



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 38 623 T2 2009.05.28

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 060 395 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 38 623.3

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US99/02442

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 905 748.2

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1999/040434

(86) PCT-Anmeldetag: 04.02.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 12.08.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 20.12.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 30.04.2008

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 28.05.2009

(51) Int Cl.⁸: G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

73605 P 04.02.1998 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Invitrogen Corp., Carlsbad, Calif., US

(72) Erfinder:

HOEFFLER, James P., Anchorage, Alaska 99516,
US; FERNANDEZ, Joseph M., Carlsbad, CA 92008,
US; NASOFF, Marc S., San Diego, CA 92131, US

(74) Vertreter:

ABK Patentanwälte, 14052 Berlin

(54) Bezeichnung: MICROARRAYS UND IHRE VERWENDUNGEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**Gebiet der Erfindung**

[0001] Die hier dargelegte Erfindung bezieht sich auf eine neue Methode zur Verwendung von Microarray-Technologien. Die Methode ist nützlich zur Charakterisierung von verschiedenen Gewebe und Zellen durch Proteinanalyse.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Neueste bahnbrechende Entwicklungen in der Technologie der Nukleinsäure-Sequenzierung haben die Sequenzierung von ganzen Genomen einer Vielfalt von Organismen, einschließlich des Menschen, ermöglicht. Die möglichen Vorteile der Sequenzierung eines kompletten Genoms sind vielseitig und reichen von Anwendungen im medizinischen Bereich bis zum besseren Verständnis evolutionärer Prozesse. Dennoch können diese Vorteile, ohne zu verstehen wie und wo diese neu sequenzierten Gene funktionieren, noch nicht vollständig realisiert werden.

[0003] Traditionell beginnt das funktionelle Verstehen mit dem Erkennen einer Aktivität, der Isolierung eines Proteins, das mit dieser Aktivität assoziiert ist, und darauf folgt die Isolierung des Gens oder der Gene, die dieses Protein kodieren. Das isolierte Protein wurde außerdem zur Herstellung von Antikörper-Reagenzien verwendet. Spezifische Antikörper und Fragmente der isolierten Gene wurden beide dazu verwendet, Gewebeexpression und -funktion zu untersuchen.

[0004] Verschiedenen Methoden sind dazu verwendet worden, Proteinexpressionsmuster zu untersuchen, einschließlich *in situ* Hybridisierungsstudien von Gewebebereichen und Northernblots. Diese Methoden sind nicht nur zeitaufwendig man benötigt auch relativ große Mengen an Material, um erfolgreich sein zu können.

[0005] Antikörper, die an spezifische Antigene binden, sind durch eine Vielzahl von Methoden produziert worden, einschließlich der Immunisierung von Tieren, der Fusion von Milzzellen von Säugetieren mit immortaliisierten Zellen zur Herstellung von Hybridomazellen, der Herstellung von zufälligen Peptiden mit Hilfe von Phagen- oder Bakterien-Display und mit beschränkten Peptid-Bibliotheken. Ungeachtet dessen, wie der gewünschte Antikörper hergestellt wurde, die zurzeit erhältlichen Methoden zur Identifizierung eines Antikörpers mit einer bestimmten Spezifität sind allgemein aufwendig und können nicht dazu verwendet werden, eine große Anzahl von Unbekannten gleichzeitig zu testen.

[0006] Eine Methode beinhaltet die Bindung des Antigens an eine poröse Membran, wie zum Beispiel Nitrozellulose, den Kontakt der Membran mit einer Quelle von Test-Antikörpern und schließlich die Bestimmung ob oder ob nicht die Antikörper an das Antigen gebunden haben. Diese Methode ermöglicht die Untersuchung einer Quelle von Test-Antikörpern pro Stück poröse Membran, was die Methode nicht nur unbequem macht sondern auch eine Materialverschwendug darstellt.

[0007] Antikörper/Antigen-Reaktionen können auch in Plastikplatten, wie zum Beispiel 96-Well Mikrotiterplatten, mit Methoden, die ähnlich zu den oben beschriebenen sind, evaluiert werden. Diese Methode wird ebenfalls durch die Anzahl der Proben, die in einem Assay getestet werden können, limitiert, daher benötigt man viele Assays, um eine große Anzahl unbekannter Antikörper zu bewerten. Chang (US Patent Nr 4,591,570 ausgestellt am 27. Mai 1986) beschreibt einen Array mit einer begrenzten Anzahl charakterisierter Antikörper bekannter Antigene auf einer Oberfläche aus Glas, der dazu verwendet werden kann, spezifische Antigene an der Oberfläche von ganzen Zellen zu binden.

[0008] Kürzlich neu aufgekommene Techniken ermöglichen die Kreation von Microarrays mit Tausenden oder Millionen unterschiedlicher Elemente. Diese Array-Technologie ist hauptsächlich zur Gestaltung von Arrays mit individuellen Nukleinsäuren verwendet worden (siehe zum Beispiel, Marshall and Hodgson, Nature Biotech. 16: 27–31, 1998; Ramsay, Nature Biotech. 16: 40–44, 1998), insbesondere für kurze, *in situ* synthetisierte Oligonukleotide.

[0009] Ein früheres Dokument von Ekins et al (Int. Fed. Clin. Chem. Ausg. 9 Nr. 3 1997-09) beschreibt eine Methode über die Verwendung eines Arrays mit RNA-Proben zur Identifizierung unterschiedlicher Genexpression in pathologischen bzw. gesunden Gewebeproben. WO97/10365 beschreibt auch das Monitoring von Expressionsleveln einer Zelle mittels eines Microarrays mit RNA-Proben.

[0010] Benötigt werden Methoden zum einfachen und schnellen Screening einer großen Anzahl von Antikörpern zur Charakterisierung von Geweben und Zellen mittels Proteinanalyse. Die hier beschriebene Erfindung befasst sich mit dieser Notwendigkeit.

Kurzbeschreibung der Erfindung

[0011] Die hier dargelegte Erfindung umfasst Methoden zur Verwendung von Microarrays zur Vereinfachung der Analyse und Charakterisierung von Genen und deren Funktion.

[0012] Die Erfindung bietet Methoden zum Vergleich der Proteinexpression von zwei oder mehreren Populationen von Zellen, wobei die Methode umfasst:

- (a) den Kontakt eines Arrays mit Antikörpern auf einer festen Oberfläche mit einem Zelllysat einer ersten Zellpopulation zur Generierung eines ersten Bindungsmusters;
- (b) den Kontakt einer zweiten Ausfertigung des Arrays mit Antikörpern auf einer festen Oberfläche mit einem Zelllysat einer zweiten Zellpopulation zur Generierung eines zweiten Bindungsmusters; und
- (c) den Vergleich der Bindungsmuster des ersten Zelllysates mit dem Bindungsmuster des zweiten Zelllysats.

[0013] Vorzugsweise ist die Bindungsspezifität der Antikörper nicht charakterisiert.

[0014] Vorzugsweise sind die Antikörper rekombinant.

[0015] Bei der Erfindung wird bevorzugt, dass das erste Zelllysat von normalen Zellen stammt während das zweite Zelllysat von abnormalen Zellen stammt.

[0016] Die abnormalen Zellen können Krebszellen sein.

[0017] Alternativ dazu kann das erste Zelllysat von normalen Zellen während eines Ruhestadiums stammen und das zweite Zelllysat von normalen Zellen in einem stimulierten Zustand.

[0018] Vorzugsweise wird der Unterschied zwischen dem ersten und dem zweiten Zelllysat durch unterschiedliche, nachweisbare Markierung sichtbar.

Kurzbeschreibung der Abbildungen

[0019] Die [Abb. 1A](#), [Fig. 1B](#) und [Fig. 1C](#) zeigen Microarrays von Antikörpern, die an positiv geladene Nylonmembran gebunden wurden, mit dem Antigen reagiert haben und mit nicht fluoreszenten Mitteln nachgewiesen wurden.

[0020] [Abb. 2](#) zeigt ein Microarray hergestellt mit Hilfe eines Array-Roboters. Die Antigen-Bindung ist mit nicht fluoreszenten Mitteln nachgewiesen worden.

[0021] [Abb. 3](#) zeigt die Fähigkeit der Antikörper-Microarrays, die relativen Bindungsaffinitäten zu einem spezifischen Antigen zu evaluieren.

[0022] [Abb. 4](#) zeigt einen Microarray mit monoklonalen Antikörpern im Vergleich zu einem Microarray mit polyclonalen Antikörpern.

[0023] Die [Abb. 5A](#), [Abb. 5B](#) und [Abb. 5C](#) zeigen einen Microarray mit Antikörpern, die mit einem Zelllysat unter Bedingungen reagiert haben, die die Menge an Hintergrundbindung variiert.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0024] Die vorliegende Erfindung umfasst Methoden zur Verwendung von Microarrays, um die Analyse und Charakterisierung von Genen und deren Funktion zu vereinfachen.

[0025] Bei der Erfindung werden Microarrays mit Antikörpern verwendet, um Proteinexpressionsprofile von Zellen zu vergleichen. Zum Beispiel können Vergleiche zwischen einer Population von Zellen eines Gewebes, wie zum Beispiel arterielle Endothelialzellen, und einem zweiten Gewebe, wie zum Beispiel venöse Endothelialzellen oder Zellen, die von einem bestimmten Gewebe aber unterschiedlichen Spezies stammen, gemacht

werden. Die Vergleiche können zwischen normalen Zellen und Zellen vom selben Gewebetyp, die von einer Person mit einer pathogenen Funktionsstörung stammen, gemacht werden. Zum Beispiel können Vergleiche zwischen normalen Zellen und Krebszellen angestellt werden. Zusätzlich können Vergleiche zwischen Zellen in einem Ruhestadium und Zellen in einem aktivierten Stadium gemacht werden, zum Beispiel zwischen ruhenden T-Zellen und aktivierte T-Zellen.

[0026] Bei einem anderen Beispiel haben die dargelegten Arrays einen Nutzen für die Bewertung von Proteinexpressionen bei Pathogenen, wie zum Beispiel Bakterien, Parasiten, Viren und Ähnlichem. Eine aus den Pathogenen hergestellte Lösung (wie zum Beispiel ein Lysat), das alle von den Pathogenen exprimierte Proteine repräsentiert, kann dazu verwendet werden, den Antikörper-Array zur Identifizierung antigenerkennender, pathogen-exprimierter Proteine zu kontaktieren. Diese Antikörper haben einen Nutzen als diagnostische Agenzien sowie als potentielles Therapeutikum.

[0027] In einer bevorzugten Ausführungsart werden uncharakterisierte Antikörper an eine feste Oberfläche eines Array-Formats gebunden, das aus getrennten Spots besteht, deren räumliche Position einfach bestimmt werden kann. Jede Position repräsentiert einen Antikörper aus einer bekannten Quelle, wie zum Beispiel ein bestimmtes Hybridom, das in einem Well in einer 96-Well Mikrotiterplatte wächst. Der Raum zwischen den Antikörperspots wird behandelt, um unspezifische Bindung an den festen Träger zu verhindern. Die aufgetragenen Antikörper werden dann in Kontakt mit einem Antigen oder mit einem Set von Antigenen gebracht für den spezifische Antikörper gesucht werden. Die Antigenlösung wird für einen bestimmten Zeitraum, der notwendig ist zur Ausbildung des Antigen:Antikörper Komplexes, in Kontakt mit dem Array belassen (normalerweise 10 Minuten bis 2 Stunden), dann werden die ungebundenen Antigene unter geeigneten Bedingungen abgewaschen. Das gebundene Antigen wird mittels einer Nachweismethode aus Vielen an einem bestimmten Antikörper-Spot nachgewiesen und damit wird die Quelle des Antikörpers identifiziert, der für ein bestimmtes Antigen spezifisch ist.

[0028] Der Begriff "Antikörper" wird hier im weitesten Sinne verwendet und umfasst insbesondere intakte monoklonale Antikörper, multispezifische Antikörper (z. B. biospezifische Antikörper) aus mindestens zwei Antikörpern gebildet und Antikörperfragmente einschließlich einzelkettige Antikörper solange sie die gewünschten Bindungseigenschaften, wie hier beschrieben, zeigen.

