

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-514913

(P2005-514913A)

(43) 公表日 平成17年5月26日(2005.5.26)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

C 1 2 P 21/02

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/566

G O 1 N 37/00

F I

C 1 2 N 15/00

C 1 2 P 21/02

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/566

G O 1 N 37/00 1 O 2

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

4 B O 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 32 頁)

(21) 出願番号 特願2003-523646 (P2003-523646)

(86) (22) 出願日 平成14年8月22日 (2002. 8. 22)

(85) 翻訳文提出日 平成16年2月20日 (2004. 2. 20)

(86) 国際出願番号 PCT/CA2002/001374

(87) 国際公開番号 W02003/018797

(87) 国際公開日 平成15年3月6日 (2003. 3. 6)

(31) 優先権主張番号 60/314, 333

(32) 優先日 平成13年8月22日 (2001. 8. 22)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(31) 優先権主張番号 60/375, 627

(32) 優先日 平成14年4月25日 (2002. 4. 25)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504066807

ヘリックス バイオフィーマ コーポレイ
ションカナダ国 エル4 ジー 6 エックス7 オ
ンタリオ, オーロラ, インダストリア
ル パークウェイ サウス 3-305

(74) 代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74) 代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74) 代理人 100113413

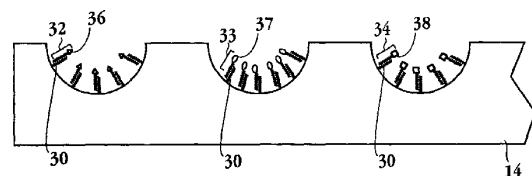
弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 内在性タンパク質の発現、精製および検出のための、方法およびデバイス

(57) 【要約】

分析のために、標的タンパク質または標的タンパク質のアレイを提示するための方法が開示される。この方法は、コード配列を形成する工程；基材上のウェル中に、このコード配列、および選択されたタンパク質合成条件下で標的タンパク質を発現し得るタンパク質合成成分を配置する工程であって、このウェルは、第二のコイル形成ペプチドで官能化された表面を有する、工程；このような条件下でこのコード配列を発現する工程であって、ここで、このように合成された標的タンパク質は、コイル-コイルヘテロダイマー形成によってこのウェルに結合し、従って、捕捉された形態で、このウェルにおいて分析のために提示される、工程；ならびにこのウェルを洗浄して未結合の成分を除去する工程、を包含する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

固相分析のために標的タンパク質を調製するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 基材上のウェル中で混合物を形成する工程であって、該混合物は、以下：

(i) 以下：

(A) 第一のコイル形成ペプチドをコードする第一の核酸配列であって、該第一のコイル形成ペプチドは、選択された電荷を有し、かつ第二の反対に荷電したコイル形成ペプチドと相互作用して、安定な α ヘリックスコイルドコイルヘテロダイマーを形成する、第一の核酸配列；および

10

(B) 該標的タンパク質をコードする第二の核酸配列、を含む、コード配列；

(i i) 該ウェル中の選択されたタンパク質合条件下で該標的タンパク質を発現し得るタンパク質合成成分であって、該ウェルは、該第二のコイル形成ペプチドで官能化された表面を有する、タンパク質合成成分、を含有する、工程；

(b) 該標的タンパク質が合成され、そしてコイルーコイルヘテロダイマー形成によって該ウェルに結合し、従って、捕捉された形態で、該ウェルにおいて分析のために提示されるような条件下で、該混合物を反応させる、工程；ならびに

(c) 該ウェルを洗浄して、未結合の成分を除去する工程、を包含する、方法。

20

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、前記コード配列は、前記第一の核酸配列が前記第二の核酸配列とインフレームであるように、該第一の核酸配列を含むクローニングベクターの切断可能な部位において、該第二の核酸配列をクローニングすることによって形成される、方法。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法であって、前記クローニングベクターは、5' から 3' の方向で、以下：

(a) 転写および翻訳開始領域；

30

(b) 前記標的タンパク質をコードする核酸が挿入され得る、切断可能な部位；

(c) 前記第一の核酸配列；

(d) 転写および翻訳終結領域、

を含み、かつこれらに作動可能に連結される、方法。

【請求項 4】

請求項 2 に記載の方法であって、前記クローニングベクターは、5' から 3' の方向で、以下：

(a) 転写および翻訳開始領域；

(b) 前記第一の核酸配列；

(c) 前記標的タンパク質をコードする核酸が挿入され得る、切断可能な部位；

40

(d) 転写および翻訳終結領域、

を含み、かつこれらに作動可能に連結される、方法。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の方法であって、前記コード配列は、以下の工程：

(a) 前記第一の核酸配列を前記第二の核酸配列に連結して、キメラコード配列を形成する工程；および

(b) 該キメラコード配列にハイブリダイズし、そして該キメラコード配列を増幅するように設計された PCR プライマーを用いて、該キメラコード配列を増幅する工程、によって形成される、方法。

【請求項 6】

50

請求項 1 に記載の方法であって、前記コード配列は、以下の工程：

(a) 前記第二の核酸配列を必要に応じてキャップ除去する工程であって、該第二の核酸配列が mRNA 分子である、工程；

(b) 以下：

(i) 前記第一のコイル形成ペプチドをコードする前記第一の核酸配列、および

(i i) 3' 末端に向かって転写するように配向された転写開始領域、を含む第一のオリゴヌクレオチドプライマーを、該 mRNA 分子の 5' 末端に連結して、RNA テンプレートを形成する工程；

(c) 逆転写酵素、デオキシリボヌクレオチド三リン酸、およびオリゴヌクレオチド dT 配列を含む第二のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、該 RNA テンプレートを逆転写して、第一鎖 cDNA を形成する工程； 10

(d) 該第一鎖 cDNA から該 mRNA を除去する工程；

(e) 該第一鎖 cDNA、DNA ポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオチド三リン酸、および該第一のプライマー配列の少なくとも 12 ヌクレオチドを含む第三のオリゴヌクレオチドプライマーをインキュベートして、二重鎖 cDNA を形成する工程；

(f) DNA ポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオチド三リン酸、該 cDNA の 3' 末端の少なくとも 12 ヌクレオチドに相補的な第四のオリゴヌクレオチドプライマー、およびその第二鎖の 3' 末端の少なくとも 12 ヌクレオチドに相補的な第五のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、該二重鎖 cDNA を増幅する工程；

によって形成される、方法。 20

【請求項 7】

請求項 1 に記載の方法であって、前記コード配列が、以下の工程：

(a) 必要に応じて前記第二の核酸配列をキャップ除去する工程であって、該第二の核酸配列が、mRNA 分子である、工程；

(b) 該 mRNA 分子の 5' 末端に第一のオリゴヌクレオチドプライマーを連結して、RNA テンプレートを形成する工程；

(c) 逆転写酵素、デオキシリボヌクレオチド三リン酸、およびオリゴヌクレオチド dT 配列を含む第一のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、該 RNA テンプレートを逆転写して、第一鎖 cDNA を形成する工程；

(d) 該第一鎖 cDNA から該 mRNA を除去する工程； 30

(e) 該第一鎖 cDNA、DNA ポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオチド三リン酸、および該第一のプライマー配列の少なくとも 12 ヌクレオチドを含む第二のオリゴヌクレオチドプライマーをインキュベートして、二重鎖 cDNA を形成する工程；

(f) 該二重鎖 cDNA を、DNA ポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオチド三リン酸、ならびに以下：

(i) 該 cDNA の第一鎖の 3' 末端の少なくとも 12 ヌクレオチドに相補的な領域；および

(i i) クローニングベクター中の第一の制限酵素部位と適合性の制限酵素部位、を含む第三のオリゴヌクレオチドプライマー、および以下：

(i) その第二鎖の 3' 末端の少なくとも 12 ヌクレオチドに相補的な領域；および 40

(i i) 該クローニングベクター中の第二の制限酵素部位と適合性の制限酵素部位、を含む第四のオリゴヌクレオチドプライマー、を用いて増幅する工程；

(g) 該第一および第二の制限酵素部位にて切断し得る制限酵素を用いて、該増幅産物および該クローニングベクターを消化する工程；ならびに

(h) 該消化された増幅産物を該クローニングベクター中にクローニングする工程、によって形成される、方法。

【請求項 8】

請求項 5 または 6 に記載の方法であって、前記増幅産物が、以下：

(a) 該増幅産物中の翻訳開始領域を認識する DNA 依存性 RNA ポリメラーゼを使用して、前記テンプレート配列をインビトロで転写する工程；および 50

(b) 該転写産物を、適切なインビトロの無細胞翻訳系と合わせる工程、
をさらに包含することによって、インビトロで翻訳される、方法。

【請求項 9】

請求項 2 または 7 に記載の方法であって、前記目的の核酸配列が、以下：

(a) 前記コード配列の下流を切断する制限酵素を用いて、前記クローニングベクター
を線状化する工程；

(b) 該クローニングベクター中の翻訳開始領域を認識する DNA 依存性 RNA ポリメ
ラーゼを使用して、前記テンプレート配列をインビトロで転写する工程；および

(c) 該転写産物を、適切なインビトロの無細胞翻訳系と合わせる工程、
をさらに包含することによって、インビトロで翻訳される、方法。

10

【請求項 10】

請求項 1 に記載の方法であって、前記コード配列が、該コード配列を翻訳し得る細胞中に
形質転換またはトランスフェクトされ、ここで、前記タンパク質合成成分が、該細胞を含
む、方法。

【請求項 11】

複数の標的タンパク質の提示を実施するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 基材中の複数のウェルの各々に、複数の異なる配列の核酸分子のうちの選択され
た 1 つを添加する工程であって、該ウェルは、その中に第一のコイル形成ペプチドを有し
、該核酸分子の各々は、第二のコイル形成ペプチドをコードする共通配列を捕捉する部分
および標的タンパク質をコードする異なる配列を標的化する部分を有する、工程；

20

(b) 選択されたタンパク質発現条件下で、該異なる配列の核酸分子を発現し得るタン
パク質合成成分を含有する溶液で、該ウェルを満たす工程；

(c) このような条件下で該異なる配列の核酸分子の発現を促進する工程であって、各
ウェル中で発現される該標的細胞は、コイル-コイルヘテロダイマー形成によって該ウェ
ルに結合し、従って、補足された形態で、該ウェルにおいて分析のために提示される、工
程；ならびに

(d) 該ウェルを洗浄して、未結合の成分を除去する工程、
を包含する、方法。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の方法であって、前記基材が、96 ウェルのアレイである、方法。

30

【請求項 13】

請求項 11 に記載の方法であって、前記基材が、前記溶液を保持し得るウェルを有する、
MALDI-MS プレートである、方法。

【請求項 14】

インビトロの無細胞翻訳系と共に使用するための、固相分析のために 1 つ以上のタンパク
質を提示するためのキットであって、該キットは、以下：

(a) 複数のウェルを含む基材であって、各ウェルは、選択された電荷を有し、かつ第
二の反対に荷電したコイル形成ペプチドと相互作用して、安定な α ヘリックスコイルドコ
イルヘテロダイマーを形成し得る、第一のコイル形成ペプチドで官能化されている、基材
；

40

(b) クローニングベクターであって、該クローニングベクターは、5' から 3' の方
向で、以下：

(i) 転写および翻訳開始領域；

(i i) 該第二のコイル形成ペプチドをコードする核酸配列；

(i i i) 転写および翻訳終結領域、

を含み、かつこれらに作動可能に連結される、クローニングベクター；

(c) 該ベクターはまた、異種タンパク質をコードする核酸が、(i) と (i i) との
間、または (i i) と (i i i) との間に挿入され得る切断可能部位を有する、ベクター
、
を備える、キット。

