

(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2004-506201

(P2004-506201A)

(43) 公表日 平成16年2月26日(2004.2.26)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/53

C 1 2 Q 1/02

GO 1 N 27/62

GO 1 N 27/64

GO 1 N 37/00

F I

GO 1 N 33/53

C 1 2 Q 1/02

GO 1 N 27/62

GO 1 N 27/64

GO 1 N 37/00 1 O 2

テーマコード (参考)

4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 86 頁)

(21) 出願番号 特願2002-517526 (P2002-517526)
 (86) (22) 出願日 平成13年8月3日 (2001.8.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年2月3日 (2003.2.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/024264
 (87) 国際公開番号 W02002/012893
 (87) 国際公開日 平成14年2月14日 (2002.2.14)
 (31) 優先権主張番号 60/222, 763
 (32) 優先日 平成12年8月3日 (2000.8.3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

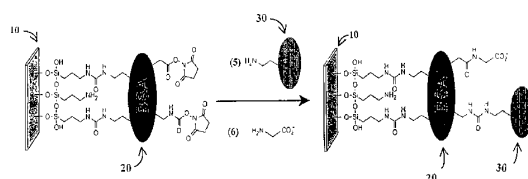
(71) 出願人 591013573
 マサチューセッツ・インスティテュート・
 オブ・テクノロジー
 MASSACHUSETTS INST I
 TUTE OF TECHNOLOGY
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州021
 39, ケンブリッジ, マサチューセッツ
 ・アベニュー 77
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100076691
 弁理士 増井 忠式
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 機能性生体分子のマイクロアレイおよびその使用

(57) 【要約】

特に興味のある生体高分子がマイクロアレイで支持体表面に結合する場合に、それらの高分子と相互作用する能力のある化合物の同定を容易にするための製品および方法を開示する。本発明の観点は結合化学、ペプチド標識、抗体の調製、適用などに関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下のもの：

固体支持体；

該固体支持体に共有結合するリンカー；および

該リンカーと共有結合を形成する能力のある末端を有するタンパク質またはタンパク質フラグメント

を含有する、タンパク質マイクロアレイ。

【請求項 2】

該末端がカルボキシ末端である、請求項 1 記載のマイクロアレイ。

10

【請求項 3】

該固体支持体がガラスである、請求項 1 記載のマイクロアレイ。

【請求項 4】

該リンカーがマレイミド基を含む、請求項 1 記載のマイクロアレイ。

【請求項 5】

該リンカーがビニルスルホン基を含む、請求項 1 記載のマイクロアレイ。

【請求項 6】

該リンカーが N - ヒドロキシスクシンイミド基を含む、請求項 1 記載のマイクロアレイ。

【請求項 7】

該タンパク質またはタンパク質フラグメントが抗体または抗体フラグメントである、請求項 1 記載のマイクロアレイ。

20

【請求項 8】

該抗体または抗体フラグメントが 1 本鎖抗体である、請求項 7 記載のマイクロアレイ。

【請求項 9】

該マイクロアレイが cm^2 当たり少なくとも 1,000 スポットを有する、請求項 1 記載のマイクロアレイ。

【請求項 10】

該マイクロアレイが cm^2 当たり少なくとも 2,000 スポットを有する、請求項 1 記載のマイクロアレイ。

【請求項 11】

30

支持体表面にタンパク質を結合させる方法であり、該方法が以下の段階：

(a) ウシ血清アルブミン分子を支持体表面に共有結合させ；

(b) 該分子の露出面上に活性化カルバメート基または活性化エステル基を形成し；そして

(c) 該活性化カルバメート基または該活性化エステル基をアミンを含む結合要素に暴露し、それによって該分子の該カルバメート基または該エステル基および該結合要素のアミン基の間に共有結合を形成させる；

を含む、上記方法。

【請求項 12】

該形成段階が該ウシ血清アルブミンを試薬に暴露して、N - ヒドロキシスクシンイミド基を形成することを含む、請求項 11 記載の方法。

40

【請求項 13】

該結合要素がタンパク質である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 14】

該タンパク質が抗体または抗体フラグメントである、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

該抗体または抗体フラグメントが 1 本鎖抗体である、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

該結合要素に結合していない該活性化カルバメート基またはエステル基をブロッキングする段階を更に含む、請求項 11 記載の方法。

50

【請求項 17】

支持体表面にタンパク質を結合させる方法であり、該方法が以下の段階：

- (a) 反応に使用できる第1の化学基を含む支持体表面を提供し；
 - (b) 第1の末端および第2の末端を含む捕捉タンパク質を提供し、該第1末端はリガンドに結合する能力を有し、該第2末端は第2の化学基を含み；そして
 - (c) 該第1の化学基と該第2の化学基との間に共有結合を形成し、それによって該捕捉タンパク質を該捕捉タンパク質の該第2末端で該支持体表面に結合させる；
- を含む、上記方法。

【請求項 18】

該捕捉タンパク質が末端システインを含む、請求項 17 記載の方法。

10

【請求項 19】

該末端システインがカルボキシ末端にある、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

該形成段階が該システインの化学的還元を含む、請求項 18 記載の方法。

【請求項 21】

タンパク質結合の小分子調節物質を同定するための方法であり、該方法が以下の段階：

- (a) 捕捉タンパク質を支持体表面上に結合させ；
 - (b) 該基質を該捕捉タンパク質のリガンドおよび少なくとも1つの小分子に暴露し；そして
 - (c) 該捕捉タンパク質および該リガンド間の結合の存在または不在を検出する；
- を含む、上記方法。

20

【請求項 22】

段階 (a) が該捕捉タンパク質を BSA - NHS スライド上に結合させることを含む、請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

段階 (a) がアルデヒド基で該支持体表面を機能化することを含む、請求項 21 記載の方法。

【請求項 24】

段階 (a) が該捕捉タンパク質を cm^2 当たり少なくとも 1,000 スポットのマイクロアレイとなるように結合させることを含む、請求項 21 記載の方法。

30

【請求項 25】

該捕捉タンパク質を GST タンパク質に融合させることを更に含む、請求項 21 記載の方法。

【請求項 26】

蛍光色素によって該捕捉タンパク質と該リガンドとの間の該結合を検出することを更に含む、請求項 21 記載の方法。

【請求項 27】

該蛍光色素が親水性ポリマー部分を含む、請求項 26 記載の方法。

【請求項 28】

該部分がポリエチレングリコールである、請求項 27 記載の方法。

40

【請求項 29】

段階 (c) が抗体フラグメントをディスプレイする標識したファージ粒子によって該捕捉タンパク質と該リガンドとの間の該結合を検出することを含む、請求項 21 記載の方法。

【請求項 30】

該リガンドが関連タンパク質のファミリーを含む、請求項 21 記載の方法。

【請求項 31】

該リガンドが Bcl-2 ファミリーのタンパク質を含む、請求項 30 記載の方法。

【請求項 32】

該捕捉タンパク質が関連タンパク質のファミリーを含む、請求項 21 記載の方法。

【請求項 33】

50

細胞経路に選択的に作用する小分子を同定するための方法であり、以下の段階：

(a) 支持体表面に捕捉タンパク質のマイクロアレイであって、細胞経路で作用するタンパク質を含むものを結合させ；

(b) 該基質表面を該捕捉タンパク質のリガンドの少なくとも1つおよび小分子の少なくとも1つに暴露し；そして

(c) 該捕捉タンパク質および該リガンド間の結合の変化であって該小分子との相互作用の結果生じる変化を検出する；

を含む、上記方法。

【請求項34】

段階(c)が質量分析を使用して該変化を定量することを更に含む、請求項33記載の方法。 10

【請求項35】

蛍光色素によって該捕捉タンパク質と該リガンドとの間の該結合を検出することを更に含む、請求項33記載の方法。

【請求項36】

該蛍光色素が親水性ポリマー部分を含む、請求項35記載の方法。

【請求項37】

該部分がポリエチレングリコールである、請求項36記載の方法。

【請求項38】

段階(c)が抗体フラグメントをディスプレイする標識したファージ粒子によって該捕捉タンパク質と該リガンドとの間の該結合を検出することを含む、請求項33記載の方法。 20

【請求項39】

段階(a)がB S A - N H Sスライド上に該捕捉タンパク質を結合させることを含む、請求項33記載の方法。

【請求項40】

段階(a)が該捕捉タンパク質を cm^2 当たり少なくとも1,000スポットのマイクロアレイとなるように結合させることを含む、請求項34記載の方法。

【請求項41】

抗原を標識するための方法であり、該方法が以下：

抗原をプロテアーゼで消化して、多数のペプチドを生成させ、該ペプチドの少なくとも1つは、該ペプチド上のエピトープと抗体または抗体フラグメントとの間の結合と干渉しない該ペプチドの領域で標識されることが可能である 30

を含む、上記方法。

【請求項42】

スクシンイミジルエステル色素を使用して該ペプチドを標識することを更に含む、請求項41記載の方法。

【請求項43】

該スクシンイミジルエステル色素がCy3、Cy5、またはAlexa色素である、請求項42記載の方法。

【請求項44】

該ペプチドの末端第1級アミンのみを標識することを更に含み、ここで該エピトープが内部にある、請求項41記載の方法。 40

【請求項45】

トリプシンで該抗原を消化することを更に含む、請求項41記載の方法。

【請求項46】

リン酸化したタンパク質を検出するための方法であり、以下の段階：

(a) 候補となるタンパク質をフラグメント化して、リン酸化部位を含む標的ペプチドを含む多数のペプチドとし；

(b) 該リン酸化部位に隣接する該標的ペプチド上のエピトープに対して親和性を有する抗体または抗体フラグメントに、該多数のペプチドを暴露し； 50

(c) 該抗体または抗体フラグメントに対する該標的ペプチドの親和性に基づいて該標的ペプチドを選択し；そして

(d) 該標的ペプチドについて質量分析を行って、リン酸化された該タンパク質のサブセットの存在を検出する；

を含む、上記方法。

【請求項 47】

段階 (a) がプロテアーゼにより該候補タンパク質を消化することを含む、請求項 46 記載の方法。

【請求項 48】

プロテアーゼがトリプシンである、請求項 47 記載の方法。

10

【請求項 49】

該エピトープに対する s c F v のパニングを更に含む、請求項 46 記載の方法。

【請求項 50】

段階 (c) が固体支持体への該抗体または抗体フラグメントの固定化を含む、請求項 46 記載の方法。

【請求項 51】

段階 (d) が該標的ペプチドのサブセットの分子量変化を検出することを含む、請求項 46 記載の方法。

【請求項 52】

段階 (d) が M A L D I 質量分析を実施することを含む、請求項 46 記載の方法。

20

【請求項 53】

エピトープに対するモノクローナル抗体を免疫化することを更に含む、請求項 46 記載の方法。

【請求項 54】

エピトープに対するポリクローナル抗体を免疫化することを更に含む、請求項 46 記載の方法。

【請求項 55】

エピトープがリン酸化部位から 15 アミノ酸未満だけ離れている、請求項 46 記載の方法。

【請求項 56】

エピトープがリン酸化部位から 10 アミノ酸未満だけ離れている、請求項 46 記載の方法。

30

【請求項 57】

エピトープが 10 アミノ酸未満である、請求項 46 記載の方法。

【請求項 58】

エピトープが 5 アミノ酸未満である、請求項 46 記載の方法。

【請求項 59】

細胞事象を研究する方法であり、以下の段階：

(a) 支持体表面上にリガンドに対する親和性を有する捕捉分子を結合させ；

(b) 該基質表面を細胞オルガネラを含有する溶液に暴露し、ここで該リガンドは該細胞オルガネラの表面に結合し；そして

40

(c) 該捕捉分子と該リガンドとの間の結合によって該オルガネラを捕捉する；

を含む、上記方法。

【請求項 60】

該捕捉分子がタンパク質を含む、請求項 59 記載の方法。

【請求項 61】

該捕捉分子が抗体またはそのフラグメントを含む、請求項 59 記載の方法。

【請求項 62】

該捕捉されたオルガネラに結合するタンパク質を研究することを更に含む、請求項 59 記載の方法。

50

【請求項 63】

該オルガネラがミトコンドリアである、請求項 59 記載の方法。

【請求項 64】

該リガンドがミトコンドリア膜に特異的に (u n i q u e l y) 結合する電圧依存性アニオンチャンネル受容体である、請求項 63 記載の方法。

【請求項 65】

該溶液が全細胞抽出物である、請求項 59 記載の方法。

【請求項 66】

該溶液が全細胞抽出液の画分である、請求項 59 記載の方法。

【請求項 67】

蛍光色素によって該捕捉を検出することを更に含む、請求項 59 記載の方法。

【請求項 68】

該蛍光色素が親水性ポリマー部分を含む、請求項 67 記載の方法。

【請求項 69】

該部分がポリエチレングリコールである、請求項 68 記載の方法。

【請求項 70】

色素が該オルガネラの無傷の電圧グラジエントを認識するための電位差特性を有する、請求項 67 記載の方法。

【請求項 71】

該オルガネラがミトコンドリアである、請求項 70 記載の方法。

【請求項 72】

抗体フラグメントをディスプレイする標識されたファージ粒子によって該捕捉を検出することを更に含む、請求項 59 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連する出願

本出願は米国仮出願第 60 / 222, 763 号 (2000 年 8 月 3 日出願) に基づいて優先権を主張するものであり、その開示は参照によって本明細書に援用される。

【0002】

技術分野

本発明は診断化学および分析化学の分野、特に複雑な化学的サンプルまたは生物学的サンプルをスクリーニングして、サンプル中の成分を特定の結合要素に結合するその能力に基づいて同定、単離、または定量するための装置に関する。本発明は特に、生物学的に重要な結合要素、または生物学的に重要なリガンドに結合する結合要素のアレイ、好ましくはマイクロアレイ、の生成および使用に関する。

【0003】

発明の背景

複雑な化学的サンプルもしくは生物学的サンプル、または多数の化合物を効率的にスクリーニングするための機能性生体分子の高密度アレイを構築するために、結合要素を固体支持体上に固定化する必要がある。当該分野において固体支持体に生物学的分子を結合させるための種々の方法が知られている。一般に、A f f i n i t y T e c h n i q u e s , E n z y m e P u r i f i c a t i o n : P a r t B , M e t h . E n z . 34 (W . B . J a k o b y および M . W i l c h e k 編 , A c a d . P r e s s , N . Y . 1974) および I m m o b i l i z e d B i o c h e m i c a l s a n d A f f i n i t y C h r o m a t o g r a p h y , A d v . E x p . M e d . B i o l . 42 (R . D u n l a p 編 , P l e n u m P r e s s , N . Y . , 1974) を参照されたい。例えば A r e n k o v らは、タンパク質をその機能を保持しつつ固定化する方法について記載しているが、これは微細加工 (m i c r o f a b r i c a t e d) ポリアクリルアミドゲルパッドを使用してタンパク質を捕捉し、その後、微量電気泳動 (m i c r o e l e c t r o p h o r e s i s) によってマトリクスを通ずる拡散を促進

10

20

30

40

50

することによるものである (Arenkovら (2000), Anal Biochem 278 (2): 123-31)。また特許文献は、固体支持体に生物学的分子を結合させる多くの異なる方法を記載している。例えば米国特許第4,282,287号は、ビオチン、アビジン、および増量剤の多層の連続的適用によってポリマー表面を修飾する方法について記載している。米国特許第4,562,157号は、光化学反応性アリールアジドへの結合によって表面に生化学的リガンドを結合させるための方法について記載している。アジドの放射線照射によって反応性ナイトレンが生成されるが、これは溶液中で高分子と不可逆的に反応し、それによって共有結合が形成される。しかしながら、ナイトレン中間体は反応性が高いため、非特異的反応によって結合効率の低下および多くの潜在的に好ましくない生成物の生成の両方が起こる。米国特許第4,681,870号は、シリカマトリクス上に遊離のアミノ基またはカルボキシル基を導入する方法を記載しており、ここではそれらの基をそれに続いてカルボジイミドの存在下でタンパク質に共有結合させてもよい。更に、米国特許第4,762,881号は、固体基質にポリペプチド鎖を結合させるための方法について記載しているが、これは光感受性非天然型 (unnatural) アミノ酸基をポリペプチド鎖に導入し、生成物を低エネルギー紫外線に暴露することによるものである。

10

【0004】

しかしながら、複合サンプル中の成分を同定、単離、および/または定量し、多数の化合物を種々の異なる結合パートナーに結合するその能力に基づいてスクリーニングする、より効率的で製造が容易なアレイ系が今なお必要とされている。

20

【0005】

発明の概要

本発明は、興味のある結合要素を基質に固定化し、サンプル分析物と相互作用させて結合させることができる、マイクロアレイ・アッセイ系を提供する。マイクロアレイは、天然または合成化合物の大型ライブラリーをスクリーニングし、結合要素の天然の結合パートナーを同定し、そして診断的または治療的目的であり得る非天然型結合パートナーを同定するのに有用である。本発明は、これまでその特異的結合活性を保持しながら高密度アレイに導入することができなかった scFv のような抗体または抗体フラグメントのマイクロアレイを提供するのに特に有用である。本発明はまた、それらのマイクロアレイの使用法、それらのアレイに有用な抗体または抗体フラグメントのためのエピトープの選択法、そしてマイクロアレイで実施したアッセイから得られるデータの分析法を提供する。

30

【0006】

好ましくは、固定化した結合要素はシリコンベースのチップまたはガラススライドのような固体支持体上に配列させてアレイとする。支持体の表面は、更なる結合化学に使用できる少なくとも1つの反応性化学基を有するように選択するか、またはそのように化学的に誘導する。必要により、フレキシブルな分子リンカーを支持体および結合要素間に挿入してもよい。それらのリンカーの例にはウシ血清アルブミン (BSA) 分子、マレイミド、およびビニルスルホン基がある。

【0007】

本発明のある態様では、結合要素の、その同族リガンドへの結合に関与する領域と、支持体に結合される領域とを分離するように、結合要素を支持体に固定化する。好ましい態様では、2つの領域は2つの異なる末端であり、結合要素を操作して、末端の1つを介して支持体上のリンカー分子への共有結合を形成させるようにする。それらの共有結合はシッフ塩基結合、マイケル付加によって生成される結合、またはチオエーテル結合によって形成してもよい。特に好ましい態様では、抗体フラグメントを操作して、そのカルボキシル末端に還元されたシステインを含むようにする。

40

【0008】

好ましい態様では、マイクロアレイは cm^2 当たり少なくとも1000スポットの密度の固定化され、なおかつ機能性を有する結合要素のアレイを含む。ある態様では、乾燥を防ぐために、固定化した結合要素の層にグリセロールのような保水剤を添加することを本発

50

明は提供する。他の態様では、基質表面に B S A のようなブロッキング剤溶液を添加することを本発明は提供する。

【 0 0 0 9 】

別の観点では、本発明は、標識が抗原と抗体または抗体フラグメントとの結合に干渉しないような抗原の標識方法を提供する。好ましい態様では、プロテアーゼ消化後に抗原をその末端アミンで標識する。特に好ましい態様では、抗原をトリプシンで消化した後、スクシンイミジルエステル色素で標識する。

【 0 0 1 0 】

更なる観点では、本発明は候補となるタンパク質を多数のペプチドにフラグメント化することによってリン酸化されたタンパク質を検出する方法を提供し、ここでペプチドの 1 つは既知の、または疑いのあるリン酸化部位を含み、抗体または抗体フラグメントを使用して、リン酸化部位に近いエピトープによってペプチドを選択する。

10

【 0 0 1 1 】

更に別の観点では、本発明はタンパク質 - タンパク質相互作用を調節する小分子の同定法を提供する。この観点によれば、捕捉タンパク質を支持体表面に結合させ、そのリガンドおよび少なくとも 1 つの小分子に暴露する。次いで捕捉タンパク質とリガンドとの間の結合の存在または不在を検出して、小分子の調節作用を確認する。好ましい態様では、同じ細胞経路で作用する捕捉タンパク質のマイクロアレイを支持体表面に結合させ、これら全てのタンパク質に対する小分子の調節作用の概要を同時に得る。

【 0 0 1 2 】

更に別の観点では、本発明は支持体表面に捕捉分子を結合させて、全細胞溶解物のような溶液中に含有される細胞オルガネラを捕捉させることによって、細胞事象を研究する方法を提供する。

20

【 0 0 1 3 】

本発明のこれらおよび他の観点は以下の詳細な開示および好ましい態様の説明によって当業者に明らかとなる。

発明の詳細な説明

本発明は一部には、天然に存在する、または人工的に製造した生体高分子のアレイ（特にマイクロアレイ）を製造する新規の方法の発見に依存し、それを使用してサンプル（生物学的サンプルおよび人工サンプルの両方を含む）をスクリーニングし、固定化した結合要素と結合するそれらのサンプル中の分子を同定、単離、または定量してもよい。このため、本発明は生物学的高分子と相互作用する能力のある化合物を同定するための、膨大な数の化合物のハイスループット・スクリーニングを可能にする方法および製品を提供する。

30

【 0 0 1 4 】

本発明は免疫アッセイにおいて特に有意に適用され、これによって抗体および同様の分子を使用する広範かつ効率的なスクリーニングが可能となる。抗体は長い間、タンパク質機能の確認、遺伝子発現の空間時間的パターンの同定、タンパク質 - タンパク質相互作用の同定、そして *in vitro* および *in vivo* での表現型ノックアウトによる標的の確認において非常に重要な役割を果たしてきた。しかしながら、個々の抗体は生物学的サンプル由来の個々のタンパク質をモニタリングするのに有用であるのに対し、本発明はハイスループット分析用にフォーマットした抗体、抗体フラグメント、または抗体様結合要素の大型アレイの生成を提供する。この技術によって正常および疾病状態の血清、細胞、および組織由来の多数のタンパク質の広範なプロファイリングが可能となるが、これは有力な診断および薬剤発見の手段となる。

40

【 0 0 1 5 】

本発明のある観点は、（特に捕捉タンパク質または抗体フラグメントの場合）化学リンカーを介して生体分子を固体支持体に結合させ、その分子の生体機能は保持する方法の改善に関する。

【 0 0 1 6 】

I . 基質 / 支持体

50

本発明のマイクロアレイは基質または支持体上に形成する。これらの基質の特性は意図する使用によって種々に変化するが、形状、原料、および基質表面の修飾に関する基本的な考慮事項を以下に記載する。

【0017】

A. 形状

本発明の基質は本質的にいずれの形状で形成してもよい。基質は実質的に平面 (planar) またはフラットな表面を少なくとも1つ有するのが好ましいが、凹凸 (indentation)、隆起 (protuberances)、階段状、隆線 (ridge)、テラス状 (terraces) などを含んでもよい。基質はシート、ディスク、チューブ、円錐、球状、凹表面、凸表面、ストランド、ストリング、またはこれらおよび他の幾何学的形状のいずれかを組み合わせた形状であってもよい。いくつかの基質表面を組み合わせ