[0029] Viele in Fachkreisen gut bekannte Verfahren können für die Herstellung polyklonaler Antikörper eines Epitops oder eines Antigens von Interesse verwendet werden. Ein Wirtstier einer beliebigen Anzahl von Spezies, wie zum Beispiel Hasen, Gänse, Schaf, Pferd, Kuh, Mäuse, usw. wird durch Injektion einer Antigenpräparation immunisiert, die aus Zellen oder von Mikroorganismen isoliert werden kann oder rekombinant oder genetisch hergestellt sein kann. Viele in Fachkreisen bekannte Adjuvantien können dazu verwendet werden, die Produktion von Antikörpern durch den immunisierten Wirt zu steigern, wie zum Beispiel das Freud'sche Adjuvans (vollständig oder unvollständig), Mineralgele, wie Aluminiumhydroxid, oberflächenaktive Substanzen, wie zum Beispiel Lysolecithin, Pluronic-Polyole, Polyanionen, Peptide, Ölemulsionen, Keyhole Limpet Hämocyanine, Dinitrophenol, Liposomen und möglicherweise nützliche humane Adjuvantien, wie zum Beispiel BCG (Bacille Calmette-Guerin) und Propionibacterium acnes, und Ähnliches.

[0030] Der Begriff "monoklonaler Antikörper", wie hier verwendet, bezieht sich auf einen Antikörper, der aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern gewonnen wurde. Zum Beispiel sind die einzelnen Antikörper, die eine Population umfassen, identisch, mit Ausnahme möglicher, natürlich vorkommender Mutationen, die zu einem geringen Ausmaß vorhanden sein können. Monoklonale Antikörper sind hochspezifisch und gegen eine einzelne antigenen Stelle gerichtet. Darüber hinaus ist jeder monoklonale Antikörper gegen eine einzelne Determinante des Antigens gerichtet, während konventionelle (polyklonale) Antikörperpräparationen typischerweise mehrere Antikörper umfassen, die gegen unterschiedliche Determinanten (Epitope) gerichtet sind. Bevorzugte Antikörper sind mAbs, die zu jeder Immunoglobulinklasse, einschließlich IgG, IgM, IgE, IgA und jeder Unterkategorie oder jedem Isotyp davon, gehören können.

[0031] Zusätzlich zu ihrer Spezifität haben monoklonale Antikörper den Vorteil, dass sie aus Hybridomkulturen, nicht kontaminiert durch andere Immunoglobuline, synthetisiert werden können. Der Modifikator "monoklonal" weist darauf hin, dass der Antikörper aus einer im Wesentlichen homogenen Population von Antikörpern gewonnen wurde und ist nicht so auszulegen, dass zur Produktion des Antikörpers irgendeine besondere Methode nötig war. Zum Beispiel können monoklonale Antikörper, die gemäß der vorliegenden Erfindung genutzt werden, nach der Hybridomtechnik hergestellt werden, die zuerst von Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975) beschrieben wurde oder aus einer Phagen-Antikörper-Bibliothek mittels der Techniken, die zum Beispiel bei Clackson et al., Nature, 352: 624–628 (1991) und Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581–597 (1991) beschrieben

wurden, isoliert werden.

[0032] Die monoklonalen Antikörper, die zur Verwendung in Betracht kommen, umfassen "chimäre" Antikörper (Imunoglobuline), bei denen ein Teil der schweren und/oder leichten Kette identisch oder homolog ist zu entsprechenden Sequenzen in den Antikörpern bestimmter Spezies oder zu einer bestimmten Antikörperklasse oder -unterklasse gehört, während der Rest der Kette(n) identisch oder homolog ist zu entsprechenden Sequenzen in den Antikörpern anderer Spezies, sowie Fragmente dieser Antikörper, solange sie die gewünschte biologische Aktivität zeigen (U.S. Patent Nr. 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851–6855 (1984)).

[0033] "Humanisierte" Formen nicht-humaner (z. B. mäuseartiger) Antikörper sind chimäre Immunoglobuline, Immunoglobulinketten oder Fragmente davon (wie zum Beispiel Fv, Fab, Fab', F(ab')2 oder andere antigenbindende Untersequenzen von Antikörpern), die minimale Sequenzen aus nicht-humanen Immunoglobulinen enthalten. Größtenteils sind humanisierte Antikörper humane Immunoglobuline (Empfängerantikörper) bei denen die Reste einer komplementaritätsbestimmenden Region (CDR) des Empfängers durch Reste einer CDR einer nicht-humanen Spezies, wie zum Beispiel Maus, Ratte oder Hase, ersetzt werden, die die gewünschte Spezifität, Affinität und Kapazität zeigen. In einigen Fällen werden die Reste der Fv umgebenden Bereiche (FR) durch entsprechende nicht-humane Reste ersetzt. Darüber hinaus können humanisierte Antikörper Reste beinhalten, die weder im Empfängerantikörper noch in den importierten CDR Sequenzen oder Sequenzen der umgebenden Bereiche (FR) auftreten. Diese Modifikationen werden zur Verfeinerung und Steigerung der Leistungsfähigkeit der Antikörper gemacht. Im Allgemeinen umfasst der humanisierte Antikörper im Wesentlichen mindestens eine, typischerweise zwei, variable Domänen, in denen alle oder im Wesentlichen alle CDR-Regionen denen eines nicht-humanen Immunoglobulins entsprechen, und alle oder im Wesentlichen alle FR-Regionen menschliche Immunoglobulinsequenzen darstellen. Der humanisierte Antikörper umfasst optimalerweise mindestens auch einen Teil der konstanten Region der Immunoglobuline (Fc), typischerweise des menschlichen Immunoglobulins. Für weitere Einzelheiten siehe Jones et al., Nature, 321: 522–525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332: 323–329 (1988) und Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593–596 (1992). Die humanisierten Antikörper schließen einen PRIMATIZED™ Antikörper mit ein, bei dem die antigenbindende Region des Antikörpers durch einen Antikörper gewonnen wird, der durch die Immunisierung eines Makakenaffen mit dem Antigen von Interesse hergestellt wird.

[0034] "Antikörperfragmente" umfassen einen Teil eines intakten Antikörpers, vorzugsweise die antigenbindende oder die variable Domäne eines intakten Antikörpers. Beispiele solcher Fragmente schließen Fab, Fab', F(ab')2, und Fv Fragmente; Diabodies; lineare Antikörper (Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057–1062 (1995)); einzelkettige Antikörpermoleküle und multispezifische Antikörper aus Antikörperfragmenten mit ein.

[0035] Einzelkettige Antikörper sind zur Anwendung in der Erfindung besonders bevorzugt. "Einzelkettige" oder "sFv" Antikörper sind Antikörperfragmente, die VH und VL Domänen eines Antikörpers umfassen, wobei diese Domänen auf einer einzelnen Polypeptidkette liegen. Vorzugsweise tragen die Fv Polypeptide zusätzlich einen Polypeptidlinker zwischen den VH und VL Domänen, der den sFvs die zur Antigenbindung benötigte Struktur verleiht. Als Überblick über sFvs siehe Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Ausg. 113, Rosenburg and Moore Herausgeber, Springer-Verlag, New York, Seiten 269–315 (1994).

[0036] Große Mengen einzelkettiger Antikörper mit uncharakterisierter zufälliger Bindungsspezifität können, unter Verwendung mehrerer in Fachkreisen bekannter Methoden, erzeugt werden. Rekombinante Antikörper Bibliotheken können zum Beispiel in filamentösen Phagenpartikeln hergestellt werden (Daniels and Lane, Methods 9(3): 494–507, 1996; Reichmann and Weill, Biochemistry 32(34): 9848–8855; Rader and Barbas, Curr Opin Biotechnol 9(4): 503–508, 1997; Iba and Kurosawa, Immunol Cell Biol 75(2): 217–221, 1997, WO 90/05144, WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/19172, GB 9722131.8, GB9810228.8 und GB 9810223.9) oder gleichermaßen in Hefe, Bakterien oder Ähnlichem. Andere Methoden zur Herstellung von zufälligen Bibliotheken von sFvs schließen verschiedenen Festphasen-Synthesemethoden mit ein.

[0037] Der Begriff "Diabodies" bezieht sich auf kleine Antikörperfragmente mit zwei Antigenbindestellen, deren Fragmente eine variable Domäne einer schweren Kette (VH) verbunden mit einer variablen Domäne einer leichten Kette (VL) in einer Polypeptidkette (VH-VL) umfassen. Durch die Verwendung eines Linkers, der zu kurz ist, um die Paarung der beiden Domänen der selben Kette zu ermöglichen, sind die Domänen dazu gezwungen, sich mit den komplementären Regionen einer anderen Kette zu paaren und zwei Antigenbindestellen zu erzeugen. Diabodies werden zum Beispiel ausführlich in EP 404,097; WO 93/11161; und Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444–6448 (1993) beschrieben.

[0038] Die in dieser Erfindung verwendeten Antikörper können vor der Herstellung eines Microarrays isoliert werden. Ein "isoliertes" Molekül, ob Antikörper, Antigen oder Nukleinsäure, ist aus einer Komponente seiner natürlichen Umgebung identifiziert und getrennt und/oder wieder gewonnen worden. Kontaminierende Komponenten seiner natürlichen Umgebung sind Materialien, die bestimmte Anwendungen des Moleküls beeinträchtigen, und Enzyme, Hormone und andere proteinöse oder nicht-proteinöse gelöste Stoffe beinhalten können. In bevorzugten Ausführungsarten wird das Protein gereinigt (1) zu 95% (Gewichtsprozent) oder am besten 99% (Gewichtsprozent), bestimmt nach der Lowry-Methode, (2) zu einem Grad, der ausreichend ist zur Sequenzierung von mindestens 15 Resten der N-terminalen oder einer internen Aminosäuresequenz mit einem Zentrifugenrührchen-Sequenzierer oder (3) zur Homogenität mittels SDS-PAGE unter reduzierenden oder nichtreduzierenden Bedingungen mit Coomassie blue oder vorzugsweise Silberfärbung. Isoliertes Protein beinhaltet das Protein *in situ* in rekombinanten Zellen, wenn mindestens eine Komponente aus der natürlichen Umgebung des Proteins nicht vorhanden ist. Gewöhnlich jedoch wird isoliertes Protein durch mindestens einen Aufreinigungsschritt präpariert. Ungereinigte Antikörper, zum Beispiel aus Serum, können genauso in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0039] Eine besonders nützliche Methode zur Isolierung von Antikörpern, wie zum Beispiel einzelkettige Antikörper aus Zellextrakt, ist die Affinitätsreinigung. Harze, die zur Antikörperreinigung geeignet sind, sind in Fachkreisen gut bekannt, zum Beispiel Protein A Sepharose. Ein rekombinanter Antikörper mit einem Tag zur Affinitätsreinigung, der die Aufreinigung ermöglicht, kann konstruiert werden. Harze, die zur Antikörperreinigung geeignet sind, sind in Fachkreisen gut bekannt, zum Beispiel Protein A Sepharose

[0040] Tags zur Affinitätsreinigung sind gewöhnlich Peptidsequenzen, die mit einem Bindungspartner interagieren, der an einen festen Träger immobilisiert wird. Synthetische DNA Sequenzen kodieren verschiedene aufeinander folgende Aminosäuren, wie zum Beispiel Histidine, die fusioniert an das exprimierte Protein zur Einschritt-Aufreinigung des rekombinanten Proteins, durch hohe Affinitätsbindung an eine Harzsäule, wie zum Beispiel Nickelsepharose, genutzt werden können. Eine Endopeptidase Erkennungssequenz kann zwischen dem Polyaminosäure-Tag und dem Protein von Interesse konstruiert werden, so dass das Leaderpeptid durch Verdau mit Enterokinase oder anderen Proteasen entfernt werden kann. Sequenzen, die Proteine kodieren wie zum Beispiel die Chitin-Bindedomäne (die Chitin bindet), Biotin (das Avidin und Straptavidin bindet) und Ähnliche können auch zur Erleichterung der Aufreinigung des Proteins von Interesse eingesetzt werden. Der Tag zur Affinitätsreinigung kann durch in Fachkreisen gut bekannte Methoden vom Protein von Interesse getrennt werden, einschließlich der Verwendung von Inteinen (Protein Self-splicing Elemente, Chong, et al, Gene 192: 271–281, 1997).