50

【請求項 15】

多重化したインビトロの無細胞タンパク質合成系であって、以下：

(a) 複数のウェルを含む基材であって、各ウェルは、選択された電荷を有し、かつ第二の反対に荷電したコイル形成ペプチドと相互作用して、安定な α ヘリックスコイルドコイルヘテロダイマーを形成し得る、第一のコイル形成ペプチドに結合されている、基材；

(b) 該ウェルの各々において、以下：

(i) 以下：

(A) 第一のコイル形成ペプチドをコードする第一の核酸配列であって、該第一のコイル形成ペプチドは、選択された電荷を有し、かつ第二の反対に荷電したコイル形成ペプチドと相互作用して、安定な α ヘリックスコイルドコイルヘテロダイマーを形成する、第一の核酸配列；および

10

(B) 該標的タンパク質をコードする第二の核酸配列、を含む、コード配列；

(i i) 該ウェル中の選択されたタンパク質合成条件下で該標的タンパク質を発現し得るタンパク質合成成分であって、該ウェルは、該第二のコイル形成ペプチドで官能化された表面を有する、タンパク質合成成分、が含まれ、これにより、

該標的タンパク質が合成され、そしてコイルーコイルヘテロダイマー形成によって該ウェルに結合し、従って、捕捉された形態で、該ウェルにおいて分析のために提示されるような条件下で、該混合物が反応する、

20

多重化したインビトロの無細胞タンパク質合成系。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、米国特許仮出願番号 60/314,333 (2001年8月22日出願) および米国特許仮出願番号 60/375,627 (2002年4月25日出願) の利益を主張し、これら両方の出願は、その全体が本明細書中で参考として援用される。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、分析のために標的タンパク質または標的タンパク質のアレイを提示するための方法、および本発明の実施において使用するためのキットに関する。

30

【0003】

(参考文献)

【0004】

【数 1】

Innis *et al.*, PCR PROTOCOLS, Academic Press, Inc., San Diego Calif., (1990).

Krieg, P.A. and Melton, D.A., *Meth. Enzymol.* 155:397, (1984).

Leibowitz, *et al.*, *Methods in Enzymology* 194:536-544 (1991).

Lesley *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266:2632 (1991).

Melton, D.A., *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 12:7035, (1984).

40

Tripet, B., *et al.*, *Prot. Eng.* 9:1029, (1996).

【背景技術】

【0005】

(発明の背景)

タンパク質は、細胞の主要な成分である。タンパク質は、細胞の形状、構造および機能を決定する。タンパク質は、別個の化学的特性を各々が有する、20種の異なるアミノ酸によって構築される。この多様性により、異なるタンパク質の化学的特性および生物学的特性における大きな多能性が可能となる。これまでにない速度で新規タンパク質が発見されているという事実にもかかわらず、高スループットの方法がないことに主に起因して、

50

タンパク質の構造研究および機能研究は後れを取っている。

【0006】

タンパク質を研究するプロセスの間に、タンパク質を固体支持体上に固定および提示することがしばしば必要である。例えば、ウェスタンブロット分析およびタンパク質発現ライブラリーのファージディスプレイスクリーニングにおいて、タンパク質は、非共有結合により固定される。免疫沈降およびアフィニティ精製のようないくつかの他の適用において、因子（例えば、抗体およびリガンド）は、その第一級アミン、スルフヒドリルまたは他の反応性基を介して、固体支持体（例えば、アガロースビーズ）に共有結合により結合体化される。固体支持体にペプチドおよびタンパク質を直接固定するための多くの方法が存在するが、これらの結合したタンパク質は、ときどき、固定後に、他のタンパク質またはリガンドと相互作用する能力を喪失する。 10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って、他のタンパク質と相互作用する能力を保持するタンパク質を固体支持体上に提示するための改善された技術の必要性が存在する。この方法は、基礎研究および臨床医学の両方のために、複数のタンパク質を迅速かつ詳細に分析することを可能にする。このような技術は、タンパク質-タンパク質、タンパク質-低分子およびタンパク質-核酸の相互作用を、異なる条件のアレイの下でモニタリングする際に、非常に価値がある。本発明は、これらの必要性を満たすように設計される。 20

【課題を解決するための手段】

【0008】

（発明の要旨）

従って、1つの局面において、本発明の目的は、固相分析のために標的タンパク質を提示する方法を提供することである。この方法を実施することに関与する工程には、基材上のウェル中で混合物を形成する工程が挙げられる。この混合物は、第一のコイル形成ペプチドをコードする第一の核酸配列を含むコード配列（この第一のコイル形成ペプチドは、選択された電荷を有し、かつ第二の反対に荷電したコイル形成ペプチドと相互作用して、安定な α ヘリックスコイルドコイルヘテロダイマーを形成し得る）；および標的タンパク質をコードする第二の核酸配列を含有する。この混合物はまた、このウェル中の選択されたタンパク質合成条件下でこの標的タンパク質を発現し得るタンパク質合成成分を含む。このウェルは、第二のコイル形成ペプチドによって官能化された表面を有する。この標的タンパク質が合成され、そしてコイル-コイルヘテロダイマー形成を介してこのウェルに結合し、従って、捕捉された形態でこのウェル中で分析のために提示される条件下で、この混合物を反応させる。次いで、このウェルを洗浄して、未結合の成分を除去する。 30

【0009】

1実施形態において、このコード配列は、第一の核酸配列が第二の核酸配列とインフレームであるように、第一の核酸配列を含むクローニングベクターの切断可能な部位に第二の核酸配列をクローニングすることによって形成される。

【0010】

別の実施形態において、クローニングベクターは、5'から3'の方向で、以下の構成要素を含み、かつこれらに作動可能に連結される：転写および翻訳開始領域；前記標的タンパク質をコードする核酸が挿入され得る、切断可能な部位；前記第一の核酸配列；ならびに転写および翻訳終結領域。あるいは、第一の核酸配列は、切断可能部位の下流に存在する。

【0011】

なお別の実施形態において、コード配列を形成することは、以下の工程を包含する：第一の核酸配列を第二の核酸配列に連結して、キメラコード配列を形成する工程；およびこのキメラコード配列にハイブリダイズし、そしてこのキメラコード配列を増幅するように設計されたPCRプライマーを用いて、このキメラコード配列を増幅する工程。あるいは 50

、コード配列を形成することは、以下の工程を包含し得る：第二の核酸配列を必要に応じてキャップ除去する工程であって、この第二の核酸配列はmRNA分子である、工程；第一のオリゴヌクレオチドプライマーを、このmRNA分子の5'末端に連結して、RNAテンプレートを形成する工程であって、この第一のオリゴヌクレオチドプライマーは、第一のコイル形成ペプチドをコードする第一の核酸配列、および3'末端に向かって転写するように配向された転写開始領域、を含む、工程；逆転写酵素、デオキシリボヌクレオチド三リン酸、およびオリゴヌクレオチドdT配列を含む第二のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、このRNAテンプレートを逆転写して、第一鎖cDNAを形成する工程；この第一鎖cDNAからmRNAを除去する工程；ならびに該第一鎖cDNA、DNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオチド三リン酸、および該第一のプライマー配列の少なくとも12ヌクレオチドを含む第三のオリゴヌクレオチドプライマーをインキュベートして、二重鎖cDNAを形成する工程；DNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオチド三リン酸、cDNAの3'末端の少なくとも12ヌクレオチドに相補的な第四のオリゴヌクレオチドプライマー、および第二鎖の3'末端の少なくとも12ヌクレオチドに相補的な第五のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、二重鎖cDNAを増幅する工程。コード配列を形成することは、以下の工程を包含し得る：必要に応じて第二の核酸配列をキャップ除去する工程であって、この第二の核酸配列はmRNA分子である、工程；このmRNA分子の5'末端に第一のオリゴヌクレオチドプライマーを連結して、RNAテンプレートを形成する工程；逆転写酵素、デオキシリボヌクレオチド三リン酸、およびオリゴヌクレオチドdT配列を含む第一のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、このRNAテンプレートを逆転写して、第一鎖cDNAを形成する工程；第一鎖cDNAからmRNAを除去する工程；第一鎖cDNA、DNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオチド三リン酸、および第一のプライマー配列の少なくとも12ヌクレオチドを含む第二のオリゴヌクレオチドプライマーをインキュベートして、二重鎖cDNAを形成する工程；この二重鎖cDNAを、DNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオチド三リン酸、ならびに第三のオリゴヌクレオチドプライマー（cDNAの第一鎖の3'末端の少なくとも12ヌクレオチドに相補的な領域；およびクローニングベクター中の第一の制限酵素部位と適合性の制限酵素部位を含む）および第四のオリゴヌクレオチドプライマー（その第二鎖の3'末端の少なくとも12ヌクレオチドに相補的な領域；およびクローニングベクター中の第二の制限酵素部位と適合性の制限酵素部位を含む）を用いて増幅する工程；第一および第二の制限酵素部位にて切断し得る制限酵素を用いて、増幅産物およびクローニングベクターを消化する工程；ならびに消化された増幅産物をこのクローニングベクター中にクローニングする工程。

【0012】

この増幅産物は、この増幅産物中の翻訳開始領域を認識するDNA依存性RNAポリメラーゼを使用して、テンプレート配列をインビトロで転写する工程；およびこの転写産物を、適切なインビトロの無細胞翻訳系と合わせる工程、をさらに包含することによって、インビトロで翻訳され得る。目的の核酸配列は、コード配列の下流を切断する制限酵素を用いて、このクローニングベクターを線状化する工程；このクローニングベクター中の翻訳開始領域を認識するDNA依存性RNAポリメラーゼを使用して、テンプレート配列をインビトロで転写する工程；およびこの転写産物を、適切なインビトロの無細胞翻訳系と合わせる工程、をさらに包含することによって、インビトロで翻訳され得る。

【0013】

1つの実施形態において、配置する（*placing*）は、コード配列を翻訳し得る細胞（この細胞はタンパク質合成の構成要素を含む）中に、このコード配列を形質転換またはトランスフェクトすることを含む。

【0014】

別の局面において、本発明は、複数の標的タンパク質の提示を実施するための方法を企図する。この方法を実施する際の工程としては、以下が挙げられる：基材における複数のウェルの各々（各ウェルは、その中に第1のコイル形成ペプチドを有する）に、複数の異

10

20

30

40

50

なる配列の核酸分子（各々は、第2のコイル形成ペプチドをコードする共通配列捕捉部分および標的タンパク質をコードする異なる配列標的部分を有する）のうちの選択された1つを添加する工程；選択されたタンパク質合成条件下で、これらのウェルを異なる配列核酸分子を発現し得るタンパク質合成構成要素を含む溶液で満たす工程；このような条件下で異なる配列核酸分子の発現を促進する工程（ここで各ウェルにおいて発現された標的タンパク質は、コイルーコイルヘテロダイマー形成を介して、ウェルに結合し、従って、ウェル中での分析のために、捕捉形態で提示される）；およびウェルを洗浄し、未結合の成分を除去する工程。

【0015】

1つの実施形態において、この基材は、96ウェルのアレイである。別の実施形態において、この基材は、この溶液を保持し得るウェルを有するMALDI-MSプレートである。