10

【0018】

B. 原料

種々の原料 (有機もしくは無機、または両方の組み合わせ) を本発明の支持体として使用できる。好適な基質原料には、限定される訳ではないが、ガラス、セラミック、プラスチック、金属、合金、炭素、紙、アガロース、シリカ、石英、セルロース、ポリアクリルアミド、ポリアミド、およびゼラチン、並びに他のポリマー支持体、他の固形物質支持体、またはフレキシブル膜支持体がある。基質として使用してもよいポリマーには、限定される訳ではないが、以下がある: ポリスチレン; ポリ(テトラ)フルオロエチレン (PTFE); ポリビニリデンジフルオリド; ポリカーボネート; ポリメチルメタクリレート; ポリビニルエチレン; ポリエチレンイミン; ポリオキシメチレン (POM); ポリビニルフェノール; ポリラクチド、ポリメタクリルイミド (PMI); ポリアルケンスルホン (PAS); ポリプロピレン; ポリエチレン; ポリヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA); ポリジメチルシロキサン; ポリアクリルアミド; ポリイミド; および種々のブロック・コポリマー。基質は原料 (水透過性であってもなくても) を組み合わせて多層状で含有することもできる。基質の好ましい態様は表面 Si-OH 機能性を有する平らな (plain) 2.5 cm x 7.5 cm のガラススライドである。

20

【0019】

C. 表面の調製 / 反応基

リンカーによる結合または結合要素による直接の結合を可能にするために、基質表面に初期処理を行って好適な反応基を生成する必要がある。それらの反応基には以下のような単純な (simple) 化学部分がある: アミノ、ヒドロキシル、カルボキシル、カルボキシレート、アルデヒド、エステル、エーテル (例えばチオエーテル)、アミド、アミン、ニトリル、ビニル、スルフィド、スルホニル、ホスホリル、または同様の化学反応基。あるいはまた、反応基は更に複雑な部分を含有してもよく、それらには、限定される訳ではないが、以下がある: マレイミド、N-ヒドロキシスクシンイミド、スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド、ニトリロトリ酢酸、活性化ヒドロキシル、ハロアセチル (例えばブromoアセチル、ヨードアセチル)、活性化カルボキシル、ヒドラジド、エポキシ、アジリジン、スルホニルクロリド、トリフルオロメチルジアジリジン、ピリジルジスルフィド、N-アシル-イミダゾール、イミダゾールカルバメート、ビニルスルホン、スクシンイミジルカルボネート、アリールアジド、無水物、ジアゾアセテート、ベンゾフェノン、イソチオシアネート、イソシアネート、イミドエステル、フルオロベンゼン、ビオチン、およびアビジン。それらの反応基を機械的、物理的、電気的、または化学的方法によって基質上に配する技術は当該分野で十分知られており、例えば米国特許第4,681,870号に記載されているが、これは参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

【0020】

高密度アレイとするために、支持体表面に反応基を高密度で“詰め込む (pack)” 必要があり得る。ガラス表面の場合の好ましい方法は、まず強酸のような試薬で表面を“ス

50

トリッピング (s t r i p) ” し、その後表面に反応基を適用または再適用するものである。

【 0 0 2 1 】

ガラス表面の場合、反応基はシラン、 $\text{Si}-\text{OH}$ 、酸化ケイ素、窒化ケイ素、第1級アミン、またはアルデヒド基でもよい。アルデヒド含有シラン試薬で処理したスライドは多くの結合要素を固定化するのに好ましく、TeleChem International (Cupertino, CA) から “Super Aldehyde Substrates” の商品名で販売されている。これらのスライド表面上のアルデヒド基はタンパク質上の第1級アミンと容易に反応してシッフ塩基結合を形成する。典型的なタンパク質はその表面上に多くのリジン残基を、そして一般により反応性の高い - アミンをそのN末端に表示するので、それらをスライドに種々の配位で結合させることができ、それによってタンパク質の種々の側を溶液中で他のタンパク質または小分子と相互作用させることができる。タンパク質のような結合要素をこれらのアルデヒドスライド上に配置した後、ウシ血清アルブミン (BSA) を含有するバッファーをスライドに適用し、分析物とスライド上の未反応アルデヒド基とのその後の非特異的結合を阻害してもよい。

10

【 0 0 2 2 】

II. リンカー

基質上の反応基の初期処理が終了すれば (必要により)、必要によってリンカー分子を基質の表面に添加して、更なる結合化学に好適となるようにしてもよい。

【 0 0 2 3 】

ここで使用するところの “リンカー” という用語は、既に基質上にある反応基と後に固定化する結合要素とを共有結合させる化学部分を意味し、これは基質上の反応基と結合要素間の連続的な連結を形成させる化学結合のバックボーンを有し、そのバックボーンに沿って多数の自由に回転する結合を有する。リンカーは好適な種類の化合物から選択してもよく、有機酸、アルデヒド、アルコール、チオール、アミンなどのポリマーまたはコポリマーを含んでもよい。例えば、ヒドロキシカルボン酸、アミノカルボン酸、またはジカルボン酸、例えばグリコール酸、乳酸、セバシン酸、またはサルコシンのポリマーまたはコポリマーを使用してもよい。あるいはまた、飽和または不飽和炭化水素、例えばエチレングリコール、プロピレングリコール、糖類などのポリマーまたはコポリマーを使用してもよい。好ましくはリンカーは、結合される結合要素がサンプル溶液中の分子と自由に相互作用して有効な結合を形成できるのに好適な長さである。

20

30

【 0 0 2 4 】

本発明のリンカーは少なくとも2つの反応基、すなわち基質に結合する第1の反応基および結合要素に結合する第2の反応基を含有する。2つの反応基は同じ化学部分であってもよい。リンカーの少なくとも2つの反応基は基質上の反応基の上に記載した化学部分のいずれかを含んでもよい。また、好ましい第2の基はマレイミド基を含有する。リンカーの第2の基の別の好ましい態様は、ビニルスルホン基である。これらの基の親水性は、バッファー水溶液中で更なるアッセイを行う際に、タンパク質のような分析物による非特異的結合を制限する助けとなると信じられる。

【 0 0 2 5 】

リンカーを基質表面に結合させる方法は既に基質上にある反応基および選択されるリンカーによって種々であり、当業者に適宜に考慮されるように、変化する。例えば、リンカーのトリクロロシリル基またはトリサルコキシ基と支持体表面上のヒドロキシル基との間の反応を介してシロキサン結合を形成してもよい。

40

【 0 0 2 6 】

リンカーは分枝または非分枝であってもよいが、リンカーのこの構造的特性、そして他の構造的特性は結合要素の関連機能 (例えばリガンド - 抗リガンド相互作用) に立体化学的に干渉すべきでない。

【 0 0 2 7 】

当業者に既知の保護基を使用してリンカーの末端基の望ましくない反応、または早期の反

50

応を防止してもよい。例えば米国特許第 5, 412, 087 号 (参照により本明細書に組み込まれる) はリンカーのチオール基上の光によって除去できる保護基の使用について記載している。

【 0 0 2 8 】

好ましい態様では、リンカーは B S A 分子を含む。それらの態様の一例はマイクロアレイの作製に好適な B S A - N H S スライドである。いくつかの適用には好適であるが、アルデヒド基で機能化し、更に B S A でブロッキングしたスライドは、ペプチドまたは小タンパク質をアレイ化する場合には好適でなく、おそらくこれは B S A が興味のある分子を不明瞭にするためである。それらの適用には B S A - N H S スライドが好ましい。図 1 A および 1 B にそれらのスライドの作製方法を示す。まず B S A の分子単層をガラススライドの表面に結合させる。図 1 A に具体的に示すように、ヒドロキシル基を有するガラススライド 10 をアミノプロピルトリエトキシシランでシラン化し (段階 1)、その後 N, N' - ジスクシンイミジルカーボネートで活性化する (段階 2)。次に、スライド上の活性化したアミノ基をリンカー 20 (B S A) と共有結合させる (段階 3)。次いで B S A の表面を N, N' - ジスクシンイミジルカーボネートで活性化し (段階 4)、これによって活性化したカルバメートおよびエステル、例えば N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) 基が得られる。図 1 B に関連して、B S A 上の活性化したリジン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸残基は結合要素 30 (ここでは捕捉タンパク質) 上の表面アミンと容易に反応し (段階 5)、尿素共有結合またはアミド共有結合を形成する。次いで、残存する B S A 上の反応基をグリシンでクエンチングする (段階 6)。結果として、結合要素 30 (こ 10
こ 20
こ 30
こ 40
こ 50
こ 60
こ 70
こ 80
こ 90
こ 100
こ 110
こ 120
こ 130
こ 140
こ 150
こ 160
こ 170
こ 180
こ 190
こ 200
こ 210
こ 220
こ 230
こ 240
こ 250
こ 260
こ 270
こ 280
こ 290
こ 300
こ 310
こ 320
こ 330
こ 340
こ 350
こ 360
こ 370
こ 380
こ 390
こ 400
こ 410
こ 420
こ 430
こ 440
こ 450
こ 460
こ 470
こ 480
こ 490
こ 500
こ 510
こ 520
こ 530
こ 540
こ 550
こ 560
こ 570
こ 580
こ 590
こ 600
こ 610
こ 620
こ 630
こ 640
こ 650
こ 660
こ 670
こ 680
こ 690
こ 700
こ 710
こ 720
こ 730
こ 740
こ 750
こ 760
こ 770
こ 780
こ 790
こ 800
こ 810
こ 820
こ 830
こ 840
こ 850
こ 860
こ 870
こ 880
こ 890
こ 900
こ 910
こ 920
こ 930
こ 940
こ 950
こ 960
こ 970
こ 980
こ 990
こ 1000
こ 1010
こ 1020
こ 1030
こ 1040
こ 1050
こ 1060
こ 1070
こ 1080
こ 1090
こ 1100
こ 1110
こ 1120
こ 1130
こ 1140
こ 1150
こ 1160
こ 1170
こ 1180
こ 1190
こ 1200
こ 1210
こ 1220
こ 1230
こ 1240
こ 1250
こ 1260
こ 1270
こ 1280
こ 1290
こ 1300
こ 1310
こ 1320
こ 1330
こ 1340
こ 1350
こ 1360
こ 1370
こ 1380
こ 1390
こ 1400
こ 1410
こ 1420
こ 1430
こ 1440
こ 1450
こ 1460
こ 1470
こ 1480
こ 1490
こ 1500
こ 1510
こ 1520
こ 1530
こ 1540
こ 1550
こ 1560
こ 1570
こ 1580
こ 1590
こ 1600
こ 1610
こ 1620
こ 1630
こ 1640
こ 1650
こ 1660
こ 1670
こ 1680
こ 1690
こ 1700
こ 1710
こ 1720
こ 1730
こ 1740
こ 1750
こ 1760
こ 1770
こ 1780
こ 1790
こ 1800
こ 1810
こ 1820
こ 1830
こ 1840
こ 1850
こ 1860
こ 1870
こ 1880
こ 1890
こ 1900
こ 1910
こ 1920
こ 1930
こ 1940
こ 1950
こ 1960
こ 1970
こ 1980
こ 1990
こ 2000
こ 2010
こ 2020
こ 2030
こ 2040
こ 2050
こ 2060
こ 2070
こ 2080
こ 2090
こ 2100
こ 2110
こ 2120
こ 2130
こ 2140
こ 2150
こ 2160
こ 2170
こ 2180
こ 2190
こ 2200
こ 2210
こ 2220
こ 2230
こ 2240
こ 2250
こ 2260
こ 2270
こ 2280
こ 2290
こ 2300
こ 2310
こ 2320
こ 2330
こ 2340
こ 2350
こ 2360
こ 2370
こ 2380
こ 2390
こ 2400
こ 2410
こ 2420
こ 2430
こ 2440
こ 2450
こ 2460
こ 2470
こ 2480
こ 2490
こ 2500
こ 2510
こ 2520
こ 2530
こ 2540
こ 2550
こ 2560
こ 2570
こ 2580
こ 2590
こ 2600
こ 2610
こ 2620
こ 2630
こ 2640
こ 2650
こ 2660
こ 2670
こ 2680
こ 2690
こ 2700
こ 2710
こ 2720
こ 2730
こ 2740
こ 2750
こ 2760
こ 2770
こ 2780
こ 2790
こ 2800
こ 2810
こ 2820
こ 2830
こ 2840
こ 2850
こ 2860
こ 2870
こ 2880
こ 2890
こ 2900
こ 2910
こ 2920
こ 2930
こ 2940
こ 2950
こ 2960
こ 2970
こ 2980
こ 2990
こ 3000
こ 3010
こ 3020
こ 3030
こ 3040
こ 3050
こ 3060
こ 3070
こ 3080
こ 3090
こ 3100
こ 3110
こ 3120
こ 3130
こ 3140
こ 3150
こ 3160
こ 3170
こ 3180
こ 3190
こ 3200
こ 3210
こ 3220
こ 3230
こ 3240
こ 3250
こ 3260
こ 3270
こ 3280
こ 3290
こ 3300
こ 3310
こ 3320
こ 3330
こ 3340
こ 3350
こ 3360
こ 3370
こ 3380
こ 3390
こ 3400
こ 3410
こ 3420
こ 3430
こ 3440
こ 3450
こ 3460
こ 3470
こ 3480
こ 3490
こ 3500
こ 3510
こ 3520
こ 3530
こ 3540
こ 3550
こ 3560
こ 3570
こ 3580
こ 3590
こ 3600
こ 3610
こ 3620
こ 3630
こ 3640
こ 3650
こ 3660
こ 3670
こ 3680
こ 3690
こ 3700
こ 3710
こ 3720
こ 3730
こ 3740
こ 3750
こ 3760
こ 3770
こ 3780
こ 3790
こ 3800
こ 3810
こ 3820
こ 3830
こ 3840
こ 3850
こ 3860
こ 3870
こ 3880
こ 3890
こ 3900
こ 3910
こ 3920
こ 3930
こ 3940
こ 3950
こ 3960
こ 3970
こ 3980
こ 3990
こ 4000
こ 4010
こ 4020
こ 4030
こ 4040
こ 4050
こ 4060
こ 4070
こ 4080
こ 4090
こ 4100
こ 4110
こ 4120
こ 4130
こ 4140
こ 4150
こ 4160
こ 4170
こ 4180
こ 4190
こ 4200
こ 4210
こ 4220
こ 4230
こ 4240
こ 4250
こ 4260
こ 4270
こ 4280
こ 4290
こ 4300
こ 4310
こ 4320
こ 4330
こ 4340
こ 4350
こ 4360
こ 4370
こ 4380
こ 4390
こ 4400
こ 4410
こ 4420
こ 4430
こ 4440
こ 4450
こ 4460
こ 4470
こ 4480
こ 4490
こ 4500
こ 4510
こ 4520
こ 4530
こ 4540
こ 4550
こ 4560
こ 4570
こ 4580
こ 4590
こ 4600
こ 4610
こ 4620
こ 4630
こ 4640
こ 4650
こ 4660
こ 4670
こ 4680
こ 4690
こ 4700
こ 4710
こ 4720
こ 4730
こ 4740
こ 4750
こ 4760
こ 4770
こ 4780
こ 4790
こ 4800
こ 4810
こ 4820
こ 4830
こ 4840
こ 4850
こ 4860
こ 4870
こ 4880
こ 4890
こ 4900
こ 4910
こ 4920
こ 4930
こ 4940
こ 4950
こ 4960
こ 4970
こ 4980
こ 4990
こ 5000
こ 5010
こ 5020
こ 5030
こ 5040
こ 5050
こ 5060
こ 5070
こ 5080
こ 5090
こ 5100
こ 5110
こ 5120
こ 5130
こ 5140
こ 5150
こ 5160
こ 5170
こ 5180
こ 5190
こ 5200
こ 5210
こ 5220
こ 5230
こ 5240
こ 5250
こ 5260
こ 5270
こ 5280
こ 5290
こ 5300
こ 5310
こ 5320
こ 5330
こ 5340
こ 5350
こ 5360
こ 5370
こ 5380
こ 5390
こ 5400
こ 5410
こ 5420
こ 5430
こ 5440
こ 5450
こ 5460
こ 5470
こ 5480
こ 5490
こ 5500
こ 5510
こ 5520
こ 5530
こ 5540
こ 5550
こ 5560
こ 5570
こ 5580
こ 5590
こ 5600
こ 5610
こ 5620
こ 5630
こ 5640
こ 5650
こ 5660
こ 5670
こ 5680
こ 5690
こ 5700
こ 5710
こ 5720
こ 5730
こ 5740
こ 5750
こ 5760
こ 5770
こ 5780
こ 5790
こ 5800
こ 5810
こ 5820
こ 5830
こ 5840
こ 5850
こ 5860
こ 5870
こ 5880
こ 5890
こ 5900
こ 5910
こ 5920
こ 5930
こ 5940
こ 5950
こ 5960
こ 5970
こ 5980
こ 5990
こ 6000
こ 6010
こ 6020
こ 6030
こ 6040
こ 6050
こ 6060
こ 6070
こ 6080
こ 6090
こ 6100
こ 6110
こ 6120
こ 6130
こ 6140
こ 6150
こ 6160
こ 6170
こ 6180
こ 6190
こ 6200
こ 6210
こ 6220
こ 6230
こ 6240
こ 6250
こ 6260
こ 6270
こ 6280
こ 6290
こ 6300
こ 6310
こ 6320
こ 6330
こ 6340
こ 6350
こ 6360
こ 6370
こ 6380
こ 6390
こ 6400
こ 6410
こ 6420
こ 6430
こ 6440
こ 6450
こ 6460
こ 6470
こ 6480
こ 6490
こ 6500
こ 6510
こ 6520
こ 6530
こ 6540
こ 6550
こ 6560
こ 6570
こ 6580
こ 6590
こ 6600
こ 6610
こ 6620
こ 6630
こ 6640
こ 6650
こ 6660
こ 6670
こ 6680
こ 6690
こ 6700
こ 6710
こ 6720
こ 6730
こ 6740
こ 6750
こ 6760
こ 6770
こ 6780
こ 6790
こ 6800
こ 6810
こ 6820
こ 6830
こ 6840
こ 6850
こ 6860
こ 6870
こ 6880
こ 6890
こ 6900
こ 6910
こ 6920
こ 6930
こ 6940
こ 6950
こ 6960
こ 6970
こ 6980
こ 6990
こ 7000
こ 7010
こ 7020
こ 7030
こ 7040
こ 7050
こ 7060
こ 7070
こ 7080
こ 7090
こ 7100
こ 7110
こ 7120
こ 7130
こ 7140
こ 7150
こ 7160
こ 7170
こ 7180
こ 7190
こ 7200
こ 7210
こ 7220
こ 7230
こ 7240
こ 7250
こ 7260
こ 7270
こ 7280
こ 7290
こ 7300
こ 7310
こ 7320
こ 7330
こ 7340
こ 7350
こ 7360
こ 7370
こ 7380
こ 7390
こ 7400
こ 7410
こ 7420
こ 7430
こ 7440
こ 7450
こ 7460
こ 7470
こ 7480
こ 7490
こ 7500
こ 7510
こ 7520
こ 7530
こ 7540
こ 7550
こ 7560
こ 7570
こ 7580
こ 7590
こ 7600
こ 7610
こ 7620
こ 7630
こ 7640
こ 7650
こ 7660
こ 7670
こ 7680
こ 7690
こ 7700
こ 7710
こ 7720
こ 7730
こ 7740
こ 7750
こ 7760
こ 7770
こ 7780
こ 7790
こ 7800
こ 7810
こ 7820
こ 7830
こ 7840
こ 7850
こ 7860
こ 7870
こ 7880
こ 7890
こ 7900
こ 7910
こ 7920
こ 7930
こ 7940
こ 7950
こ 7960
こ 7970
こ 7980
こ 7990
こ 8000
こ 8010
こ 8020
こ 8030
こ 8040
こ 8050
こ 8060
こ 8070
こ 8080
こ 8090
こ 8100
こ 8110
こ 8120
こ 8130
こ 8140
こ 8150
こ 8160
こ 8170
こ 8180
こ 8190
こ 8200
こ 8210
こ 8220
こ 8230
こ 8240
こ 8250
こ 8260
こ 8270
こ 8280
こ 8290
こ 8300
こ 8310
こ 8320
こ 8330
こ 8340
こ 8350
こ 8360
こ 8370
こ 8380
こ 8390
こ 8400
こ 8410
こ 8420
こ 8430
こ 8440
こ 8450
こ 8460
こ 8470
こ 8480
こ 8490
こ 8500
こ 8510
こ 8520
こ 8530
こ 8540
こ 8550
こ 8560
こ 8570
こ 8580
こ 8590
こ 8600
こ 8610
こ 8620
こ 8630
こ 8640
こ 8650
こ 8660
こ 8670
こ 8680
こ 8690
こ 8700
こ 8710
こ 8720
こ 8730
こ 8740
こ 8750
こ 8760
こ 8770
こ 8780
こ 8790
こ 8800
こ 8810
こ 8820
こ 8830
こ 8840
こ 8850
こ 8860
こ 8870
こ 8880
こ 8890
こ 8900
こ 8910
こ 8920
こ 8930
こ 8940
こ 8950
こ 8960
こ 8970
こ 8980
こ 8990
こ 9000
こ 9010
こ 9020
こ 9030
こ 9040
こ 9050
こ 9060
こ 9070
こ 9080
こ 9090
こ 9100
こ 9110
こ 9120
こ 9130
こ 9140
こ 9150
こ 9160
こ 9170
こ 9180
こ 9190
こ 9200
こ 9210
こ 9220
こ 9230
こ 9240
こ 9250
こ 9260
こ 9270
こ 9280
こ 9290
こ 9300
こ 9310
こ 9320
こ 9330
こ 9340
こ 9350
こ 9360
こ 9370
こ 9380
こ 9390
こ 9400
こ 9410
こ 9420
こ 9430
こ 9440
こ 9450
こ 9460
こ 9470
こ 9480
こ 9490
こ 9500
こ 9510
こ 9520
こ 9530
こ 9540
こ 9550
こ 9560
こ 9570
こ 9580
こ 9590
こ 9600
こ 9610
こ 9620
こ 9630
こ 9640
こ 9650
こ 9660
こ 9670
こ 9680
こ 9690
こ 9700
こ 9710
こ 9720
こ 9730
こ 9740
こ 9750
こ 9760
こ 9770
こ 9780
こ 9790
こ 9800
こ 9810
こ 9820
こ 9830
こ 9840
こ 9850
こ 9860
こ 9870
こ 9880
こ 9890
こ 9900
こ 9910
こ 9920
こ 9930
こ 9940
こ 9950
こ 9960
こ 9970
こ 9980
こ 9990
こ 10000
こ 10010
こ 10020
こ 10030
こ 10040
こ 10050
こ 10060
こ 10070
こ 10080
こ 10090
こ 10100
こ 10110
こ 10120
こ 10130
こ 10140
こ 10150
こ 10160
こ 10170
こ 10180
こ 10190
こ 10200
こ 10210
こ 10220
こ 10230
こ 10240
こ 10250
こ 10260
こ 10270
こ 10280
こ 10290
こ 10300
こ 10310
こ 10320
こ 10330
こ 10340
こ 10350
こ 10360
こ 10370
こ 10380
こ 10390
こ 10400
こ 10410
こ 10420
こ 10430
こ 10440
こ 10450
こ 10460
こ 10470
こ 10480
こ 10490
こ 10500
こ 10510
こ 10520
こ 10530
こ 10540
こ 10550
こ 10560
こ 10570
こ 10580
こ 10590
こ 10600
こ 10610
こ 10620
こ 10630
こ 10640
こ 10650
こ 10660
こ 10670
こ 10680
こ 10690
こ 10700
こ 10710
こ 10720
こ 10730
こ 10740
こ 10750
こ 10760
こ 10770
こ 10780
こ 10790
こ 10800
こ 10810
こ 10820
こ 10830
こ 10840
こ 10850
こ 10860
こ 10870
こ 10880
こ 10890
こ 10900
こ 10910
こ 10920
こ 10930
こ 10940
こ 10950
こ 10960
こ 10970
こ 10980
こ 10990
こ 11000
こ 11010
こ 11020
こ 11030
こ 11040
こ 11050
こ 11060
こ 11070
こ 11080
こ 11090
こ 11100
こ 11110
こ 11120
こ 11130
こ 11140
こ 11150
こ 11160
こ 11170
こ 11180
こ 11190
こ 11200
こ 11210
こ 11220
こ 11230
こ 11240
こ 11250
こ 11260
こ 11270
こ 11280
こ 11290
こ 11300
こ 11310
こ 11320
こ 11330
こ 11340
こ 11350
こ 11360
こ 11370
こ 11380
こ 11390
こ 11400
こ 11410
こ 11420
こ 11430
こ 11440
こ 11450
こ 11460
こ 11470
こ 11480
こ 11490
こ 11500
こ 11510
こ 11520
こ 11530
こ 11540
こ 11550
こ 11560
こ 11570
こ 11580
こ 11590
こ 11600
こ 11610
こ 11620
こ 11630
こ 11640
こ 11650
こ 11660
こ 11670
こ 11680
こ 11690
こ 11700
こ 11710
こ 11720
こ 11730
こ 11740
こ 11750
こ 11760
こ 11770
こ 11780
こ 11790
こ 11800
こ 11810
こ 11820
こ 11830
こ 11840
こ 11850
こ 11860
こ 11870
こ 11880
こ 11890
こ 11900
こ 11910
こ 11920
こ 11930
こ 11940
こ 11950
こ 11960
こ 11970
こ 11980
こ 11990
こ 12000
こ 12010
こ 12020
こ 12030
こ 12040
こ 12050
こ 12060
こ 12070
こ 12080
こ 12090
こ 12100
こ 12110
こ 12120
こ 12130
こ 12140
こ 12150
こ 12160
こ 12170
こ 12180
こ 12190
こ 12200
こ 12210
こ 12220
こ 12230
こ 12240
こ 12250
こ 12260
こ 12270
こ 12280
こ 12290
こ 12300
こ 12310
こ 12320
こ 12330
こ 12340
こ 12350
こ 12360
こ 12370
こ 12380
こ 12390
こ 12400
こ 12410
こ 12420
こ 12430
こ 12440
こ 12450
こ 12460
こ 12470
こ 12480
こ 12490
こ 12500
こ 12510
こ 12520
こ 12530
こ 12540
こ 12550
こ 12560
こ 12570
こ 12580
こ 12590
こ 12600
こ 12610
こ 12620
こ 12630
こ 12640
こ 12650
こ 12660
こ 12670
こ 12680
こ 12690
こ 12700
こ 12710
こ 12720
こ 12730
こ 12740
こ 12750
こ 12760
こ 12770
こ 12780
こ 12790
こ 12800
こ 12810
こ 12820
こ 12830
こ 12840
こ 12850
こ 12860
こ 12870
こ 12880
こ 12890
こ 12900
こ 12910
こ 12920
こ 12930
こ 12940
こ 12950
こ 12960
こ 12970
こ 12980
こ 12990
こ 13000
こ 13010
こ 13020
こ 13030
こ 13040
こ 13050
こ 13060
こ 13070
こ 13080
こ 13090
こ 13100
こ 13110
こ 13120
こ 13130
こ 13140
こ 13150
こ 13160
こ 13170
こ 13180
こ 13190
こ 13200
こ 13210
こ 13220
こ 13230
こ 13240
こ 13250
こ 13260
こ 13270
こ 13280
こ 13290
こ 13300
こ 13310
こ 13320
こ 13330
こ 13340
こ 13350
こ 13360
こ 13370
こ 13380
こ 13390
こ 13400
こ 13410
こ 13420
こ 13430
こ 13440
こ 13450
こ 13460
こ 13470
こ 13480
こ 13490
こ 13500
こ 13510
こ 13520
こ 13530
こ 13540
こ 13550
こ 13560
こ 13570
こ 13580
こ 13590
こ 13600
こ 13610
こ 13620
こ 13630
こ 13640
こ 13650
こ 13660
こ 13670
こ 13680
こ 13690
こ 13700
こ 13710
こ 13720
こ 13730
こ 13740
こ 13750
こ 13760
こ 13770
こ 13780
こ 13790
こ 13800
こ 13810
こ 13820
こ 13830
こ 13840
こ 13850
こ 13860
こ 13870
こ 13880
こ 13890
こ 13900
こ 13910
こ 13920
こ 13930
こ 13940
こ 13950
こ 13960
こ 13970
こ 13980
こ 13990
こ 14000
こ 14010
こ 14020
こ 14030
こ 14040
こ 14050
こ 14060
こ 14070
こ 14080
こ 14090
こ 14100
こ 14110
こ 14120
こ 14130
こ 14140
こ 14150
こ 14160
こ 14170
こ 14180
こ 14190
こ 14200
こ 14210
こ 14220