[0041] Durch die Verwendung einer Menge Harz mit geeigneten Bindestellen für nur eine kleine Menge des Antikörpers in der ungereinigten Mischung, kann der Isolierungsprozess dazu genutzt werden, gleichzeitig die Ausbeute zu normalisieren und den Antikörper zu isolieren. Zum Beispiel können die Proben, obwohl jede Probe unterschiedliche und unbekannte Mengen des Antikörperproteins enthält, mit einer Menge an Harz, die eine maximale Bindekapazität von 10 mgs hat, in Kontakt gebracht werden. Auf diese Weise werden größere Mengen Antikörper ungebunden durch das Harz durchlaufen. Die maximal gebundene Menge kann dann aus dem Harz eluiert werden.

[0042] In Fachkreisen sind Methoden zur Herstellung von Microarrays bekannt, einschließlich des Druckens auf eine feste Oberfläche mit Drucknadeln (passive Drucknadel, Federkiehl-Drucknadel oder Ähnliches) oder des Spottens mit einzelnen Tropfen einer Lösung. Passive Drucknadeln geben genügend Probe für einen einzelnen Spot ab. Federkiehl-Drucknadeln geben genügend Probe für mehrere Spots ab. Blasendrucker verwenden einen Ring, um ein kleines Volumen zu halten, das durch das Drücken eines Stempels in den Ring abgegeben wird. Beim Mikrodispensen wird ein Spritzmechanismus verwendet, um mehrere Spots eines festgelegten Volumens abzugeben. Zusätzlich können Proben mit der piezoelektrischen (Inkjet-)Technologie auf feste Träger aufgetragen werden, die aktiv Proben auf den festen Träger transferiert.

[0043] Eine Methode wird bei Shalon und Brown (WO 95/35505, veröffentlicht am 28 Dez. 1995) beschrieben. Mit der von Shalon und Brown beschriebenen Methode und Vorrichtung kann ein Array auf einem Glasobjektträger mit bis zu 600 Spots pro Quadratzentimeter und einem Volumen von 0.01 to 100 nl pro Spot erzeugt werden. Geeignete Antikörperkonzentrationen reichen von 1 ng/P bis 1 pg/P. Bei der vorliegenden Erfindung kann jeder Spot einen oder mehr als einen eindeutigen Antikörper beinhalten.

[0044] Andere Methoden zur Herstellung von Arrays sind in Fachkreisen bekannt, einschließlich des photolithographischen Druckens (Pease, et al, PNAS 91(11): 5022–5026, 1994) und der *in situ* Synthese. Während bekannte *in situ* Synthesemethoden für die Synthese von Polypeptiden, die lang genug sind um Antikörper dar-

zustellen, weniger sinnvoll sind können sie für die Herstellung von bis zu 50 Aminosäure langen Polypeptiden verwendet werden, die wie unten beschrieben als Bindeproteine dienen können.

[0045] Die Microarrays können auf einer Vielzahl von festen Oberflächen wie zum Beispiel Plastik (z. B. Polycarbonat), komplexen Kohlenhydraten (z. B. Agarose und Sepharose), Acrylharzen (z. B. Acrylamid und Latexperlen) und Nitrocellulose erzeugt werden. Bevorzugte feste Träger umfassen Glasobjektträger, Siliconscheiben und positiv geladenen Nylonmembranen. Typische Beispiele für geeignete feste Träger sind in den unten stehenden Beispielen beschrieben.

[0046] Methoden für die kovalente Anheftung von Antikörpern an feste Träger sind in Fachkreisen gut bekannt. Beispiele solcher Methoden kommen in Bhatia, et al, Anal. Biochem. 178(2): 408–413, 1989; Ahluwalia, et al, Biosens. Bioelectron. 7(3): 207–214, 1992; Jonsson, et al, Biochem. J. 227(2): 373–378, 1985; und Freij-Larsson, et al, Biomaterials 17(22): 2199–2207, 1996 vor. Zusätzlich können Proteine mittels der Methoden der unten stehenden Beispiele an einen festen Träger gebunden werden.

[0047] Methoden zur Reduzierung unspezifischer Bindung an feste Oberflächen sind in Fachkreisen bekannt und schließen das Waschen der beladenen festen Oberfläche mit Rinderserumalbumin (BSA), rekonstruierter fettfreier Milch, Lachssperma DNA, Schweineheparin oder Ähnlichem mit ein (siehe Ausubel, et al, Short Protocols in Molecular Biology, 3. Auflage, 1995).

[0048] Arrays können dazu verwendet werden, antigenspezifische Antikörper zu identifizieren. Die Arrays werden mit einer Lösung in Kontakt gebracht, die ein oder mehr als ein bekanntes Antigen enthält, um die Antikörper im Array zu identifizieren, die eine Bindungsspezifität für das Antigen haben. Die Antigene sind oft Proteine, obwohl sie auch organisch-chemische Komponenten, Kohlenhydrate, Nukleinsäuren oder Ähnliches sein können. Sie können isoliert, halb aufgereinigt, rekombinant oder natürlich vorkommend sein. Die Menge an Antigen kann von 1 bis 100 ng/P variieren. Das Antigen wird für einen Zeitraum in Kontakt mit dem Array belassen, der geeignet ist, zur Bildung von Antigen:Antikörper Komplexen, falls eines der Antikörper im Array spezifisch für das Antigen ist. Der dafür geeignete Zeitraum wird zwischen 5 Minuten und 24 Stunden liegen, und wird im Allgemeinen bei 0,5 bis 2 Stunden liegen.

[0049] Ein Antigen von besonderem Interesse stellt das rekombinante Protein dar, entweder ein vollständiges Genprodukt oder Fragmente davon, zum Beispiel ein Expressed Sequence Tag (oder EST-Fragment). EST-Fragmente sind relativ kurze cDNA-Sequenzen, die zufällig generiert und sequenziert worden sind, gewöhnlich als Teil eines laufenden Versuchs zur Kartierung eines vollständigen Genoms (Adams, et al, Science 252(5013): 1651–1656, 1991). Eine große Anzahl dieser Sequenzen sind in öffentlichen Datenbanken verfügbar. Die Identität der Proteine, kodiert durch die überwiegende Mehrheit der Sequenzen, ist unbekannt. Die folgende Diskussion kann, obwohl sie sich auf die Expression von EST-kodierten Proteinen bezieht, genauso auf jedes exprimierte Produkt einer Nukleinsäure, einschließlich vollständiger Proteine, angewendet werden.

[0050] Die Techniken, mit denen Zellen genetisch so konstruiert werden können, dass sie Peptide eines vorgegebenen EST-Fragments exprimieren, sind in Fachkreisen verfügbar. Die Methoden der Erfindung können zur Identifizierung eines Antikörpers, der spezifisch für ein Peptid ist, genutzt werden. Diese Antikörper können dann als Reagenzien bei der Reinigung und Identifizierung vollständiger Proteine und in anderen experimentellen Verfahren eingesetzt werden, die die Lokalisierung und Funktion eines Proteins aufklären.

[0051] Prokaryotische Würte sind gewöhnlich sehr effizient und zweckdienlich zur Produktion rekombinanter Proteine und stellen daher eine Art bevorzugtes Expressionssystem für EST-Fragmente dar. Prokaryoten werden am häufigsten durch verschiedene E. coli Stämme repräsentiert. Dennoch können auch andere mikrobielle Stämme verwendet werden, einschließlich anderer Bakterienstämme.

[0052] In prokaryotischen Systemen können Plasmidvektoren mit Replikationsstellen und mit Kontrollsequenzen aus einem, mit dem Wirt kompatiblen, Spezies verwendet werden. Beispiele für geeignete Plasmidvektoren können pBR322, pUC118, pUC119 und Ähnliche mit einschließen; geeignete Phagen- oder Bacteriophagevektoren können λgt10, λgt11 und Ähnliche mit einschließen; und geeignete Virusvektoren können pMAM-neo, PKRC und Ähnliche mit einschließen. Vorzugsweise hat der ausgewählte Vektor der vorliegenden Erfindung die Fähigkeit, in der ausgewählten Wirtszelle zu replizieren.

[0053] Anerkannte prokaryotische Würte schließen Bakterien wie zum Beispiel E. coli und solche aus Gattungen wie zum Beispiel Bacillus, Streptomyces, Pseudomonas, Salmonella, Serratia und Ähnliche mit ein. Allerdings werden die Polypeptide unter diesen Bedingungen nicht glycosyliert. Die ausgewählten Würte müssen

mit dem Replikon und den Kontrollsequenzen des Expressionsplasmids kompatibel sein

[0054] Zur Expresssinn eines EST-Fragments in einer prokaryotischen Zelle ist es notwendig, die Gensequenz funktionsfähig mit einem funktionellen prokaryotischen Promotor, wie zum Beispiel einem T7-Promotor oder einen RSC-Promotor, zu verbinden. Solche Promotoren können entweder konstitutiv oder noch besser regulierbar (z. B. induzierbar oder reprimierbar) sein. Beispiele solcher konstitutiver Promotoren schließen den int-Promotor des Bacteriophagen λ , den bla-Promotor der β -Lactamase Gensequenz aus pBR322, den CAT-Promotor der Chloramphenicolacetyltransferase Gensequenz aus pPR325 und Ähnliche mit ein. Beispiele für induzierbare prokaryotische Promotoren umfassen den rechten und linken Hauptpromotor des Bakteriophagen (PL und PR), die trp-, recA-, lacZ-, Lac-, und gal-Promotoren von *E. coli*, die α -amylase (Ulmanen Ett et al., J. Bacteriol. 162: 176–182, 1985) und den Sigma 28 spezifischen Promotor von *B. subtilis* (Gilman et al., Gene sequence 32: 11–20(1984)), die Promotoren der *Bacillus* Bakteriophagen (Gryczan, In: The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, Inc., NY (1982)), Promotoren von Streptomyces (Ward et al., Mol. Gen. Genet. 203: 468–478, 1986) und Ähnliche. Beispiele von eukaryotischen Promotoren werden in Glick (J. Ind. Microbiol. 1: 277–282, 1987); Cenatiempo (Biochimie 68: 505–516, 1986); und Gottesman (Ann. Rev. Genet. 18: 415–442, 1984) besprochen.

[0055] Für eine angemessene Expression in einer prokaryotischen Zelle wird außerdem eine Ribosomenbindestelle stromabwärts der genkodierenden Sequenz benötigt. Solche Ribosomenbindestellen sind zum Beispiel in Gold et al. (Ann. Rev. Microbiol. 35: 365–404, 1981) dargelegt. Die Auswahl von Kontrollsequenzen, Expressionsvektoren, Transformationsmethoden und Ähnlichem hängt vom Zelltyp der Wirtszelle, die zur Genexpression verwendet wird, ab.

[0056] Die Wirtszellen, die in Expressionssystemen der vorliegenden Erfindung verwendet werden, sind nicht streng begrenzt, vorausgesetzt, sie eignen sich zur Expression des Peptids von Interesse. Geeignete Wirte können häufig eukaryotische Zellen mit einschließen. Bevorzugte eukaryotische Wirte umfassen zum Beispiel Hefen, Pilze, Insektenzellen und Säugerzellen entweder in vivo oder in Zellkulturen. Säugerzellen, die als Wirte einen Nutzen haben können, schließen HeLa-Zellen, Zellen fibroblastischen Ursprungs wie VERO, 3T3 oder CHOK1, HEK 293 Zellen oder Zellen lymphoiden Ursprungs (wie zum Beispiel 32D Zellen) und ihre Derivate mit ein. Bevorzugte Säugerwirtszellen umfassen SP2/0 und JS58L, ebenso wie Neuroblastomzelllinien wie IMR 332 und PC12, die bessere Kapazitäten für eine korrekte posttranskriptionale Prozessierung bieten können.