【0016】

なお別の局面において、本発明は、無細胞インビトロ翻訳系で使用するための固相分析のための1つ以上の標的タンパク質を提示するためのキットを含む。このキットは、複数のウェルを有する基材（各ウェルは、選択された電荷を有し、そして第2の逆に荷電したコイル形成ペプチドと相互作用して安定な α -ヘリックスコイルドーコイルヘテロダイマーを形成し得る第1のコイル形成ペプチドで機能付与されている）；5'-3'方向で、操作可能に連結された(i)転写開始領域および翻訳開始領域、(ii)第2のコイル形成ペプチドをコードする核酸配列、(iii)転写終結領域および翻訳終結領域を含むクロニングベクター、を含む。このベクターはまた、標的タンパク質をコードする核酸が(i)と(ii)との間または(ii)と(iii)との間に挿入され得る切断部位を有する。

【0017】

さらに別の局面において、本発明は、多重インビトロ無細胞タンパク質合成系を含む。この系は、複数のウェルを含む基材を含み、各ウェルは、ウェルに結合された、選択された電荷を有し、そして第2の逆に荷電したコイル形成ペプチドと相互作用して安定な α -ヘリックスコイルドーコイルヘテロダイマーを形成し得る第1のコイル形成ペプチドを有する。各ウェル中に、(i)(A)選択された電荷を有し、そして第2の逆に荷電したコイル形成ペプチドと相互作用して安定な α -ヘリックスコイルドーコイルヘテロダイマーを形成し得る第1のコイル形成ペプチドをコードする第1の核酸配列、および(B)標的タンパク質をコードする第2の核酸配列を含むコード配列が含まれる。各ウェルはまた、ウェル中で、選択されたタンパク質合成条件下で標的タンパク質を合成し得るタンパク質合成構成要素を含み、このウェルは、第2のコイル形成ペプチドで機能付与された表面を有する。この混合物は、標的タンパク質が合成され、そしてコイルーコイルヘテロダイマー形成を介してウェルに結合し、故に各ウェルにおいて捕捉形態で分析のために提示されるような条件下で反応する。

【0018】

本発明のこれらおよび他の目的および特徴は、以下の本発明の詳細な説明が、添付の図面と合わせて読まれた場合に、より完全に理解される。

【0019】

（発明の詳細な説明）

（I. 定義）

他に示されない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明の分野の当業者に対して有する意味と同じ意味を有する。当業者は、当該分野の定義および用語について、特にSambrookら(1989)およびAusubel FMら(1993)に向けられる。本発明が記載の特定の方法論、プロトコル、および試薬に制限されない（これらは、変動し得るので）ことが、理解されるべきである。

【0020】

本明細書中に引用される全ての刊行物および特許は、本発明と関連して使用され得る組

成物および方法論を記載および開示するために、本明細書中に参考として明白に援用される。

【0021】

本明細書中で使用される場合、用語「支持体」は、それに薬剤が堆積および固定される材料をいう。

【0022】

本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド」は、ペプチド結合によって連結された単鎖のアミノ酸残基を形成する化合物をいう。本明細書中で使用される場合、用語「タンパク質」は、用語「ペプチド」と同意語であり得るか、またはさらに、2つ以上のペプチドの複合体を称し得る。

10

【0023】

用語「核酸分子」は、RNA分子、DNA分子およびcDNA分子を含む。遺伝コードの縮重の結果として、所定のペプチド（例えば、E-コイルおよびK-コイル）をコードする多数のヌクレオチド配列が、作製され得ることが理解される。

【0024】

「異種」核酸構築物または配列は、それが発現される細胞に対してネイティブでない配列の一部を有する。制御配列に関して、異種は、実際には同じ遺伝子（その発現を現在制御している）を制御するために機能しない制御配列（すなわちプロモーターまたはエンハンサー）をいう。一般的に、異種核酸配列は、その細胞に内在性でも、異種核酸配列が存在するゲノムの一部でもなく、そして感染、トランスフェクション、微量注入、エレクトロポレーションなどによって細胞に付加されている。「異種」核酸構築物は、ネイティブの細胞中に見られる制御配列／DNAコード配列の組合せと同じであるか、または異なる制御配列／DNAコード配列の組合せを含み得る。

20

【0025】

本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」は、異なる宿主細胞間を移すために設計された核酸構築物をいう。「発現ベクター」は、外来細胞において異種DNAフラグメントを組み込み、そして発現する能力を有するベクターをいう。多くの原核生物発現ベクターおよび真核生物発現ベクターが、市販されている。適切な発現ベクターの選択は、当業者の知識内である。

【0026】

本明細書中で使用される場合、「発現カセット」または「発現ベクター」は、標的細胞内またはインビトロで特定の核酸の転写を可能にする一連の特定の核酸エレメントを有する、組換えのまたは合成的に作製された核酸構築物である。組換え発現カセットは、プラスミド、染色体、ミトコンドリアDNA、プラスチドDNA、ウイルス、または核酸フラグメントに組み込まれ得る。代表的に、発現ベクターの組換え発現カセット部分は、他の配列もあるが、転写される核酸配列およびプロモーターを含む。

30

【0027】

本明細書中で使用される場合、用語「プラスミド」は、クローニングベクターとして使用される環状の二本鎖(ds)DNA構築物をいい、そしてプラスミドは、多くの細菌およびいくつかの真核生物において、染色体外自己複製遺伝因子を形成する。

40

【0028】

本明細書中で使用される場合、用語「選択マーカーをコードするヌクレオチド配列」は、宿主細胞中で発現し得るヌクレオチド配列をいい、そしてこの選択マーカーの発現が、発現された遺伝子を含む細胞に、対応する選択薬剤の存在下で増殖する能力を与える。

【0029】

本明細書中で使用される場合、用語「プロモーター」および「転写開始因子」は、下流の遺伝子の転写を指向するように機能する核酸配列をいう。一般的に、プロモーターは、標的遺伝子が発現されている宿主細胞に適切である。プロモーターは、他の転写制御核酸配列および翻訳制御核酸配列（「制御配列」とも呼ばれる）と共に所定の遺伝子を発現するために必要である。一般的に、転写制御核酸配列および翻訳制御核酸配列としては、プ

50

ロモーター配列、リボゾーム結合部位、転写開始配列および転写停止配列、翻訳開始配列および翻訳停止配列、ならびにエンハンサー配列またはアクチベータ配列が挙げられるが、これらに限定されない。

【0030】

本明細書中で規定される場合、「キメラ遺伝子」または「異種核酸構築物」は、制御エレメントを含む、異なる遺伝子の部分から構成され得る非ネイティブ遺伝子（すなわち、宿主中に導入されている遺伝子）をいう。宿主細胞の形質転換のためのキメラ遺伝子構築物は、代表的には異種タンパク質コード配列に作動可能に連結された転写制御領域（プロモーター）から構成されるか、または選択マーカーキメラ遺伝子においては形質転換された宿主細胞に抗生物質耐性を付与するタンパク質をコードする選択マーカー遺伝子に作動可能に連結された転写制御領域（プロモーター）から構成される。宿主細胞への形質転換のための、本発明の代表的なキメラ遺伝子は、構成的または誘導性である転写調節領域、タンパク質コード配列、および終結配列を含む。キメラ遺伝子構築物はまた、標的タンパク質の分泌が所望される場合、シグナルペプチドをコードする第2のDNA配列を含み得る。

10

【0031】

核酸が別の核酸配列との機能的関係に配置される場合、核酸は「作動可能に連結される」。例えば、ポリペプチドが、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合、分泌リーダーをコードするDNAがポリペプチドのためのDNAに作動可能に連結される；プロモーターまたはエンハンサーが、配列の転写に作用する場合、プロモーターまたはエンハンサーは、コード配列に作動可能に連結される；あるいはリボゾーム結合部位が翻訳を促進するように位置付けられる場合、リボゾーム結合部位は、コード配列に作動可能に連結される。一般的に、「作動可能に連結される」は、連結されるDNA配列が連続的であり、そして分泌リーダーの場合、連続的かつリーディングフェーズの中にある。しかし、エンハンサーは、連続的でなくてよい。連結は、都合の良い制限部位でのライゲーションによって達成される。このような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが、従来の手順に従って使用される。

20

【0032】

本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子」は、ポリペプチド鎖の産生に関与するDNAのセグメントを意味し、遺伝子は、コード領域の前の領域および後ろの領域（例えば、5'非翻訳（5'UTR）配列または「リーダー」配列および3'UTR配列または「トレイラー」配列、ならびに個々のコードセグメント（エキソン）間の介在配列（イントロン）を含んでも含まなくてもよい。

30

【0033】

本明細書中で使用される場合、「組換え」は、細胞またはベクター（異種核酸配列の導入によって改変されているか、またはこの細胞は、そのようにして改変された細胞に由来する）への参照を含む。したがって、例えば、組換え細胞は、ネイティブ（非組換え）形態の細胞内に同一の形態で見られない遺伝子を発現するか、またはそうでなければ、ヒトの介入の結果として異常に発現されるか、下方発現されるか、または全く発現されないネイティブ遺伝子を発現する。

40

【0034】

細胞への核酸配列の挿入に関連して、用語「導入される」は、「トランスフェクション」、または「形質転換」もしくは「形質導入」を意味し、そして真核生物細胞または原核生物細胞への核酸配列の組み込み（ここで、核酸配列は、細胞のゲノム（例えば、染色体、プラスミド、プラスチド、またはミトコンドリアDNA）に組み込まれ得るか、自律性のレプリコンに変換され得るか、または一過性に発現され得る（例えば、トランスフェクトされたmRNA））に対する参照を含む。

【0035】

本明細書中で使用される場合、用語「発現」は、それによって遺伝子の核酸配列に基づいてポリペプチドが産生されるプロセスをいう。このプロセスは、転写および翻訳の両方

50

を含む。

【0036】

用語「シグナル配列」は、細胞外への成熟形態のタンパク質の分泌を促進する、タンパク質のN末端部分のアミノ酸配列をいう。成熟形態の細胞外タンパク質は、シグナル配列を欠き、シグナル配列は、分泌プロセスの間に切り取られる。

【0037】

用語「宿主細胞」は、ベクターを含み、そして発現構築物の複製、または転写および翻訳（発現）を支持する細胞を意味する。本発明における使用のための宿主細胞は、原核生物細胞（例えば、E. coli）または真核細胞生物（例えば、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞、両生類細胞または哺乳動物細胞）であり得る。

10

【0038】

本明細書中で使用される場合、用語「活性な」および「生物学的に活性な」は、特定の標的タンパク質に関連する生物学的活性（例えば、酵素活性）をいう。このことは、所定のタンパク質の生物学的活性が、代表的に当業者によりそのタンパク質によると考えられる任意の生物学的活性をいうことに従う。

【0039】

（I I . キット）

便宜上、本発明において使用される基材および規定量の試薬は、組み合わせて包装されたキットにおいて提供され得る。故に、1つの局面において、本発明は、複数の標的タンパク質の提示を実施するためのキットを提供する。図1は、キット10の平面図であり、キット10は基材14および、必要に応じて、カバーリング16（これは、透明であり得、そして基材に取り付けられる）を備える。この基材は、複数の個別のウェル20を備える。図2に示すように、基材14中の各ウェル20は、選択された電荷を有し、そして第2の逆に荷電したコイル形成ペプチドと相互作用して安定な α -ヘリックスコイルド-コイルヘテロダイマーを形成し得る第1のコイル形成ペプチド30で機能付与されている。2つの逆に荷電したペプチドは、自発的に自己アセンブルし、ヘテロダイマー複合体になる。コイルド-コイルヘテロダイマーの相互作用は、下記の第I V 節においてさらに記載される。