ライブラリーから直接選択することができ、これはファージ粒子を細胞から回収し、増幅することによって行う。参照：B e c e r r i l ら (1 9 9 9) , B i o c h e m B i o p h y s R e s C o m m u n . 2 5 5 (2) : 3 8 6 - 9 3 (参照により本明細書に組み込まれる)。

【 0 0 3 3 】

B . 受容体

天然に存在する生物学的受容体、またはそれらの受容体を合成もしくは組換えによって修飾した変異体を本発明の結合要素として使用してもよい。結合要素として使用できる受容体の種類には細胞外マトリクス受容体、細胞表面受容体、および細胞内受容体がある。受容体の具体的な例にはフィブロネクチン受容体、フィブリノーゲン受容体、マンノース 6 - リン酸受容体、e r b - B 2 受容体、および E G F (上皮成長因子) 受容体がある。

10

【 0 0 3 4 】

C . 受容体リガンド

同様に、天然に存在する生物学的受容体リガンド、またはそれらのリガンドを合成もしくは組換えによって修飾した変異体を結合要素として使用し、それらの特異的結合パートナーまたは他の非天然型結合パートナーをスクリーニングしてもよい。それらのリガンドの種類にはホルモン、成長因子、神経伝達物質、抗原があり、またファージディスプレイすることができる。

【 0 0 3 5 】

D . 基質 / リンカーへの結合のための修飾

当業者に明白なように、結合要素を修飾して共有結合または非共有結合を介する基質表面上の反応基または基質に結合したリンカーの第 2 の反応基への結合を容易にしてもよい。それらの修飾の例として、求核性 S - 、N - 、および O - 含有基を付加してリンカーへのマイケル付加反応を介する固体支持体への結合要素の結合を容易にしてもよい。

20

【 0 0 3 6 】

結合要素の結合親和性を保持するために、結合要素を修飾して、結合要素の同族リガンドとの相互作用に關与する領域から分離した領域で支持体基質に結合するようにするのが好ましい。結合要素が第 1 の末端でそのリガンドに結合する場合、結合要素を第 2 の、もしくは反対の末端、または末端間のいずれかの位置で支持体へ結合させることがそのような解決策となりうる。結合要素が s c F v である好ましい態様では、本発明は s c F v を求電子性リンカー (例えばマレイミド基) との結合を介して、s c F v の抗原結合活性に干渉することなく、ガラススライド表面に結合できるような修飾方法を提供する。実施例 C (i) に詳述するこの方法によれば、まず s c F v を操作してそのカルボキシ末端がシステイン残基を含有するようにし、これはその後マレイミド基のような求電子性リンカーと共有結合を形成することができる。同様に、結合要素の N - 末端を操作して支持体表面への結合のための反応基を含有させることができる。

30

【 0 0 3 7 】

E . 基質 / リンカーへの結合

結合要素を基質表面上またはリンカー上の反応性末端基に結合させる方法にはチオエーテル結合、ジスルフィド結合、アミド結合、カルバメート結合、尿素結合、エステル結合、カーボネート結合、エーテル結合、ヒドラゾン結合、シッフ塩基結合のような結合、および (例えばイオン性または疎水性相互作用を介する) 非共有結合を形成する反応が含まれる。反応の形態は当然、基質 / リンカーおよび結合要素の両方にある可能な反応基に依存する。

40

【 0 0 3 8 】

以下の実施例の項に記載するように、マイケル付加を利用してガラススライドに化合物を結合させてもよく、平らなガラススライドを誘導体化して、マレイミド基で高密度に機能化した表面を得てもよい。次いでチオール基を含有する化合物 (例えばカルボキシ末端にシステインを含有するように修飾した s c F v) をマレイミドと反応させてチオエーテル結合を形成してもよい。

50

【 0 0 3 9 】

I V . マイクロアレイの形成

ある観点では本発明は、基質上に直接、またはリンカーを介して固定化した結合要素のアレイ（高密度マイクロアレイを含む）の作製法を提供する。本発明の方法によれば、非常に高密度の（ cm^2 当たり 100 スポットを超える、好ましくは 1,000 スポットを超える、そして更に好ましくは 2,000 スポットを超える密度の）マイクロアレイを、高密度の反応基を生成するように機能化した、または反応基を有する高密度のリンカーの付加によって機能化した支持体表面上に生体分子を結合させることによって生成することができる。

【 0 0 4 0 】

A . スポットティング

本発明のマイクロアレイは多くの方法によって製造してもよく、それらには少量の反応物を基質表面上の特定の位置に施与する“スポットティング”がある。スポットティングの方法には、限定される訳ではないが、以下がある：マイクロフルイディクス・プリンティング、マイクロスタンピング（例えば米国特許第 5,515,131 号および米国特許第 5,731,152 号参照）、マイクロコンタクト・プリンティング（例えば WO 96/29629 号参照）、およびインクジェット・ヘッド・プリンティング。一般に、分配装置はサンプル沈着量を制御するためのキャリブレーション手段を含み、支持体表面に関してサンプルを移動および配置させるための構造を含んでもよい。

【 0 0 4 1 】

(i) 容量 / スポットサイズ

結合要素毎のアレイに分配される液体の容量は意図されるアレイの使用法および利用できる装置によって変化する。好ましくは 1 回の分配での容量は 100 nL 未満、より好ましくは 10 nL 未満、そしてもっとも好ましくは約 1 nL である。得られるスポットのサイズも同様に変化し、好ましい態様では、これらのスポットは直径 20,000 μm 未満、より好ましくは直径 2,000 μm 未満、そして最も好ましくは直径約 150 - 200 μm である（平方センチメートル当たり約 1600 スポットとなる）。

【 0 0 4 2 】

(i i) 粘性の添加物

1 個の結合要素のスポットに相当するアレイのスポットサイズを、溶液の粘性を高めるグリセロールまたはトレハロースのような媒質の添加によって低減し、それによって溶液の拡散を防止してもよい。親水性基質表面上の疎水性境界は、アレイを含むスポットのサイズを制限する役割を果たせる。

【 0 0 4 3 】

結合要素の溶液に湿潤剤を添加することによって、基質表面上に生成した後のマイクロアレイの脱水を効果的に予防してもよい。酸化、またはタンパク質の場合は変性と同様に、脱水によって結合要素に化学的または立体化学的变化が起こりうるので、湿潤剤の添加によってマイクロアレイを保存および安定化し、s c F v のような結合要素の機能性を保持することができる。例えば好ましい態様では、s c F v を 40 % グリセロールを含有するリン酸バッファー（PBS）溶液中でマレイミド誘導体化したガラスに結合させる。グリセロールによって持続的に水分が補給され、変性が防止される。

【 0 0 4 4 】

(i i i) ブロッキング剤

ブロッキング剤の溶液をマイクロアレイに適用して、結合要素に結合していない反応基による非特異結合を防止してもよい。例えばウシ血清アルブミン（BSA）、カゼイン、または脱脂乳の溶液をブロッキング剤として使用し、その後のアッセイにおけるバックグラウンド結合を低減してもよい。

【 0 0 4 5 】

(i v) ロボット工学

好ましい態様では、高精度コンタクト・プリンティングロボットを使用して少量の溶解し

10

20

30

40

50

た結合要素をマイクロタイタープレートのウェルから採取し、約 1 nL の溶液を基質（例えば化学的に誘導体化したガラス顕微鏡スライド）の表面上の規定の位置に反復して運搬する。それらのロボットの例には GMS 417 アレイヤー（Affymetrix（Santa Clara, CA）から販売されている）およびスプリット・ピン・アレイヤー（split pin arrayer）（<http://cmgm.stanford.edu/pbrown> からダウンロードできる説明書に従って行う）がある。化学的に誘導体化したガラス顕微鏡スライドはカスタムメイドのスライドサイズの反応容器を使用して調製するのが好ましく、これによってスライドの片面に均一に溶液を適用することができ、これについては実施例の項に示し、検討する。これによってスライド上に化合物の超小型のスポットが形成される。しかしながら、当業者に評価されるように本発明は 10
1 nL 容量の溶液の運搬、特定のロボット装置の使用、または化学的に誘導体化したガラススライドの使用に限定されるものではなく、また、ピコリットルまたはそれ以下の容量を運搬できるような別の運搬手段を使用することもできる。従って、高精度アレイロボットに加え、化合物を運搬するための他の手段を使用することができ、それには、限定される訳ではないが、インクジェットプリンター、圧電プリンター、および小容量のピペティング・ロボットがある。

【0046】

B. in situ 光化学

基質表面上の分子のアレイまたはマイクロアレイの形成において、in situ 光化学を光活性化反応基と組み合わせて使用してもよく、この基は基質表面上、リンカー上、または結合要素上に存在してもよい。それらの光活性化基は当該分野で周知である。 20

【0047】

C. 標識

結合要素を蛍光、放射性、染色、および他の物理的または化学的な標識またはエピトープでタグ化してもよい。ある好ましい態様では標識の定量が可能であり、これはその後のアッセイに大きな利点となる。

【0048】

好ましい態様では、ポリエチレングリコールのような親水性ポリマー部分を含有する蛍光色素を使用する。

V. アッセイサンプル

固体支持体上での結合要素のマイクロアレイの形成の際、大量のサンプルを結合アッセイのために支持体表面に適用してもよい。それらのサンプルの例を以下に示す： 30

A. 体液 / 組織および生検サンプル

本発明のマイクロアレイを使用してアッセイするサンプルは種々の生理学的、環境、または人工の供給源から得てもよい。特に、生理学的サンプル、例えば患者または生体の体液をアッセイサンプルとして使用してもよい。それらの体液には、限定される訳ではないが、以下がある：唾液、粘液、汗、全血、血清、尿、生殖液（genital fluids）、糞便、骨髓、血漿、脊髄液、心膜液、胃液、腹腔液（abdominal fluids）、腹水、胸膜液、および他の身体部分からの抽出液、そして他の腺からの分泌液。あるいはまた、培養液中で増殖させた細胞から得た生物学的サンプルを利用してもよい 40
。それらのサンプルには細胞物質の溶解および分画によって得られた上清、全細胞溶解物、または細胞画分がある。

【0049】

B. 細胞抽出物

細胞抽出物およびその画分（生物学的存在から直接得たものおよび人工的環境で増殖させたものを含む）を使用して特定の結合要素に結合する細胞溶解物中の分子をスクリーニングすることもできる。

【0050】

C. 正常サンプルと疾病サンプル

上記のサンプルのいずれかを正常な、または疾病を有する生物学的存在からの細胞集団か 50

ら誘導してもよい。

【0051】

D. 処理サンプルと未処理サンプル

上記のサンプルのいずれかを、有害または有益のいずれかであると信じられる、または疑われる化合物または他の処理により処理をした、または処理していない細胞集団から誘導してもよく、処理および非処理集団間の差異を使用して処理の効果を評価してもよい。

【0052】

E. 標識

所定のサンプル中の特定の分子を修飾して後の検出を可能にしてもよく、これは当業者に知られる技術、例えば蛍光、放射性、染色、および他の物理的または化学的標識の使用によって行う。好ましい態様では、親水性ポリマー部分（例えばポリエチレングリコール（例えばフルオレシン-PEG2000-NHS））を含有する蛍光色素を使用する。標識はサンプル中の分析物を直接標識するか、または分析物を認識する親和性タグを標識するか（間接標識）によって行うことができる。異なる蛍光色素でサンプル分析物を直接標識することにより、同一スポットから複数のアッセイを行うことが可能となる（例えば標的タンパク質の発現レベルおよびリン酸化レベルの測定）。分析物がファージディスプレイ・リガンドである場合、リガンドと結合要素のマイクロアレイとの間の結合を検出するためにファージをあらかじめ標識してもよい。

【0053】

直接標識法では、長い間、サンプルの過剰標識が深刻な問題であると認識されてきた。タンパク質の過剰標識はタンパク質複合体の凝集を引き起こす可能性があり、これによって非特異的染色が起きる傾向がある；また、抗体のエピトープ認識機能の崩壊によって抗体の抗原に対する特異性が低下し、これによってシグナルの喪失が起こりうる。当該分野で周知のように、過剰標識を低減するために、標識過程の反応時間を短縮するか、または基質：標識比を増加させる必要がある。過剰標識の解決策は、まず全タンパク質を消化してペプチドとし、その後ペプチドの末端を標識し、これによって内部エピトープの標識を回避することである。このように、過剰標識を心配することなく標識過程を完了させ、従って研究者は標識過程にわたってより完全に制御しうる。更に、ペプチド上の可能性のある標識部位が既知である場合は、内部エピトープを認識する親和性試薬を介してペプチドを捕捉した後、標識されたペプチドを定量することが可能である。この方法を適用して、細胞抽出物中の全タンパク質から消化した標識されたペプチドを定量し、タンパク質発現レベルの定量分析を行う。

【0054】

好ましい態様では、全タンパク質をトリプシンで消化し、その後スクシンイミジルエステル色素（例えばCy3、Cy5、またはAlexa色素）によって標識を行う。スクシンイミジルエステル色素は第1級アミン（例えばリジン中のもの）を標識する。トリプシンはリジンの後で開裂し、C-末端にリジンを有するペプチドを生成する。従って、トリプシン消化から得られるペプチドは2つの種類に分けられる：リジンを含有せずN-末端に第1級アミンを有するもの、およびC-末端にリジンを有し、従って両末端に第1級アミンを有するもの。いずれのペプチドも内部リジンを有しない。結果として、スクシンイミジルエステル色素は内部エピトープを標識することなく、トリプシンペプチドをその末端でのみ標識する。

【0055】

別の態様では、トリプシン以外のプロテアーゼを使用して全タンパク質を消化してもよく、この場合も捕捉するペプチドが内部リジンを含有しない限りスクシンイミジルエステル色素を標識に使用する。そのように、ここでも選択されたペプチドの末端のみが標識される。それらのペプチドを優先的パニングペプチド（preferential panning peptide）として使用してもよい。優先的パニングペプチドを利用するために、まずペプチドに対して免疫グロブリンを産生させる。次に（例えば全細胞溶解物からの）サンプルを特定のパニングペプチドを生成するような単一のプロテアーゼまたは複

10

20

30

40

50

数のプロテアーゼの組み合わせで消化し、ペプチドのライブラリーを得る。次いでこれらのペプチドをスクシンイミジルエステル色素で完全に標識する。大過剰量の反応性標識試薬を使用して非リジン含有ペプチドの完全な標識を確実にしてもよい。次いで、標識されたペプチドを免疫グロブリンに適用して捕捉する。

【0056】

優先的パニングペプチド上の標識の量は既知であるため、アフィニティー捕捉後に検出される標識シグナルの量によって所定のサンプル中のそれらのペプチドの量を定量することができる。ある標的タンパク質のプロテアーゼ消化から得られるそれらのパニングペプチドの数がかれば、その数を容易にサンプル中の標的タンパク質の量に換算することができる。リジン以外のアミノ酸をこの方法で使用するための標的とすることもできる。例えば、限定された数の天然または付加したシステインを含有するタンパク質を選択または構築して、還元されたチオールを介して、マレイミドが結合した色素（例えばマレイミド結合した Alexa488 (Molecular Probes, Eugene, Oregon から市販されている)）で標識してもよい。

【0057】

抗原分析物の間接標識を、後の検出のために（例えば放射性原子、蛍光分子で）標識した2次抗体または抗体フラグメントを使用してサンドイッチ方式で行ってもよい。好ましい態様では、抗原に対する蛍光標識した2次抗体によって抗体のマイクロアレイに結合する抗原を検出し、抗原を標識することは不要である。更なる好ましい態様では、2次抗体は抗体フラグメントをディスプレイする標識したファージ粒子である。M13のようなファージを使用する標準的なファージディスプレイ技術を使用して scFv のような抗体フラグメントを含むファージ抗体をしてもよい。これによって、ファージディスプレイ抗体ライブラリーからのサンドイッチ検出のための試薬の、相対的に簡易および迅速な製造が可能となる。ファージ抗体が、固定化した捕捉抗体が抗原上で認識するものとは異なるエピトープを認識することを確実にするために、ファージディスプレイライブラリーからの選択を以下のような方法で実施してもよい：（1）捕捉の目的でマイクロアレイに固定化したのと同じの抗体で試験管をコーティングする、（2）試験管をブロッキングし、抗原を添加し、コーティングした抗体で捕捉する、（3）洗浄後、ファージ抗体ライブラリーを試験管内でパニングする。単離したファージ抗体（またはポリクローナルファージ抗体）は捕捉抗体が認識するエピトープとは別のエピトープとのみ結合し、従ってサンドイッチ検出方式に理想的である。

【0058】

F. 接触時間

上記の方法に従って調製した表面にサンプルを暴露して結合アッセイを行うことができる。まずそれらの表面をサンプル溶液に暴露し、次いでそれぞれの具体的なアッセイに好適な時間インキュベートするが、これは予想される結合反応に必要とされる時間に大きく依存する。この過程を反復して、同時にまたは連続的に複数のサンプルを適用することができる。一般に複数サンプルの連続的な適用には間に洗浄を行う必要がある。

【0059】

VI. 結合アッセイ

上記の方法に従って調製した表面を使用して、表面に結合した結合要素に高い親和性を有するサンプル中の分子をスクリーニングすることができる。特異的結合は、サンプル中の標的分子を標識する方法によって（もしあるなら）、多くの異なる方法で検出および測定してもよい。一般的な例はオートラジオグラフィーの技術を使用して、放射性同位元素であらかじめ標識した分子の結合を検出するものである。

【0060】

好ましい態様では、蛍光色素（Cy5）を使用して所定のサンプル中のタンパク質を標識した後、サンプルを機能性 scFv のマイクロアレイをプリントしたスライド表面に適用した。インキュベーションおよび洗浄後、スライド表面を乾燥し、分子動力学 STORM または ArrayWorxTM 光学測定器（Applied Precision, Se

10

20

30

40

50

attle, WA) でイメージ化した。

【0061】

別の好ましい態様では、CY3のような蛍光色素で標識した2次抗体を、結合にあずかる第1の抗体を後に検出するために使用した。

当該分野で知られる種々の検出方法(いくつかをあげると、例えば質量分析、表面プラズモン共鳴(surface plasmon resonance)、および光学分光法)を本発明に使用して、結合標的が全く標識されなくても結合を検出することができる。

