

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/50

G01N 33/68

G01N 33/574



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01109720.5

[45] 授权公告日 2005 年 8 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 1213300C

[22] 申请日 2001.3.23 [21] 申请号 01109720.5

[30] 优先权

[32] 2000.3.24 [33] DE [31] 10014685.6

[71] 专利权人 MPB 梅尔泰克专利合伙企业

地址 德国马格德堡

[72] 发明人 瓦尔特·舒伯特

审查员 刘 铭

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 3 页 说明书 8 页

[54] 发明名称 鉴别细胞特异性靶结构的方法

[57] 摘要

本发明涉及鉴别细胞特异性靶结构的方法，特别是涉及鉴别细胞表面上的细胞特异性蛋白质组合模式的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种用于鉴别细胞特异性靶结构的方法，所述方法包括如下步骤：

(a) 将包括至少一种标记分子的试剂溶液 Y1 自动沉积在含有来自细胞或组织样品的细胞和/或细胞膜的物体 X1 上；

(b) 使试剂溶液 Y1 与物体 X1 反应，并自动检测用试剂溶液 Y1 标记的物体 X1 的至少一种标记模式；

(c) 在检测该标记模式之前或之后除去所述试剂溶液 Y1，并用其他试剂溶液 Yn (n=2, 3, ..., N) 重复步骤 (a) 和 (b)，每种试剂溶液均含有所述的至少一种标记分子和/或至少另一种标记分子；

(d) 组合步骤 (b) 中检测的标记模式以得到物体 X1 的复合分子组合模式；

(e) 用含有来自不同的细胞或组织样品的其他细胞和/或其他细胞膜的至少另一种物体 Xn (n=2, 3, ..., N) 重复步骤 (a) 至 (d)；

(f) 确定物体 X1 和物体 Xn 的组合模式之间的至少一种差异；

(g) 鉴别其标记模式导致步骤 (f) 中确定的差异的至少一种试剂溶液 Y1 或 Yn；

(h) 选择来自不同于步骤 (f) 确定的物体 Xn 的细胞或组织样品的细胞和/或细胞膜的匀浆物中的由至少步骤 (g) 鉴别的

试剂溶液 Y1 或 Yn 的标记分子结合的分子或分子复合物；以及

(i) 生物化学鉴定步骤 (h) 中选择的分子或分子复合物。

2、权利要求 1 的方法，其中在步骤 (h) 之前，步骤 (h) 所用的匀浆物通过分子或分子复合物分离方法分成各个匀浆物成分。

3、权利要求 2 的方法，其中所述分子或分子复合物分离方法是蛋白质分离方法。

4、权利要求 1 的方法，其中所述物体 X1 含有来自患者的细胞或组织样品的细胞和/或细胞膜，且至少一种其他的物体 Xn 含有来自健康测试者的细胞或组织样品的细胞和/或细胞膜。

5、权利要求 1 的方法，其中所述方法包括如下额外步骤：

(x) 制备物体 X1 和 Xn 所用的细胞和/或细胞膜所来自的每种所述细胞或组织样品的每一样品部分的蛋白质表达分布图，并将物体 X1 相关的蛋白质表达分布图与物体 Xn 相关的蛋白质表达分布图相比较，这种比较将显示至少一种差异。

6、权利要求 5 的方法，其中所述方法在步骤 (x) 之后包括如下步骤：

(y) 检查导致步骤 (x) 中确定的差异的至少一种蛋白质和/或至少一种蛋白质修饰是否结合步骤 (g) 中鉴别的试剂溶液 Y1 或 Yn 的至少一种标记分子。

7、权利要求 5 的方法，其中步骤 (a) 和/或步骤 (c) 所用的至少一种标记分子与导致步骤 (x) 检测的差异的至少一种蛋白质和/或至少一种蛋白质修饰结合。