20

【0040】

任意の適合性の基材が、本発明と併せて使用され得る。この基材（通常は固体）は、種々の有機材料または無機材料の任意のもの、あるいはそれらの組合せ（単なる例として、プラスチック（例えば、ポリプロピレンまたはポリスチレン）；セラミック；シリコン；（ヒューズド）シリカ、石英またはガラス（これらは、例えばガラス顕微鏡スライドまたはガラスカバースリップの厚さを有し得る）；紙（例えば、濾紙）；ジアゾ化セルロース；ニトロセルロースフィルター；ナイロン膜；またはポリアクリルアミドもしくは他の型のゲルパッド（例えば、フィルム（種々の慣用的な従来の方法のうちの任意のものによって湿ったゲルを乾燥させることにより調製される）を含む、エアロゲルで作製されるエアロパッドまたはエアロビーズ（これは、例えば、非常に多孔性の固体である）））であり得る。アッセイを実施する方法が光学的検出を包含する場合、光を通す基材は有用である。好ましい実施形態において、この基材は、マルチウェル（例えば、組織培養プレート（例えば、24ウェルプレート、96ウェルプレート、256ウェルプレート、384ウェルプレート、864ウェルプレートまたは1536ウェルプレート））のプラスチック表面である。別の好ましい実施形態において、この基材は、Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight mass spectrometer（MALDI-MS）における使用のために適切なプレートである。MALDI-MSを実施する例示的な方法は、米国特許第6,111,251号（本明細書中にその全体が参考として明白に援用される）に記載される。タンパク質を結合および同定するための、さらなる基材および方法は、米国特許第6,027,942号および同第5,719,060号（これらの両方は、本明細書中にその全体が参考として援用される）に見出され得る。

30

40

50

【0041】

MALDI-MSは、バイオポリマーおよびペプチド、タンパク質およびDNAフラグメントのような物質の質量決定のための方法として確立されている。この方法では、分析される物質は、代表的に、マトリクス材料の溶液中に配置され、そして支持体または基材上にコーティングされる。この溶質をエバポレートし、固体マトリクス中に分析物を残し、次いでこれに照射をして、分析物分子および合成ポリマーの脱離を引き起こす。この脱離プロセスは、炭化、断片化または化学的に分解させることなく、分離および検出のための質量分析器または類似の機器に、大きな生物学的分子を放出するために特に有用である。

【0042】

この基材は、空間的に離れており、そしてアドレス可能であるか、または同定可能である領域を備える。各領域は、それらに結合したコイルドコイルペプチド30を含む。1つの実施形態において、これらの領域は、液体の透過に耐性である任意の物理的障壁によって互いに離され得る。別の実施形態において、MALDI-MSプレートのような基材がそこにエッチング処理されて、別個の浅いウェルを有し得る。あるいは、基材は、分離またはウェルのない領域（例えば、平坦な表面）を備え得、そして個々の領域は、別個の領域の輪郭を描く構造物（例えば、プラスチックまたはガラスの一片）を被せることによってさらに規定され得る。この領域の相対的方向性は、正方形または長方形の表面あるいは他の表面内の平行なアレイまたは垂直なアレイ、円形の基材内の放射状に広がるアレイ、または線状のアレイを含む（しかし、これらに限定されない）種々の形態のうちの任意の形態を取り得る。領域内の結合したコイル形成ペプチドの数は、1つ、または好ましくは少なくとも2つであり得る。1つの実施形態において、領域内の、結合したコイル形成ペプチドの密度は、約 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{15}$ 分子/ mm^2 の間、好ましくは約 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{12}$ 分子/ mm^2 の間、より好ましくは約 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$ 分子/ mm^2 の間、そして最も好ましくは約 8.5×10^{11} 分子/ mm^2 である。

【0043】

このキットはまた、下記の第IIIA節に記載されるような、第2のコイル形成ペプチドをコードする核酸配列を含むクローニングベクターを含み得る。さらに、このキットは、下記の第IIC節により詳細に記載されるようなインビトロ翻訳系を含み得る。このキットはまた、種々の緩衝化培地を含み得、これらのうちのいくつかは、上記の構成要素のうちの1つ以上を含み得る。

【0044】

このキット中の種々の試薬の相対量は、本発明のタンパク質提示方法論を実施するために必要な濃度の試薬を提供するために、広範に変動され得る。適切な状況下で、キット中の試薬のうちの1つ以上は、賦形剤（これは、溶解の際に、本発明に従う方法またはアッセイを実施するための適切な濃度を有する試薬溶液を提供する）を含む、通常、凍結乾燥された乾燥粉末として提供され得る。各試薬は、別個の容器内に梱包され得るか、またはいくつかの試薬は、交差反応性および有効期間が許容する1つの容器内に組み合され得る。

【0045】

このキットはまた、上記のように本発明に従う方法の説明書を含み得る。この指示書は、例えば、表面の第1のコイル形成ペプチドの説明、いくつかのペプチドが存在するかの表示およびそれらが配置される表面の場所の表示を含み得る。この指示書はまた、結合したペプチドと発現されたタンパク質とを会合させるためのプロトコル（例えば、インビトロ翻訳のための条件および試薬、インキュベーションの温度および時間、ならびに非会合の分子を除去（例えば、洗浄）するための条件および試薬など）を含み得る。さらにこの指示書は、本出願において開示されるパラメータ、条件または実施形態のうちの任意のものを含み得る。

【0046】

(III. コード配列の形成および発現)

(A. ベクター構築)

図3Aおよび図3Bは、コード配列50（または発現カセット）を含む、インビトロ発現系またはインビボ発現系における操作のために設計された、本発明における使用のための発現ベクターを例示する。この発現ベクターは、コード配列から下流および上流の随伴配列52および随伴配列54を有する。このコード配列は、図3Aに示されるように、目的の配列62のC末端においてコイルドーコイル領域60を有し得る。あるいは、図3Bに示されるように、コード配列50のコイルドーコイル領域60は、目的の配列62のN末端にあり得る。

【0047】

随伴配列は、プラスミドまたはウイルス起源の随伴配列であり、そしてベクターが宿主細胞中で複製されることを可能にするように、ベクターに必要な特性を提供する。適切な形質転換ベクターは、以下に記載される。発現プラスミドの適切な構成要素（転写開始因子および翻訳開始因子、目的のタンパク質をコードするコード配列およびコイルドーコイル領域、ならびに適切な転写終結因子および翻訳終結因子を含む）はまた、以下に考察される。3つの例示的なプラスミドは、pET-17b [pMA2] プラスミド、pET-17b [pS1A] プラスミドおよびpET-17b [cMyc-E] プラスミドである。

【0048】

(A1. 転写開始因子および翻訳開始因子)

本発明の転写開始因子は、インビトロまたはインビボの背景において、コード配列の転写を開始し得る任意の配列であり得る。従って、転写開始因子は、一般的に、その転写開始因子配列からのインビトロ転写に適切な、利用可能なRNAポリメラーゼ酵素を有する必要がある。この転写開始因子は、例えば、T3プロモーターまたはSP6プロモーターであり得る。これらのプロモーターは、二本鎖線状DNAテンプレートからインビトロでmRNAを作製するために、対応するT3RNAポリメラーゼまたはSP6RNAポリメラーゼと併せて使用される。好ましくは、転写開始因子は、T7プロモーター（配列番号5）であり、T7プロモーターは、以下に記載されるようなT7転写終結因子と併せて使用される。このプロモーターは、天然の配列または代替的に合成配列であり得る。二本鎖DNAにおいて、転写開始因子は、下流を転写するように方向付けられたコード配列の上流である。

【0049】

(A2. 転写終結因子および翻訳終結因子)

発現カセットの終結制御領域は、転写開始領域を有するネイティブであり得るか、または別の供給源由来であり得る。転写の終結領域は、発現を増強するために、特に、mRNAの安定性について選択され得る。好ましくは、転写終結因子は、T7転写終結因子（配列番号6）である。

【0050】

(A3. ベクターの構築)

本発明のヌクレオチド配列は、インビトロ発現系において、目的のタンパク質に結合されたハイブリッドコイルドーコイル領域を作製するために有用である。このようにして、本発明のハイブリッドポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が、発現カセット中に提供される。このような発現カセットは、制御領域の転写制御下にあるようにヌクレオチド配列を挿入するための、複数の制限部位を有して提供され得る。

【0051】

上記のように、コイルドーコイル領域は、目的のタンパク質のC末端またはN末端のいずれかにあり得る。目的のタンパク質についてと同様に、ハイブリッドポリペプチド中に存在する他の要素の各々は、公知の天然に存在するポリペプチド配列であり得るか、または合成的に誘導され得る（本明細書中に記載されるような、ハイブリッドポリペプチドの機能に悪影響を及ぼさない、任意のそれらの改変体を含む）。「悪影響を及ぼす」は、その要素の改変形態を含むことが、その要素のネイティブ形態を含むハイブリッドポリペ

チドに比べて減少したそのハイブリッドペプチドの生物活性を生じることを意図する。

【0052】

発現カセットの調製において、種々のヌクレオチド配列フラグメントが、適切な方向性および、必要に応じて、適切なリーディングフレーム中にある配列を提供するために操作され得る。このような目的で、アダプターまたはリンカーが、ヌクレオチドフラグメントを結合するために使用され得るか、他の操作が、便利な制限部位、余分なヌクレオチドの除去、制限部位の除去などを提供するために含まれ得る。この目的で、インビトロ変異誘発、プライマー修復、制限、アニーリング、再置換（例えば、トランジションおよびトランスバージョン）が、含まれ得る。詳細には、Sambrookら、（1989）を参照のこと。

10

【0053】

本発明の発現カセットは、レプリコン（例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス、ミニ染色体）にライゲーションされ、それによって、インビボで自律DNA複製し得る発現ベクターを形成し得る。好ましくは、このレプリコンは、プラスミドである。このようなプラスミド発現ベクターは、クローニング目的のために原核生物宿主内で安定に維持されることを可能にする、1つ以上の複製系において維持される。

【0054】

図3Aおよび図3Bは、インビトロ翻訳系におけるハイブリッドポリペプチドの発現での使用のための例示的な形質転換ベクターを示す。ベクター構築の詳細は、実施例1Bにおいて示される。

20

【0055】

（B. PCR産物の形成）

コード配列は、第1の核酸配列を、第2の核酸配列にライゲーションして、キメラコード配列を形成させ、そしてキメラコード配列にハイブリダイズし、そして増幅するように設計されたPCRプライマーを用いてキメラコード配列を増幅することによって形成され得る。第1の核酸配列は、選択された電荷を有し、そして第2の逆に荷電したコイル形成ペプチドと相互作用して安定な α -ヘリックスコイルド-コイルヘテロダイマーを形成し得る第1のコイル形成ペプチドをコードするべきである。第2の核酸配列は、目的の標的タンパク質をコードする。

【0056】

選択された配列とハイブリダイズするPCRプライマーの設計は、当該分野で公知である。例えば、米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号、および同第4,800,159号；ならびにInnisら、（1990）（これらの各々は、その全体が本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。

30

【0057】

コード配列を形成するための本発明の代替方法は、細胞または組織からのmRNAを単離することである。RNA単離の方法は、例えば、Ausubel, F. M. ら、Current Protocols in Molecular Biology、第1巻、4.1.1-4.2.9頁および4.5.1-4.5.3頁、John Wiley & Sons, Inc., 1993.において教示される。mRNA分子は、ポリAテールで終わるヌクレオチド配列を含み、そして一本鎖である。図5Aおよび図5Bにおいて例示されるように、mRNA155は、当該分野で標準の方法によって、脱キャップ（decap）され得る。例えば、酵素および試薬（RNAを脱キャップするためのタバコ酸ピロホスファターゼを含む）は、Madison, WIのEpicentre Technologiesから購入され得る。第1のオリゴヌクレオチドプライマー150は、一本鎖RNAを一本鎖DNAにライゲーションし得るリガーゼ（例えば、T4RNAリガーゼ）で、mRNAの5'末端にライゲーションされる。第1のプライマーは、mRNAの3'末端に向かって転写するように方向付けられた転写開始領域を含む。1つの実施形態において、第1のプライマーはまた、第1のコイル形成ペプチドをコードする第1の核酸配列を含む。上記で考察されたように、転写開始領域は、インビトロ転写を促進し得る任意

