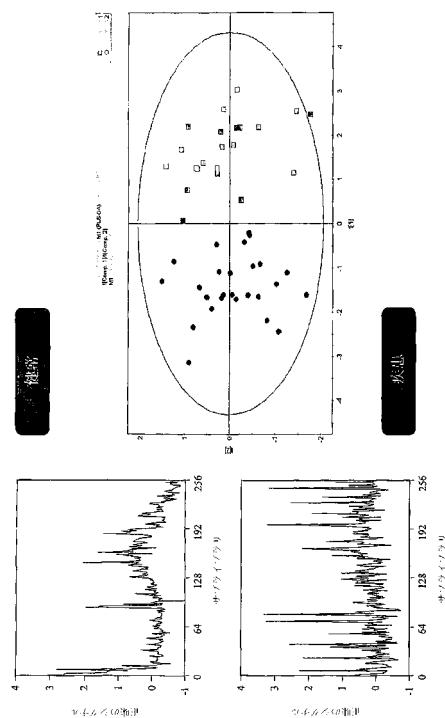
【図3】



【図4】



【図5】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT																			
				International Application No PCT/GB2004/001016															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 G01N33/53 B01J19/00 C12N15/10 C07K7/00																			
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) IPC 7 G01N B01J C12N																			
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE																			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 99/39210 A (MILLER SAMUEL ; HUMPHERY SMITH IAN (AU)) 5 August 1999 (1999-08-05) abstract; claims</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-12</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">HAAB B B ET AL: "PROTEIN MICROARRAYS FOR HIGHLY PARALLEL DETECTION AND QUANTITATION OF SPECIFIC PROTEINS AND ANTIBODIES IN COMPLEX SOLUTIONS" GENOME BIOLOGY (ONLINE), XX, GB, vol. 2, no. 2, 2001, page COMPLETE, XP001147826 ISSN: 1465-6914 abstract</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-12</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 00/07024 A (BUGELSKI PETER JOHN ; YALLOP RHIANNON (GB); SMITHKLINE BEECHAM PLC (GB) 10 February 2000 (2000-02-10) the whole document</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-12</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center; padding: 2px;">-/-</td> </tr> </tbody> </table>					Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 99/39210 A (MILLER SAMUEL ; HUMPHERY SMITH IAN (AU)) 5 August 1999 (1999-08-05) abstract; claims	1-12	X	HAAB B B ET AL: "PROTEIN MICROARRAYS FOR HIGHLY PARALLEL DETECTION AND QUANTITATION OF SPECIFIC PROTEINS AND ANTIBODIES IN COMPLEX SOLUTIONS" GENOME BIOLOGY (ONLINE), XX, GB, vol. 2, no. 2, 2001, page COMPLETE, XP001147826 ISSN: 1465-6914 abstract	1-12	X	WO 00/07024 A (BUGELSKI PETER JOHN ; YALLOP RHIANNON (GB); SMITHKLINE BEECHAM PLC (GB) 10 February 2000 (2000-02-10) the whole document	1-12	-/-		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																	
X	WO 99/39210 A (MILLER SAMUEL ; HUMPHERY SMITH IAN (AU)) 5 August 1999 (1999-08-05) abstract; claims	1-12																	
X	HAAB B B ET AL: "PROTEIN MICROARRAYS FOR HIGHLY PARALLEL DETECTION AND QUANTITATION OF SPECIFIC PROTEINS AND ANTIBODIES IN COMPLEX SOLUTIONS" GENOME BIOLOGY (ONLINE), XX, GB, vol. 2, no. 2, 2001, page COMPLETE, XP001147826 ISSN: 1465-6914 abstract	1-12																	
X	WO 00/07024 A (BUGELSKI PETER JOHN ; YALLOP RHIANNON (GB); SMITHKLINE BEECHAM PLC (GB) 10 February 2000 (2000-02-10) the whole document	1-12																	
-/-																			
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.																	
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but 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		Date of mailing of the International search report																	
24 September 2004		30.03.05																	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stricker, J-E																	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inte nal Application No PCT/GB2004/001016
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BRINDLE JOANNE T ET AL: "Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabonomics."</p> <p>NATURE MEDICINE, vol. 8, no. 12, December 2002 (2002-12), pages 1439-1444, XP002975960 ISSN: 1078-8956 cited in the application abstract</p> <p>-----</p>	
P,X	<p>EP 1 319 954 A (CT NAT DE GENOTYPAGE) 18 June 2003 (2003-06-18) abstract; claims</p> <p>-----</p>	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2004/001016

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-12

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/ GB2004/001016

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-12

Methods for determining the relative abundance of a plurality of proteins or for detecting a plurality of immunoglobulins.

2. claims: 13-21, 41-44

Mixture of peptides, library and kit containing a plurality of antigens or a library of peptides

3. claims: 22-40

Method of detecting a plurality of immunoglobulins and method of detecting the presence of, or susceptibility to, a disease

4. claims: 45, 46

Method of reducing the redundancy and bias of an antibody-expressing phage library

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/GB2004/001016

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9939210	A	05-08-1999		AU 740830 B2		15-11-2001
				AU 2259799 A		16-08-1999
				WO 9939210 A1		05-08-1999
				CA 2319828 A1		05-08-1999
				EP 1051624 A1		15-11-2000
				JP 2002502038 T		22-01-2002
WO 0007024	A	10-02-2000		EP 1101114 A2		23-05-2001
				WO 0007024 A2		10-02-2000
				US 2002142354 A1		03-10-2002
EP 1319954	A	18-06-2003		EP 1319954 A1		18-06-2003
				AU 2002366693 A1		23-06-2003
				CA 2470083 A1		19-06-2003
				EP 1454143 A2		08-09-2004
				WO 03050544 A2		19-06-2003

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 N 15/00

A

(81)指定国 AP(BW,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,PL,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,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,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,M,D,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA53 BA80 EA03 HA01 HA03 HA11
4H045 AA11 AA20 AA30 DA75 DA86 EA50 FA72 FA74