[0057] Zusätzlich stehen auch Pflanzenzellen zur Verfügung, und mit den Pflanzenzellen kompatible Kontrollsequenzen sind verfügbar, wie zum Beispiel die 35S und 19S des Blumenkohlmosaikvirus, der Nopalinsynthese-Promotor und Signalsequenzen zur Polyadenylierung und Ähnliches. Einen anderen bevorzugten Wirt stellen Insektenzellen, zum Beispiel Drosophilalarven, dar. Bei der Verwendung von Insektenzellen als Wirt kann der Alkoholdehydrogenase-Promotor verwendet werden (Rubin, Science 240: 1453–1459, 1988). Alternativ dazu können Baculovirusvektoren konstruiert werden, um große Mengen von einem EST-Fragment kodierten Peptid in Insektenzellen zu exprimieren (Jasny, Science 238: 1653, 1987); Miller et al., In: Genetic Engineering (1986), Setlow, J. K., et al., eds., Plenum, Vol. 8, Seiten 277–297).

[0058] Jedes beliebige einer Serie von Hefe-Expressionssystemen kann verwendet werden, vorausgesetzt es umfasst einen Promotor und Terminationselemente einer aktiv exprimierten Gensequenz, die für glykolytische Enzyme kodiert, die in großen Mengen produziert werden, wenn Hefe in Medium, das reich an Glukose ist, angezogen wird. Bekannte glykolytische Gensequenzen können außerdem sehr effiziente transkriptionelle Kontrollssignale bieten. Die Hefe bietet, dadurch dass sie posttranskriptionale Peptidmodifikationen durchführen kann, beträchtliche Vorteile. Es gibt eine Anzahl rekombinanter DNA-Strategien, die starke Promotorsequenzen und Plasmide mit hoher Kopienzahl verwenden, die zur Produktion des gewünschten Peptids in Hefe verwendet werden können. Die Hefe erkennt Leadersequenzen auf klonierten Genprodukten von Säugern und sekretiert Peptide mit Leadersequenzen (z. B. Prepeptide). Für Wirte aus Säugerzellen sind mehrere mögliche Vektorsysteme zur Expression von EST-Fragmenten verfügbar.

[0059] Eine große Auswahl transkriptioneller und translationaler regulatorischer Sequenzen kann, abhängig von der Natur des Wirts, eingesetzt werden. Die transkriptionellen und translationalen regulatorischen Signale können aus viralen Quellen, wie zum Beispiel aus dem Adenovirus, dem Bovinen Papillomavirus, dem Cytomegalovirus, dem Siamvirus oder Ähnlichen stammen, bei denen die regulatorischen Signale mit einer bestimmten Gensequenz assoziiert sind, die ein hohes Expressionslevel zeigen. Alternativ dazu können Promotoren von Säuger-Expressionsprodukten verwendet werden, wie zum Beispiel Aktin, Kollagen, Myosin oder Ähnliches. Regulatorische Signale zur Transkriptionsinitiation können so ausgewählt werden, dass eine Repression oder Aktivierung möglich ist, so dass die Expression der Gensequenzen reguliert werden kann. Inte-

ressant sind regulatorische Signale, die temperatursensitiv sind, so dass durch eine Veränderung der Temperatur die Expression reprimiert oder initiiert werden kann, oder solche, die einer chemischen (wie zum Beispiel Metabolit-)Regulation unterliegen.

[0060] Die Expression von EST-Fragmenten in eukaryotischen Wirten schließt die Verwendung eukaryotischer regulatorischer Regionen mit ein. Solche Regionen beinhalten im Allgemeinen eine Promotorregion, die dazu geeignet ist die RNA-Synthese zu initiieren. Bevorzugte eukaryotische Promotoren schließen zum Beispiel den Promotor der Methallothionein I Gensequenz aus der Maus (Hamer et al., J. Mol. Appl. Gen. 1: 273–288, 1982); den TK-Promotor des Herpesvirus (McKnight, Cell 31: 355–365, 1982); den frühen SV40-Promotor (Benoist et al., Nature (London) 290: 304–310, 1981); den Hefepromoter der gal4-Gensequenz (Johnston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 6971–6975, 1982); Silver et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81: 5951–5955, 1984), den CMV-Promotor, den EF-1-Promotor und Ähnliche mit ein.

[0061] Ein EST-Fragment und ein funktionsfähig verbundener Promotor können in eine prokaryotische oder eukaryotische Empfängerzelle entweder als nicht-replizierbares DNA-(oder RNA-)Molekül eingeführt werden, entweder als lineares Molekül oder noch besser als geschlossenes, kovalentes, zirkuläres Molekül (Plasmid). Da solche Moleküle unfähig zur autonomen Replikation sind, kann die Expression der Gene durch die vorübergehende Expression der eingeführten Sequenzen erfolgen. Alternativ dazu kann eine dauerhafte oder stabile Expression durch die Integration der DNA-Sequenzen in das Wirtschromosom erreicht werden.

[0062] Ein Vektor der die Fähigkeit besitzt, die gewünschten Gensequenzen in das Wirtszellchromosom zu integrieren, kann verwendet werden. Zellen, die die eingeführte DNA stabil ins Chromosom integriert haben, können durch die Einführung eines oder mehr als eines Markers selektiert werden, der die Selektion auf Wirtszellen, die den Expressionsvektor enthalten, ermöglicht. Der Marker kann einem auxotrophen Wirt Phototrophie verleihen, eine Biozidresistenz z. B. gegen Antibiotika oder Schwermetalle, wie zum Beispiel Kupfer, verleihen oder Ähnliches. Die selektierbare Gensequenz des Markers kann entweder direkt an eine DNA-Gensequenz gebunden sein, um exprimiert zu werden, oder in dieselbe Zelle durch Kotransfektion eingeführt werden. Allgemein selektierbare Gensequenzen für Marker schließen die für Antibiotikaresistenzen mit ein, wie z. B: Ampicillin, Tetracyclin, Kanamycin, Bleomycin, Streptomycin, Hygromycin, Neomycin, Zeocin™ und Ähnliche. Selektierbare auxotrophe Gensequenzen umfassen zum Beispiel hisD, das das Wachstum in histidinfreiem Medium in Gegenwart von Histidinol ermöglicht.

[0063] Zusätzliche Elemente können für die optimale Synthese der einzelkettigen Bindepotein mRNA benötigt werden. Diese Elemente können Spleicing-Signale ebenso wie Transkriptionspromotoren, Enhancer und Terminationssignale mit einschließen. cDNA-Expressionsvektoren, die solche Elemente tragen schließen die bei Okayama, Mol. Cell. Bio. 3: 280, 1983 beschriebenen mit ein.

[0064] Das rekombinante Antigen kann als Fusionsprotein hergestellt werden. Wenn zwei proteinkodierende Sequenzen, die in der Natur nicht miteinander verbunden sind, im selben Leserahmen vorliegen, wird das daraus resultierende Protein "Fusionsprotein" genannt, bei dem zwei unabhängige Proteine "fusioniert" wurden. Fusionsproteine können bei sehr vielen Anwendungen eingesetzt werden. Zum Beispiel können zwei funktionelle Proteine zur Produktion eines einzigen Proteins, mit vielen enzymatischen Aktivitäten, fusioniert werden oder kurze Peptidsequenzen, wie zum Beispiel Epitoptags oder Affinitätstags zur Aufreinigung (siehe oben), können an größere Proteine fusioniert werden und als Hilfsmittel bei der Aufreinigung oder bei der Identifizierung des exprimierten Proteins als Epitope, die von spezifischen Antikörpern detektiert werden, eingesetzt werden,

[0065] Epitoptags sind kurze Peptidsequenzen, die durch epitopspezifische Antikörper erkannt werden. Ein Fusionsprotein, bestehend aus einem rekombinanten Protein und einem Epitoptag, kann einfach und leicht durch die Verwendung eines Antikörpers, der an eine Chromatographiesäule gebunden ist, aufgereinigt werden. Weiterhin ermöglicht das Vorhandensein des Epitoptags den Nachweis des rekombinanten Proteins in einem nachfolgenden Assay, wie zum Beispiel Westernblot, ohne die Notwendigkeit, einen Antikörper gegen das rekombinante Protein selbst herstellen zu müssen. Beispiele für allgemein verwendete Epitoptags schließen V5, Glutathione-S-Transferase (GST), Hämagglutinin (HA), das Peptid Phe-His-His-Thr-Thr, die Chitinbindedomäne und Ähnliche mit ein.

[0066] Ein Fusionsprotein kann ein Mittel zum einfachen Nachweis eines rekombinanten Antigenproteins darstellen. Zum Beispiel kann die Fusionskomponente selbst einen detektierbaren Teil darstellen, wie zum Beispiel ein fluoreszierendes Protein (Grün fluoreszierendes Protein, Gelb fluoreszierendes Protein oder Ähnliches), oder es kann alternativ dazu Teil eines spezifischen Bindungspaares sein (wie zum Beispiel Biotin und

Streptavidin), das durch die Reaktion mit dem Bindungspartner zu einer detektierbaren Substanz konjugiert.

[0067] Die vorangegangenen Elemente können zur Herstellung von Vektoren, die geeignet sind für die Verwendung in den Methoden der Erfindung, kombiniert werden. Fachkreise werden fähig sein, die, für die Verwendung in ihren jeweiligen Systemen geeigneten Elemente, auszuwählen und zu kombinieren.

[0068] Die eingeführten Nukleinsäuremoleküle können in ein Plasmid oder in einen viralen Vektor eingeführt werden, der zur autonomem Replikation im empfangenden Wirt fähig ist. Eine große Auswahl an Vektoren kann für diesen Zweck eingesetzt werden. Wichtige Faktoren bei der Auswahl eines bestimmten Plasmids oder viralen Vektors beinhalten: die Einfachheit mit der Empfängerzellen, die den Vektor enthalten, erkannt werden können und von den Empfängerzellen, die den Vektor nicht enthalten, getrennt werden können; die Kopienzahl des Vektors, die für einen bestimmten Wirt gewünscht wird; und ob gewünscht wird, dass die Möglichkeit besteht den Vektor zwischen den Zellen unterschiedlicher Spezies "hin und her zu bewegen".

[0069] Geeignete prokaryotische Vektoren schließen Plasmide wie, zum Beispiel die, die zur Replikation in *E. coli* fähig sind, mit ein (zum Beispiel pBR322, ColE1, pSC101, PACYC 184, itVX, pRSET, pBAD (Invitrogen, Carlsbad, CA) und Ähnliche). Solche Plasmide werden bei Sambrook (cf. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2. Auflage, herausgegeben von Sambrook, Fritsch, & Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)) dargelegt. *Bacillus* Plasmide schließen pC194, pC221, pT127 und Ähnliche mit ein und werden bei Gryczan (In: The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, NY (1982), Seiten 307–329) dargelegt. Geeignete Streptomyzeten Plasmide schließen pIJ101 (Kendall et al., J. Bacteriol. 169: 4177–4183, 1987) und Streptoceten Bacteriophagen wie zum Beispiel φC31 (Chater et al., In: Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology, Akademiai Kaido, Budapest, Hungary (1986), Seiten 45–54) mit ein. *Pseudomonas* Plasmide werden von John et al. (Rev. Infect. Dis. 8: 693–704, 1986) und Izaki (Jpn. J. Bacteriol. 33: 729–742, 1978) besprochen.

[0070] Geeignete eukaryotische Plasmide schließen zum Beispiel BPV, Vaccinia, SV40, 2-micron circle, pCDN3.1 (Invitrogen) und Ähnliche und deren Derivate mit ein. Solche Plasmide sind in Fachkreisen bekannt (Botstein et al., Miami Wntr. Symp. 19: 265–274, 1982); Broach, In: "The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Life Cycle and Inheritance", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, Seiten 445–470 (1981); Broach, Cell 28: 203–204, 1982); B (Dilon et al., J. Clin. Hematol. Oncol. 10: 39–48, 1980); Maniatis, In: Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Ausgabe 3, Gene Sequence Expression, Academic Press, NY, Seiten 563–608 (1980).