40

50

の転写開始配列（例えば、T7プロモーター配列、T3プロモーター配列、またはSP6プロモーター配列を含む）であり得る。一般的にこれらのプロモーターは、適切なRNAポリメラーゼ酵素（これは、インビトロ転写を達成する）と対をなす。

【0058】

オリゴヌクレオチドdT配列を有する第2のプライマー160は、センスmRNA鎖の逆転写を達成するために、逆転写酵素および適切な緩衝液ならびにデオキシリボヌクレオチド三リン酸とともに反応物に添加される。1つの実施形態において、第2のプライマーは、少なくとも10連続したdTのオリゴヌクレオチドdT配列を有する。次いで、mRNAは、任意の適切な手段（例えば、NaOHまたはRNaseの添加を包含する）によって除去され得る。

10

【0059】

この段階で、一本鎖cDNAが生成され、そしてこれらは5'～3'までの第2プライマー配列、mRNAに対する相補的配列および第1プライマー配列を含む。次いで、第1プライマー150、または第1プライマーの少なくとも12ヌクレオチド配列が、DNAポリメラーゼおよびデオキシリボヌクレオチドトリホスフェートを用いた1本鎖アンチセンス鎖からの2本鎖cDNA165の生成反応（図5Cに示す）に用いられ得る。2本鎖cDNAから、インビトロ反応で、RNAポリメラーゼ存在下で、cRNAを生成し得る。このRNAポリメラーゼは、プロモーター配列に対して適切である。例えば、T7プロモーターが使用される場合、T7RNAポリメラーゼは、インビトロ転写反応を触媒するために用いられる。このcDNAはまた、5'プライマーおよび3'プライマーを用いて増幅され得、各プライマーは、異なる配列に対して相補的である。各増幅プライマーは、N末端またはC末端のコイルドコイルペプチドをコードするDNA配列を含み得る、クローニングベクター内の第1制限酵素部位と適合する制限酵素部位を含み得る。この増幅は、DNAポリメラーゼ（例えば、Taq DNAポリメラーゼ）、デオキシリボヌクレオチドトリホスフェート、ならびにポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のための適切な緩衝液および温度条件を用いて実行される。

20

【0060】

このcDNAはまた、他の操作（実験、ならびに他の増幅および分析）を実施するために、ベクターにライゲーションされ得る。直鎖状2本鎖cDNAから、コード配列をインビトロで転写および翻訳し得る。発現用ベクターには、哺乳動物発現ベクター、酵母発現ベクター、両生類発現ベクターまたは昆虫発現ベクターを含む、任意の真核生物発現ベクターまたは原核生物発現ベクターが含まれ得る。cDNAは、直鎖テンプレートから配列決定され得るか、または配列決定ベクター内に配置され得る。

30

【0061】

（C. インビトロでのRNAおよびタンパク質の合成）

（C1. RNA合成）

上記のようにPCR増幅産物としてのコード配列または上記に記載されるベクター中にクローニングされるコード配列は、転写開始領域を認識するDNA依存的RNAポリメラーゼおよび適切な成分を用いるインビトロでのテンプレート配列の転写によって、インビトロで翻訳され得る。図4A～4Eは、インビトロでの、本発明を用いたRNA転写物の作製に関する工程を例証する。これらの図は、図3Aおよび図3Bに示されるプラスミド110様プラスミドを示す。これらのベクターは、ベクター100に挿入したマルチクローニングサイト108内に目的の領域104の配列およびコイルドコイル領域106の配列を含むキメラ遺伝子102を有する。所望されれば、このプラスミドは、図4Cに示すように、コード配列から転写配列までの下流を切断する適切な制限酵素を用いて直線化され得る。あるいは、プローブ上のベクター配列の存在が、後の適用を妨害しない場合、転写物は、そのテンプレートとしてインタクトなプラスミドを用いて合成され得る。

40

【0062】

所望されれば、そのDNAをインビトロ転写反応に使用する前に、直線化されたプラスミドDNAまたはインタクトなプラスミドDNAを、フェノール：クロロホルム：イソア

50

ミルアルコールを用いて抽出し、エタノール沈殿し、そしてTEまたは水中に懸濁し得る。適切なRNAポリメラーゼおよびNTPを含むRNA合成反応成分を、直線化したプラスミドDNAまたはインタクトなプラスミドDNAと共にインキュベートし、RNA転写物を作製する。このDNAテンプレートをRNaseを含まないDNase Iを用いて除去し得、図4Eのように精製RNA転写物を作製した。インビトロでのRNA合成のための例示的方法は、Melton, 1984に記載される。

【0063】

(C2. タンパク質合成)

RNA合成に続き、転写産物170を、図7A～図7Bに示すように、適切なインビトロ翻訳系を併用し、N末端またはC末端のいずれか一方にコイルドコイル領域を含む標的タンパク質を作製し得る。インビトロ翻訳系で作製される標的タンパク質175は、基板結合コイルドコイルペプチド185を介して基板180に結合し得る。インビトロタンパク質合成を実施するための例示的な方法は、Leibowitzら(1991)、Lesleyら(1991)；ならびに米国特許第5,968,767号および同第6,322,970号に記載され、各々は、その全体が本明細書中で参考として明らかに援用される。

【0064】

所望されれば、翻訳前に合成RNA分子をキャップ化し得る。インビトロで合成されるキャップ化RNA分子は、翻訳に有効なテンプレートである(例えば、KriegおよびMelton(1984)を参照のこと)。合成転写物の翻訳前のキャッピングに有効な系およびプロトコルは、市販の販売業者(例えば、Promega, WI; www.promega.com)から入手し得る。

【0065】

(D. 宿主細胞内でのタンパク質合成)

インビトロでの翻訳の代わりとして、先に記載した適切なベクター201に含まれ、図6Aに示したコード配列202を、コイルドコイルドメイン203を有する目的のタンパク質204の発現のために、宿主細胞に形質転換またはトランスフェクトし得る。この宿主細胞を、形質転換またはトランスフェクトの前または後に、基板206のウェル内に置き、そしてコイルドコイルドメインを有する目的のタンパク質の発現に有効な条件を共し得る。この発現ハイブリッドポリペプチド200は、宿主細胞から分泌され、そして各ウェルにおいてコイルドコイルペプチド205に結合し得る。ハイブリッドペプチド200が分泌されない場合、その宿主細胞は、タンパク質200が、その細胞から放出され、そして表面結合コイルドコイルペプチド205に結合し得るように溶解され得る。次いでこのウェルを洗浄し、非結合成分を除去し得る。タンパク質の発現および細胞の溶解の例示的な方法は、米国特許第6,238,861号および同第5,496,549号に記載され、これらの両方とも、参考としてその全体が本明細書中に明らかに援用される。

【0066】

宿主細胞は、種々の標準的な技術(エレクトロポレーション、微小粒子衝撃(microparticle bombardment)、スフェロプラスト生成法、またはホールセル法(例えば、塩化リチウムおよびポリエチレングリコールを含む方法)(Creggら, 1985; Liuら, 1992; Waterhamら, 1996; ならびにCreggおよびRussell, 1998))を用いて、上記に記載の発現構築物で形質転換される。

【0067】

本発明の基本的な方法には必要ないが、プロモーター配列(例えば、真核細胞系(例えば、酵母プロモーター、哺乳動物プロモーター、または昆虫プロモーター)で機能するプロモーター)は、これらの細胞系における発現を促進するために、ベクター配列内に含まれ得る。発現または他の目的のための、これらのさらなるプロモーター配列は、上述した細胞の存在しないインビトロでの転写のために用いられるプロモーターとは区別され得る。

【0068】

1つの実施形態において、組換え発現ベクターは、目的の配列のC末端またはN末端にEペプチド（配列番号1）をコードする核酸配列のコピーを含むように操作される。このプラスミドは、選択的ハイブリッドポリペプチド発現のための誘導性のプロモーター（例えば、IPTG誘導性プロモーター）、遺伝子挿入のためのマルチクローニングサイト、クローン選択のためのアンピシリン耐性遺伝子および単純に精製するために新しく作製したハイブリッドポリペプチドを細胞膜周辺腔に配向させるためのシグナル配列を含み得る。目的の配列のC末端にEペプチドをコードする核酸配列を含ませるコード配列の例示的な操作方法は、Tripettら、1996に記載される。あるいは、発現ベクターは、目的の配列のC末端またはN末端にKペプチド（配列番号2）、またはそれらの改変体を含み得る。本発明において有用なさらなるコイルドコイルペプチドは、米国特許第6,165,335号、同第6,130,037号、同第5,955,379号および同第5,824,483号に見出され得、これらは参考としてその全体が本明細書中に援用される。

【0069】

（IV. α ヘリックスコイルドコイル複合体の処方）

第1コイル形成ペプチドおよび第2コイル形成ペプチドを、 α ヘリックスコイルドコイルヘテロ2量体の形成を促進する条件下で一緒に混合する場合、それらは相互作用して、2サブユニット α ヘリックスコイルドコイルヘテロ2量体複合体を形成する。 α ヘリックスコイルドコイルコンホメーション中のペプチドは、各ペプチドの1次構造によって決定される特徴的な様式で互いに相互作用する。 α ヘリックスの3次構造は、その結果、1次配列中の7つのアミノ酸残基が、2つの α ヘリックスのターンにほぼ対応する。あるいは、 α ヘリックスコンホメーションを生じる1次アミノ酸配列は、7つの各残基の単位（7連子（heptads）といわれる）に分解され得る。このヘテロ2量体サブユニットペプチドは、1列に並んだ一連の7連子で構成される。7連子の配列が、ヘテロ2量体サブユニットペプチド内で特に繰り返される場合、この7連子は、「用語リスト」または単純に「リピート」といわれ得る。

【0070】

1次コイル形成ペプチドおよび2次コイル形成ペプチドは、平行または逆平行のいずれかの配置で、ヘテロ2量体コイルドコイルヘリックス（コイルドコイルヘテロ2量体）に組み立てられ得る。平行配置において、これらの2つのヘテロ2量体サブユニットペプチドヘリックスが同じ方向（アミノ末端からカルボキシ末端へ）を有するように、この2つのヘテロ2量体サブユニットペプチドヘリックスを並べた。逆平行配置において、1つのヘリックスのアミノ末端が他のヘリックスのカルボキシ末端と並ぶように（逆もまた同様に）、これらのヘリックスを配置する。

【0071】

このようなヘテロ2量体サブユニットは、PCT特許出願WO 95/31480「Heterodimer Polypeptide Immunogen Carrier Composition and Method」、1995年11月23日公開（参考としてその全体が本明細書中に援用される）に記載される。例示的なサブユニットは、本明細書中で、K-コイル（リジン残基によって電荷が優位に供給される正電荷サブユニットといわれる）およびE-コイル（グルタミン酸残基によって電荷が優位に供給される負電荷サブユニットといわれる）といわれる。上記に記載される適用からの好ましい例としては、配列番号1～配列番号2が挙げられる。K-コイルおよびE-コイルはまた、K-コイルおよびE-コイルのリピートを含み得、それぞれヘテロ2量体サブユニットペプチドとして用いる。