【0062】

VII. アッセイ結果の分析

A. サンプル中の存在 / 不在の検出

本発明を使用して生物学的サンプルにおける、興味分子への結合パートナーの存在または不在を確認することができる。

【0063】

B. サンプル間の比の測定

異なる細胞集団における(例えば正常および疾病状態間での)遺伝子およびタンパク質発現の比を比較によって計算できる。

【0064】

VIII. 適用 / 実用

本発明によって研究できる生物学的に重要な分子には、限定される訳ではないが、シグナル伝達、アポトーシス、二量体化、遺伝子調節、細胞周期および細胞周期チェックポイント、そしてDNA損傷チェックポイントに関与するものがあるので、本発明は生物学および医学の研究に広く適用できる。

【0065】

通常の技術を有する当業者にも評価されるように、タンパク質アレイは、タンパク質と生体高分子以外の別な種類の分子との間の相互作用を検出するのに有用であり得る。例えば本発明のアレイは、いくつかあげると触媒、物質研究、情報保存、分離科学の分野でも有用であり得る。

【0066】

A. 標的の発見

通常の技術を有する当業者に評価されるように、非常に高い空間密度を有するタンパク質のアレイの生成によって、所定のタンパク質集団および生体高分子間に起こる結合および / または活性化事象の検出が容易になる。従って本発明は、ある観点では、分子パートナーを同定し、生物学的に重要な高分子の結合標的を発見する方法を提供する。パートナーは、興味のある特定の高分子に結合して興味のある生体高分子を活性化または阻害する能力のあるタンパク質であってもよい。一般に、この方法は以下を含む: (1) 上記のような1つ以上のタンパク質のアレイを提供し、ここでタンパク質のアレイは cm^2 当たり少なくとも1,000スポットの密度を有し; (2) アレイを1つ以上の型の興味のある生体高分子と接触させ; そして(3) 特定のタンパク質および高分子パートナー間の相互作用を測定する。

【0067】

特に好ましい態様では、本発明のアレイを使用して遺伝生化学の研究のための化合物を同定する。伝統的な遺伝学では、DNA配列における不活性化(例えば欠失または“ノックアウト”)または活性化(例えば腫瘍発生性)変異のいずれかを使用して、これらの遺伝子によりコードされるタンパク質の機能を研究する。遺伝生化学はそのかわりに小分子の使用を含むが、この小分子はそれらが結合するタンパク質の機能を変更し、それによってタンパク質の機能を不活性化または活性化するものである。当然、これはもっとも最近認可された小分子薬剤の作用の基礎である。本発明は、“チップ様”技術を開発して小分子および興味のある特定のタンパク質の間の相互作用の迅速な検出を確実にすることを含む。本発明の方法および組成物を使用して、遺伝生化学の研究に使用するための小分子リガンドを同定することができる。通常の技術を有する当業者に認識されるように、本発明の

10

20

30

40

50

組成物および方法を、高密度のタンパク質フォーマットを必要とする他の目的に利用することができる。

【0068】

B. シグナル変換

本発明で実施される結合アッセイの別の好ましい態様は、小分子によるタンパク質 - タンパク質相互作用の変調 (modulation) の研究である。これらのアッセイでは種々の分子による同族の結合の促進または競合のいずれかを測定し、種々の条件下での結合動力学的観点の理解を深める。代表的な態様では、捕捉タンパク質を支持体表面上に結合させてマイクロアレイを成し、同族リガンドを添加して捕捉タンパク質に結合させる。捕捉タンパク質およびその同族リガンド間の結合をモニタリングし、薬剤候補となりうる小分子が存在する場合としない場合とで比較する。好ましい態様では、捕捉タンパク質の、種々の小分子の作用を受ける種々のリガンドとの種々の相互作用を、マイクロアレイチップ上で多重様式で調査する。

10

【0069】

タンパク質相互作用は多くの場合、結合モチーフと呼ばれる場合もあるドメインを通して起こる。タンパク質相互作用の制御に有効な小分子が作用すると最も考えられるのはこれらの領域においてである。しかしながら、ファミリー内のタンパク質は結合モチーフの形成に関与する相同配列を共有する傾向があり、これらのモチーフを含有するタンパク質は多くの場合、同様の機能を有する。それらのタンパク質機能を制御する薬剤のスクリーニングにおける問題はこれらのスクリーニングにおいて特異性を得ることであり、これはタンパク質の結合モチーフファミリーのあいだで標的が同様の構造であり、同様の結合特性を有するためである。ここに開示するタンパク質マイクロアレイ技術によって、多数のモチーフ含有タンパク質ファミリーメンバーを制御するための小分子の特異性の測定の段階が効率的かつ容易に反復できるものになり、薬剤スクリーニングの工程が非常に容易になる。

20

【0070】

代表的な態様では、細胞アポトーシスに影響を及ぼすことが知られている Bcl-2 ファミリーの制御を研究する。これらのタンパク質は4つの Bcl-2 相同領域 (BH1-4) の組み合わせと相同性を共有する。Bcl-2 ファミリータンパク質は、ミトコンドリアおよび小胞体で膜の挙動およびイオンチャンネル機能を制御することによって細胞をアポトーシスから保護するか、またはアポトーシスを促進するように機能する。抗アポトーシスファミリーのメンバーである Bcl-2、Bcl-XL、および Mcl-1 は4つのドメイン全てを含有する。プロアポトーシス (pro-apoptotic) メンバーの最大の群である Bad、Bik、Bid、Bag-1、HRK、および Noxa は BH-3 ドメインのみを含有し、プロアポトーシスタンパク質である Bax およびマルチドメインプロアポトーシスタンパク質は BH-1、BH-2、および BH-3 ドメインを含有する。

30

【0071】

本発明の方法を使用してアポトーシス制御タンパク質のファミリー全体の機能を制御する小分子をスクリーニングすることができる。それらの小分子は BH-3 タンパク質の機能を擬態して薬剤候補として役立ちうる。図3Aおよび3Bに関連して、Bcl-2 ファミリーのアポトーシス制御タンパク質からの組換え融合タンパク質を標準的な方法で調製し、上記のような BSA-NHS ガラススライドまたはアルデヒド誘導体化ガラススライド 10 上にリンカー 20 を介して結合要素 30 としてプリントしてマイクロアレイとしてもよい。これらのタンパク質 (例えば完全長 Bcl-XL タンパク質) のリガンド 80 を、小分子 90 (例えば Bcl-2 ファミリータンパク質 BAK からの BH-3 含有ペプチドまたは BH-3 含有ペプチドを擬態する小分子) の不在下または存在下で添加してもよい。リガンド 80 を蛍光色素 (例えば Cy5) で標識してもよい。プリントされるタンパク質、リガンド、または小分子の濃度は単独で、または他と組み合わせで変化しうる。その後スライドを Arrayworn スキャナーのような光学測定器を使用して測定し、そし

40

50

て／または市販の質量分析チップを使用して質量分析によって確認してもよい。結合したリガンドから得られるシグナルの増加または減少を使用して小分子の制御の役割が亢進的制御か抑制的制御かに関わらず、図表化することができる。本発明の方法を使用して、複数の捕捉分子、複数のリガンド、および複数の小分子を単一のアレイ支持体（例えば96ウェルプレート）上で並行してスクリーニングすることができ、薬剤スクリーニングの効率が非常に向上する。より詳細な例は実施例のE(iii)に見られる。

【0072】

シグナル変換の研究における本発明の適用の別の例は、マルチドメインを含有するBcl-2ファミリーメンバーのBH-4領域を介するアポトーシス経路においてタンパク質-タンパク質結合を阻害する小分子のスクリーニングである。

10

【0073】

C. タンパク質発現

現在まで、標識した細胞抽出物におけるマイクロアレイに基づくタンパク質の検出に関する報告は発表されていない。細胞表面タンパク質の標識および検出によって複数の細胞表面抗原の並行したプロファイリングが可能となる。細胞表面分子のプロファイリングにおける技術水準はフローサイトメトリまたは蛍光顕微鏡によるものであり、現在は1つのサンプルで2-5個の異なる抗原をプロファイリングできる。理論的には抗体アレイによって無数の抗原の検出が可能である。更に、抗体アレイは細胞内タンパク質およびタンパク質修飾（例えばリン酸化）を発現と並行して検出できる可能性を有する。

【0074】

代表的な態様では、c-ErbB2、EGFR、およびトランスフェリン受容体のような細胞表面タンパク質に対するモノクローナル抗体を、GMS417アレイヤーによってBSA-NHSスライド上に配列させる。類表皮ガン細胞系A-431または乳ガン細胞系SK-BR-3のようなガン細胞系からの生きた細胞をサンプル細胞として使用してもよい。好ましくは細胞表面タンパク質を、ポリエチレングリコールのような親水性ポリマー部分を含有し、良好な特異性を示し、低バックグラウンドであり、細胞内のタンパク質を標識しない色素で標識する。それらの色素の一例はShearwaterから販売されているフルオレセイン-PEG2000-NHS色素である。標識および洗浄した後、細胞を溶解する（例えばSDS中で）。次いで、総標識タンパク質を抗体マイクロアレイ上でインキュベートして結合を起こさせ、その後スライドを光学測定器でスキャンする。結果として、A-431細胞系はEGFRを過剰発現するがErbB2はしないことが確認された。同様に、SK-BR-3細胞系はErbB2を過剰発現するがEGFRはしないことが確認された。

20

30

【0075】

D. 翻訳後修飾

タンパク質機能は多くの場合、（いくつかをあげると）ミリスチル化（myristoylation）、ゲラニル-ゲラニル化、もしくはファルネシル化によって得られるような糖複合体、脂質アンカーの添加のような翻訳後修飾によって、またはリン酸化によって制御される。リン酸化または脱リン酸化によるタンパク質機能の制御は細胞のシグナル変換の中核をなす。

40

【0076】

本発明の方法を使用して翻訳後修飾事象の研究またはリン酸化部位の同定ができる。好ましい態様では、scFvのような抗体フラグメントをマトリックス支援レーザー脱離イオン化（Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization; MALDI）チップにプリントしてタンパク質中の既知のリン酸化部位、および疑いのあるリン酸化部位のリン酸化を検出する。反応性表面であるMALDI質量分析表面へのタンパク質の結合は米国特許第6,020,208号に記載されており、これは参照によって本明細書に組み込まれる。チップはCiphaGen Biosystems（Freemont, CA）から市販されている。代表的な態様では、アポトーシスタンパク質Bcl-2、Bad、およびカスパーゼ9に対するリン特異的抗体を反応

50

性表面MALDIチップに結合させ、これらのタンパク質のリン酸化されたフラグメントの選択的捕捉に使用する。チップを飛行時間型質量分析を使用して、質量を分析することができる。

【0077】

本発明の方法は更に、質量分析と合わせて組換え1本鎖抗体(scFv)を使用し、既知または未知のリン酸受容残基上におけるリン酸化事象の発生を検出する新しい方法を提供する。この方法は近接リン親和性マッピング(proximal phospho-affinity mapping)と呼ばれており、作製が困難であることが知られているIMACの使用またはリン特異的抗体の使用によらない別の方法として役立つ。

【0078】

図2に関連し、この方法の態様は組換え1本鎖抗体(scFv)、ポリクローナル抗体、またはモノクローナル抗体30を使用するが、これはリン酸化部位70そのものの代わりに、リン酸化部位70がリン酸化について確認されているか、またはその疑いがあるかに関わらず、部位70に近接する同一抗原上のエピトープ50を認識するように設計されている。エピトープ50は、エピトープ50とリン酸化部位70との間の距離がリン酸化事象によって抗体認識が妨害されないようなものである限り、5-10アミノ酸程度まで近接していてもよい。それらの抗体または抗体フラグメント30(リンカー20を介して支持体表面10に結合している)は抗原(例えばトリプシンペプチド)がリン酸化されているかいないかに関わらず、抗原60を認識する。代表的な態様では、トリプシンもしくはV8のようなプロテアーゼを使用して、またはCNBrのような非酵素法によってペプチドを生成する。これによってペプチドフラグメントが生成され、これはその独自のサイズによって同定できる。これらのフラグメントの中に既知の、または予測されるリン酸化部位を含有する標的フラグメント60がある。1本鎖抗体または伝統的な抗体を、標準的なパニング方法を使用して、トリプシンフラグメント60中のリン酸化部位70に近接するエピトープ領域50に相当する合成ペプチドに対してパニングまたは免疫化する。エピトープ50はわずか3-7アミノ酸から成る。生成される抗体または抗体フラグメントをMALDI反応性チップに結合させた捕捉分子として使用してもよい。次いでチップを使用して、リン酸化を示す特徴的な質量変化を検出してもよい。この方法によって並行した精製/同定およびリン酸化の分析が可能となるため、リン酸化のスクリーニングのための価値のある検出手段となる。また、この方法に従って生成される抗体または抗体フラグメントはリン酸化状態および非リン酸化状態のいずれでも標的ペプチドを認識するので、この方法はリン酸化に影響を及ぼす事象および条件の研究にも有用である。

【0079】

特に好ましい態様では、ペプチド60を以下のように選択する：まず、タンパク質の配列情報を含むデータベースでサーチしてキナーゼ基質のコンセンサス配列を標的タンパク質中に配する。次いで、種々のプロテアーゼの消化マップの比較によってそれらのコンセンサス配列を含むペプチドを選択する。約20アミノ酸のペプチドが好ましい。最後に選択したペプチド上のキナーゼ基質コンセンサス配列以外のエピトープを選択して抗体または抗体フラグメントを産生させる。

【0080】

E. 細胞オルガネラ

本発明の方法を使用して全細胞抽出物または全細胞抽出物の画分からの細胞オルガネラを捕捉することもできる。好ましい態様では、ミトコンドリア膜と独自に会合する電圧依存性アニオンチャンネル("VDAC")受容体を認識する抗体を前述のようにプリントした後、緑色蛍光を結合させたチトクロームc発現ミトコンドリアを捕捉させる。電位差特性を有する色素を使用して無傷の電圧グラジエントを有するミトコンドリアを特異的に標識することができる。異なる状態の細胞からの捕捉されたミトコンドリアまたは他のオルガネラの検出を使用してアポトーシスまたは他の細胞事象の発生を示すことができる。

【0081】

F. その他

10

20

30

40

50

本発明の方法を他の適用、例えば組織タイピング、疾病診断、および治療の評価に使用してもよい。遺伝的障害が明らかになりうる患者からの生物学的サンプル（WO 89 / 11548号。参照によって本明細書に組み込まれる）を本発明に使用してもよい。同様に、本発明を使用して所定のサンプルにおけるタンパク質発現の異常、抗原または毒物の存在を検出することができる。更に、本発明の方法を使用して、薬剤、医薬リード化合物、または環境因子の変化への暴露に対する生体、組織、または個々の細胞からの応答を評価することもできる。

【0082】

実施例

A. 基質表面の調製

10

(i) ガラススライドのストリッピングおよび反応基の再充填の方法

好ましい方法の一例は以下の通りである：まず平らなガラススライド（例えばVWR Scientific Products）をピラニア（piranha）溶液（濃 H_2SO_4 および30% H_2O_2 の70:30 v/v 混合液）中、室温で12時間洗浄する。（注：“ピラニア”溶液はいくつかの有機物質と激しく反応するので、十分注意して操作すべきである）。水で完全に洗浄した後、スライドをシラン溶液（例えば95%エタノール中の3-アミノプロピルトリエトキシシランの3%溶液）で処理する。また、スライドの処理の前に、シラン溶液を少なくとも10分間攪拌して加水分解およびシラノール形成をさせてもよい。次いでスライドをエタノールまたは同様の溶液に軽く浸漬し、遠心分離して過剰のシラノールを除去する。その後、吸収されたシラン層を硬化させる（例えば115℃で1時間）。冷却後、スライドをエタノールまたは同様の溶液で洗浄して未結合の試薬を除去する。

20

【0083】

単純な半定量的方法を使用してスライド表面上のアミノ基の存在を確認することができる。アミノ誘導体化したスライドを5 mLの50 mM 重炭酸ナトリウム（pH 8.5）で簡単に洗浄する。その後スライドを、0.1 mMのスルホ-スクシンイミジル-4-O-（4,4'-ジメトキシトリチル）-ブチレート（s-SDTB; Pierce, Rockford, IL）を含有する50 mM 重炭酸ナトリウム（pH 8.5）5 mLに浸漬し、30分間激しく攪拌できる。（s-SDTB溶液の調製は3.03 mgのs-SDTBを1 mLのDMFに溶解し、50 mM 重炭酸ナトリウム（pH 8.5）で50 mLに希釈して行う）。30分間インキュベートした後、スライドを20 mLの蒸留水で洗浄し、その後5 mLの30%過塩素酸で処理することができる。橙色の溶液となれば、これはスライドがアミンでうまく誘導体化されたことを示す；未処理のガラススライドでは色の変化が見られない。酸処理によって遊離される4,4'-ジメトキシトリチルカチオン（ $E_{498nm} = 70,000 M^{-1} cm^{-1}$ ）の定量はおおよそ nm^2 当たり2アミノ基の密度を示す。

30

【0084】

B. 基質へのリンカーの付加

(i) リンカーとしてのBSA

ウシ血清アルブミン（BSA）の固定化層の表面上に活性化されたアミノ基およびカルボキシル基をディスプレイするBSA-NHSスライドを以下のように製作した：10.24 gのN,N'-ジスクシンイミジルカーボネート（100 mM）および6.96 mLのN,N'-ジイソプロピルエチルアミン（100 mM）を400 mLの無水N,N'-ジメチルホルムアミド（DMF）に溶解した。30枚のポリリジンスライド（例えばCMT-GAPスライド（Corning Incorporated, Corning, NY））はその表面にアミノ基をディスプレイするが、これをこの溶液に室温で3時間浸漬した。これらのスライドを95%エタノールで2回洗浄し、その後1% BSA（w/v）を含有するリン酸バッファー溶液（PBS）（pH 7.5）400 mLに室温で12時間浸漬する。スライドを更にdd H_2O で2回、95%エタノールで2回洗浄し、200 gで1分間遠心分離して過剰の溶媒を除去した。次いで100 mMのN,N'

40

50

- ジスクシンイミジルカーボネートおよび 100 mM の N , N - ジイソプロピルエチルアミンを含有する DMF の 400 ml にスライドを室温で 3 時間浸漬した。スライドを 95 % エタノールで 4 回洗浄し、上記のように遠心分離して BSA - NHS スライドを得た。スライドはデシケーター中で真空下、室温で保存し、2 ヶ月まで顕著な活性の喪失が見られなかった。

【0085】

(i i) リンカーとしてのマレイミド (maleimido)

マレイミド誘導体化したスライドを以下のように製造した：平らなガラススライドの表面を実施例 A (i) に記載するように“充填”（例えば再シラン化）した後、得られたスライドをスライドサイズのポリジメチルシロキサン (PDMS) 反応容器に移した。それぞれのスライドの片面を 50 mM 重炭酸ナトリウムバッファー (pH 8 . 5) 中の 20 mM N - スクシンイミジル 3 - マレイミドプロピオネートで 3 時間処理した（この溶液の調製は、N - スクシンイミジル 3 - マレイミドプロピオネートを DMF に溶解し、バッファーで 10 倍に希釈して行った）。インキュベーション後、プレートを蒸留水で数回洗浄し、遠心分離で脱水し、室温で真空下、更なる使用まで保存した。得られたスライド表面はマレイミド末端を有する。

【0086】

C . 結合要素の調製

(i) システイン標識した s c F v の製造および精製

s c F v C 6 . 5 はヒト腫瘍抗原 c - e r b B - 2 の細胞外領域に $1 . 6 \times 10^{-10}$ M の K d で結合する。抗体を Schier ら (1996) , J . Mol . Biol . 255 (1) : 28 - 43 に記載されるようなアフィニティー選択法を使用して単離した。

【0087】

その後 s c F v C 6 . 5 の遺伝子を pUC - 119 - (Hexa - His) - Cys 発現ベクターにサブクローニングし、これによって s c F v の COOH - 末端にヘキサ - His タグ、次いで 1 個のシステインが付加された。タンパク質を発現させ、固定化した金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) を使用して精製した。C 6 . 5 の結合親和性変異体を相補的結合領域 (CDR) の変異誘発によって作製し、誘導変異体の親和定数 [C 6 . 5 M L 3 - 4 (K d = $3 . 4 \times 10^{-9}$) および C 6 . 5 G 98 (K d = $1 . 6 \times 10^{-9}$)] を Biacore を使用して測定した (Schier ら , 1996 b に記載される) 。システインタグを付した s c F v C 6 . 5 、 C 6 . 5 M L 3 - 4 、および C 6 . 5 G 98 を使用してガラス表面に化学的に結合させた s c F v によるリガンドの捕捉を証明した。これらの s c F v の COOH 末端システインの還元されたスルフヒドリルによってチオールが生成され、これを使用してマレイミド基で機能化したガラス表面に s c F v を結合させることができる。

【0088】

(i i) マレイミドリンカーにコンジュゲートさせるための s c F v の還元

精製した s c F v を 5 mM システアミン (SIGMA) を使用して 25 °C で 1 時間還元し、P10 スピнкаラムを使用してリン酸バッファー溶液 (PBS) (pH 7 . 0) に交換した。

【0089】

D . マイクロアレイを使用するアッセイ

(i) 蛍光のスキニングスライド

Array W o R o x ^{T M} スライドスキャナー (Applied Precision , Issaquah , WA) を使用してスライドをスキニングした。スライドをピクセル当たり 5 μm の解像度でスキニングした。入射光および放射光のいずれにもダブルフィルターを使用した。フルオレセインの蛍光は FITC / FITC 励起 / 放射フィルターセットを使用して観察し、Cy3 の蛍光は Cy3 / Cy3 励起 / 放射フィルターセットを使用して観察し、Cy5 の蛍光は Cy5 / Cy5 励起 / 放射フィルターセットを使用

10

20

30

40

50

して観察した。

【0090】

E. マイクロアレイの適用

(i) s c F v 修飾したガラス表面上での標識したペプチドの親和捕捉

細胞表面タンパク質の定常状態トリプシン開裂を、S K B R 3 (ヒト乳ガン) または S K O V 3 細胞について、T P C K 処理したトリプシンを使用して4で行った。トリプシン消化物をM A L D I 質量分析法を使用して測定したが、S K O V 3 細胞について図4 A に示す。約0.5 μl の消化物をM A L D I 表面に負荷し、以下から成るマトリクスで包埋した: ケイ皮酸飽和50%アセトニトリル、0.5%トリフルオロ酢酸 (T r i f l o u r a n d a c e t i c a c i d)。消化物をプロテアーゼ阻害剤で処理し、トランスフェリン受容体のエクトドメインに対する精製した6 x H i s - s c F v 1 μg と共にインキュベートした。N i - N T A セファロースビーズを使用してs c F v - ペプチド複合体を消化物から精製した。ビーズを洗浄した後、上記のケイ皮酸マトリクスに包埋した。マトリクスで溶出したペプチドの質量分析を行った (図4 B に示す)。エピトープを含有するトリプシンペプチドを、E X P A S Y シリーズ (s u i t e) からのペプチド (p e p t i d e n t) プログラムを使用して同定した。コントロール実験のために、C H O 細胞で発現したH A タグ化したトランスフェリン受容体を、セファロースビーズに結合した抗H A I g G を使用して免疫沈降させた。精製したタンパク質を、H A ペプチドを使用してビーズから脱離し、固定化したT P C K 処理トリプシンで消化した。s c F v エピトープを含有するペプチドをH 7 s c F v を使用して精製し、上記のように質量分析を行ったが、これを図4 C に示す。トランスフェクトしたトランスフェリンタンパク質はそのアミノ末端にH A エピトープ配列を含有する (細胞内ドメイン)。このタグは細胞外特異的標識のためのコントロールとして役立つ。