[0071] Sobald die Antikörper:Antigen Komplexe ausgebildet worden sind, und ungebundenes Antigen unter geeigneten Bedingungen weggewaschen worden ist, kann der Antigen:Antikörper Komplex, mittels einer der in Fachkreisen bekannten Techniken, nachgewiesen werden. Geeignete Waschbedingungen sind in Fachkreisen bekannt (siehe zum Beispiel Ausubel, et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3. Auflage, 1995). Exemplarische Waschbedingungen sind in den unten stehenden Beispielen gezeigt.

[0072] Im Fall von rekombinaten Antigenen können zur Detektion Expressionsvektoren verwendet werden, die, wie oben beschrieben, chimäre Fusionsproteine bilden. Das Epitop-getaggte Antigen kann mit Antikörpern, die spezifisch gegen die Tagsequenz sind, nachgewiesen werden. Dieser Antikörper kann entweder selbst nachweisbar markiert sein oder durch einen dritten nachweisbar markierten Antikörper detektiert werden. Alternativ dazu kann das Antigen im Komplex mit Biotin vorkommen und mittels nachweisbar markiertem Avidin oder Streptavidin detektiert werden. Außerdem kann das Antigen selbst nachweisbar markiert sein, zum Beispiel mit einer Fluoreszenzfarbstoffverbindung.

[0073] Der Begriff „nachweisbar markiert“, wie er hier benutzt wird, umfasst Antigene, die direkt an eine nachweisbare Substanz, wie zum Beispiel einen Fluoreszenzfarbstoff, gekoppelt sind und Antigene, die an einen Teil eines Bindungspaares, wie zum Beispiel Biotin/Streptavidin, oder einen Epitoptag gebunden sind, der spezifisch mit einem Molekül interagieren kann, das detektiert werden kann, wie zum Beispiel durch die Produktion eines gefärbten Substrats oder durch Fluoreszenz.

[0074] Substanzen, die zum Nachweis von markierten Proteinen geeignet sind, umfassen Fluoreszenzfarbstoffe wie zum Beispiel Fluoreszinisothiocyanat (FITC), Fluoreszin, Rhodamin, Tetramethyl-Rhodamin-5 (und 6)-Isothionat (TRITC), Texasrot, Cyaninfarbstoffe (Cy3 und Cy5 zum Beispiel) und Ähnliche und Enzyme, die mit colorimetrischen Substraten reagieren, wie zum Beispiel Meerrettichperoxidase. In der Praxis der Erfindung wird im Allgemeinen die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen bevorzugt, da sehr geringen Mengen nachgewiesen werden können. Liegen mehrere Antigene in einem Array vor, kann darüber hinaus jedes Antigen

mit einer unterschiedlichen Fluoreszenzverbindung markiert werden aber gemeinsam detektiert werden. Markierte Spots können mit einem Fluorimeter nachgewiesen werden, wobei jedes Signal auf ein Antigen hinweist, das an einen spezifischen Antikörper gebunden ist.

[0075] Die Bildung der Antigen:Antikörper Komplexe kann unter einer Vielzahl unterschiedlicher Bedingungen, zur Identifizierung von Antikörpern mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften, durchgeführt werden. Reaktionslösungen mit Antigenen können unterschiedliche Salzkonzentrationen enthalten oder können bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt werden. Zusätzlich kann die Bindungsreaktion bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt werden. Mit jedem Set an Bedingungen werden Antikörper mit unterschiedlicher Affinität zum Antigen identifiziert. Zum Beispiel können Antikörper, die bei pH 2 binden, ihren Nutzen möglicherweise unter sehr sauren Bedingungen entfalten, wie sie zum Beispiel im Magen vorliegen. Genauso können sich Antikörper, die bei Temperaturen um den Siedepunkt binden, möglicherweise bei Untersuchungen von thermophilen Organismen als nützlich erweisen. Im Allgemeinen liegen die pH Bedingungen zwischen 2 und 10 (bestenfalls um pH 8), die Temperaturen liegen zwischen 0°C und 100°C und die Salzkonzentrationen zwischen 1PM und 1M (im Fall von NaCl).

[0076] Affinitätskonstanten sind ein Maß für die Interaktion zwischen einem bestimmten Liganden und seinem passenden Rezeptor. Die „Bindungsaaffinität“ oder das Maß für die Stärke einer bestimmten Antigen:Antikörper Wechselwirkung wird im Allgemeinen durch Affinitätskonstanten für ein Konzentrationsgleichgewicht, aus assoziierten oder nicht-assozierten Konfigurationen eines Antigens und seines Antikörpers, bestimmt. Vorzugsweise sollte die Antigenbindung mit einer Affinität von ungefähr $ka = 10^{-6}$ M oder größer stattfinden, um einen Nutzen für die vorliegende Erfindung zu haben, noch besser sind ungefähr 10^{-7} M und bestenfalls liegen die Affinitätskonstanten zwischen ungefähr 10^{-8} M und 10^{-11} M. Antikörperfragmente haben im Allgemeinen Affinitäten im Bereich zwischen 10^{-6} M und 10^{-7} M.

[0077] Bei einer bevorzugten Ausführungsart der Erfindung werden Microarrays mit uncharakterisierten Antikörpern verwendet, um Expressionsprofile von Zellen zu vergleichen. Zum Beispiel können Vergleiche zwischen einer Population von Zellen eines Gewebes, wie zum Beispiel arterielle Endothelialzellen, und einem zweiten Gewebe, wie zum Beispiel venöse Endothelialzellen oder Zellen, die von einem bestimmten Gewebe aber unterschiedlichen Spezies stammen, gemacht werden. Die Vergleiche können zwischen normalen Zellen und Zellen vom selben Gewebetyp, die von einer Person mit einer pathogenen Funktionsstörung stammen, gemacht werden. Zum Beispiel können Vergleiche zwischen normalen Zellen und Krebszellen angestellt werden. Zusätzlich können Vergleiche zwischen Zellen in einem Ruhestadium und Zellen in einem aktivierten Stadium gemacht werden, zum Beispiel zwischen ruhenden T-Zellen und aktivierten T-Zellen.

[0078] Bei einem anderen Beispiel haben die dargelegten Arrays einen Nutzen für die Bewertung von Proteinexpressionen bei Pathogenen, wie zum Beispiel Bakterien, Parasiten, Viren und Ähnlichem. Ein aus den Pathogenen hergestelltes Lysat, das alle von den Pathogenen exprimierte Proteine repräsentiert, kann dazu verwendet werden den Antikörper-Array zur Identifizierung antigenerkennender, pathogen-exprimierter Proteine zu kontaktieren. Diese Antikörper haben einen Nutzen als diagnostische Agenzien sowie als potentielles Therapeutikum.

[0079] Zelluläre Lysate werden, wie oben beschrieben, als „Antigene“ eingesetzt und reagieren mit zwei identischen Microarrays. Antikörper, die sich als reaktiv in einem aber nicht in dem anderen Array erweisen, deuten auf das Vorliegen eines differentiell exprimierten Gens hin. Dieser Antikörper ist dann bei der nachfolgenden Isolierung und Identifizierung dieser Proteine von Nutzen, die sich in den beiden Zellpopulationen unterscheiden. Im Fall von normalen Zellen und Krebszellen können so Proteine identifiziert werden, die in Krebszellen exprimiert werden und zu deren malignen Zustand beitragen.

[0080] Microarrays mit vorher charakterisierten Antikörpern können für viele Anwendungen eingesetzt werden, wobei die Erstellung von Zellprofilen eine davon darstellt. Ein Array kann zum Beispiel aus Antikörpern bestehen, die ein Set von Antigenen erkennt, von denen bekannt ist, dass sie in aktivierten T-Zellen vorkommen aber nicht in T-Zellen im Ruhezustand. Eine T-Zellpopulation kann dann lysiert werden, und das Lysat mit dem Array in Kontakt gebracht werden, um zu bestimmen, ob die Population das Profil von T-Zellen im aktivierte oder im Ruhezustand repräsentiert.

[0081] Die Microarrays und die hier beschriebenen Methoden können als Methoden zur Diagnose bestimmter Funktionsstörungen verwendet werden. Zum Beispiel kann eine Sammlung von Antikörpern, die spezifisch für eine Auswahl von Antigenen ist, die mit einer oder mehr als einer Funktionsstörung assoziiert sind, auf ein Array aufgebracht und in Kontakt mit Körperflüssigkeit gebracht werden, die Antigene enthält, deren Vorliegen

oder Fehlen auf eine bestimmte Funktionsstörung hinweisen würde. Der Vorteil der Verwendung eines Microarrays gegenüber einem konventionellen Immunoassay liegt in der Möglichkeit eine Population von Antikörpern mit einzubeziehen, um eine Vielzahl von Funktionsstörungen auf einer einzigen Oberfläche zu diagnostizieren, eine signifikante Einsparung von Zeit, Kosten und Materialien, die zur Erstellung einer Diagnose benötigt werden.

[0082] So könnte zum Beispiel, wenn ein Patient mit Symptomen die typisch für mehrere unterschiedliche Funktionsstörungen sind, die sich durch das Vorliegen oder Fehlen von einem oder mehr als einem Protein auszeichnen, ein einziges Microarray Assay zur Erstellung einer spezifischen Diagnose verwendet werden, um so den Patienten richtig zu behandeln. Patienten, die an einem Schlaganfall oder Hirnschlag leiden, geben verschiedene Proteine, wie zum Beispiel neuronspezifische Enolase (NSE) aus den Neuronalzellen und S-100 aus den Gliazellen und den Astrozyten, in die Zerebrospinalflüssigkeit ab. Solche Proteine werden unter Bedingungen, die zu ähnlichen Symptomen führen können, wie zum Beispiel Drogenauswirkungen, nicht freigesetzt, was die richtige Diagnose noch mehr erschwert. Ein diagnostisches Array könnte diese und andere Proteine in der CSF leicht nachweisen und damit zu einer raschen klinischen Diagnose und Behandlung führen.

Beispiel I – Bestimmung der optimalen Konzentrationen von Antikörper und Antigen

[0083] Unterschiedliche Konzentrationen (1 µg/µl, 100 ng/µl, 10 ng/µl, 1 ng/µl) von gesamt Maus-IgG oder eines monokonalen Maus anti-PLC-gamma wurden auf einen Aldehyd-Objekträger (Cel Associates, Inc., Houston, Texas) gespottet, der eine nicht-kovalente Anheftung der Proteine erlaubt. Mit einem manuellen 8 Nadel Hand-Arrayer wurden die Objekträger für eine Stunde mit PEST (Phosphat-gepufferte Saline mit 0,10% Tween 20) und 3% Milcheiweiß blockiert. Nachfolgend wurden die Objekträger dreimal für je 15 Minuten in PEST gewaschen. Duplikate der Objekträger wurden mit 50 µl Gänse anti-Maus IgG-Antikörpern (GAMG), die an eine CY3 oder CY5 Fluoreszenzfarbstoffverbindung (Amersham, Arlington Heights, Illinois) gebunden waren, mit einer Konzentration von 10 µg/ml oder 1 µg/ml inkubiert. Anschließend wurden die Objekträger nochmal dreimal für je 15 Minuten in PEST gewaschen und vor dem Scannen mittels Zentrifugation getrocknet. Eine Bindung wurde, wie in unten stehender Tabelle 1 gezeigt, nachgewiesen.