8、权利要求 1 的方法，其中步骤 (a) 和/或步骤 (c) 所用的至少一种标记分子是荧光素缀合的。

9、权利要求 1 的方法，其中步骤 (a) 和/或步骤 (c) 所用的至少一种标记分子是抗体。

10、权利要求 9 的方法，其中所述抗体得自抗体文库，该抗体文库是原初型或非原初型。

11、权利要求 1 的方法，其中步骤 (a) 和/或步骤 (c) 所用的至少一种标记分子是配体。

12、权利要求 11 的方法，其中所述配体得自配体文库，该配体文库是原初型或非原初型。

13、权利要求 1 的方法，其中在步骤 (c) 除去试剂溶液之后，进行一漂洗步骤，该步骤中将一种漂洗溶液沉积在物体 X1 上，完全洗掉试剂溶液之后除去。

14、权利要求 1 的方法，其中步骤 (d) 通过计算机辅助成象覆盖图进行。

15、权利要求 1 的方法，其中所述方法包括随机重复的漂白循环。

16、权利要求 15 的方法，其中所述随机重复的漂白循环在步骤 (b) 之后。

鉴别细胞特异性靶结构的方法

技术领域

本发明涉及鉴别细胞特异性靶结构的方法。

背景技术

鉴别细胞特异性靶结构对于验证可能导致生物体内无法估计的作用的细胞-细胞相互作用是关键。特别地，了解疾病特异性靶结构是开发有效的同时副作用很小的药物的决定性必要条件。

现有技术已知免疫细胞（淋巴细胞）表达特异组合的蛋白质，也称为蛋白质组合模式，简称 PCP，其负责结合脑和肌肉组织中的血管的内皮样细胞。其他蛋白质组合却不导致与这种内皮样细胞的结合。令人惊奇地，这些特异的组合是个体间一致的，总是显示相同的结合功能。其结果是，所述特异性蛋白质组合模式似乎是细胞表面的个体间一致的淋巴细胞结合密码，用于结合存在细胞特异性靶结构的器官特异性内皮样细胞表面。细胞特异性靶结构因此可显示相当特异的蛋白质组合模式。

浸润性肿瘤细胞表面也显示特异性蛋白质组合模式，其将导致目的明确的即器官选择性浸润行为。为此，这种蛋白质组合模式组成了可能的药物的靶结构。

然而，开发这种高选择性药物的一不可避免的的必要条件是这种靶结构的分子组成的知识。

现有技术中公开了鉴别靶结构的方法，其是基于分析疾病组织或细胞的基因表达模式，与健康组织或细胞的基因表达模式相比较，

蛋白质表达模式和信使核糖核酸 (mRNA) 均意在提供新蛋白质的表现、疾病组织或细胞中失控的或异常修饰的蛋白质的信息 (例如: F. Lottspeich/H. Zorbas; Bioanalytik; Spektrum Analytischer Verlag; Heidelberg, 1998)。

但是, 这些方法均使用细胞匀浆物, 其通常基于几千个或几百万个细胞, 因为仅能通过这样大量的细胞才能产生上述的表达模式。在细胞匀浆物中, 细胞以破碎的开放形式存在, 从而可通过生物化学方法进行抽提和分离。

这些现有技术方法的一个缺点是它们不适合鉴别蛋白质组合模式, 因为这种蛋白质组合模式中的各个蛋白质组分由于产生细胞匀浆物和随后的抽提步骤而完全分离, 由此丧失了其细胞和组织拓扑学位置的相关信息。另外, 破坏细胞区室使得不能获得这些细胞区室内的蛋白质组合及其相关拓扑学相互关系的信息。

另外, 现有技术方法另一缺点是它们不能在一个细胞水平进行分析, 从而不能指出各个细胞的不同方式的蛋白质组合模式。再者, 仅以少量存在的蛋白质不能由现有技术方法检测。这在例如仅存在于少数致病性疾病特异性细胞中的蛋白质或特异性蛋白质组合的情况下尤其如此。