【0091】

精製したトランスフェリン受容体および細胞表面タンパク質のトリプシン消化物を第1級アミン反応性色素N H S - C Y - 5 で標識し、P B S に対して透析した。次いで標識したペプチドを、10 mg / ml のB S A および0.05% T w e e n 20 を含有するP B S で0.2 mg / ml の濃度に希釈し、トランスフェリン受容体に対するs c F v (H 7) で誘導体化したガラススライドの表面上でインキュベートした。加湿チャンバー内で一晚、4で行インキュベートした。C Y - 5 標識されたペプチドの結合を、蛍光スキャナーを使用して測定した。図4 D に実験結果を示すが、これはトランスフェリン受容体が種々の濃度のH 7 s c F v に結合することを示している。H A エピトープは細胞内ドメイン上にあるので、ここでは抗H A I g G がネガティブコントロールとなる。

【0092】

(i i) マレイミド誘導体化したガラススライドに結合したs c F v の機能性の試験

マレイミド誘導体化したガラススライド表面上のスポットの輪郭を疎水性のペンで描いてサンプルが分散しないようにした後、実施例C (i i) に記載するように還元したs c F v 1.0 μg を、加湿チャンバーにおいて4で12時間、ガラス表面に結合させた。チオールを含有する末端システインは、おそらくチオエーテル結合によって、マレイミド基に容易に結合する。チトクロームc およびB c l - 2 に対するモノクローナル抗体、および末端システインを含有しないs c F v を2 - イミノチオラン・H C l (トラウト試薬) で処理して表面に暴露したリジンにスルフヒドリル残基を導入した。その後これらの抗体を上記のように還元し、コントロールとして使用した。結合後、スポットの洗浄を、2% B S A、0.05% T w e e n 20、および1.0 mM -メルカプトエタノールを含有するP B S を用いて、25で15分間、3回行った。同族リガンドまたはネガティブコントロールを、2% B S A、0.05% T w e e n 20 を含有するP B S 中、10.0 p M から0.01 p M の範囲の濃度で好適なスポットに添加し、加湿チャンバーにおいて4で2時間インキュベートした。

【0093】

ある場合には、40%グリセロールをスポット混合物に添加し、s c F v のマイクロアレ

10

20

30

40

50

イ化を容易にしたが、これはサンプルがサブマイクロリットルの容量でスポットティングした場合でも乾燥しないためである。s c F v C 6 . 5 および s c F v F 5 では、40 % グリセロールは s c F v 結合の機能に不利な効果を有さなかった。

【0094】

s c F v 6 . 5 の同族リガンドは精製した e r b B - 2 受容体である。e r b B - 2 の組換えエクドメインを標準的な方法を使用して C H O 細胞から発現させ、精製した。N H S - C Y 5 単機能色素 (A M E R S H A M) を使用して、色素 / タンパク質の最終モル比 5 . 0 でタンパク質を標識した。標識化反応は 0 . 1 M 炭酸ナトリウムバッファー中、25 で 30 分間実施し、P 10 スピンカラムを使用して P B S に交換した。コントロールとして使用した他のタンパク質 (B c l - 2、チトクローム c、および B S A) は上記のように C Y - 5 で同様に標識した。標識したタンパク質を、ファージ生成した抗体またはモノクローナル抗体のいずれかでの免疫沈降によって免疫原性について試験し、その後ガラスに結合した s c F v のリガンドとして使用した。e r b B - 2 タンパク質を 2 % B S A を含有する P B S T w e e n 20 中、1 μ M から 1 p M の範囲で、加湿チャンバーにおいて 25 で 2 時間インキュベートした。C Y 5 標識した e r b B 2 をネガティブコントロールとして使用した。

10

【0095】

インキュベーション後、サンプルを P B S、0 . 05 % T w e e n 20 で 2 分間、3 回、そして P B S で 1 回洗浄した。サンプルを乾燥させた後、分子動力学 S T O R M 上で 640 nm の励起光を使用してイメージ化した。

20

【0096】

(i i i) シグナル変換における小分子

B c l - 2 ファミリーのアポトーシスを制御するタンパク質からの組換え融合タンパク質を標準的な方法で調製し、B S A - N H S ガラススライドまたはアルデヒド誘導体化ガラススライドのいずれかにプリントした。タンパク質は、40 % グリセロール含有バッファー中、ミリリットル当たり 200 から 20 マイクログラムの濃度範囲でプリントした。プリンティングは記載のように G M S 417 リング・アンド・ピン・プリンターを使用して行った。プレートに捕捉タンパク質サンプルを負荷した；G M S 417 プリンターでのプリンティングのための 96 ウェルプレート。タンパク質を反応性スライド上、わずかに水分を補給した条件下、4 で 12 時間インキュベートした。結合反応が完了した後、P B S および蛍光色素で標識した同族リガンドの変異体でスライドを洗浄した。A r r a y w o r x 光学測定器を使用して検出した。

30

【0097】

プリントしたタンパク質は B c l - X L および B A X の G S T 融合体、および 6 x ヒスチジンタグ化した B c l - X L であった。これらのタンパク質のリガンドは完全長の B c l - X L タンパク質および B c l - 2 ファミリーのタンパク質 B A K 由来の B H 3 含有ペプチドであった。ペプチドを A l e x a 488 で標識し、完全長のタンパク質を C Y 5 で標識した。G M S プリンターから運搬される液体の容量はストローク当たり 50 - 70 μ L で 5 回反復する。スポット当たり 350 p g から 350 f g の範囲のタンパク質を運搬した。プリントした後、タンパク質を加湿チャンバーにおいて 4 で 12 時間、インキュベートした。その後 P B S でスライドを洗浄し、10 % B S A を含有する P B S で 5 分間ブロッキングした。表面の反応性およびタンパク質の結合効率を測定するために、G S T 融合タンパク質の存在のモニタリングを、標識した抗 G S T 標識抗体を 1 n g / m l で使用して行った。

40

【0098】

標識したタンパク質リガンドを、疎水性バリアーによる 1 cm^2 のエリアに含有させた 40 μ l の容量でインキュベートした。

その後スライドを洗浄し、A r r a y w o r x スキャナーで測定した。更に、図 5 (質量分析プロファイル) に示すように、B a x - G S T タンパク質によるリガンドの結合が左図で確認され、G S T タンパク質では結合しないことが右図に示されている。

50

【0099】

図6は、未標識の小分子(ここではBH3ペプチド)が捕捉分子(Bax-GST融合タンパク質)を巡って標識されたりガンド(ここではBcl-XL)と競合する能力を有することが確認されている。4つの質量分析プロファイルに示すように、BH3ペプチドの量の増加に伴って、標識されたりガンドと捕捉タンパク質との間の結合が減少することが観察された。これによって、捕捉タンパク質とリガンドとの間の相互作用が実際にBH-3ドメインに帰することができることが確認された。BH-3タンパク質-タンパク質相互作用を特異的に促進することが確認されている小分子を使用して同じ型の実験を実施し、予想通り、捕捉分子(Bakペプチド)によるリガンド(Bcl-XL)結合の向上が観察された。

10

【0100】

その後、Bcl-2ファミリーのメンバーの機能に作用することが知られている3つの薬剤と競合させるリガンドとしてBH3ファミリーのいくつかのペプチドを種々の濃度で使用し、これらの実験を反復した。それぞれの場合にBcl-XLを捕捉タンパク質としてBSA-NHSガラススライド上にプリントした。スライド上に捕捉された標識されたりガンドの検出された蛍光を図7Aおよび7B中の欄に示した。異なる薬剤は同一ファミリーからの2つのリガンドで異なる特異性を示した。Bak(図7A)では阻害効果が実質的に全ての場合で観察されたが、Bid(図7B)では、PNASまたは相対的に低濃度のアンチマイシンはその結合の阻害が見られない。この実験は、標的タンパク質の大ファミリーの各メンバーに関して候補となる薬剤の特異性をマッピングするのに有用でありう

20

【0101】

(iv)細胞表面タンパク質発現

ガン細胞系における細胞表面抗原の発現を検出するためにモノクローナルおよびscFv抗体をガラスマイクロアレイ上にプリントした。c-ErbB2、EGFR、およびトランスフェリン受容体に対する抗体をBSA-NHS活性化ガラススライド上にプリントした。モノクローナル抗体では、蛍光色素で標識した2ng/mL未満の組換え抗原を検出した。細胞抽出物における抗原の検出のために、ガン細胞系の細胞表面をNHSに基づく色素を使用して蛍光で標識した。これによっていくつかのガン細胞系のc-ErbB2およびEGFRの差次細胞表面発現の検出が可能となった。トランスフェリン受容体は直接標識法を使用して検出しなかった；しかしながら、マイクロ・サンドイッチ法を使用する場合、トランスフェリン受容体も検出した。

30

【0102】

c-ErbB2、EGFR、およびトランスフェリン受容体(TfR)に対するモノクローナル抗体をGMS 417アレイヤー上で配列させた。抗体を40%グリセロール中でスポッティングし、BSA-NHSスライド上でのスポットの乾燥を防止した。抗体を冷所で一晚スライドと反応させた。得られたスポットのサイズは375マイクロメートルの間隔で(中央から中央)約150マイクロメートルであった。

【0103】

スライドを0.5Mグリシン中で30分間、次いでBSA中で更に30分間ブロックし、その後サンプルを添加した。複数のサンプルを単一のスライド上で処理する場合、抗体スポットの群を疎水性のペンで描いて分離し、スライド当たり24サンプルまで処理できるようにした。あるいはまた、抗体スポットの群を粘着性テフロン(登録商標)マスクを使用して分離し、スライド当たり50以上のサンプルを処理できるようにした。

40

【0104】

サンプルは通常、Cy3またはCy5-NHS色素を用いて室温で1時間標識し、未反応の色素をゲル濾過で除去する。この研究で使用した細胞系は乳腺ガン細胞系SKBR3および類表皮ガン細胞系A-431であった。色素フルオレセイン-PEG2000-NHS(Shearwater)をPBS中10mg/mLで使用して氷上で2時間、細胞表面を標識し、細胞を洗浄して未反応の色素を除去した後、TBS中の0.25%SDS

50

に可溶化した。組換えタンパク質抗原を 0.1% Tween-PBS 中の 2% BSA 中でインキュベートした。BSA を含有しない溶解バッファー中で細胞溶解物をインキュベートした。サンプルと共に 2 から 3 時間インキュベートした後、洗浄バッファーを含有するビーカーに迅速に浸水することによって、4 × 10 回：TPBS 中で 20 回、次いで PBS 中で 20 回、スライドを洗浄した。Array W o R x スライドリーダーを使用して蛍光を検出した。

【0105】

感度：

連続希釈した Alexa 488 で標識した ErbB2 および Cy5 で標識した EGFR と共にマイクロアレイをインキュベートした。洗浄後、スライドを Array W o R x でスキャニングした。図 8 に示すように、TfR 抗体 # 3 以外、全ての抗体はそれぞれ ErbB2、TfR、および EGFR を捕捉できた。1.6 ng/mL という低希釈でタンパク質の捕捉を検出できた。

10

【0106】

細胞表面抗原の検出：

乳腺ガン細胞系 SKBR3 および類表皮ガン細胞系 A-431 をコンフルエントになるまで増殖させ、細胞表面を色素フルオレセイン-PEG2000-NHS で標識した。標識に続いて細胞を洗浄して未反応の色素を除去し、細胞を 0.25% SDS 中で溶解した。その後、標識されたタンパク質全体（約 50,000 細胞に相当）を抗体マイクロアレイ上で 2 時間インキュベートし、スライドを Array W o R x でスキャニングした。図 9 に示すように、A-431 細胞系は EGFR を過剰発現するが ErbB2 はしない；SKBR-3 細胞系は ErbB2 を過剰発現するが EGFR は低レベルにしか発現しない。この 2 つの細胞系における 2 つの受容体の差次発現はフローサイトメトリーによって確認する（例えば A-431 細胞において細胞当たり > 10⁶ EGFR 受容体）。

20

【0107】

異なる方法では、細胞タンパク質を蛍光で直接標識しなかった。それに代わり、アレイに結合する抗原を、抗原に対する蛍光標識した 2 次抗体で検出した。この“サンドイッチ”検出法の感度は直接標識した組換え抗原で観察されるものと同様であった。

【0108】

ある実験で、抗体を前述のようにマイクロアレイにプリントし、未標識の抗原と共に 2 時間インキュベートした。Cy5（EGFR の検出）または Cy3（TfR の検出）で標識した抗原に対する 2 次抗体で結合を検出した。結果を図 10 に示す：凡例に示すモノクローナル抗体は約 25 ng/mL で良好な感度を示す。

30

【0109】

同じサンドイッチ法を、Cy5 で標識した scFv F5 のようなファージディスプレイした抗体を使用して実施した。

細胞抽出物中の抗原を検出するために、細胞系（A431 または SKBR-3）を 0.25% SDS 中で溶解し、抽出物を抗体アレイと共に 2 時間インキュベートした。洗浄後、結合した抗原を蛍光モノクローナル抗体（EGFR および TfR）またはファージ抗体（ErbB2）で検出した。図 11 に示すように、サンドイッチ法を使用して、両細胞抽出物において 3 つの抗原、EGFR、ErbB2、または TfR の全てを検出した。抗 EGFR 抗体によって A431 細胞系および SKBR-3 細胞系における ErbB2 の差次発現が検出された（> 10 倍の差異）。同様に、抗 ErbB2 ファージ抗体によって 2 つの細胞系における ErbB2 の発現の差異が検出された。予想通り、トランスフェリン受容体発現の場合、2 つの細胞系間で発現の顕著な差異は検出されなかった。

40

【0110】

本明細書において上に引用した全ての文書、特許、出版物は参照によってここに組み込まれる。本発明の種々の修飾および変更は、本発明の範囲および意図から逸脱することなく、当業者に明白である。本発明について特定の好ましい態様と関連して記載したが、請求する本発明はそれらの特定の態様に過度に制限されるべきではないことは理解されるべき

50

である。実際に、本発明を実施するために記載した様式の種々の修飾で当業者に明白なものは、本発明の範囲内にあることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 A は、支持体表面を処理して B S A 分子をそれに結合させ、B S A 分子を活性化するための代表的な段階を示す。

図 1 B は、捕捉タンパク質を活性化した B S A 分子に結合させるための代表的な段階を示す。

【図 2】近接リン親和性マッピングを示す。

【図 3】図 3 A、3 B は、タンパク質 - タンパク質相互作用を調節する小分子を研究する態様を示す。

【図 4】図 4 A は、S K O V 3 細胞のトリプシン消化物からの定常表面タンパク質の質量分析の概要である。

図 4 B は、ペプチドが N i - N T A S E L D I 表面上で s c F v H 7 によってアフィニティー捕捉されることを示す質量分析図である。

図 4 C は、コントロール実験の結果を示す質量分析図である。

図 4 D は、C Y - 5 で標識したトランスフェリン受容体エクトドメインのトリプシンペプチドの捕捉を示す。

【図 5】ネガティブコントロールに対する捕捉分子としての融合タンパク質による結合を示す質量分析図である。

【図 6】S E L D I 表面上で小分子が結合要素をめぐってリガンドと競合することを示す質量分析図である。

【図 7】図 7 A、7 B は、小分子の存在下または不在下で固定化した結合要素に結合したリガンドから検出された蛍光単位を示す。

【図 8】種々の濃度の標識された E G F R、T f R、または E r b B 2 を捕捉したマイクロアレイの蛍光スキャンを示す。

【図 9】抗体マイクロアレイに捕捉された細胞溶解物由来の標識された細胞表面タンパク質を示す蛍光スキャンである。

【図 10】標識された 2 次抗体によって未標識の抗原の捕捉を検出するマイクロアレイの蛍光スキャンである。

【図 11】細胞溶解物由来の抗原の結合を検出する蛍光スキャンである。検出は標識された 2 次抗体による。

10

20

30

【 図 4 】

FIG. 4A

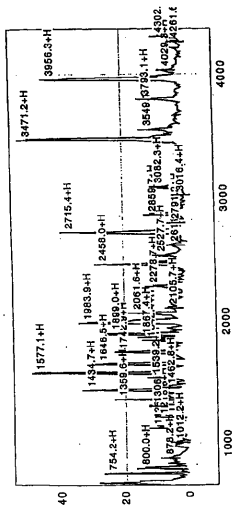


FIG. 4B

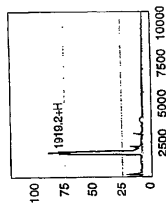


FIG. 4C

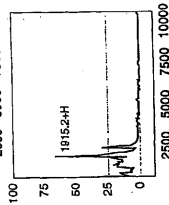
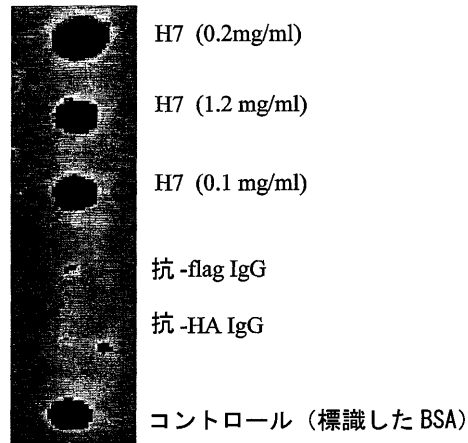
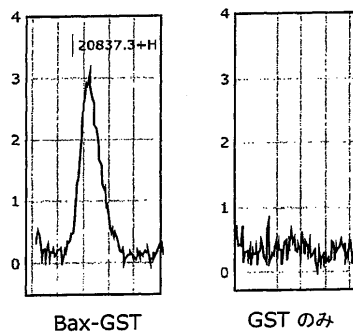


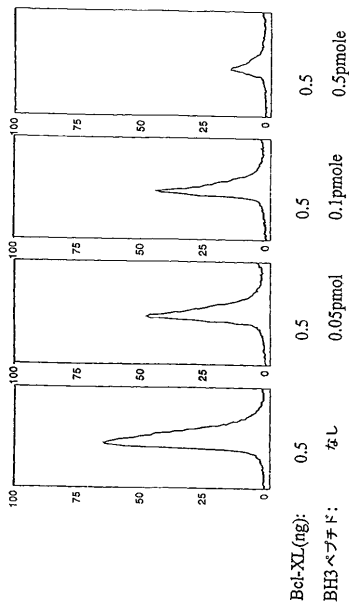
FIG. 4D



【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】

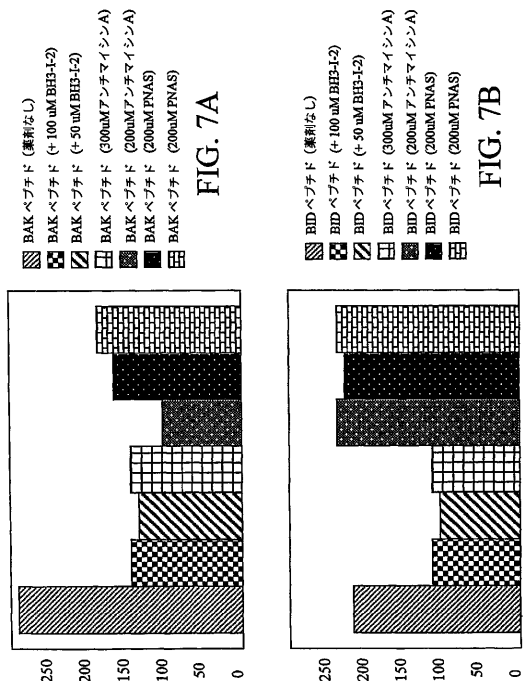
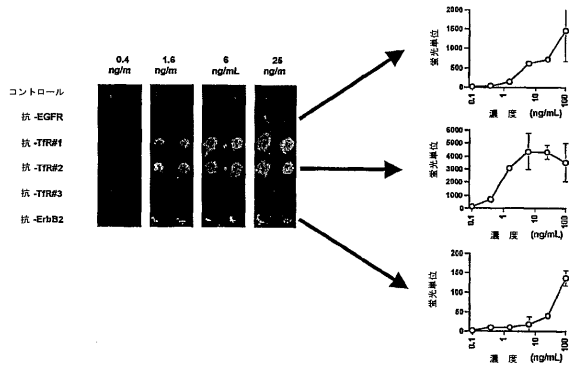
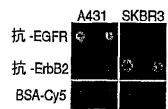


FIG. 7B

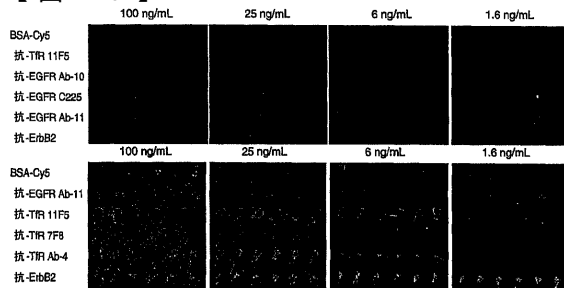
【図 8】



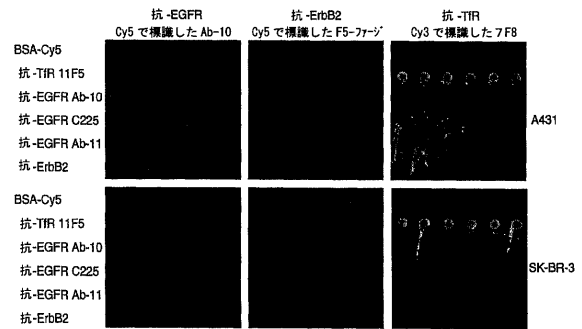
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/12893 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/53 (74) Agent: MEYERS, Thomas, C.; Testa, Hurwitz & Thibault, LLP, High Street Tower, 125 High Street, Boston, MA 02110 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/24264
- (22) International Filing Date: 3 August 2001 (03.08.2001) (81) Designated States (national): 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/222,763 3 August 2000 (03.08.2000) US
- (71) Applicant: MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY [US/US]; 77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139 (US).
- (72) Inventors: CARDONE, Michael, H.; 84 Gainsborough Street, Apartment 206, Boston, MA 02015 (US). MACBEATH, Gavin; 146 Oakland Avenue, #1, Arlington, MA 02476 (US). NIELSEN, Ulrik; 48 Hawthorne Street, Cambridge, MA 02138 (US). MARKS, James, D.; USCF, 1001 Potrero Avenue, Bldg. 1, Rm 170, San Francisco, CA 94143 (US). SORGER, Peter; 336 Harvard Street, Unit E, Cambridge, MA 02139 (US). SINSKY, Anthony; 285 Commonwealth Avenue, Boston, MA 02115 (US).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/12893 A2

(54) Title: MICROARRAYS OF FUNCTIONAL BIOMOLECULES, AND USES THEREFOR

(57) Abstract: Disclosed are products and methods to facilitate the identification of compounds that are capable of interacting with biological macromolecules of interest, especially when such macromolecules are attached to a support surface in microarray. Aspects of the invention concern attachment chemistry, peptide labeling, antibody preparation, applications and so on.