【0072】

上記で参照した適用において示した指導に従って設計したヘテロ2量体サブユニットペプチドは、代表的に、平行方向対逆平行方向でのアセンブリのための優先度を示す。例えば、配列番号3および配列番号4によって同定される例示的なペプチドは、（WO 95/31480出願で検討したように）他のペプチド配列として平行配置のヘテロ2量

体を形成する。目的のタンパク質を第1コイル形成ペプチドに付着させる場合、一般に、ヘテロ2量体の遠位末端で目的のタンパク質を付着させることが望ましい。特に、ヘテロ2量体が、平行配置を形成する場合、第2コイル形成ペプチドは、好ましくは、C末端で基板表面に固着され、そしてこの目的のタンパク質は、N末端で第1コイル形成ペプチドに結合される。

【0073】

記載したように、ヘテロ2量体中の2つサブユニットペプチドのうちの1つが、基板に固着され、そして他のペプチドは、提示を意図する目的のタンパク質を含む。両方の場合、このペプチドは、合成後に合成または誘導され、必要とされる付着機能を提供し得る。一般に、大部分の結合方法は、大腸菌形成ペプチドのいずれかの大腸菌形成活性を失わせ

10

【0074】

第2コイル形成ペプチドの改変を考慮すると、このペプチドは、そのN末端またはC末端のいずれかで合成され、基板表面とペプチドのヘリックス形成部分との間のスペーサーとして機能し得るさらなる末端ペプチドを保有し得る。あるいは、第2個コイル形成ペプチドは、高親和性結合反応（例えば、ペプチドに保持されるビオチン部分とその表面に共有結合したアビジン分子との間）を介して基板表面に付着し得る。

【0075】

目的のタンパク質は、固体（solid-state）法、PCR法、または組換え法のいずれかによって、インビボまたはインビトロで合成され、組み立てられるヘテロ2量体において遠位方向に向けられる第1コイル形成ペプチドの末端に目的のタンパク質を含み得る。固体法による結合体の形成において、目的のタンパク質は、好ましくはN末端アミノ酸残基、またはヘテロ2量体の露出面に面した残基の1つに、共有結合する。好ましいカップリング基は、システイン残基のチオール基であり、これは標準的な方法で容易に改変される。他の有用なカップリング基としては、メチオニンのチオエステル、ヒスチジンのイミダゾリル基、アルギニンのグアニジニル基、チロシンのフェノール基およびトリプトファンのインドリル基があげられる。これらのカップリング基は、当業者に公知の反応条件を用いて誘導され得る。

20

【0076】

標的タンパク質第1コイル形成ペプチド結合体32、33、34（図2）を、表面固定化第2コイル形成ペプチド30に結合させるために、これらペプチドを、ヘテロ2量体形成をに好都合な条件下で接触させる。コイルドコイルヘテロ2量体形成に好都合な例示的な媒体は、生理学的に適合する水溶液である（代表的には、約6～約8の間のpHおよび約50mM～約500mMの間の塩濃度を有する）。好ましくは、この塩濃度は、約100mMと約200mMとの間である。例示的な良性媒体は、以下の組成を有する：50mMリン酸カリウム、100mM KCl、pH7。同等に有効な媒体は、代替物（例えば、リン酸カリウムの代わりにリン酸ナトリウムおよび／またはKClの代わりにNaCl）によって作製され得る。ヘテロ2量体は、上記のpHおよび塩の範囲外の条件下の媒体で形成され得るが、いくつかの分子の相互作用およびヘテロ2量体対ホモ2量体の相対的安定性は、上記に詳細に記載した特徴と異なり得る。例えば、ヘテロ2量体を安定化する傾向にあるイオン基の間のイオン相互作用は、例えば、酸性pHでのGlu側鎖のプロトン化、または例えば、塩基性pHでのLys側鎖の脱プロトン化に起因して、低pH値または高pH値で崩壊され得る。しかし、コイルドコイルヘテロ2量体形成における低pH値および高pH値のこのような効果は、塩濃度の上昇によって克服され得る。

30

40

【0077】

塩濃度の上昇は、イオン引力の安定化を中和し得るか、またはイオン反発力の不安定化を抑制し得る。特定の塩は、イオン間相互作用の中和において、より高い有効性を有する。例えば、K-コイルペプチドの場合、1M以上の濃度の ClO_4^- アニオンは、最大の α ヘリックス構造の誘導に必要とされ、それに対して、3M以上の濃度の Cl^- イオンは、同様の効果において必要とされる。低pHおよび高pHでのコイルドコイル形成にお

50

るこの高い塩のヘリックス間効果はまた、ヘリックス間のイオン引力が、ヘリックス形成のために必要ではなく、コイルドコイルがヘテロ2量体対ホモ2量体として形成される傾向にあるか否かを制御することを示す。E-コイルペプチドおよびK-コイルペプチドはまた、共通に係る米国特許出願番号09/654,191 (Attorney Docket #: 4800-0015.31) (参考として本明細書中にその全体が明確に援用される)の実施例2のように、目的のタンパク質または他の生体分子に結合し得る。

【0078】

(V. 適用)

1つの局面において、本発明は、複数の標的タンパク質の提供を実行する方法を含む。一般に、複数の異なる配列の核酸分子から選択される、異なる配列の核酸分子が、基板中の複数のウェルの各々に、添加される。基盤における各ウェルは、第1のコイル形成ペプチドを有する。異なる配列の各核酸分子は、以下の2つの部分を有する：共通配列捕捉部位をコードする第2コイル形成ペプチド、および異なる配列の標的部位をコードする標的タンパク質。

【0079】

基板中のウェルを、選択したタンパク質合成条件下で異なる配列の核酸分子の発現が可能であるタンパク質合成成分を含む溶液で満たす。次いで、異なる配列の核酸分子を発現させる。各ウェルで発現した標的タンパク質は、基板結合コイル形成ペプチドを有するコイル-コイルヘテロ2量体形成を介してウェルに結合し、従って、捕捉形態におけるウェル内での分析が提示される。次いで、このウェルを洗浄して、結合していない成分を取り除き得る

1つの実施形態において、異なる配列の標的タンパク質は、各々、cDNA分子のライブラリーから選択される異なるcDNA分子である。発現後、各ウェルに提示されるタンパク質は、図2に示されるように、異なる配列36, 37, 38を有する。各ウェルで発現した標的タンパク質は、基板結合コイル形成ペプチドを有するコイル-コイルヘテロ2量体形成を介してウェルに結合し、従って、捕捉形態におけるウェル内での分析が提示される。各タンパク質は、cDNAライブラリーの代表である。次いで、提示されたタンパク質を、1つ以上の薬物に対してスクリーニングし、選択した薬物と相互作用するタンパク質を同定し得る。

【0080】

図8に示されるように、別の実施形態において、異なる領域302、303において変異されたタンパク質300を、所定の基板315上の各ウェルが同じタンパク質303の異なる変異体302または303を含むように、各ウェル310に配置する。例えば、96ウェルプレートは、同じタンパク質の、96種類の異なる変異体を有する。タンパク質または薬物を用いて、高親和性結合についてプレートをスクリーニングする。次いで、質量分析法を用いて、どの変異残基がタンパク質または薬物の結合親和性を増大させる原因であるかを同定する。

【0081】

さらに別の実施形態において、異なる配列の各標的タンパク質は、同じDNA分子にコードされる。図9に示されるように、発現およびタンパク質結合の後、各ウェル410中に、提示されるタンパク質400を、全て同定する。次いで、提示されるタンパク質を、異なる組成のパネルに対してスクリーニングし、提示されるタンパク質と相互作用する薬物を同定し得る。1つの実施形態において、化学的ライブラリーをプールに再分画し、次いで各プールを各ウェルに添加する。質量分析法を用いて、提示されるタンパク質に特異的に結合する化合物または化合物のプールを同定する。別の実施形態において、DNAライブラリーをプールに再分画し、次いで各プールを各ウェルに添加する。質量分析法を用いて、提示されるタンパク質に対して特異的なDNA結合配列を同定する。さらに別の実施形態において、提示されるタンパク質は、各ウェルに提示される酵素または酵素改変体である。潜在的な酵素基質のライブラリーをウェルに添加し、質量分析法を用いてウェル中の生成物の生成を同定するか；またはインヒビターを用いた場合の密着結合分子 (ti

ght binding molecule)を同定する。

【0082】

提示されるタンパク質を用いて、上記に記載されるように生化学的反應（例えば、タンパク質の相互作用、核酸の相互作用、低分子の相互作用など）をモニターし得る。例えば、抗原と抗体との間の特異的な相互作用の効率；レセプター（例えば、精製したレセプターまたは細胞膜に結合するレセプター）とそれらのリガンドとの間の特異的な相互作用の効率、アゴニストとアンタゴニストとの間の特異的な相互作用の効率；および酵素（例えば、プロテアーゼまたはキナーゼ）とそれらの基質との間の特異的な相互作用の効率、あるいは生成物に転換された基質量の増加または減少；ならびに他の多くのもの。このような生化学的アッセイは、標的タンパク質の性質の特徴付け、またはスクリーニングアッセイの基礎として用いられ得る。例えば、特定のプロテアーゼXaおよびV I I aの存在についてサンプルをスクリーニングするために、このサンプルを、標的タンパク質が個々のプロテアーゼである組合せについてアッセイし得る。提供される特定のプロテアーゼに対して特異的な蛍光発原質がプロテアーゼに結合しそして切断される場合、この基質は蛍光発光し、通常、結果として、例えば、2つのエネルギー移動対の間で切断されそして分離され、そしてシグナルを検出し得る。別の実施形態において、特定のキナーゼ（例えば、Src、チロシンキナーゼ、またはZAP70）の存在についてサンプルをスクリーニングするために、目的の1つ以上のキナーゼを含むサンプルを、結合した提供されるポリペプチドが目的のキナーゼの1つによって選択的にリン酸され得る組合せについてアッセイし得る。

10

20

【0083】

認められた技術、日常的に決められる条件を用いて、サンプルを基質のアレイを用いて、適切な緩衝液中で、そして必要な補因子とともに、経験的に決定される時間にわたってインキュベートし得る。各反応物を、経験的に決定された条件下で処理（例えば、洗浄）して非結合成分および所望でない成分を除去した後、結合した成分を、質量分析法によって決定し得る。

【0084】

別の実施形態において、提供されるタンパク質を用いて、提供されるタンパク質および所定のプローブの相互作用を調節する薬剤をスクリーニングし得る。薬剤は、プローブ、タンパク質またはタンパク質+プローブで形成される複合体のいずれかとの直接的または間接的な相互作用によってタンパク質/プローブ相互作用を調節し得る。この調節は、多様な形態を可能にし、それらの調節としてはプローブに対するタンパク質の結合親和性の増加または減少、プローブのタンパク質への結合の競合的阻害または非競合的阻害である、タンパク質とプローブが結合する速度の増加または減少、あるいは場合によってはプローブ/タンパク質相互作用の増加または減少を導き得るプローブまたはタンパク質の活性の増加または減少が挙げられるが、これらに限定されない。このような薬剤は、合成されるかまたは天然に存在する基質であり得る。また、このような薬剤は、未改変の状態または他種との凝集体として用いられ得；そしてこれらの薬剤は、直接または特異的に結合基質を介して、結合メンバーに共有結合または非共有結合し得る。