Tabelle 1

Antikörper	Konz.	Antigen	Konz.	Nachweisgrad
PLC-gamma	1 µg/µl	GAMG-CY3	10 µg/ml	+++
	100 ng/µl		10 µg/ml	+++
	10 ng/µl		10 µg/ml	+
	1 ng/µl		10 µg/ml	-
Maus-IgG	1 µg/µl	GAMG-CY3	10 µg/ml	+++
	100 ng/µl		10 µg/ml	+++
	10 ng/µl		10 µg/ml	+
	1 ng/µl		10 µg/ml	-
PLC-gamma	1 µg/µl	GAMG-CY3	1 µg/ml	+
	100 ng/µl		1 µg/ml	+
	10 ng/µl		1 µg/ml	-
	1 ng/µl		1 µg/ml	-
Maus-IgG	1 µg/µl	GAMG-CY3	1 µg/ml	+
	100 ng/µl		1 µg/ml	+
	10 ng/µl		1 µg/ml	-
	1 ng/µl		1 µg/ml	-
PLC-gamma	1 µg/µl	GAMG-CY5	10 µg/ml	+++
	100 ng/µl		10 µg/ml	+++
	10 ng/µl		10 µg/ml	+
	1 ng/µl		10 µg/ml	-
Maus-IgG1	1 µg/µl	GAMG-CY5	10 µg/ml	+++
	100 ng/µl		10 µg/ml	+++
	10 ng/µl		10 µg/ml	+
	1 ng/µl		10 µg/ml	-
PLC-gamma	1 µg/µl	GAMG-CY5	1 µg/ml	+
	100 ng/µl		1 µg/ml	+
	10 ng/µl		1 µg/ml	-
	1 ng/µl		1 µg/ml	-
Maus-IgG	1 µg/µl	GAMG-CY5	1 µg/ml	+
	100 ng/µl		1 µg/ml	+
	10 ng/µl		1 µg/ml	-
	1 ng/µl		1 µg/ml	-

+++ starkes Signal, ++ mittelstarkes Signal

+ schwaches Signal, - kein Signal

Beispiel II – Vergleich von festen Trägern

[0084] Eine Verdünnungsreihe (1 µg/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml) mit Maus-IgG oder PLC-gamma wurde von Hand auf Aldehyd, Polystyren, Nitrocellulose und Surmodic Objektträger aufgetragen. Aldehyd, Nitrocellulose, Polystyren und Surmodic Objektträger wurden von unterschiedlichen Anbietern von Außerhalb bezogen (Aldehyd Objektträger-Cel Associates, Inc., Houston, Texas, Nitrocellulose Objektträger-Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon; Polystyren Objektträger-Nunc, Inc., Naperville, Illinois; Surmodic Objektträger-Surmodics, Inc., Eden Prairie, Minnesota). Die Surmodic Objektträger tragen ein geheim gehaltenes Polymer auf der Glasoberfläche, das unter geeigneten Bedingungen (vom Hersteller beschrieben) kovalente Bindungen mit Proteinen ausbildet.

[0085] Nach dem Auftragen von Hand (ungefähr 20–30 nl pro Spot) wurden die Nitrocellulose, Aldehyd und Polystyren Objektträger sofort für eine Stunde mit PEST und 3% Milcheiweiß blockiert, dreimal mit PEST gewaschen und mit 50 µl GAMQCY3 für 30 Minuten hybridisiert. Die Surmodic Objektträger wurden, wie von Hersteller empfohlen, über Nacht in einer Kammer mit feuchtem Salz inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Surmodic Objektträger, wie oben beschrieben, behandelt. Nach der Hybridisierung wurden alle unterschiedlichen Objektträger dreimal in PEST gewaschen, getrocknet und mit einem Scan Array 3000 Fluoreszenzscanner ge-scannt.

[0086] Alle getesteten Objektträger ermöglichen den Nachweis der Antigen:Antikörper Bindung bei höherer

Antikörperkonzentration. Die mit Aldehyd und Nitrocellulose behandelten Objektträger zeigten die größte Effizienz in der Antikörperbindung, und eine Antikörper:Antigen Interaktion konnte bei 1 ng/ μ l nachgewiesen werden.

Beispiel III – Nachweis einer Bindung mittels nicht fluoreszierender Methoden

[0087] Auf positiv geladene Nylonmembranen (Zeta Probe Membranes, Bio Rad Laborstories, Hercules, CA) wurden von Hand 1 μ l anti-His, anti-V5, anti-Thioredoxin (anti-Thio), anti-FOS, anti-PLC-gamma und anti-CREB Antikörper (Invitrogen, Carlsbad, CA; alle Antikörper mit einer Konzentration von ungefähr 1 mg/ml) aufgetragen. Alle Filter wurden für 1 Stunde in PEST mit 3% Milcheiweiß blockiert, dreimal mit PEST gewaschen und drei Stunden bei Raumtemperatur mit 1 μ g/ml biotinyliertem D1 Protein inkubiert. D1 ist ein Kreatinkinase Fusionsprotein aus einer cDNA-Bibliothek aus humanen, fetalen Herzen isoliert und in den pBAD-Thio-His-TOPO Vektor (Invitrogen, Carlsbad, CA) kloniert, zur Erzeugung eines Thioredoxin-V5-His-Kreatinkinase Fusionsproteins. D1 wurde nach Angaben des Herstellers mit dem EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC Biotinylation Kit (Pierce, Rockford, IL) biotinyliert

[0088] Nach drei weiteren Waschschritten mit demselben Puffer wurden die Filter mit Streptavidin/alkaline Phosphatase Konjugat oder Streptavidin/Meerrettich Peroxidase Konjugat (Boehringer Mannheim, GmbH Germany) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

[0089] Die Filter wurden fünfmal mit PEST gewaschen, getrocknet und mittels Eintauchen in ECL Chemiluminescent Substrat (ECL-Amersham, Arlington Heights, Illinois) oder dem chromogenischen Substrat BCIP/NBT (Sigma, Chemicals, st. Louis, MO) entwickelt. Ein Kodak Chemilumineszensfilm wurde für 1 bis 10 Sekunden mit den mit BCL entwickelten Filtern belichtet.

[0090] Die Ergebnisse sind in den [Abb. 1A](#), [Abb. 1B](#) und [Abb. 1C](#) gezeigt. In allen Fällen waren nur die Antikörper nachweisbar, die spezifisch für die Epitope auf dem Antigen-Fusionsprotein waren, und nur in den aufgetragenen Spots, was zeigt, dass das System sowohl ein gutes Signal-Stör-Verhältnis als auch Spezifität aufweist.

[0091] Das Experiment wurde mit einem Array wiederholt, das mit einem automatisierten Arrayer erzeugt worden war. Die Antikörper (1 mg/ml) wurden mit einem von Invitrogen entwickelten, automatisierten 96 Nadel Microarrayer gespottet. Neben den drei Antikörpern zur Positivkontrolle (anti-His, anti-Thio, anti-V5) wurden fünfzehn Antikörper als Negativkontrolle (gemischte Maus Monoklonale) aufgetragen. Die Filter wurden, wie oben beschrieben, unter Verwendung des alkalinen Phosphatase Konjugats und des chromogenischen Substrats BCIP/NBT behandelt.

[0092] Wie [Abb. 2](#) zeigt waren Bindung und Nachweis des Antikörpers hoch spezifisch und sensitiv.

Beispiel IV – Bewertung der Antikörperaffinität

[0093] Anti-His, anti-V5, anti-FOS, anti-PLC-gamma, 25C1 DG und anti-VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) Antikörper wurden auf einen Nitrocellulose Objektträger aufgetragen und reagierten, wie oben beschrieben, mit biotinyliertem D1 Protein. Die Bindung wurde, wie oben beschrieben, mit Sreptavidin-CY3 nachgewiesen. Die anti-V5 Antikörperspots zeigten eine rote, die anti-His Spots eine grüne Färbung, während die Negativkontrollen nicht nachweisbar waren (siehe [Abb. 3](#)). In einer schwarz-weiß Abbildung zeigt sich die relative Zunahme der Bindungsaffinitäten durch eine Zunahme von Weiß in einem vorgegebenen Bereich. Die Färbung der Spots weist generell auf das Vorliegen einer größeren Menge von fluoreszenzmarkiertem Antigen hin und zeigt damit die relative Bindungsaffinität zwischen Antikörper und Antigen an. Die Färbungen in absteigender Reihenfolge, von der höchsten bis zur geringsten Affinität, sind weiß, rot, gelb, grün und blau. Mit dieser Technik können viele Antikörper auf ihre Affinität zu einem einzelnen Antigen getestet werden.

Beispiel V – Polyklonale Antikörper Microarrays

[0094] Zum Nachweis einer spezifischen Bindung an polyklonale Antikörper wurden sechs Antikörper von Hand auf einen Nitrocellulose Objektträger aufgetragen, drei polyklonale Antikörper (anti-E12 (ungereinigtes polyklonales Serum vom Hasen an einem His-V5-Thioredoxin-Thymidinkinase Fusionprotein), anti-lexA (lexA Repressorprotein) und anti-GFP (grünes Fluoreszenzprotein)) und drei monoklonale Antikörper (anti-V5, anti-His und anti-GalU (ein Transkriptionsfaktor vom Säuger). Der Objektträger wurde mit PEST und 3% Milcheiweiß für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert und mit E12-Biotinkonjugat inkubiert, das analog zum

D1-Protein nach dem oben beschriebenen Protokoll hergestellt wurde. Nach ausführlichen Waschschriften mit PEST wurden die Objektträger für eine Stunde mit Streptavidin-CY3 Konjugat (Amersham, Arlington Heights, IL) inkubiert, fünfmal mit PEST gewaschen und vor dem Scannen auf dem Scan Array 3000 mittels Zentrifugation getrocknet.

[0095] Wie in [Abb. 4](#) zu sehen ist, wurde die Bindung mit beiden Antikörper, dem antigenspezifischen polyklonalen Antikörper (anti-B12) und den antigenspezifischen monoklonalen Antikörpern (anti-His, anti-V5) nachgewiesen und nicht mit einem der Antikörper, die als Negativkontrolle verwendet wurden.

Beispiel VI – Microarrayanalyse markierter Zelllysate

[0096] Eine Reihe von Experimenten wurde durchgeführt, um zu bestimmen, ob die Antikörper eines Mikroarrays in der Lage sind, Antikörper in einem Zelllysat spezifisch nachzuweisen.

[0097] CHO Zellen, die große Mengen an beta-Galaktosidase exprimieren, wurden bis zur Konfluenz in einer T-175-Flasche angezogen (Rams Medium mit Pen/Strep und L-Glutamin mit 10% FCS, bei 37°C mit 5% CO₂). Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA geerntet. NP40 Extrakte wurden durch Pelletieren der Zellen (107 Zellen), einen Waschschritt mit PBS und der Aufnahme in 5% NP40 präpariert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt. Die löslichen Proteine wurden mittels eines Pierce Biotinylierungskits, nach Angaben des Herstellers, biotiniert.

[0098] Nitrocellulose Objektträger (siehe oben) mit aufgetragenen monoklonalen Antikörpern (anti-beta-Gal, anti-His, anti-Thio, anti-V5, anti-FOS, anti-PLC-gamma, anti-VEGF und 25C10G (ein anti-CRM Antikörper) wurden blockiert, gewaschen, hybridisiert und mit Streptavidin-CY3, wie in Beispiel VI oben beschrieben, entwickelt. Wie in [Abb. 5A](#) zu sehen ist, kann beta-Galaktosidase Bindung nachgewiesen werden, auch wenn zusätzlich einige unspezifische Bindungen zu sehen sind.

[0099] Das Experiment wurde wiederholt, außer dass nach der Zentrifugation des Extraktes die löslichen Proteine, vor der Biotinylierung, über Nacht bei 4°C gegen 50 mM Phosphatpuffer dialysiert wurden. Wie in [Abb. 5B](#) zu sehen ist, wurde der größte Teil der unspezifischen Bindungen, die im vorherigen Experiment auftraten, beseitigt.

[0100] Beim nächsten Experiment wurden die dialysierten Extrakte mit den biotinierten, löslichen Proteinen zur Reduktion der unspezifischen, hydrophoben Wechselwirkungen auf 10% Glycerol eingestellt. Außerdem wurde die Natriumchlorid-Konzentration auf 0,2 M eingestellt, um die spezifischen, ionischen Wechselwirkungen zu erhöhen. Alle anderen Bedingungen blieben unverändert. Wie in [Abb. 5C](#) zu sehen ist wurden durch dieses Protokoll alle unspezifischen Bindungen beseitigt.

Patentansprüche

1. Ein Verfahren für das Vergleichen von Proteinexpression in zwei oder mehr als zwei Populationen von Zellen, wobei

dieses Verfahren Folgendes umfasst:

(a) Kontaktieren einer Antikörper-Anordnung auf einer festen Oberfläche mit einem Zelllysat einer ersten Zellpopulation,

wobei ein erstes Bindungsmuster erzeugt wird;

(b) Kontaktieren einer zweiten Antikörper-Anordnung auf einer festen Oberfläche mit einem Zelllysat einer zweiten Zellpopulation, wobei ein zweites Bindungsmuster erzeugt wird; und

(c) Vergleichen des Bindungsmusters des ersten Zelllysats mit dem Bindungsmuster des zweiten Zelllysats.