WO 02/12893

PCT/US01/24264

**MICROARRAYS OF FUNCTIONAL BIOMOLECULES,
AND USES THEREFOR**

Related Application

This application is based on and claims priority of U.S. Provisional Patent Application No. 60/222,763, filed on August 3, 2000, the disclosure of which is hereby incorporated by reference.

Field of the Invention

The present invention relates to the field of diagnostic and analytical chemistry, and particularly to devices for screening complex chemical or biological samples to identify, isolate or quantify components within a sample based upon their ability to bind to specific binding elements. The invention is particularly related to the production and use of arrays, preferably microarrays, of binding elements which are of biological significance or which bind to ligands of biological significance.

Background of the Invention

To construct high-density arrays of functional biomolecules for efficient screening of complex chemical or biological samples or large numbers of compounds, the binding elements need to be immobilized onto a solid support. A variety of methods are known in the art for attaching biological molecules to solid supports. See generally, *Affinity Techniques, Enzyme Purification: Part B, Meth. Enz.* 34 (ed. W. B. Jakoby and M. Wilchek, Acad. Press, N.Y. 1974) and *Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography*, Adv. Exp. Med. Biol. 42 (ed. R. Dunlap, Plenum Press, N.Y. 1974). Arenkov et al., for example, have described a way to immobilize proteins while preserving their function by using microfabricated polyacrylamide gel pads to capture proteins, and then accelerating diffusion through the matrix by microelectrophoresis (Arenkov et al. (2000), *Anal Biochem* 278(2):123-31). The patent literature also describes a number of different methods for attaching biological molecules to solid supports. For example, U.S. Pat. No. 4,282,287 describes a method for modifying a polymer surface through the successive application of multiple layers of biotin, avidin, and extenders. U.S. Pat. No. 4,562,157 describes a technique for attaching biochemical ligands to surfaces by attachment

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 2 -

to a photochemically reactive arylazide. Irradiation of the azide creates a reactive nitrene that reacts irreversibly with macromolecules in solution, resulting in the formation of a covalent bond. The high reactivity of the nitrene intermediate, however, results in both low coupling efficiencies and many potentially unwanted products due to nonspecific reactions. U.S. Pat. No. 4,681,870 describes a method for introducing free amino or carboxyl groups onto a silica matrix, in which the groups may subsequently be covalently linked to a protein in the presence of a carbodiimide. In addition, U.S. Pat. No. 4,762,881 describes a method for attaching a polypeptide chain to a solid substrate by incorporating a light-sensitive unnatural amino acid group into the polypeptide chain and exposing the product to low-energy ultraviolet light.

There remains, however, a need for more efficient and easy-to-make array systems that identifies, isolates and/or quantifies components within complex samples, as well as to screen large numbers of compounds based upon their ability to bind to a variety of different binding partners.

Summary of the Invention

The present invention provides microarray assay systems where binding elements of interest are immobilized on a substrate and are able to interact with and bind to sample analytes. The microarrays are useful for screening large libraries of natural or synthetic compounds to identify natural binding partners for the binding elements, as well as to identify non-natural binding partners which may be of diagnostic or therapeutic interest. The invention is particularly useful in providing microarrays of antibodies or antibody fragments such as scFv, which have previously not been successfully incorporated into high-density arrays while maintaining their specific binding activity. The invention also provides methods for using such microarrays, methods for selecting epitopes for the antibodies or antibody fragments useful in such arrays, and methods for analyzing the data obtained from assays conducted on the microarrays.

Preferably, the immobilized binding elements are arranged in an array on a solid support, such as a silicon-based chip or glass slide. The surface of the support is chosen to possess, or are chemically derivatized to possess, at least one reactive chemical group that can be used for further attachment chemistry. There may be optional flexible molecular linkers interposed between the support and the binding elements. Examples of such linkers include bovine serum albumin (BSA) molecules, maleimide and vinyl sulfone groups.

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 3 -

In certain embodiments of the invention, a binding element is immobilized on a support in ways that separate the binding element's region responsible for binding to its cognate ligand and the region where it is linked to the support. In a preferred embodiment, the two regions are two separate termini, and the binding element is engineered to form covalent bond, through one of the termini, to a linker molecule on the support. Such covalent bond may be formed through a Schiff-base linkage, a linkage generated by a Michael addition, or a thioether linkage. In a particularly preferred embodiment, an antibody fragment is engineered to comprise a reduced cysteine at its carboxyl terminus.

In preferred embodiments, the microarrays comprise an array of immobilized yet functional binding elements at a density of at least 1,000 spots per cm². In some embodiments, to prevent dehydration, the invention provides for adding a humectant such as glycerol to the layer of immobilized binding elements. In other embodiments, the invention provides for the addition of a blocking agent solution such as BSA to the substrate surface.

In another aspect, the present invention provides methods of labeling an antigen such that the labeling will not interfere with the antigen's binding with an antibody or antibody fragment. In a preferred embodiment, the antigen is labeled at its terminal amines after protease digestion. In a particularly preferred embodiment, the antigen is digested with trypsin before being labeled with a succinimidyl ester dye.

In a further aspect, the present invention provides a method for detecting a phosphorylated protein by fragmenting a candidate protein into a plurality of peptides wherein one of the peptides comprises a known or suspected phosphorylation site, and using an antibody or antibody fragment to select the peptide through an epitope close to the phosphorylation site.

In yet another aspect, the present invention provides a method for identifying a small molecule that regulates protein-protein interaction. According to this aspect, a capture protein is attached to a support surface and exposed to its ligand and at least one small molecule. The presence or the absence of binding between the capture protein and the ligand is then detected to determine the regulatory effect of the small molecule. In a preferred embodiment, a microarray of capture proteins that act in the same cellular pathway are attached to the support surface to profile the regulatory effect of a small molecule on all these proteins in a parallel fashion.

In yet a further aspect, the present invention provides a method for studying a cellular event by attaching a capture molecule on a support surface to capture a cellular organelle contained in a solution such as a whole-cell lysate.

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 4 -

These and other aspects of the invention will be apparent to one of ordinary skill in the art from the following detailed disclosure, and description of the preferred embodiments.

Brief Description of the Drawings

- FIG. 1A illustrates exemplary steps of treating a support surface to attach a BSA molecule to it and activating the BSA molecule.
- FIG. 1B illustrates exemplary steps of attaching a capture protein to the activated BSA molecule.
- FIG. 2 illustrates proximal phospho-affinity mapping.
- FIG. 3A and 3B illustrate an embodiment where small molecule regulating protein-protein interaction is studied.
- FIG. 4A is a mass spectrometry profile of the steady state surface proteins from a trypsin digest of SKOV3 cells.
- FIG. 4B is a mass spectrometry diagram showing peptide being affinity captured by scFv H7 on Ni-NTA SELDI surface.
- FIG. 4C is a mass spectrometry diagram showing the result of a control experiment.
- FIG. 4D illustrates the capture of transferrin receptor ectodomain tryptic peptide that is labeled with CY-5.
- FIG. 5 are mass spectrometry diagrams showing binding by a fusion protein as a capture molecule versus the negative control.
- FIG. 6 are mass spectrometry diagrams showing a small molecule competes a ligand off an binding elements on a SELDI surface.
- FIG. 7A and 7B show fluorescence units detected from ligand bound to immobilized binding elements in the presence or absence of a small molecule.
- FIG. 8 shows fluorescence scans of microarrays that have captured labeled EGFR, TFR or ErbB2 at various dilutions.
- FIG. 9 is a fluorescence scan showing labeled cell surface proteins from cell lysate being captured by antibody microarrays.
- FIG. 10 are fluorescence scans of microarrays where the capture of unlabeled antigen is detected through a second labeled antibody.
- FIG. 11 are fluorescence scans detecting the binding of antigens from cell lysates. The detection is through a second labeled antibody.

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 5 -

Detailed Description of the Invention

The present invention depends, in part, upon the discovery of new methods of producing arrays, particularly microarrays, of naturally occurring or artificially produced biological macromolecules which may be used to screen samples, including both biological and artificial samples, to identify, isolate or quantify molecules in such samples that associate with the immobilized binding elements. Towards this end, the present invention provides methods and products to enable the high-throughput screening of very large numbers of compounds to identify those compounds capable of interacting with biological macromolecules.

The present invention has particularly significant applications in immunoassays, which pave the way for extensive and efficient screening using antibodies and similar molecules. Antibodies have long played an essential role in determining protein function, in identifying the spatiotemporal pattern of gene expression, in identifying protein-protein interactions, and for *in vitro* and *in vivo* target validation by phenotypic knockout. However, whereas individual antibodies are useful for monitoring individual proteins from biological samples, the present invention provides for the generation of large arrays of antibodies, antibody fragments, or antibody-like binding elements formatted for high throughput analysis. This technology, which enables comprehensive profiling of large numbers of proteins from normal and diseased-state serum, cells, and tissues, provides a powerful diagnostic and drug discovery tool.

One aspect of the present invention concerns improvements in methods of attaching a biomolecule to a solid support through a chemical linker, while retaining the biological functions of that molecule, particularly in the case of a capture protein or an antibody fragment.

I. Substrate/Support

The microarrays of the present invention are formed upon a substrate or support. Although the characteristics of these substrates may vary widely depending upon the intended use, the basic considerations regarding the shape, material and surface modification of the substrates are described below.

A. Shape

The substrates of the invention may be formed in essentially any shape. Although it is preferred that the substrate has at least one surface which is substantially planar or flat, it may also include indentations, protuberances, steps, ridges, terraces and the like. The substrate can be in the form of a sheet, a disc, a tubing, a cone, a sphere, a concave surface, a convex surface, a

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 6 -

strand, a string, or a combination of any of these and other geometric forms. One can also combine several substrate surfaces to make use of the invention. One example would be to sandwich analyte-containing samples between two flat substrate surfaces with microarrays formed on both surfaces according to the invention.

5 B. Material

Various materials, organic or inorganic or a combination of both, can be used as support for this invention. Suitable substrate materials include, but are not limited to, glasses, ceramics, plastics, metals, alloys, carbon, papers, agarose, silica, quartz, cellulose, polyacrylamide, polyamide, and gelatin, as well as other polymer supports, other solid-material supports, or
 10 flexible membrane supports. Polymers that may be used as substrate include, but are not limited to: polystyrene; poly(tetra)fluoroethylene (PTFE); polyvinylidenedifluoride; polycarbonate; polymethylmethacrylate; polyvinylethylene; polyethyleneimine; polyoxymethylene (POM); polyvinylphenol; polylactides; polymethacrylimide (PMI); polyalkenesulfone (PAS); polypropylene; polyethylene; polyhydroxyethylmethacrylate (HEMA); polydimethylsiloxane;
 15 polyacrylamide; polyimide; and various block co-polymers. The substrate can also comprise a combination of materials, whether water-permeable or not, in multi-layer configurations. A preferred embodiment of the substrate is a plain 2.5 cm x 7.5 cm glass slide with surface Si-OH functionalities.

C. Surface Preparation/Reactive Groups

20 In order to allow attachment by a linker or directly by a binding element, the surface of the substrate may need to undergo initial preparation in order to create suitable reactive groups. Such reactive groups could include simple chemical moieties such as amino, hydroxyl, carboxyl, carboxylate, aldehyde, ester, ether (e.g. thio-ether), amide, amine, nitrile, vinyl, sulfide, sulfonyl, phosphoryl, or similarly chemically reactive groups. Alternatively, reactive groups may
 25 comprise more complex moieties that include, but are not limited to, maleimide, N-hydroxysuccinimide, sulfo-N-hydroxysuccinimide, nitrilotriacetic acid, activated hydroxyl, haloacetyl (e.g., bromoacetyl, iodoacetyl), activated carboxyl, hydrazide, epoxy, aziridine, sulfonylchloride, trifluoromethyldiaziridine, pyridyldisulfide, N-acyl-imidazole, imidazolecarbamate, vinylsulfone, succinimidylcarbonate, arylazide, anhydride, diazoacetate,
 30 benzophenone, isothiocyanate, isocyanate, imidoester, fluorobenzene, biotin and avidin. Techniques of placing such reactive groups on a substrate by mechanical, physical, electrical or

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 7 -

chemical means are well known in the art, such as described by U.S. Pat. No. 4,681,870, incorporated herein by reference.

To achieve high-density arrays, it may be necessary to "pack" the support surface with reactive groups to a higher density. One preferred method in the case of a glass surface is to first
5 "strip" the surface with reagents such as a strong acid, and then to apply or reapply reactive groups to the surface.

In the case of a glass surface, the reactive groups can be silanes, Si-OH, silicon oxide, silicon nitride, primary amines or aldehyde groups. Slides treated with an aldehyde-containing silane reagent are preferred in immobilizing many binding elements and are commercially
10 available from TeleChem International (Cupertino, CA) under the trade name "SuperAldehyde Substrates." The aldehyde groups on the surface of these slides react readily with primary amines on proteins to form a Schiff base linkage. Since typical proteins display many lysine residues on their surfaces, as well as the generally more reactive α -amines at their N-termini, they can attach to the slide in a variety of orientations, permitting different sides of the protein to
15 interact with other proteins or small molecules in solution. After arraying binding elements such as proteins onto these aldehyde slides, a buffer containing bovine serum albumin (BSA) may be applied to the slide to block later non-specific binding between analytes and unreacted aldehyde groups on the slide.

II. Linkers

20 Once the initial preparation of reactive groups on the substrate is completed (if necessary), linker molecules optionally may be added to the surface of the substrate to make it suitable for further attachment chemistry.

As used herein, the term "linker" means a chemical moiety which covalently joins the reactive groups already on the substrate and the binding element to be eventually immobilized,
25 having a backbone of chemical bonds forming a continuous connection between the reactive groups on the substrate and the binding elements, and having a plurality of freely rotating bonds along that backbone. Linkers may be selected from any suitable class of compounds and may comprise polymers or copolymers of organic acids, aldehydes, alcohols, thiols, amines and the like. For example, polymers or copolymers of hydroxy-, amino-, or di-carboxylic acids, such as
30 glycolic acid, lactic acid, sebacic acid, or sarcosine may be employed. Alternatively, polymers or copolymers of saturated or unsaturated hydrocarbons such as ethylene glycol, propylene glycol, saccharides, and the like may be employed. Preferably, the linker should be of an appropriate

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 8 -

length that allows the binding element, which is to be attached, to interact freely with molecules in a sample solution and to form effective binding.

The linker in the present invention comprises at least two reactive groups with the first to bind the substrate and the second to bind the binding element. The two reactive groups may be of the same chemical moiety. The at least two reactive groups of linkers may include any of the chemical moieties described above of reactive groups on the substrate. And one preferred second group comprises a maleimide group. Another preferred embodiment for a linker's second group is a vinyl sulfone group. It is believed that the hydrophilicity of these groups helps limit nonspecific binding by analytes such as proteins when further assay is conducted in an aqueous buffer.

Methods for binding the linker to the surface of the substrate will vary depending on the reactive groups already on the substrate and the linker selected, and will vary as considered appropriate by one skilled in the art. For example, siloxane bonds may be formed via reactions between the trichlorosilyl or trisalkoxy groups of a linker and the hydroxyl groups on the support surface.

The linkers may be either branched or unbranched, but this and other structural attributes of the linker should not interfere stereochemically with relevant functions of the binding elements, such as a ligand-antiligand interaction.

Protection groups, known to those skilled in the art, may be used to prevent linker's end groups from undesired or premature reactions. For instance, U.S. Pat. No. 5,412,087, incorporated herein by reference, describes the use of photo-removable protection groups on a linker's thiol group.

In a preferred embodiment, the linker comprises a BSA molecule. An example of such an embodiment is a BSA-NHS slide suitable for making microarrays. Although appropriate for some applications, slides functionalized with aldehyde groups, further blocked with BSA, are not suitable when peptides or small proteins are arrayed, presumably because the BSA obscures the molecules of interest. For such applications, BSA-NHS slides are preferred. Figures 1A and 1B illustrate a method of making such a slide. First, a molecular monolayer of BSA is attached to the surface of a glass slide. Specifically shown in Fig. 1A, a glass slide **10** with hydroxyl groups is silanated with aminopropyl triethoxy silane (step 1) before being activated with *N,N'*-disuccinimidyl carbonate (step 2). The activated amino group on the slide in turn forms covalent bonds with linker **20**, which is BSA (step 3). Then, the surface of the BSA is activated with

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 9 -

N,N'-disuccinimidyl carbonate (step 4), resulting in activated carbamate and ester, such as a *N*-hydroxy succinimide (NHS) group. Referring to FIG. 1B, the activated lysine, aspartate, and glutamate residues on the BSA react readily with the surface amines on the binding element **30**, which is a capture protein here (step 5) to form covalent urea or amide linkages. Any remaining reactive groups on BSA are subsequently quenched with glycine (step 6). The result is a binding element **30** (a capture protein here) immobilized to a support **10** through a linker **20** (a BSA molecule here). In contrast to the BSA-blocked slides with aldehyde functionality, proteins or peptides arrayed on BSA-NHS substrates are displayed on top of the BSA monolayer, rendering them accessible to macromolecules in solution.

10 III. Binding Elements

The binding elements of the present invention may be chosen from any of a variety of different types of naturally occurring or synthetic molecules, including those having biological significance ("biomolecules").

For example, the binding elements may include naturally occurring molecules or molecule fragments such as nucleic acids, nucleic acid analogs (e.g., peptide nucleic acid), polysaccharides, phospholipids, capture proteins including glycoproteins, peptides, enzymes, cellular receptors, and immunoglobulins (e.g., antibodies, antibody fragments,) antigens, naturally occurring ligands, other polymers, and combinations of any of the above. And it is also contemplated that natural product-like compounds, generated by standard chemical synthesis or from split-and-pool library or parallel syntheses, may be utilized as binding elements.

20 A. Antibodies and Antibody Fragments

Antibodies and antibody fragments are preferred candidates for binding elements. These include antigen-binding fragments (Fabs), Fab' fragments, pepsin fragments (F(ab')₂ fragments), scFv, Fv fragments, single-domain antibodies, dsFvs, Fd fragments, and diabodies, as well as full-length polyclonal or monoclonal antibodies. Antibody-like fragments, such as modified fibronectin, CTL-A4, and T cell receptors are contemplated here as well. Once the microarray has been formed, the antigen binding domains of the antibodies or antibody fragments may be utilized to screen for molecules with the specific antigenic determinants recognized by the antibodies or antibody fragments.

30 In a preferred embodiment, to study cellular translocation events and cell surface expression, phage-displayed scFv that trigger cell internalization of a surface receptor can be directly selected from large non-immune phage libraries by recovering and amplifying phage

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 10 -

particles from within the cells. See Becerril et al. (1999), Biochem Biophys Res Commun. 255(2): 386-93, the entire disclosure of which is incorporated by reference herein.

B. Receptors

Naturally occurring biological receptors, or synthetically or recombinantly modified variants of such receptors, also may be used as the binding elements of the invention. Classes of receptors that can be used as binding elements include extracellular matrix receptors, cell-surface receptors and intracellular receptors. Specific examples of receptors include fibronectin receptors, fibrinogen receptors, mannose 6-phosphate receptors, erb-B2 receptors, and EGF (epidermal growth factor) receptors.

C. Receptor Ligands

Similarly, naturally occurring biological receptor ligands, or synthetically or recombinantly modified variants of such ligands, also may be used as binding elements to screen for their specific binding partners, or for other, non-natural binding partners. Classes of such ligands include hormones, growth factors, neurotransmitters, antigens and can be phage-displayed.

D. Modifications for Coupling to Substrate/Linkers

As will be apparent to those of skill in the art, the binding elements may be modified in order to facilitate attachment, through covalent or non-covalent bonds, to the reactive groups on the surface of the substrate, or to the second reactive groups of a linker attached to the substrate. As examples of such modifications, nucleophilic S-, N- and O- containing groups may be added to facilitate attachment of the binding element to the solid support via a Michael addition reaction to the linker.

To preserve the binding affinity of an binding element, it is preferred that the binding element is modified so that it binds to the support substrate at a region separate from the region responsible for interacting with the binding element's cognate ligand. If the binding element binds its ligand at a first terminus, attaching the binding element to the support at a second or opposite terminus, or somewhere in between the termini may be such a solution. In a preferred embodiment, where the binding element is an scFv, the present invention provides a modification method such that the scFv can be attached to the surface of a glass slide through binding with an electrophilic linker, such as a maleimide group, without interfering with the scFv's antigen-binding activity. According to this method which is detailed in Example C (i), an scFv is first engineered so that its carboxy-terminus includes a cysteine residue which can then form a

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 11 -

covalent bond with an electrophilic linker such as the maleimide group. Similarly, a binding element's N-terminus can be engineered to include a reactive group for attachment to the support surface.

E. Coupling to Substrates/Linkers

5 Methods of coupling the binding element to the reactive end groups on the surface of the substrate or on the linker include reactions that form linkage such as thioether bonds, disulfide bonds, amide bonds, carbamate bonds, urea linkages, ester bonds, carbonate bonds, ether bonds, hydrazone linkages, Schiff-base linkages, and noncovalent linkages mediated by, for example, ionic or hydrophobic interactions. The form of reaction will depend, of course, upon the available reactive groups on both the substrate/linker and binding element.

10 As discussed in the Examples section below, a Michael addition may be employed to attach compounds to glass slides, and plain glass slides may be derivatized to give surfaces that are densely functionalized with maleimide groups. Compounds containing thiol groups, such as an scFv modified to include a cysteine at the carboxy-terminus, may then be reacted with the maleimides to form a thioether linkage.

IV. Formation of Microarrays

In one aspect, the present invention provides methods for the generation of arrays, including high-density microarrays, of binding elements immobilized on a substrate directly or via a linker. According to the methods of the present invention, extremely high density 20 microarrays, with a density over 100, preferably over 1000, and further preferably over 2000 spots per cm², can be formed by attaching a biomolecule onto a support surface which has been functionalized to create a high density of reactive groups or which has been functionalized by the addition of a high density of linkers bearing reactive groups.

A. Spotting

25 The microarrays of the invention may be produced by a number of means, including "spotting" wherein small amounts of the reactants are dispensed to particular positions on the surface of the substrate. Methods for spotting include, but are not limited to, microfluidics printing, microstamping (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,515,131 and U.S. Pat. No. 5,731,152), microcontact printing (see, e.g., PCT Publication WO 96/29629) and inkjet head printing.

30 Generally, the dispensing device includes calibrating means for controlling the amount of sample deposition, and may also include a structure for moving and positioning the sample in relation to the support surface.

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 12 -

(i) Volume/Spot Size

The volume of fluid to be dispensed per binding element in an array varies with the intended use of the array, and available equipment. Preferably, a volume formed by one dispensation is less than 100 nL, more preferably less than 10 nL, and most preferably about 1 nL.

- 5 The size of the resultant spots will vary as well, and in preferred embodiments these spots are less than 20,000 μm in diameter, more preferably less than 2,000 μm in diameter, and most preferably about 150-200 μm in diameter (to yield about 1600 spots per square centimeter).

(ii) Viscosity Additives

- 10 The size of a spot in an array corresponding to a single binding element spot may be reduced through the addition of media such as glycerol or trehalose that increase the viscosity of the solution, and thereby inhibit the spreading of the solution. Hydrophobic boundaries on a hydrophilic substrate surface can also serve to limit the size of the spots comprising an array.