30

【0085】

前述から、本発明の目的および特徴が、いかに多様であるが理解され得る。

40

【0086】

（表1）

（本発明を支持して供給される配列）

【0087】

【表 1】

詳 細	配列 番号
Eコイル: Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys	1
Kコイル: Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu	2
Glu Val Glu Ala Leu Gln Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Cys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Glu Ala Leu Gln Lys	3
Lys Val Glu Ala Leu Lys Lys Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Ala Leu Lys Cys Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Glu Ala Leu Lys Lys	4
T7 プロモーター TAATACGACTCACTATA	5
T7 ターミネーター CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTT TT	6

(V I . 実施例)

以下の実施例は、本明細書中に記載される発明をさらに例証するが、本発明の範囲のいかなる限定も意図しない。

【0088】

(実施例1)

(インビトロ発現MS研究)

(A. 要旨)

インビトロ発現質量分析法の研究は、インビボで発現されるタンパク質の同定について、MALDI-MSを使用する。本研究の目的は、コイルドコイルタンパク質提示のプラットフォーム、インビトロでのタンパク質発現および質量分析法に基づく、ハイスループットのタンパク質分析の可能性を試験することであった。一般に、Eコイルータグ化融合タンパク質を、無細胞環境においてクローニングおよび発現し、そして発現したタンパク質を、96ウェルELISAプレート上に固定したKコイルペプチドによって、すぐに捕捉した。続いて、捕捉したEコイルタグ化タンパク質を、MALDI-MSによって検出した。

【0089】

(B. 実験の詳細)

リボソーム抽出物をPromega Bioscience (San Luis Obispo, CA) から購入したか、またはE. coli株BL21* (DE3) から社内で調製した。3つのDNA構築物 (例えば、Tn1ペプチド-Eコイル (pMA2)、アクチンペプチド-Eコイル (pS1A)、およびcMycペプチド-Eコイル (cMyc-E)) をT7プロモーター配列を含むDNAプラスミドpET-17bにクローニングした。クローニングしたこれら3つのプラスミドのインビトロでの発現試験は、 $\mu\text{g}/\text{m}$

1 レベルのタンパク質が獲得され得ることを示した。Coasters スルフヒドリル結合 96 ウェルプレート、Corning Life Sciences (Acton, MA) から購入した。リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS, pH 6.5) (1 mM EDTA、および 0.1 μ M ジチオスレイトールを含む) 中の 1 μ l/ml の K コイル-チオールを、ウェル中で、室温で 1 時間インキュベーションすることによって、K コイルペプチドをプレート上に共有結合的に固定した。プレート上の反応していないマレイミドを、100 μ M システインを用いてブロッキングした。クローニングしたプラスミド、S30 リボソーム抽出物、緩衝液および必要な成分を含む 100 μ l のインビトロ発現反応カクテルを、K コイルを固定したプレートのウェルに添加し、37°C で 2 時間インキュベートした。次いで、このプレートを、0.05% Tween-20 を含む PBS (pH 7.4) で 5 回洗浄し、10 mM リン酸緩衝液 (塩化ナトリウムを含まない) で 3 回洗浄した。結合した E コイル-タグ化タンパク質を、0.05% TFA/H₂O 中の 30 μ l の 50% アセトニトリルで抽出した。1 μ l の抽出物を MS 標的プレートのウェルに添加し、そして 1 μ l のマトリックス溶液 (0.05% TFA/H₂O 中の 1 ml の 50% アセトニトリル中の 4 mg のフェルラ酸 (ferulic acid) および 6 mg のシナピン酸) と混合した。この混合物を MALDI-MS 標的プレート上で室温で結晶化させ、最終的に Micromass TOF 2E 質量分析法機を用いて分析した。この質量分析法機に 337 nm 窒素レーザーを備え付け、 $\times 20$ KV の加速電圧で、リニア陽イオンモードで操作した。多チャンネルプレート高質量検出器を、スペクトルの記録のために用いた。

10

20

【0090】

(C. 結果)

図 10 C は、市販の抽出物を用いて発現され、そして K コイル固定表面によって捕捉された Tnl ペプチド E コイルタンパク質 (pMA2) の質量スペクトルを示す。図 10 A は、発現反応カクテル中に単なる pET-17b プラスミドを用いたネガティブコントロールである。図 10 B は、システイン固定表面における融合タンパク質の非特異的結合を示す。融合タンパク質の質量に対応するピークが、図 10 C で矢印によって示される。

【0091】

図 11 C は、市販の抽出物を用いて発現され、そして K コイル固定表面によって捕捉されたアクチンペプチド E コイルタンパク質 (pS1A) の質量スペクトルを示す。図 11 A は、発現反応カクテル中に単なる pET-17b プラスミドを用いたネガティブコントロールである。図 11 B は、システイン固定表面における融合タンパク質の非特異的結合を示す。融合タンパク質の質量に対応するピークが、図 11 C で矢印によって示される。

30

【0092】

図 12 C は、市販の抽出物を用いて発現され、そして K コイル固定表面によって捕捉される cMy c ペプチド E コイルタンパク質 (cMy c-E) の質量スペクトルを示す。図 12 A は、発現反応カクテル中に単なる pET-17b プラスミドを用いたネガティブコントロールである。図 12 B は、システイン固定表面における融合タンパク質の非特異的結合を示す。融合タンパク質の質量に対応するピークが、図 12 C で矢印によって示される。

40

【0093】

図 13 C は、社内抽出物を用いて発現させられ、そして K コイル固定表面によって捕捉された cMy c ペプチド E コイルタンパク質 (cMy c-E) の質量スペクトルを示す。図 13 A は、発現反応カクテル中に単なる pET-17b プラスミドを用いたネガティブコントロールである。図 13 B は、システイン固定表面における融合タンパク質の非特異的結合を示す。融合タンパク質の質量に対応するピークが、図 13 C で矢印によって示される。

【0094】

図 10 ~ 図 13 に示されるように、3 つのクローン化プラスミドから発現される E コイルタグ化タンパク質は、K コイル固定プレートによって捕捉され、そして MS によって同

50

定した（図中矢印によって示される）。図10～図12は、社内抽出物を用いた結果（図13）と比較した、市販のリボソーム抽出物から得られた結果を示す。この社内抽出物（図13）は、非特異的結合を殆ど示さなかった。

【0095】

本明細書中に記載される全ての刊行物および特許出願は、本発明が属する分野の当業者の技術水準を示す。全ての加工物および特許出願は、各々、個々の刊行物または特許出願が参考として具体的かつ個別に援用されるのと同じ程度まで、参考として本明細書中に援用される。

【0096】

本発明は、特定の実施形態に関して記載されているが、種々の変更および改変が、本発明から逸脱することなくなされ得ることが、当業者に明らかである。 10

【図面の簡単な説明】

【0097】

【図1】図1は、本発明の1つの実施形態に従って構成された標的タンパク質提示キットの斜視図である。

【図2】図2は、本発明の1つの実施形態に従って構成された、各ウェル中に異なる標的タンパク質を含む図1の提示キット中の矢印2-2の方向で描かれた断面図である。

【図3A】図3Aは、目的の配列およびC末端コイルド-コイルドメインを含むプラスミド p E T-17 b の特徴および関連する制限部位を示すマップである。

【図3B】図3Bは、目的の配列およびN末端コイルド-コイルドメインを含むプラスミド p E T-17 b の特徴および関連する制限部位を示すマップである。 20

【図4】図4A～4Eは、本発明の1つの実施形態における、コード配列のインビトロ合成における工程を示す。

【図5】図5A～5Cは、本発明の1つの実施形態における、プライマーをmRNAに係留し、cDNAを作製する工程を例示する。

【図6】図6A～6Cは、本発明の1つの実施形態に従って、標的タンパク質を作製し、そして基材に係留する工程を示す。

【図7】図7A～7Cは、本発明の1つの実施形態に従って、基材中で標的タンパク質をインビトロ翻訳し、そしてウェルに係留する工程を示す。

【図8】図8は、各ウェル中に異なる変異型標的タンパク質を含む図1の提示キット中の矢印2-2の方向で描かれた断面図である。 30

【図9】図9は、各ウェル中に同じ変異型標的タンパク質を含む図1の提示キット中の矢印2-2の方向で描かれた断面図である。

【図10】図10A～10Cは、市販の抽出物を用いて発現され、そしてKコイル固定化表面により捕捉されたTn1ペプチドEコイルタンパク質（pMA2）、および適切なコントロールの質量スペクトルを示す。

【図11】図11A～11Cは、市販の抽出物を用いて発現され、そしてKコイル固定化表面により捕捉されたアクチンペプチドEコイルタンパク質（pS1A）、および適切なコントロールの質量スペクトルを示す。

【図12】図12A～12Cは、市販の抽出物を用いて発現され、そしてKコイル固定化表面により捕捉されたcMycペプチドEコイルタンパク質（cMyc-E）、および適切なコントロールの質量スペクトルを示す。 40

【図13】図13A～13Cは、社内（in-house）の抽出物を用いて発現され、そしてKコイル固定化表面により捕捉されたcMycペプチドEコイルタンパク質（cMyc-E）、および適切なコントロールの質量スペクトルを示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Helix Biopharma Corporation

<120> Method and Device for Integrated Protein
Expression, Purification and Detection

<130> 548008019WO00

<140> Not Yet Assigned

<141> Filed Herewith

<150> US 60/314,333

<151> 2001-08-22

<150> US 60/375,627

<151> 2002-04-25

<160> 6

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> E coil-forming peptide

<400> 1

Glu	Val	Ser	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ser	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val
1				5				10				15			
Ser	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ser	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ser	Ala
		20				25						30			
Leu	Glu	Lys													
		35													

<210> 2

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> K coil-forming peptide

<400> 2

Lys	Val	Ser	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ser	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val
1				5				10				15			
Ser	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ser	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ser	Ala
		20				25						30			
Leu	Lys	Glu													
		35													

<210> 3

<211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> coil-forming peptide

<400> 3
 Glu Val Glu Ala Leu Gln Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Glu Cys Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys Glu Val Glu Ala
 20 25 30
 Leu Gln Lys
 35

10

<210> 4
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> coil-forming peptide

<400> 4
 Lys Val Glu Ala Leu Lys Lys Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Lys Cys Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu Lys Val Glu Ala
 20 25 30
 Leu Lys Lys
 35