现有技术方法的另一缺点是制备组织或细胞的步骤从它们的取出或收集直至分离蛋白质的步骤可能受到各种可变的外部影响, 不能控制和标准化。

发明内容

因此, 本发明的目的在于提供能够鉴别细胞特异性组合模式的

方法，其克服了上述现有技术中的缺点。

本发明目的通过鉴别细胞特异性靶结构的创造性方法而实现，该方法包括如下步骤：(a) 将包括至少一种标记分子的试剂溶液 Y1 自动沉积在含有来自细胞或组织样品的细胞和/或细胞膜的物体 X1 上；(b) 使试剂溶液 Y1 反应，并自动检测用试剂溶液 Y1 标记的物体 X1 的至少一种标记模式；(c) 在检测该标记模式之前或之后除去所述试剂溶液 Y1，并用其他试剂溶液 Yn (n=2, 3, ..., N) 重复步骤 (a) 和 (b)，每种试剂溶液均含有所述的至少一种标记分子和/或至少另一种标记分子；(d) 组合步骤 (b) 中检测的标记模式以得到物体 X1 的复合分子组合模式；(e) 用含有来自不同的细胞或组织样品的其他细胞和/或其他细胞膜的至少另一种物体 Xn (n=2, 3, ..., N) 重复步骤 (a) 至 (d)；(f) 确定物体 X1 和物体 Xn 的组合模式之间的至少一种差异；(g) 鉴别其标记模式导致步骤 (f) 中确定的差异的至少一种试剂溶液 Y1 或 Yn；(h) 选择来自不同于步骤 (f) 确定的物体 Xn 的细胞或组织样品的细胞和/或细胞膜的匀浆物的由至少步骤 (g) 鉴别的试剂溶液 Y1 或 Yn 的标记分子结合的分子或分子复合物；以及 (i) 生物化学鉴定步骤 (h) 中选择的分子或分子复合物。

本发明方法使得能对比性检查来自不同细胞或组织样品的各个细胞或细胞膜的蛋白质组合模式，由此可鉴别这样的标记分子，其例如结合来自第一种组织或细胞样品的第一个物体的特定蛋白质组合模式或这种蛋白质组合模式的特定区域，而同时不结合来自第二

种组织或细胞样品的第二个物体。通过这些鉴别的标记分子，可以用第一种组织和/或细胞样品的样品部分检测或选择并随后鉴定那些由所鉴别的标记分子结合的蛋白质组合模式的分子区域（分子或分子复合物）。这使得能检测一种蛋白质组合模式的分子组成，所述蛋白质模式中的分子排列以及该蛋白质组合模式在一种组织或细胞内的排列。

具体实施方式

根据本发明的一特别优选的实施方案，在步骤（h）之前，步骤（h）所用的匀浆物通过分子或分子复合物分离方法、特别是蛋白质分离方法分成各个匀浆物成分，这将特别有利于从匀浆物选择分子或分子复合物。

根据本发明的另一优选的实施方案，物体 X1 含有来自患者的细胞或组织样品的细胞和/或细胞膜，且至少一种其他的物体 Xn 含有来自健康测试者的细胞或组织样品的细胞和/或细胞膜。这将使得能鉴别疾病特异性靶结构或相应蛋白质组合模式，并且基于这些疾病特异性蛋白质组合模式的知识，将能开发高度特异性的药物，这种药物由于非常特异性因而几乎无副作用。

根据本发明的另一优选的实施方案，所述方法包括如下平行步骤：（x）制备物体 X1 和 Xn 所用的细胞和/或细胞膜所来自的每种所述细胞或组织样品的每一样品部分的蛋白质表达分布图，并将物体 X1 相关的蛋白质表达分布图与物体 Xn 相关的蛋白质表达分布图相比较，这种比较将显示至少一种差异。

另外，本发明方法在步骤（x）之后可包括如下步骤：（y）检查

导致步骤 (x) 中确定的差异的至少一种蛋白质和/或至少一种蛋白质修饰是否结合步骤 (g) 中鉴别的试剂溶液 Y1 或 Yn 的所述至少一种标记分子。这将能够确定通过比较蛋白质表达分布图检测的差异是否是与方法相关的假象 (见上述), 或者它们是真正形成明显差异, 因为它们在本发明方法中也检测到。本发明方法因此也可用作已知方法的一个重要补充。

根据本发明的另一特别优选的实施方案, 步骤 (a) 和/或步骤 (c) 所用的至少一种标记分子与导致步骤 (x) 确定的差异的至少一种蛋白质和/或至少一种蛋白质修饰结合。使用已知的方法, 例如可开发与通过比较蛋白质表达分布图鉴别为靶结构区域的蛋白质或蛋白质修饰结合的抗体或配体。在本发明方法中使用这些抗体或配体将使得能检查通过比较蛋白质表达分布图确定的蛋白质是否将产生蛋白质组合模式。