- Adding a humectant to the solution of the binding element may also effectively prevent the dehydration of the microarrays, once they are created on the surface of the substrate. Because
15 dehydration can result in chemical or stereochemical changes to binding elements, such as oxidation or, in the case of proteins, denaturation, the addition of a humectant can act to preserve and stabilize the microarray and maintain the functionality of binding elements such as scFv. For example, in some preferred embodiments, scFv are coupled to maleimide-derivatized glass in phosphate-buffered saline (PBS) solutions with 40% glycerol. The glycerol helps maintain
20 continued hydration which, in turn, helps to prevent denaturation.

(iii) Blocking Agents

- Solutions of blocking agents may be applied to the microarrays to prevent non-specific binding by reactive groups that have not bound to a binding element. Solutions of bovine serum albumin (BSA), casein, or nonfat milk, for example, may be used as blocking agents to reduce
25 background binding in subsequent assays.

(iv) Robotics

- In preferred embodiments, high-precision, contact-printing robots are used to pick up small volumes of dissolved binding elements from the wells of a microtiter plate and to repetitively deliver approximately 1 nL of the solutions to defined locations on the surfaces of
30 substrates, such as chemically-derivatized glass microscope slides. Examples of such robots include the GMS 417 Arrayer, commercially available from Affymetrix of Santa Clara, CA, and a split pin arrayer constructed according to instructions downloadable from

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 13 -

http://cmgm.stanford.edu/pbrown. The chemically-derivatized glass microscope slides are preferably prepared using custom slide-sized reaction vessels that enable the uniform application of solution to one face of the slide as shown and discussed in the Examples section. This results in the formation of microscopic spots of compounds on the slides. It will be appreciated by one of ordinary skill in the art, however, that the current invention is not limited to the delivery of 1 nL volumes of solution, to the use of particular robotic devices, or to the use of chemically derivatized glass slides, and that alternative means of delivery can be used that are capable of delivering picoliter or smaller volumes. Hence, in addition to a high precision array robot, other means for delivering the compounds can be used, including, but not limited to, ink jet printers, piezoelectric printers, and small volume pipetting robots.

B. In Situ Photochemistry

In forming arrays or microarrays of molecules on the surface of a substrate, in situ photochemistry maybe used in combination with photoactivatable reactive groups, which may be present on the surface of the substrate, on linkers, or on binding elements. Such photoactivatable groups are well known in the art.

C. Labeling

Binding elements may be tagged with fluorescent, radioactive, chromatic and other physical or chemical labels or epitopes. For certain preferred embodiments where quantified labeling is possible, this yields great advantage for later assays.

In a preferred embodiment, a fluorescent dye containing a hydrophilic polymer moiety such as polyethyleneglycol is used.

V. Samples for Assays

Upon formation of microarrays of binding elements on the solid support, large quantities of samples may be applied to the support surface for binding assays. Examples of such samples are as follows:

A. Body Fluids/Tissue and Biopsy Samples

Samples to be assayed using the microarrays of the present invention may be drawn from various physiological, environmental or artificial sources. In particular, physiological samples such as body fluids of a patient or an organism may be used as assay samples. Such fluids include, but are not limited to, saliva, mucous, sweat, whole blood, serum, urine, genital fluids, fecal material, marrow, plasma, spinal fluid, pericardial fluids, gastric fluids, abdominal fluids, peritoneal fluids, pleural fluids and extraction from other body parts, and secretion from other

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 14 -

glands. Alternatively, biological samples drawn from cells grown in culture may be employed. Such samples include supernatants, whole cell lysates, or cell fractions obtained by lysis and fractionation of cellular material.

B. Cell Extracts

5 Extracts of cells and fractions thereof, including those directly from a biological entity and those grown in an artificial environment, can also be used to screen for molecules in the lysates that bind to a particular binding element.

C. Normal v. Diseased Samples

10 Any of the above-described samples may be derived from cell populations from a normal or diseased biological entity.

D. Treated v. Untreated Samples

Any of the above-described samples may be derived from cell populations which have or have not been treated with compounds or other treatments which are believed or suspected of being either deleterious or beneficial, and differences between the treated and untreated
15 populations may be used to assess the effects of the treatment.

E. Labeling

Specific molecules in a given sample may be modified to enable later detection by using techniques known to one of ordinary skill in the art, such as using fluorescent, radioactive, chromatic and other physical or chemical labels. In a preferred embodiment, a fluorescent dye
20 containing a hydrophilic polymer moiety such as polyethyleneglycol (e.g. fluorescein-PEG2000-NHS) is used. Labeling can be accomplished through direct labeling of analytes in the sample, or through labeling of an affinity tag that recognizes an analyte (indirect labeling). Direct labeling of sample analytes with different fluorescent dyes makes it possible to conduct multiple assays from the same spot (e.g., measuring target protein's expression level and phosphorylation level).
25 When the analyte is a phage-displayed ligand, the phage may be pre-labeled for detecting binding between the ligand and the microarray of binding elements.

Under the direct-labeling approach, sample over-labeling has long been recognized as a serious problem. Over-labeling of proteins can cause aggregation of protein conjugate, which tends to result in non-specific staining; it can also reduce antibody's specificity for its antigen by
30 disrupting antibody's epitope-recognition function, causing loss of signal. It is well known in the art that, to mitigate over-labeling, one need to either shorten reaction time for the labeling process or increase substrate:label ratio. A solution to over-labeling is to first digest a whole

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 15 -

protein into peptides and then label the termini of the peptides, which avoids labeling any internal epitopes. Accordingly, the labeling process may proceed to completion without one having to worry about over-labeling and thus giving a researcher more complete control over the labeling process. Moreover, if the potential labeling sites on a peptide is known, it is possible to quantify labeled peptide once the peptide is captured through affinity reagents that recognize an internal epitope. An application of this method would be to quantify labeled peptides digested from whole proteins in cell extracts for quantitative analysis of protein expression levels.

In a preferred embodiment, whole proteins are digested with trypsin before subjected to labeling by a succinimidyl ester dye such as Cy3, Cy5 or an Alexa dye. A succinimidyl ester dye labels primary amines, such as the one in lysine. Trypsin cleaves after lysines and generates peptides with lysines at their C-terminus. Therefore, peptides resulting from trypsin digestion fall into two categories: those without lysine and having a primary amine at the N-terminus, and those with a lysine at the C-terminus and hence primary amines at both termini. None of the peptide would have any internal lysine. As a result, a succinimidyl ester dye will only label tryptic peptides at their termini without labeling any internal epitope.

In an alternative embodiment, one may use a protease other than trypsin to digest a whole protein and still use a succinimidyl ester dye for labeling as long as the peptide to be captured does not contain an internal lysine. That way, labeling will still only occur at a terminus of the selected peptide. Such a peptide may be used as a preferential panning peptide. To take advantage of a preferential panning peptide, an immunoglobulin is first raised against the peptide. Second, a sample, e.g., from a whole cell lysate, is digested with a protease or a combination of proteases that will generate that specific panning peptide, resulting in a library of peptides. These peptides are then labeled to completion with a succinimidyl ester dye. A large excess of reactive labeling reagent may be used to ensure complete labeling of the non-lysine containing peptide. Then, the labeled peptides are applied to the immunoglobulin for capture.

Because the amount of labeling on a preferential panning peptide is known, one can quantify the amount of such peptide in a given sample through the amount of label signals detected after affinity capture. Once the number of such panning peptides resulting from the protease digestion of one target protein is known, that number can be easily translated into the amount of the target protein in the sample. Amino acids other than lysine can also be targeted for use with this method. For example, proteins with limited number of natural or added cysteine may be selected or constructed to be labeled, via a reduced thiol with maleimide-coupled dye

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 16 -

such as maleimide-coupled Alexa 488 (commercially available from Molecular Probes of Eugene, Oregon).

Indirect labeling of an antigen-analyte may be achieved by using a second antibody or antibody fragment that has been labeled for subsequent detection (e.g., with radioactive atoms, fluorescent molecules) in a sandwiched fashion. In a preferred embodiment, an antigen that binds to a microarray of antibodies is detected through a second fluorescently labeled antibody to the antigen, obviating the need for labeling the antigen. In a further preferred embodiment, the second antibody is a labeled phage particle that displays an antibody fragment. Standard phage display technology using phages such as M13 may be used to produce phage antibodies including antibody fragments such as scFv. This allows relatively easy and fast production of reagents for sandwich detection from phage display antibody libraries. To ensure that the phage antibodies recognize an epitope different from the one that the immobilized capture antibody recognizes on the antigen, selection from phage display libraries may be carried out in the following way: (1) tubes are coated with the same antibody that is immobilized in microarray for capture purpose, (2) the tube is blocked and the antigen is added and captured by the coated antibody, (3) after washing, phage antibody libraries may be panned in the tubes. The isolated phage antibodies (or polyclonal phage antibody) will only bind epitopes distinct from the epitope the capture antibody recognizes, and are thus ideal for the sandwich detection approach.

F. Contact time

Binding assays can be performed by exposing samples to the surface prepared according to methods described above. Such a surface is first exposed to a sample solution and then incubated for a period of time appropriate for each specific assay, which largely depends on the time needed for the expected binding reactions. This process can be repeated to apply multiple samples either simultaneously or sequentially. Sequential application of multiple samples generally requires washes in between.

VI. Binding Assays

A surface prepared according to the methods described above can be used to screen for molecules in a sample that have high affinity for the binding elements attached to the surface. Specific binding may be detected and measured in a number of different ways, depending on the way the target molecules in the sample are labeled, if at all. A common example is to use the

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 17 -

technique of autoradiography to detect binding of molecules pre-labeled with radioactive isotopes.

In a preferred embodiment, fluorescent dyes (CY5) were used to label proteins in a given sample before the sample was applied to a slide surface printed with microarrays of functional scFv. After incubation and washes, the slide surface was then dried and imaged on a molecular dynamics STORM or ArrayWorx™ optical reader from Applied Precision of Seattle, WA.

In another preferred embodiment, secondary antibodies labeled with fluorochromes such as CY3 were used for later detection of a primary antibody participating in the binding.

Various detection methods known in the art such as mass spectrometry, surface plasmon resonance, and optical spectroscopy, to name a few, can be used in this invention to allow detection of binding even if binding targets are not labeled at all.

VII. Analysis of Assay Results

A. Detecting Presence/Absence in Samples

This invention can be used to confirm the presence or the absence, in a biological sample, of a binding partner to a molecule of interest.

B. Determining Ratios Between Samples

Ratios of gene and protein expression in different cell populations, such as between a normal and a diseased state, can be calculated for comparison.

VIII. Applications/Utilities

Because the molecules of biological significance that can be studied by this invention include, but are not limited to, those involved in signal transduction, apoptosis, dimerization, gene regulation, cell cycle and cell cycle checkpoints, and DNA damage checkpoints, the present invention has broad applications in the research of biological sciences and medicine.

As will also be appreciated by one of ordinary skill in the art, protein arrays may also be useful in detecting interactions between the proteins and alternate classes of molecules other than biological macromolecules. For example, the arrays of the present invention may also be useful in the fields of catalysis, materials research, information storage, separation sciences, to name a few.

A. Target Discovery

It will be appreciated by one of ordinary skill in the art that the generation of arrays of proteins having extremely high spatial densities facilitates the detection of binding and/or

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 18 -

activation events occurring between proteins of a defined set and biological macromolecules.

Thus, the present invention provides, in one aspect, a method for identifying molecular partners and discovering binding targets for macromolecules of biological significance. The partners may be proteins that bind to particular macromolecules of interest and are capable of activating or inhibiting the biological macromolecules of interest. In general, this method involves (1) providing an array of one or more proteins, as described above, wherein the array of proteins has a density of at least 1,000 spots per cm² (2) contacting the array with one or more types of biological macromolecules of interest; and (3) determining the interaction between specific proteins and macromolecule partners.

In a particularly preferred embodiment the inventive arrays are utilized to identify compounds for chemical genetic research. In classical genetics, either inactivating (e.g., deletion or "knock-out") or activating (e.g., oncogenic) mutations in DNA sequences are used to study the function of the proteins that are encoded by these genes. Chemical genetics instead involves the use of small molecules that alter the function of proteins to which they bind, thus either inactivating or activating protein function. This, of course, is the basis of action of most currently approved small molecule drugs. The present invention involved the development of "chip-like" technology to enable the rapid detection of interactions between small molecules and specific proteins of interest. The methods and composition of the present invention can be used to identify small molecule ligands for use in chemical genetic research. One of ordinary skill in the art will realize that the inventive compositions and methods can be utilized for other purposes that require a high density protein format.

B. Signal Transduction

Another preferred embodiment of the binding assays performed in this invention is to study modulation of protein-protein interaction by small molecules. These assays measure either the facilitation or competition for cognate binding by different molecules in order to help understand aspects of binding dynamics under varying conditions. In an exemplary embodiment, a capture protein is attached on a support surface in microarray, cognate ligands are added to bind to the capture protein. The binding between the capture protein and its cognate ligand is monitored and compared in the presence or absence of a small molecule that may be a drug candidate. In a preferred embodiment, various capture proteins's interaction with various ligands affected by various small molecules are investigated in a multi-plex fashion on a microarray chip.

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 19 -

Protein interactions often occur through domains that are sometimes called binding motifs. It is in these regions that small molecules that are effective at regulating protein interactions are most likely to work. However, proteins within a family tend to share homologous sequences that contribute to forming binding motifs and proteins that contain these motifs often have similar functions. A problem in screening for drugs that regulate such protein functions is obtaining specificity in these screens as the targets among the binding motif family of proteins are similar in structure, and have similar binding features. The protein microarray technology disclosed here permits efficient and easily repeatable steps for determine specificity of small molecules for regulating large numbers of motif-containing protein family members, and will greatly facilitate the process of drug screening.

In an exemplary embodiment, regulation of the Bcl-2 family, known to affect cell apoptosis, is studied. These proteins share homology to combinations of four Bcl-2 homology regions (BH1-4). The Bcl-2 family proteins function to either protect cells against apoptosis or to promote apoptosis by regulating membrane behavior and ion channel function at the mitochondria and the endoplasmic reticulum. The anti-apoptotic family members, Bcl-2, Bcl-XL, and Mcl-1 contain all four domains. The largest group of pro-apoptotic members, Bad, Bik, Bid, Bag-1, HRK, and Noxa contain only BH-3 domains, while pro-apoptotic proteins Bax and (Multidomain pro-apoptotic proteins) contain BH-1, BH-2, and BH-3 domains.

Methods of the invention can be used to screen for small molecules that regulate the function of an entire family of apoptosis-regulating proteins. Such a small molecule may mimic the function of a BH-3 protein and serve as a drug candidate. Referring to FIG. 3A and 3B, recombinant fusion proteins from the Bcl-2 family of apoptosis regulating proteins may be prepared by standard methods and printed in microarrays as binding element **30** on either BSA-NHS glass slides or an aldehyde derivatised glass slide **10** as described earlier through a linker **20**. Ligands **80** for these proteins such as a full length Bcl-XL protein may be added in the absence or presence of a small molecule **90** such as a BH-3 containing peptide from the Bcl-2 family protein BAK or a small molecule that mimics a BH-3 containing peptide. The ligand **80** may be labeled with a fluorescent dye (e.g. CY5). Concentration of the printed proteins, the ligands, or the small molecule may be varied, by itself or in combinations with others. The slides may then be read using an optical reader such as the Arrayworx scanner and/or confirmed through mass spectrometry using commercially available mass spectrometry chips. The increase or decrease in the signal obtained from bound ligand can be used to chart the regulatory roles of

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 20 -

the small molecule, whether it is up-regulatory or down-regulatory. Using the method of the invention, multiple capture molecules, multiple ligands and multiple small molecules can be screened side by side on a single array support (e.g. a 96 well plate), greatly increasing efficiency in drug screening. A more detailed example can be found in the Example Section E (iii).

5 Another example of the invention's application in studying signal transduction is to screen for small molecules that inhibit protein-protein binding in the apoptotic pathway through the BH-4 region of multidomain-containing BCL-2 family members.

C. Protein Expression

To date, there are no published reports on microarray-based detection of proteins in
10 labeled cell extracts. Labeling and detection of cell surface proteins would allow parallel profiling of multiple cell surface antigens. State of the art in cell surface molecule profiling is by flow cytometry or fluorescence microscopy, currently allowing 2-5 different antigens to be profiled in a single sample. Antibody arrays in theory allow the detection of an unlimited number of antigens. Furthermore, antibody arrays have the potential for detecting intracellular proteins
15 and protein modifications such as phosphorylation in parallel with expression.

In an exemplary embodiment, monoclonal antibodies to cell surface proteins such as c-ErbB2, EGFR, and transferrin receptor are arrayed on a BSA-NHS slide by a GMS 417 arrayer. Live cells from a cancerous cell line such as the epidermoid carcinoma cell line A-431 or breast cancer cell line SK-BR-3 may be used as sample cells. Cell surface proteins are preferably
20 labeled with a dye that contains a hydrophilic polymer moiety such as a polyethyleneglycol, which has shown good specificity, low background, and does not label proteins inside cells. An example of such a dye is fluorescein-PEG2000-NHS dye available from Shearwater. Following labeling and wash, cells are lysed (e.g., in SDS). Total labeled proteins are then incubated on the antibody microarray for binding to occur before the slides are scanned by an optical reader. As a
25 result, it was confirmed that the A-431 cell line over-expresses EGFR but not ErbB2. Likewise, it was confirmed that the SK-BR-3 cell line over-expresses ErbB2, but not EGFR.

D. Post-translational Modification

Protein function is often regulated by post-translational modifications such as the addition of sugar complexes, lipid anchors such as provided by myristoylation, geranyl-geranylation or
30 farnesylation, or by phosphorylation to mention a few. The regulation of protein function by phosphorylation or dephosphorylation is central in cell signal transduction.

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 21 -

Methods of the present invention can be used to study post-translational events or to identify phosphorylation sites. In a preferred embodiment, antibody fragments such as scFv are printed on Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) chips for detecting phosphorylation of known and suspected phosphorylation sites in proteins. Coupling proteins to reactive surface MALDI mass spectrometry surfaces was described in U.S. Patent 6,020,208, and incorporated herein by reference. The chip is commercially available from Ciphergen Biosystems, Fremont, CA. In an exemplary embodiment, phosphospecific antibodies against the apoptotic proteins Bcl-2, Bad, and caspase 9 are coupled to reactive surface MALDI chips, and are used for selective capture of phosphorylated fragments of these proteins. The chip can be analyzed for mass using time of flight mass spectrometry.

Methods of the present invention further provide a new way to detect the occurrence of a phosphorylation event on a known or unknown phospho-accepting residue using recombinant single chain antibodies (scFv) coupled with mass spectrometry. This method has been termed proximal phospho-affinity mapping, and serves as an alternative method that does not rely on the use of IMAC or the use of phospho-specific antibodies, which are notoriously difficult to make.

Referring to FIG. 2, an embodiment of this method uses recombinant single chain antibodies (scFv), polyclonal, or monoclonal antibodies **30** that are designed to recognize, instead of a phosphorylation site **70** itself, an epitope **50** on the same antigen that is in proximity to the phosphorylation site **70**, whether site **70** is confirmed or just suspected for phosphorylation. The epitope **50** may be as close as 5-10 amino acids away, as long as the distance between the epitope **50** and the phosphorylation site **70** is such that antibody recognition is not hindered by a phosphorylation event. Such an antibody or antibody fragment **30**, which is coupled to a support surface **10** through a linker **20**, will recognize the antigen **60** (e.g. a tryptic peptide) whether or not the antigen is phosphorylated. In an exemplary embodiment, peptides are generated using proteases such as trypsin or V8, or by non-enzymatic methods, such as CNBr. This yields peptide fragments that can be identified by their unique sizes. Among these fragments are the target fragments **60** that contain known or predicted phosphorylation sites. Single chain antibodies or traditional antibodies are panned or immunized against synthetic peptides that correspond to an epitope region **50** that is close to the phosphorylation site **70** in the tryptic fragment **60** using standard panning procedures. The epitope **50** may consist of as few as 3-7 amino acids. The antibody or antibody fragment that are generated may be used as capture molecule coupled to MALDI reactive chips. The chips may then be used to detect characteristic

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 22 -

mass shift indicative of phosphorylation. Since this method enables parallel purification/identification and analysis of phosphorylation, it offers a valuable detection tool for phosphorylation screening. And because the antibody or antibody fragment generated according to this method recognizes the target peptide in both the phosphorylated and unphosphorylated state, this method is also useful in studying events and conditions that affect phosphorylation.

In a particularly preferred embodiment, the peptide 60 is selected in the following way: first, kinase substrate consensus sequences are located in the target protein through searches conducted in a database that contains protein sequence information. Then, a peptide containing such consensus sequence is selected through comparing the digestion maps of various proteases-- peptides of about 20 amino acids are preferred. Last, an epitope other than the kinase substrate consensus sequences on the selected peptide is chosen for raising an antibody or antibody fragment.

E. Cellular Organelle

Methods of the invention can also be used to capture cellular organelles from whole cell extracts or from fractions of whole cell extracts. In a preferred embodiment, an antibody that recognizes a voltage dependent anion channel ("VDAC") receptor uniquely associated with the mitochondrial membrane is printed as described earlier to capture Green Fluorescent-coupled cytochrome C expressing mitochondria. Dyes that have potentiometric quality can be used to specifically label mitochondria that have intact voltage gradient. The detection of captured mitochondria or other organelles from cells at different states can be used to indicate occurrence of apoptosis or other cellular events.

F. Others

Methods of the invention may also be used for other applications such as tissue typing, disease diagnosis, and evaluation of therapeutics. Biological samples from patients that may reveal genetic disorders (PCT patent publication No. 89/11548, incorporated herein by reference), may be used in the present invention. Likewise, this invention can be used to detect abnormality in protein expressions, the existence of antigens or toxins in a given sample. Further, methods of the invention can also be used to evaluate responses from organisms, tissues or individual cells to exposure to drugs, pharmaceutical lead compounds, or changes in environmental factors.

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 23 -

EXAMPLESA. Substrate Surface Preparation(i) Method of stripping glass slide and re-packing with reactive groups

An example of this preferred method is as follows: first, a plain glass slide (VWR Scientific Products, for instance) is cleaned in a piranha solution (70:30 v/v mixture of concentrated H_2SO_4 and 30% H_2O_2) for 12 hours at room temperature. (Caution: "piranha" solution reacts violently with several organic materials and should be handled with extreme care). After thorough rinsing with water, the slides is treated with a silane solution, such as a 3% solution of 3-aminopropyltriethoxysilane in 95% ethanol. And before treating the slides, the silane solution may be stirred for at least 10 minutes to allow hydrolysis and silanol formation. The slide is then briefly dipped in ethanol or like solutions and centrifuged to remove excess silanol. The adsorbed silane layer is then cured (e.g., one hour at 115°C). After cooling, the slide is washed in ethanol or like solutions to remove uncoupled reagent.