2. Ein Verfahren wie in Anspruch 1 beansprucht, wobei die Antikörper nicht charakterisierte Bindungsspezifität aufweisen.

3. Ein Verfahren wie in Anspruch 1 beansprucht, wobei es sich bei den Antikörpern um rekombinante Antikörper handelt.

4. Ein Verfahren wie in einem der Ansprüche 1 bis 3 beansprucht, wobei das erste Zelllysat von normalen Zellen und das zweite Zelllysat von anormalen Zellen stammt.

5. Ein Verfahren wie in Anspruch 4 beansprucht, wobei es sich bei den anormalen Zellen um Krebszellen

handelt.

6. Ein Verfahren wie ein einem der Ansprüche 1 bis 4 beansprucht, wobei das erste Zelllysat von normalen Zellen in einem ruhenden Zustand und das zweite Zelllysat von anormalen Zellen in einem angeregten Zustand stammt.

7. Ein Verfahren wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 beansprucht, wobei der Unterschied zwischen dem ersten und dem zweiten Zelllysat in dem Vorhandensein einer detektierbaren Markierung besteht.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Abbildung 1A

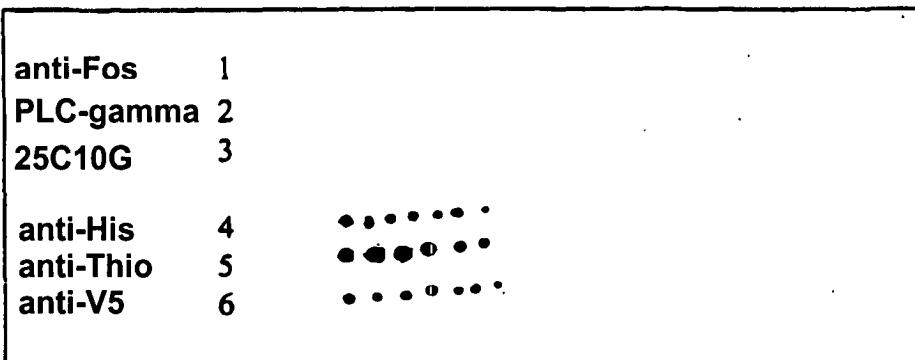


Abbildung 1B

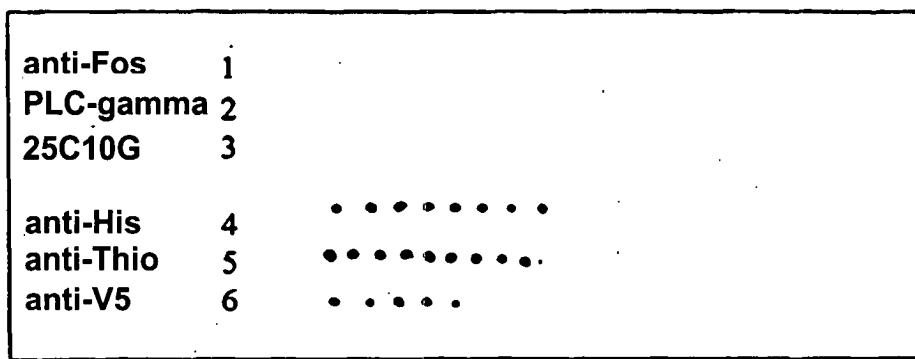


Abbildung 1C

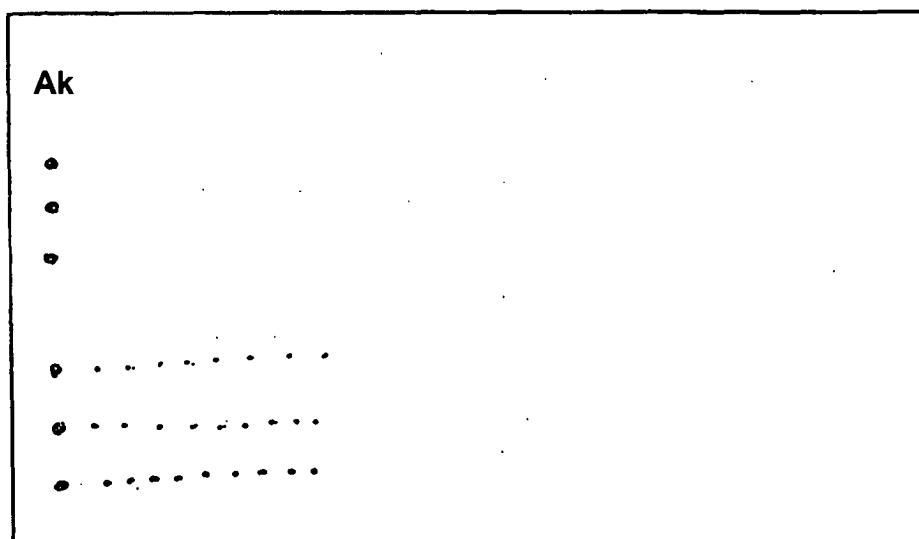


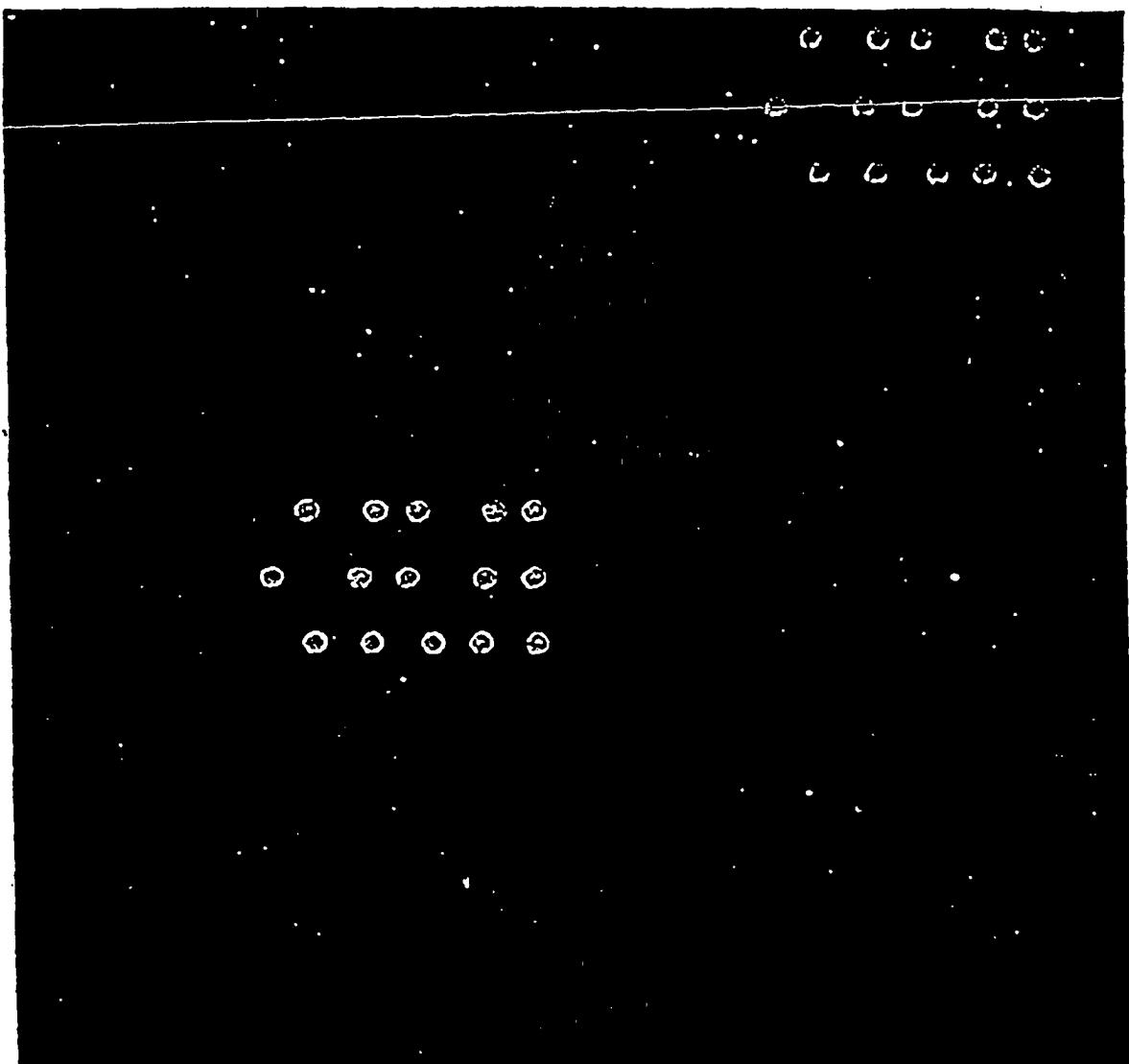
Abbildung 2



PLC - gamma

FOS

His



VEGF

V5

25C10G

Abbildung 3

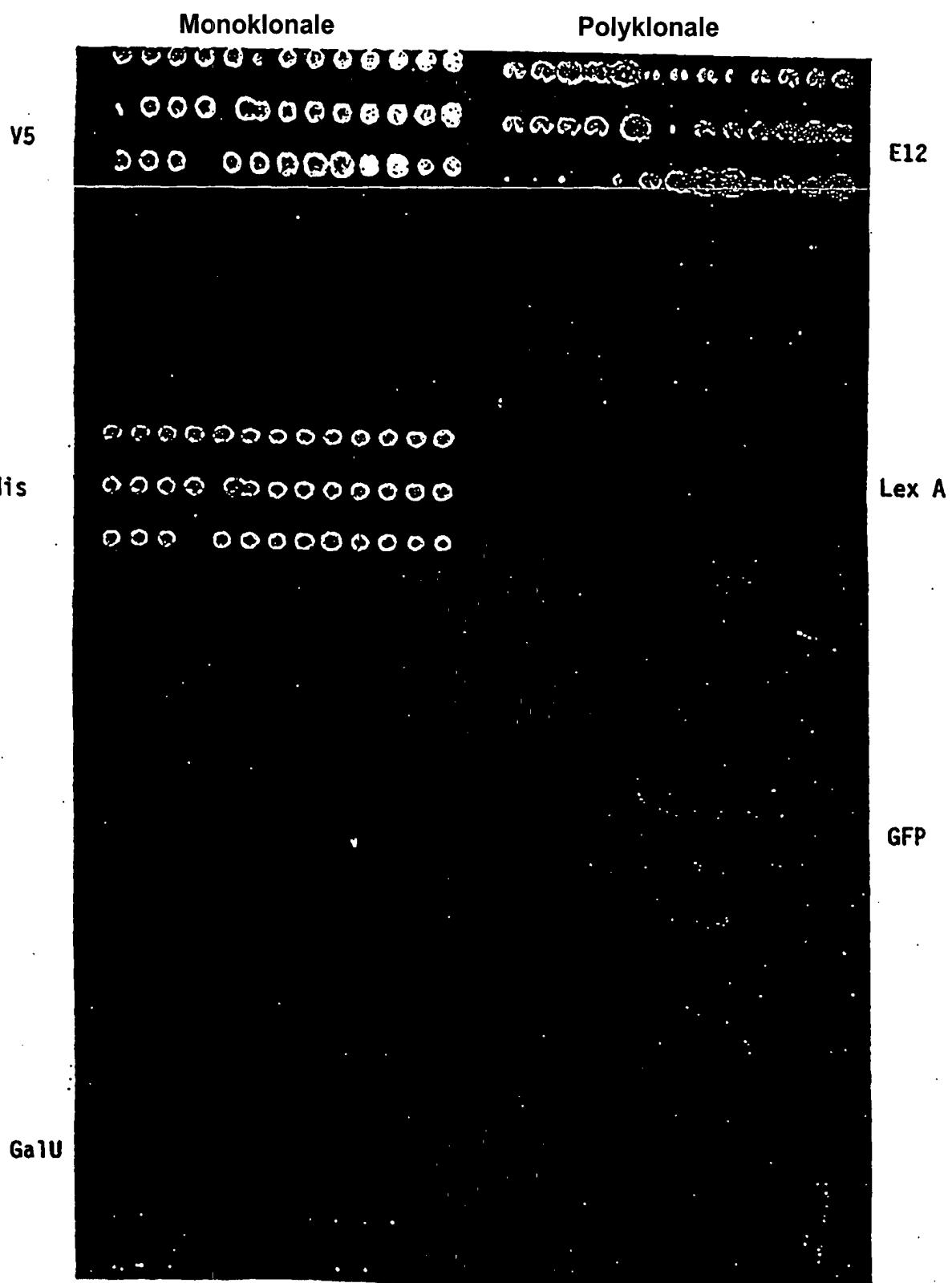


Abbildung 4

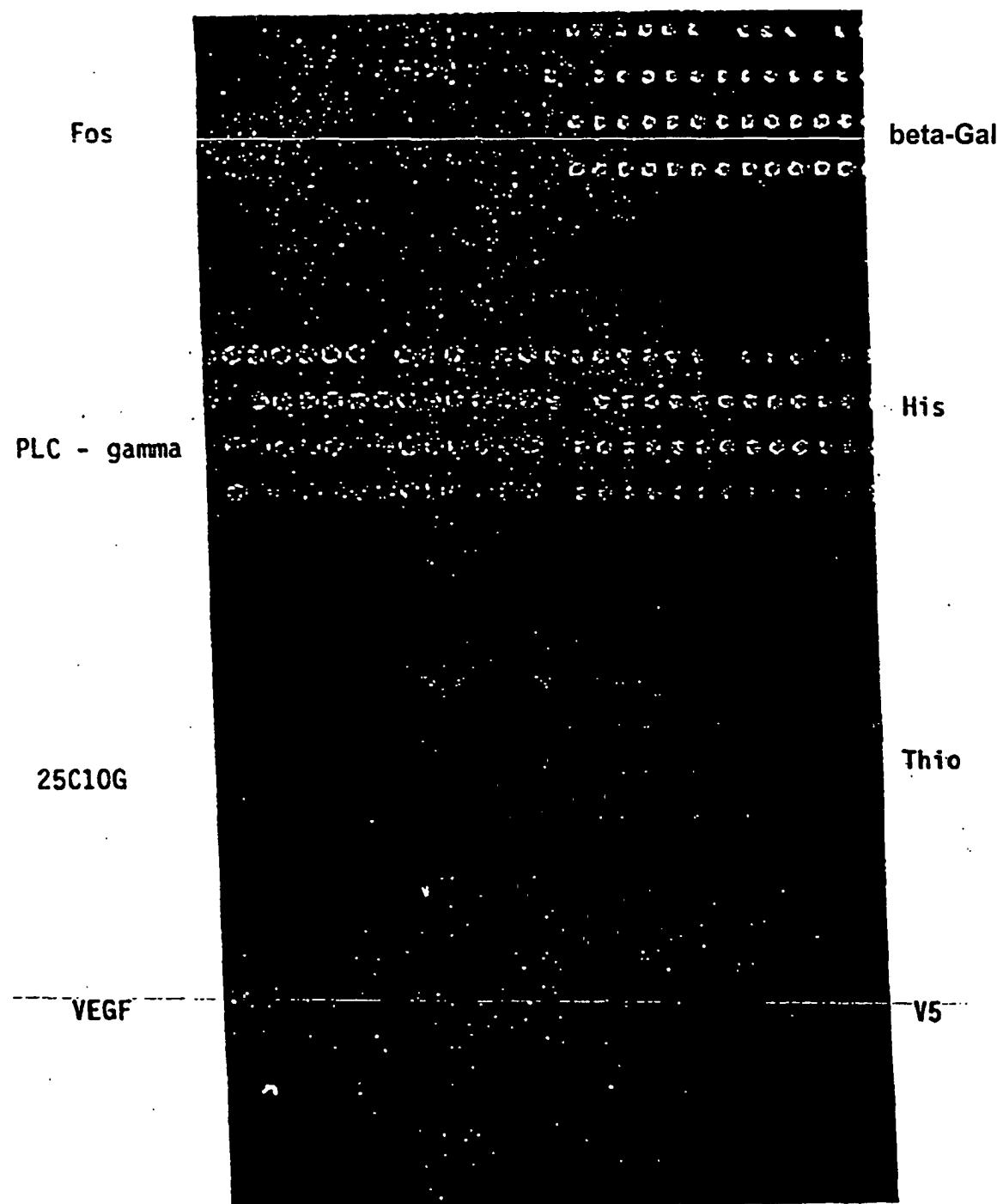


Abbildung 5A

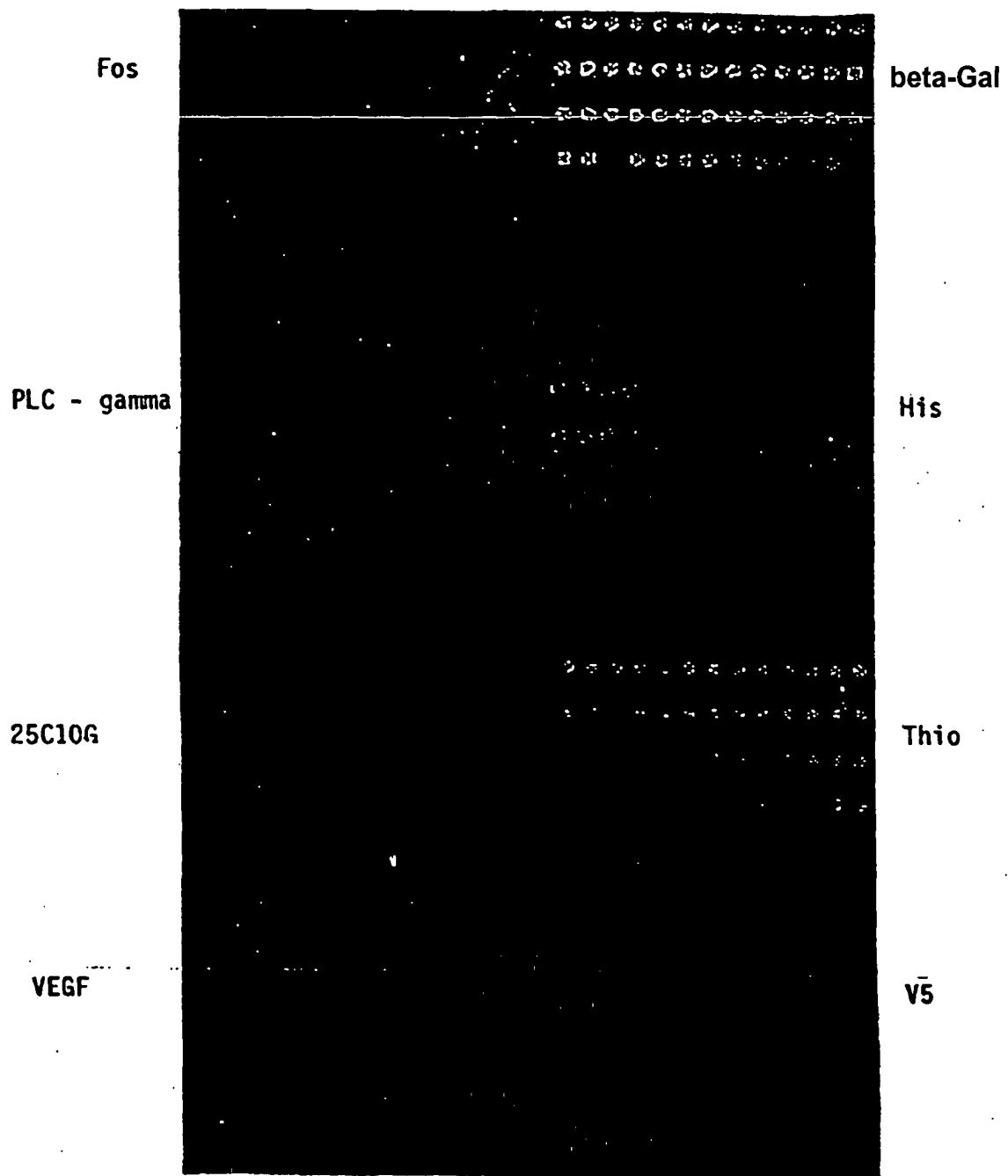


Abbildung 5B

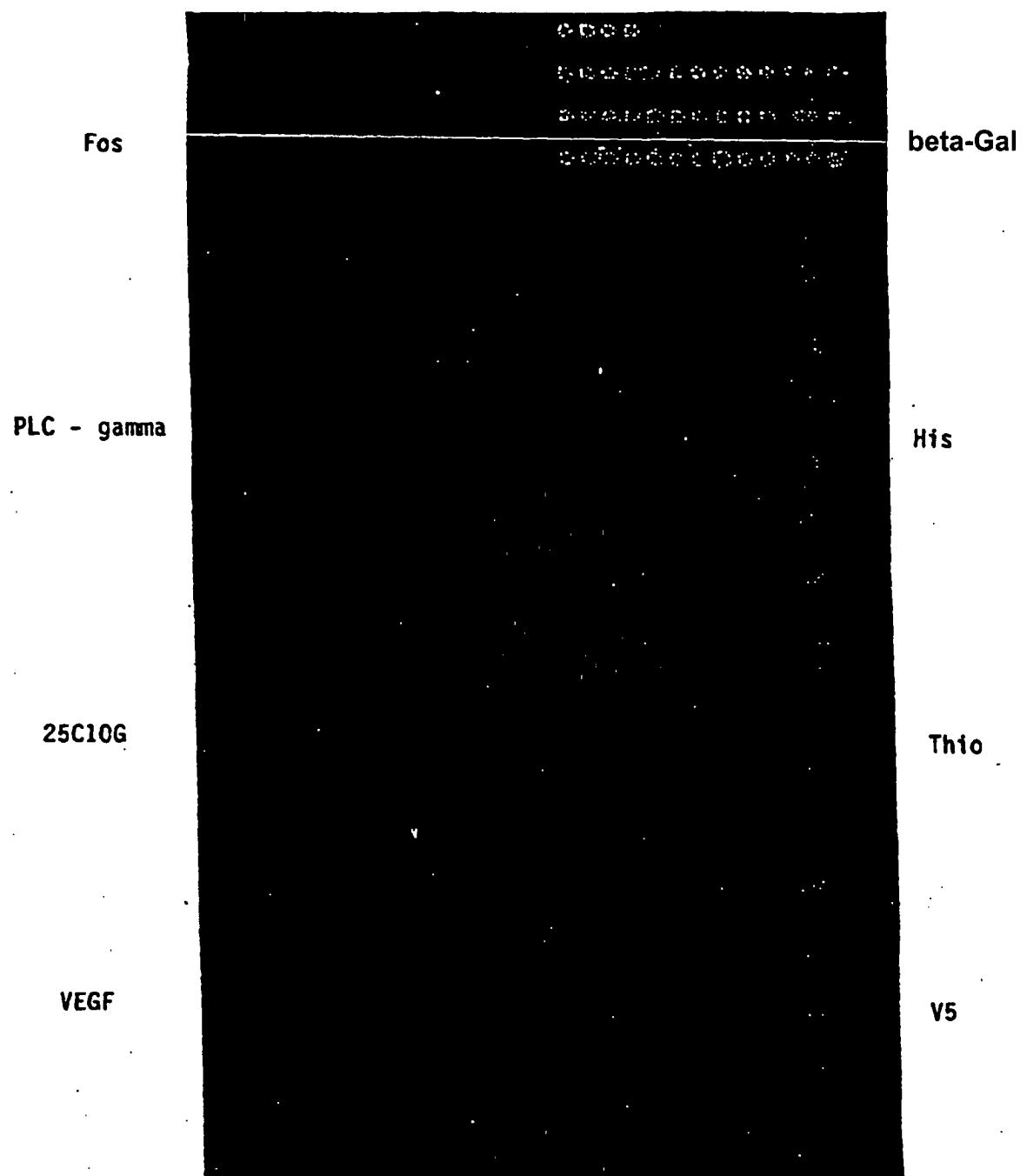


Abbildung 5C