20

<210> 5
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> T7 promoter

<400> 5
 taatacgact cactata

17

<210> 6
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30

<220>
 <223> T7 terminator

<400> 6
 ctagcataac cccttggggc ctctaaacgg gtcttgaggg gtttttt

47

【図 1】

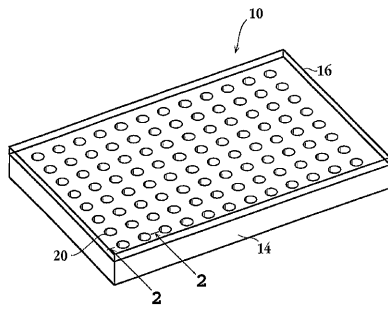


Fig. 1

【図 2】

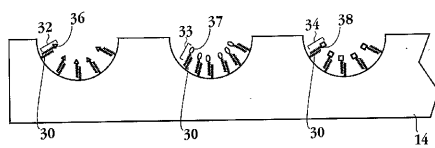


Fig. 2

【図 3 A】

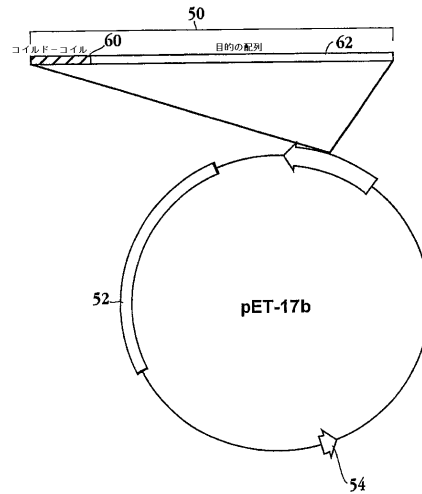


Fig. 3A

【図 3 B】

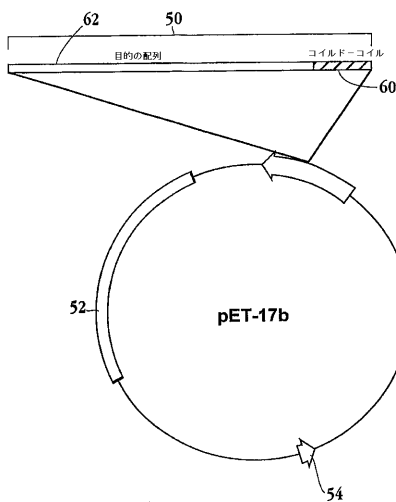


Fig. 3B

【図 4】

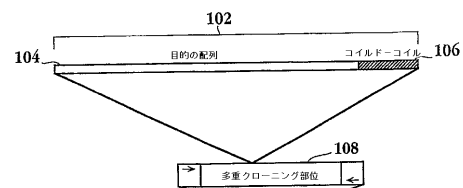


Fig. 4A

ベクターの調製
1. 制限消化
2. 脱リン酸化
混合、ライゲーション、形質転換、コロニーのスクリーニング

Fig. 4B



Fig. 4C

DNAを線状化するために、
プラスミドを適切な制限酵素
を用いて調製
RNA合成反応構成要素
(適当なRNAポリメラーゼ
およびNTP)の添加
ならびにインキュベーション

Fig. 4D

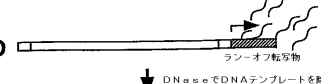
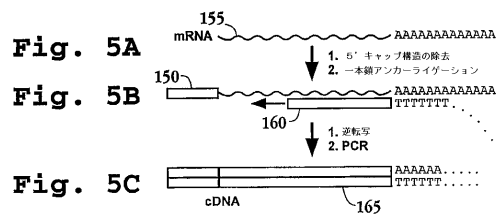


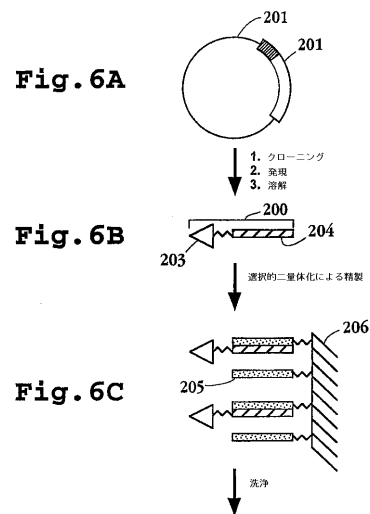
Fig. 4E

ランオフ転写物
↓
DnaaseでDNAテンプレートを除去
精製されたRNA転写物

【図 5】



【図 6】



【図 7 A】

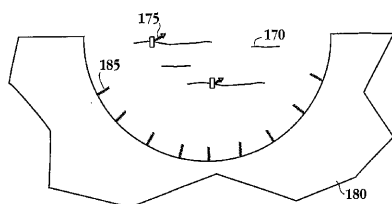


Fig. 7A

【図 7 B】

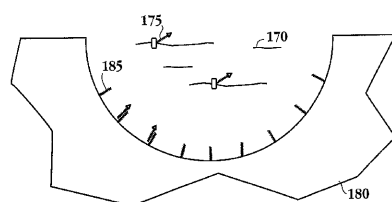


Fig. 7B

【図 7 C】

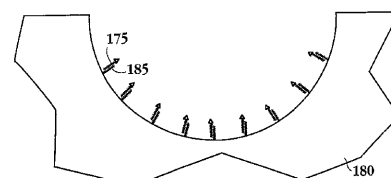


Fig. 7C

【図 8】

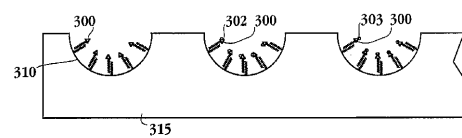


Fig. 8

【図 9】

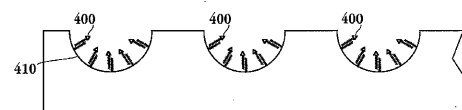


Fig. 9

【図 10 A】

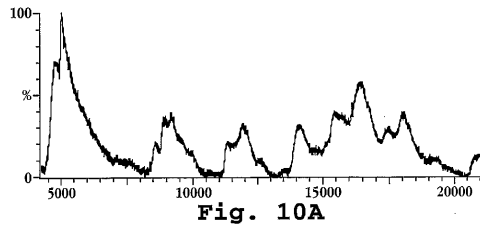


Fig. 10A

【図 11 A】

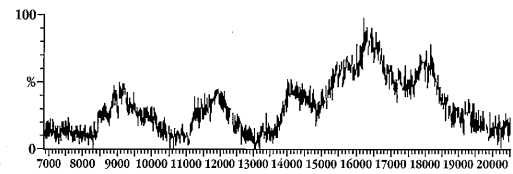


Fig. 11A

【図 10 B】

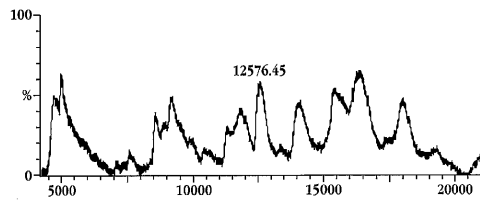


Fig. 10B

【図 11 B】

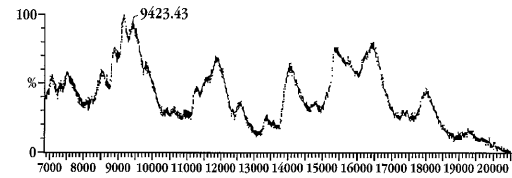


Fig. 11B

【図 10 C】

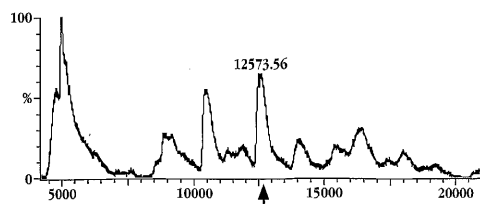


Fig. 10C

【図 11 C】

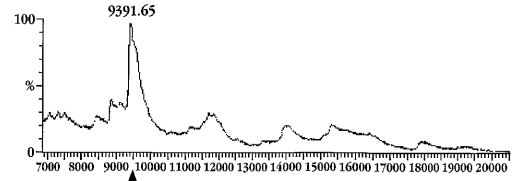


Fig. 11C

【図 12 A】

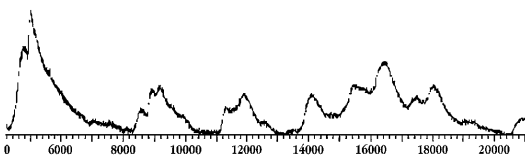


Fig. 12A

【図 13 A】

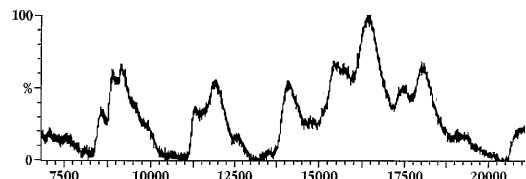


Fig. 13A

【図 12 B】

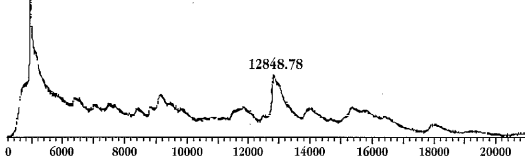


Fig. 12B

【図 13 B】

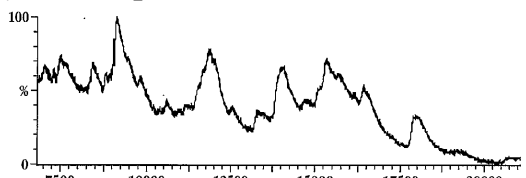


Fig. 13B

【図 12 C】

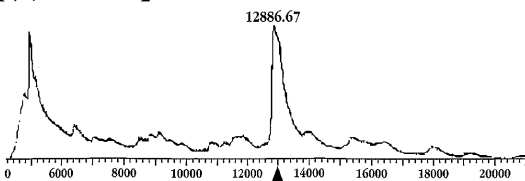


Fig. 12C

【図 13 C】

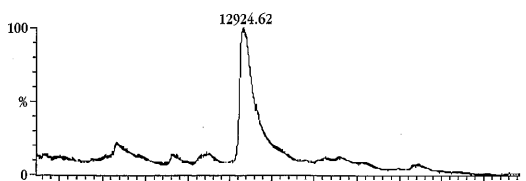


Fig. 13C

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Interna Application No PCT/CA 02/01374
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/10 G01N33/68 C12P21/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
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, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHAO H ET AL: "Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL SCIENCES & APPLICATIONS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 715, no. 1, 11 September 1998 (1998-09-11), pages 307-329, XP004147004 ISSN: 1570-0232 the whole document	1-10, 14, 15
X	WO 00 52456 A (HELIX BIOPHARMA CORP) 8 September 2000 (2000-09-08) the whole document	1-10, 14, 15
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ 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 *Z* 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 April 2003		23/06/2003
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 Wimmer, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat	Application No
PCT/CA	02/01374

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 41424 A (PENCE INC ;UNIV MCGILL (CA)) 6 November 1997 (1997-11-06) the whole document -----	1-10,14, 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internal

Application No

PCT/CA 02/01374

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0052456	A	08-09-2000	AU 2898500 A	21-09-2000
			WO 0052456 A1	08-09-2000
WO 9741424	A	06-11-1997	AT 234461 T	15-03-2003
			AT 234462 T	15-03-2003
			AU 711956 B2	28-10-1999
			AU 2563897 A	19-11-1997
			AU 711861 B2	21-10-1999
			AU 2563997 A	19-11-1997
			CA 2251674 A1	06-11-1997
			CA 2252474 A1	06-11-1997
			WO 9741424 A1	06-11-1997
			WO 9741425 A1	06-11-1997
			DE 69719742 D1	17-04-2003
			DE 69719817 D1	17-04-2003
			EP 0895592 A1	10-02-1999
			EP 1005644 A1	07-06-2000
			JP 2001503849 T	21-03-2001
			JP 2000510233 T	08-08-2000
			US 6478939 B1	12-11-2002
			US 6461490 B1	08-10-2002
			US 6107080 A	22-08-2000
			US 6165335 A	26-12-2000
			US 6130037 A	10-10-2000

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 チャオ, ヘイマン
カナダ国 エル4ジー 5ジー4 オンタリオ, オーロラ, ギルバンク ドライブ 20

(72)発明者 ウォン, ワー ワイ.
カナダ国 ティー5ティー 2エス1 アルバータ, エドモントン, 77ティーエイチ アベニュー 17915

(72)発明者 ティアン, バオミン
カナダ国 ティー6イー 1ワイ1 アルバータ, エドモントン, スイート 307, アベニュー 10615-81

(72)発明者 シーガル, ドナルド
カナダ国 エル4エー 7エックス4 オンタリオ, ストウフヴィル, ルーラル ルート 3

(72)発明者 マクエルロイ, ジェリー
カナダ国 エル43 3エル0 オンタリオ, リッチモンド ヒル, ハイ オーク トレイル 26

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA07 HA01 HA08 HA11
4B064 AG01 CA21 CC24 DA01 DA13