另外, 步骤 (a) 和/或步骤 (c) 所用的至少一种标记分子可以是荧光素缀合的, 这种荧光素标记将使标记分子特别易于检测。

另外, 步骤 (a) 和/或步骤 (c) 所用的至少一种标记分子可以是抗体, 该抗体可得自抗体文库, 该抗体文库可以是原初型或非原初型。所谓的原初型抗体文库是其抗体不显示任何已知特异性的文库, 而非原初型抗体文库的抗体将识别已知的分子如蛋白质或糖蛋白。因此使用非原初型文库将提供即时信息, 如抗体的性质及所述抗体与何种分子结合等。

另外, 步骤 (a) 和/或步骤 (c) 所用的至少一种标记分子可以

是配体。该配体可得自配体文库，该配体文库可以是原初型或非原初型。术语“原初型”和“非原初型”的定义与上述类似。

在步骤(c)除去试剂溶液之后，可进行一漂洗步骤，该步骤中将一种漂洗溶液沉积在物体 X1 上，一段时间后除去。这将防止新沉积的试剂溶液被先前施加的试剂溶液污染。

有利地，步骤(d)可通过计算机辅助成象覆盖图进行。

所述方法可包括随机重复的漂白循环，特别是在步骤(b)之后。这种漂白循环将防止已被检测的标记在后续步骤中不再被检测到。

本发明的详细细节、特征和优点将参照下述实施方案的描述而清楚。

在该实施方案中，组织或细胞样品分成两个样品部分，第一个样品部分作为起始材料产生匀浆物，用于根据已知方法生物化学鉴定蛋白质。特别应用如 2D 凝胶电泳的方法制备蛋白质表达分布图。

第二个样品部分用于制备组织切片或具有完整细胞的细胞制备物。当第二个样品部分是组织块时，制备其组织切片。但是当其是悬液中的细胞时，这些细胞将以完整形式施加于一个表面，特别是玻片上。以此方式获得的第一个物体进行下述自动化步骤：

1. 取具有非原初型抗体文库的一或多个荧光素缀合抗体的第一种试剂溶液 Y1；
2. 将所述试剂溶液 Y1 加至第一个物体上；
3. 在特定温度、特别是室温将所述物体与这一溶液 Y1 保温；
4. 去除所述试剂溶液；

5. 向物体上一次或多次滴加漂洗溶液，随后除去所述漂洗溶液；
6. 将一种缓冲溶液加至所述第一个物体上；
7. 检测荧光分布图，如果使用多种荧光素则用选择性荧光记录滤波器照相，在这一步骤中，确定样品中的一个抗体/多个抗体是否显示结合信号及在何处显示结合信号，类似地数字记录第一个物体的细胞或组织的每一成象点或位点的阳性和阴性信号；
8. 再次施加漂洗溶液；
9. 通过荧光激发漂白样品，当不再能检测到荧光时终止漂白步骤；
10. 除去所述漂洗溶液；
11. 取具有不同或相同抗体文库的一或多个类似地荧光素缀合抗体的第二种试剂溶液 Y2；
12. 将所述试剂溶液 Y2 加至第一个物体上。

通过重复步骤 1—10 而持续这一方法，所用试剂溶液 Y3, Y4, Y5, ..., Yn 可含有非原初型或原初型文库的抗体或配体。以此方式，可用完整的原初型文库、完整的非原初型文库或非原初型和原初型文库混合体检查一个相同物体。

每个方法循环（步骤 1—10）通过记录相应相差成象或鉴别性干扰相差成象而终止。

基于步骤 7 中记录的标记模式，通过计算机辅助成象覆盖图确

定存在的信号组合和不存在的信号组合，两者一起给出组合模式。

针对第一个物体确定的这一组合模式与其他样品或测试者、细胞状态或疾病的其他组合模式进行比较，所述其他组合模式通过用相同试剂溶液根据上述相同标准化步骤分析得到。

如果这一比较得到特异于所检查样品的独特信号组合，或者如果得到特异于一种状态、细胞类型、疾病或功能的信号组合，则这些信号组合基于特异的即选择性分子相互作用，并因此鉴定了所述状态、疾病、功能或细胞类型。随后可将相应抗体或配体与所检测的信号组合结合。

以此方式滤出的抗体和/或配体随后可用于“捕获”第一个样品部分中的能特异地结合这些配体或抗体的蛋白质、糖蛋白或其他碳水化合物，为此，可使用已知的生物化学分析方法。如此发现的分子可以是单个的分子或不同分子的复合物，在每种情况下，它们均组成了高度特异的靶结构，特别用于开发药物。