A simple, semi-quantitative method can be used to verify the presence of amino groups on the slide surface. An amino-derivatized slide is washed briefly with 5 mL of 50 mM sodium bicarbonate, pH 8.5. The slide can then be dipped in 5 mL of 50 mM sodium bicarbonate, pH 8.5 containing 0.1 mM sulfo-succinimidyl-4-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrate (s-SDTB; Pierce, Rockford, IL) and shaken vigorously for 30 minutes. (The s-SDTB solution may be prepared by dissolving 3.03 mg of a s-SDTB in 1 mL of DMF and diluting to 50 mL with 50 mM sodium bicarbonate, pH 8.5). After a 30-minute incubation, the slide can then be washed with 20 mL of distilled water and subsequently treated with 5 mL of 30% perchloric acid. The development of an orange-colored solution will indicate that the slide has been successfully derivatized with amines; no color change has been seen for untreated glass slides. Quantitation of the 4,4'-dimethoxytrityl cation ($E_{498\text{nm}}=70,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) released by the acid treatment has indicated an approximate density of 2 amino groups per nm^2 .

B. Addition of Linkers to Substrates(i) BSA as linker

BSA-NHS slides, displaying activated amino and carboxyl groups on the surface of an immobilized layer of bovine serum albumin (BSA), were fabricated as follows: 10.24 g *N,N'*-disuccinimidyl carbonate (100 mM) and 6.96 ml *N,N'*-diisopropylethylamine (100 mM) were dissolved in 400 ml anhydrous *N,N*-dimethylformamide (DMF). Thirty polylysine slides, such as CMT-GAP slides (Corning Incorporated, Corning, NY), displaying amino groups on their

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 24 -

surface, were immersed in this solution for 3 hr at room temperature. These slides were rinsed twice with 95% ethanol and then immersed in 400 ml of phosphate buffered saline (PBS), pH 7.5 containing 1% BSA (w/v) for 12 hr at room temperature. Slides were further rinsed twice with ddH₂O, twice with 95% ethanol, and centrifuged at 200 g for 1 min to remove excess solvent.

- 5 Slides were then immersed in 400 ml DMF containing 100 mM *N,N'*-disuccinimidyl carbonate and 100 mM *N,N*-diisopropylethylamine for 3 hr at room temperature. Slides were rinsed four times with 95% ethanol and centrifuged as above to yield BSA-NHS slides. Slides were stored in a desiccator under vacuum at room temperature for up to two months without noticeable loss of activity.

10 (ii) A maleimide group as linker

Maleimide-derivatised slides were manufactured as follows: after the surface of a plain glass slide was "packed" (re-silanated, for instance) as described in the Example A(i), the resulting slides were transferred to slide-sized polydimethylsiloxane (PDMS) reaction vessels. One face of each slide was treated with 20 mM *N*-succinimidyl 3-maleimido propionate in 50 mM sodium bicarbonate buffer, pH 8.5, for three hours. (This solution was prepared by dissolving the *N*-succinimidyl 3-maleimido propionate in DMF and then diluting 10-fold with buffer). After incubation, the plates were washed several times with distilled water, dried by centrifugation, and stored at room temperature under vacuum until further use. The resulting slide surface was equipped with a maleimide end.

20 C. Preparation of Binding Elements

(i) Production and purification of cysteine-tagged scFv

The scFv C6.5 binds to the extracellular region of the human tumor antigen c-erbB-2 with a K_d of 1.6×10^{-10} M. This antibody was isolated using affinity driven selection as described in Schier et al. (1996), *J. Mol. Biol.* 255(1):28-43.

- 25 The gene for the scFv C6.5 was then subcloned into a pUC-119-(Hexa-His)-Cys expression vector, which results in the addition of a hexa-His tag followed by a single cysteine to the COOH-terminus of the scFv. The protein was expressed and purified using immobilized metal affinity chromatography (IMAC). Binding affinity mutants of C6.5 were made by mutagenizing the complementary binding region (CDR), and the affinity constants of the derivative mutants [C6.5ML 3-4 (K_d= 3.4×10^{-9}) and C6.5G98 (K_d= 1.6×10^{-9})], were determined using BiaCore (described in Schier et al 1996b). The cysteine tagged scFv C6.5, C6.5ML3-4, and C6.5 G98. were used to demonstrate ligand capture by scFv which have been chemically

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 25 -

coupled to glass surfaces. The reduced sulphhydryl of the COOH terminal cysteine of these scFv yields a thiol that can be used to couple the scFv to glass surfaces that have been functionalized with maleimide groups.

(ii) Reducing an scFv for conjugation to a maleimide linker

- 5 Purified scFv were reduced with 5mM cysteamine (SIGMA) for 1 hour at 25°C and exchanged into phosphate buffered saline(PBS), pH7.0 using a P10 spin column.

D. Assays Employing Microarrays

(i) Scanning slides for fluorescence

- 10 Slides were scanned using an Array WoRox™ slide scanner (AppliedPrecision, Issaquah, WA). Slides were scanned at a resolution of 5 µm per pixel. Double filters were employed for both the incident and emitted light. Fluorescein fluorescence was observed using a FITC/FITC excitation/emission filter set, Cy3 fluorescence was observed using a Cy3/Cy3 excitation/emission filter set, and Cy5 fluorescence was observed using a Cy5/Cy5 excitation/emission filter set.

15 E. Applications of Microarrays

(i) Affinity capture of labeled peptides on scFv modified glass surfaces.

- Steady state trypsin cleavage of cell surface proteins was performed on SKBR3 (human breast carcinoma) or SKOV3 cells at 4°C using TPCK-treated trypsin. Tryptic digests were examined using MALDI mass spectrometry, which is shown in FIG. 4A for SKOV3 cells. About
20 0.5 µl of the digest was loaded onto a MALDI surface and embedded with matrix consisting of cinnamic acid saturated 50% acetonitrile, 0.5% Trifluor, and acetic acid. Digests were treated with protease inhibitors and incubated with 1 µg of purified 6x His-scFv against the transferrin receptor ecto-domain. The scFv-peptide complex was purified from the digests using Ni-NTA sepharose beads. The beads were washed and then were embedded in cinnamic acid matrix as
25 described above. The matrix eluted peptides were analyzed for mass spectrometry, as shown in FIG. 4B. The epitope containing tryptic peptide was identified using the pepident program from the EXPASY suite. For the control experiment HA-tagged transferrin receptor expressed in CHO cells was immuno-precipitated using anti-HA IgG coupled to sepharose beads. The purified protein was displaced from the beads using HA-peptide and then digested with
30 immobilized TPCK-treated trypsin. The scFv epitope-containing peptide was purified using the H7 scFv and analyzed for mass as above and is shown in FIG. 4C. The transfected transferrin

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 26 -

protein contain an HA epitope sequence on its amino terminal (intracellular domain). This tag serves as a control for extracellular-specific labeling.

Trypsin digests of the purified transferrin receptor and of the cell surface proteins were labeled with the primary amine reactive dye NHS-CY-5 and dialyzed against PBS. The labeled peptides were then diluted to a concentration of 0.2 mg/ml in PBS with 10mg/ml BSA and 0.05% Tween 20 and incubated on the surfaces of glass slides which had been derivatized with the scFv against the transferrin receptor (H7). Incubations were performed overnight in a humidified chamber at 4°C. Binding of CY-5 labeled peptide was determined using a fluorescence scanner. FIG. 4D shows the result of the experiment where the transferrin receptors are shown to bind to the H7 scFv of varying concentrations. Because the HA epitope was on an intracellular domain, the anti-HA IgG serves a negative control here.

(ii) Functionality testing of scFv coupled to maleimide-derivatized glass slides

Spots on a maleimide-derivatized slide surface were outlined with a hydrophobic pen to keep samples from spreading and 1.0µg of scFv reduced as described in Example C (ii) was then allowed to couple to the glass surfaces for 12 hours at 4°C in a humidity chamber. The thiol-containing terminal cysteines readily attach to the maleimide groups, presumably by a thioether linkage. Monoclonal antibodies to cytochrome-c and Bcl-2, and scFv without terminal cysteines were treated with 2-iminothiolane•HCl (Traut's reagent) to introduce sulfhydryl residues at surface-exposed lysines. These antibodies were then reduced as described above and used as controls. After coupling, the spots were rinsed 3X with PBS containing 2% BSA, 0.05% Tween 20, and 1.0 mM β-mercaptoethanol for 15 minutes at 25°C. Cognate ligand or negative control were added to the appropriate spots at concentrations ranging from 10.0 pM to 0.01 pM in PBS containing 2%BSA, 0.05%, Tween-20 and allowed to incubate for 2 hours in a humidity chamber at 4°C.

In some cases, 40% glycerol is added to the spotting mixture to facilitate the microarraying of the scFv's, because the samples will not dry out even when spotted in sub-microliter volumes. For scFv C6.5 and scFv F5, 40% glycerol had no adverse effect on the function of the scFv binding.

The cognate ligand for scFvC6.5 is the purified erbB-2 receptor. The recombinant ectodomain of erbB-2 was expressed and purified from CHO cells using standard techniques. NHS-CY5 monofunctional dye (AMERSHAM) was used to label the protein at a final molar dye/protein ratio of 5.0. The labeling reaction was carried out in 0.1M sodium carbonate buffer

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 27 -

for 30 minutes at 25°C and exchanged into PBS using a P10 spin column. Other proteins used as controls (Bcl-2, cytochrome-c, and BSA) were similarly labeled with CY5 as described. Labeled proteins were examined for immunogenicity by immuno-precipitation either with phage generated antibody or monoclonal antibodies and were then used as ligands to glass coupled scFv. The erbB-2 proteins were incubated in a range of 1 μ M to 1 pM in PBS Tween 20 with 2% BSA for 2 hours at 25°C in a humidity chamber. CY5 labeled erbB2 was used as a negative control.

After incubation, samples were washed 3 X 2 minutes with PBS, 0.05% Tween 20 and 1 X with PBS. Samples were allowed to dry and then imaged on a molecular dynamics STORM using the excitation at 640 nm.

(iii) Small molecules in Signal Transduction

Recombinant fusion proteins from the Bcl-2 family of apoptosis regulating proteins were prepared by standard methods and printed on either BSA-NHS glass slides or an aldehyde derivatised glass slide. Proteins were printed at concentrations ranging from 200 to 20 micrograms per milliliter in a buffer containing 40% glycerol. Printing was performed as described using the GMS 417 ring and pin printer. Plates were loaded with the capture protein samples; 96 well plates for printing with the GMS417 printer. Proteins were allowed to incubate on the reactive slides for 12 hours under slightly hydrated conditions at 4°C. After the binding reaction went to completion the slides were rinsed with PBS and variations of the cognate ligand labeled with fluorescent dyes. Detection was performed using the Arraywrx optical reader.

The printed proteins were GST fusions of Bcl-XL and BAX and a 6 x histidine-tagged-Bcl-XL. Ligands for these proteins were the full length Bcl-XL protein and the BH3 containing peptide from the Bcl-2 family protein BAK. The peptides were labeled with Alexa 488 and the full length protein was labeled with CY5. The volume of liquid delivered from the GMS printer is 50-70 pL per stroke repeated 5 times. Protein delivered ranged from 350 pg to 350 fg of protein per spot. After printing, proteins were allowed to incubate for 12 hours at 4 degree in a humidity chamber. The slides were then washed with PBS and blocked with PBS with 10% BSA for 5 minutes. To determine the reactivity of the surfaces and the coupling efficiency of the proteins, the presence of the GST-fusion proteins were monitored using labeled anti-GST-tag antibody at 1 ng/ml.

Labeled protein ligands were incubated in a volume of 40 μ l contained in an area of 1 cm² by a hydrophobic barrier.

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 28 -

The slides were then rinsed and read using the Arrayworx scanner. In addition, As shown in FIG. 5, which is a mass spectrometry profile, binding of a ligand by a Bax-GST protein is confirmed on the left, while non-binding by a GST protein is shown on the right.

FIG. 6 confirms the ability of an unlabelled small molecule (a BH3 peptide here) to compete a labeled ligand (Bcl-XL here) off the capture molecule (Bax-GST fusion protein). As shown in the four mass spectrometry profiles, with an increasing amount of the BH3 peptide, lesser binding between labeled ligand and the capture protein was observed. This confirmed that the interaction between the capture protein and the ligand was indeed attributable to the BH-3 domain. The same type of experiment was carried out using a small molecule that has been identified as specifically enhancing BH3 protein-protein interaction, and enhancement in ligand (Bcl-XL) binding by a capture molecule (Bak peptide) was observed as expected.

These experiments were then repeated using several peptides of the BH3 family as ligands to compete with three drugs known to affect Bcl-2 family member function at various concentrations. Bcl-XL was printed on BSA-NHS glass slides as capture proteins in each case. The detected fluorescence of the labeled ligand captured on the slide were shown in columns in FIGS. 7A and 7B, different drugs showed differential specificity for the two ligands from the same family. For Bak (FIG.7A), inhibitory effects were seen in virtually all the cases, while for Bid (FIG. 7B), PNAS or a relatively low concentration of anitmycin does not seem to inhibit its binding. This experiment can be useful in mapping out a drug candidate's specificity regarding each member of a large family of target proteins.

(iv) Cell Surface Protein Expression

Monoclonal and scFv antibodies were printed on glass microarrays for detection of cell surface antigen expression in cancer cell lines. Antibodies to c-ErbB2, EGFR, and transferrin receptor were printed on BSA-NHS activated glass slides. With the monoclonal antibodies, less than 2 ng/mL of recombinant antigen labeled with fluorescent dye was detected. For antigen detection in cell extracts, the cell surfaces of cancer cell lines were labeled with fluorescence using NHS-based dyes. This allowed the detection of differential cell surface expression of c-ErbB2 and EGFR on several cancer cell lines. The transferrin receptor was not detected using the direct labeling approach; however, when a micro-sandwich approach was employed, also the transferrin receptor was detected.

Monoclonal antibodies to c-ErbB2, EGFR, and transferrin receptor (TfR) were arrayed on a GMS 417 arrayer. The antibodies were spotted in 40% glycerol to prevent drying out of the

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 29 -

spots onto BSA-NHS slides. Antibodies were allowed to react with the slide overnight in the cold. The resulting spot size was about 150 micrometer with a spacing of 375 micrometer (center to center).

Slides were blocked for 30 minutes in 0.5 M glycine and then in BSA for another 30 minutes before samples were added. When multiple samples were processed on a single slide, groups of antibody spots were separated by drawing with a hydrophobic pen to allow up to 24 samples to be processed per slide. Alternatively, the groups of antibody spots were separated using an adhesive Teflon mask allowing 50 or more samples to be processed per slide.

The samples were usually labeled with Cy3 or Cy5-NHS dyes for one hour at room temperature and un-reacted dye is removed by gel filtration. The cell lines used in this study were the breast adenocarcinoma cell line SKBR3 and the epidermoid carcinoma cell line A-431. Cell surfaces were labeled using the dye, fluorescein-PEG2000-NHS (Shearwater), at 10 mg/mL in PBS for two hours on ice and un-reacted dye was removed by washing the cells before solubilizing in 0.25% SDS in TBS. Recombinant protein antigens were incubated in 2% BSA in 0.1% tween-PBS. Cell lysates were incubated in the lyses buffer without BSA. Following incubation with the samples for two to three hours, the slides were washed 4x10 times: 20 times in TPBS, then 20 times in PBS, by rapid submersion in a beaker containing the wash buffer. The fluorescence was detected using the ArrayWoRx slide reader.

Sensitivity:

Microarrays were incubated with serial dilutions of ErbB2 labeled with alexa488 and EGFR labeled with Cy5. After washing, the slide was scanned on the ArrayWoRx. As shown in Figure 8, except for Tfr antibody #3, all the antibodies were able to capture ErbB2, Tfr, and EGFR respectively. Protein capture was detected at a dilution as low as 1.6 ng/mL.

Detection of cell surface antigens:

The breast adenocarcinoma cell line SKBR3, and the epidermoid carcinoma cell line A-431, were grown to confluence and the cell surface labeled with the dye fluorescein-PEG2000-NHS. Following labeling, un-reacted dye was removed by washing the cells and the cells were lysed in 0.25% SDS. Total labeled protein (corresponding to about 50,000 cells) was then incubated on the antibody microarray for two hours and the slides scanned on the ArrayWoRx. As shown in FIG. 9, the A-431 cell line over-expresses EGFR, but not ErbB2; and the SK-BR-3 cell line over-expresses ErbB2, but only expresses low levels of EGFR. This differential

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 30 -

expression of the two receptors in the two cell lines is confirmed by flow cytometry (e.g., $>10^6$ EGFR receptors per cell in A-431 cells).

In a different approach, the cell proteins were not labeled directly with fluorescence. Instead, instead, antigen binding to the array was detected with a second fluorescent-labeled antibody to the antigen. The sensitivity of this "sandwich" detection approach was similar to what was observed for the directly labeled recombinant antigens.

In one experiment, antibodies were printed as before in microarrays and incubated with unlabeled antigens for two hours. Binding was detected with a second antibody to the antigen labeled with Cy5 (for detecting EGFR) or Cy3 (for detecting TfR). Results are shown in FIG. 10: monoclonal antibodies as listed in the legend exhibits good sensitivity at about 25 ng/mL.

The same sandwich approach was performed using phage displayed antibody such as scFv F5 labeled with Cy5.

For detection of antigens in cell extracts, cell lines (A431 or SKBR-3) were lysed in 0.25% SDS and extracts were incubated with the antibody array for two hours. After washing, bound antigen was detected with fluorescent monoclonal antibodies (for EGFR and TfR) or phage antibody (for ErbB2). As shown in FIG. 11, using the sandwich approach, all three antigens, EGFR, ErbB2, or TfR, were detected in both cell lysates. The anti-EGFR antibodies detected the differential expression of ErbB2 in the A431 and SK-BR-3 cell lines (>10 fold difference). Like wise, the anti-ErbB2 phage antibody detected the difference in expression of ErbB2 in the two cell lines. As expected, in the case of transferrin receptor expression, no major difference in expression was detected between the two cell lines.

All documents, patents, publications cited above in the specification are herein incorporated by reference. Various modifications and variations of the present invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in the art are intended to be within the scope of the invention.

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 31 -

CLAIMS

What is claimed is:

- 1 1. A protein microarray, comprising:
 - 2 a solid support;
 - 3 a linker covalently attached to said solid support; and
 - 4 a protein or protein fragment having a terminus that is capable of forming a covalent
 - 5 bond with said linker.
- 1 2. The microarray of claim 1, wherein said terminus is a carboxy terminus.
- 1 3. The microarray of claim 1, wherein said solid support is glass.
- 1 4. The microarray of claim 1, wherein said linker comprises a maleimide group.
- 1 5. The microarray of claim 1, wherein said linker comprises a vinyl sulfone group.
- 1 6. The microarray of claim 1, wherein said linker comprises a N-hydroxy succinimide
- 2 group.
- 1 7. The microarray of claim 1, wherein said protein or protein fragment is an antibody or
- 2 antibody fragment.
- 1 8. The microarray of claim 7, wherein said antibody or antibody fragment is a single chain
- 2 antibody.
- 1 9. The microarray of claim 1, wherein said microarray has at least 1,000 spots per cm².
- 1 10. The microarray of claim 1, wherein said microarray has at least 2,000 spots per cm².
- 1 11. A method for attaching a protein to a support surface, said method comprising the steps
- 2 of:
 - 3 (a) covalently attaching a bovine serum albumin molecule to a support surface;
 - 4 (b) forming an activated carbamate group or activated ester group on an exposed surface
 - 5 of said molecule; and
 - 6 (c) exposing said activated carbamate group or said activated ester group to a binding
 - 7 element comprising an amine, thereby forming a covalent bond between said carbamate or said
 - 8 ester group of said molecule and said amine group of said binding element.
- 1 12. The method of claim 11, wherein said forming step comprises exposing said bovine
- 2 serum albumin to a reagent to form a N-hydroxy succinimide group.
- 1 13. The method of claim 11, wherein said binding element is a protein.
- 1 14. The method of claim 13, wherein said protein is an antibody or antibody fragment.

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 32 -

- 1 15. The method of claim 14, wherein said antibody or antibody fragment is a single chain
2 antibody.
- 1 16. The method of claim 11, further comprising the step of blocking any of said activated
2 carbamate or ester groups that have not bound to said binding element.
- 1 17. A method for attaching a protein to a support surface, said method comprising the steps
2 of:
3 (a) providing a support surface comprising a first chemical group available for reaction;
4 (b) providing a capture protein comprising a first terminus and a second terminus, said
5 first terminus capable of binding to a ligand, said second terminus comprising a second chemical
6 group; and
7 (c) forming a covalent bond between said first chemical group and said second chemical
8 group, thereby attaching said capture protein to said support surface at said second terminus of
9 said capture protein.
- 1 18. The method of claim 17, wherein said capture protein comprises a terminal cysteine.
- 1 19. The method of claim 18, wherein said terminal cysteine is at a carboxy terminal.
- 1 20. The method of claim 18, wherein said forming step comprises chemically reducing said
2 cysteine.
- 1 21. A method for identifying a small molecule regulator of protein binding, the method
2 comprising the steps of:
3 (a) attaching a capture protein on a support surface;
4 (b) exposing said substrate to a ligand for said capture protein and at least one small
5 molecule; and
6 (c) detecting the presence or the absence of binding between said capture protein and said
7 ligand.
- 1 22. The method of claim 21, wherein step (a) comprises attaching said capture protein on a
2 BSA-NHS slide.
- 1 23. The method of claim 21, wherein step (a) comprises functionalizing said support surface
2 with aldehyde groups.
- 1 24. The method of claim 21, wherein step (a) comprises attaching said capture protein in a
2 microarray of at least 1,000 spots per cm².
- 1 25. The method of claim 21, further comprising fusing said capture protein to a GST protein.

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 33 -

- 1 26. The method of claim 21, further comprising detecting said binding between said capture
2 protein and said ligand through a fluorescent dye.
- 1 27. The method of claim 26, wherein said fluorescent dye comprises a hydrophilic polymer
2 moiety.
- 1 28. The method of claim 27, wherein said moiety is a polyethyleneglycol.
- 1 29. The method of claim 21, wherein step (c) comprises detecting said binding between said
2 capture protein and said ligand through a labeled phage particle displaying an antibody fragment.
- 1 30. The method of claim 21, wherein said ligand comprises a family of related proteins.
- 1 31. The method of claim 30, wherein said ligand comprises the Bcl-2 family of proteins.
- 1 32. The method of claim 21, wherein said capture protein comprises a family of related
2 proteins.
- 1 33. A method for identifying a small molecule that selectively affects a cellular pathway, the
2 method comprising the steps of:
- 3 (a) attaching a microarray of capture proteins on a support surface, said microarray
4 comprises proteins that act in a cellular pathway;
- 5 (b) exposing said substrate surface to at least one ligand of said capture proteins and at
6 least one small molecule; and
- 7 (c) detecting a change in binding between said capture proteins and said ligand, said
8 change resulting from interaction with said small molecule.
- 1 34. The method of claim 33, wherein step (c) further comprises using mass spectrometry to
2 quantify said change.
- 1 35. The method of claim 33, further comprising detecting said binding between said capture
2 protein and said ligand through a fluorescent dye.
- 1 36. The method of claim 35, wherein said fluorescent dye comprises a hydrophilic polymer
2 moiety.
- 1 37. The method of claim 36, wherein said moiety is a polyethyleneglycol.
- 1 38. The method of claim 33, wherein step (c) comprises detecting said binding between said
2 capture protein and said ligand through a labeled phage particle displaying an antibody fragment.
- 1 39. The method of claim 33, wherein step (a) comprises attaching said capture proteins on a
2 BSA-NHS slide.
- 1 40. The method of claim 34, wherein step (a) comprises attaching said capture protein in a
2 microarray of at least 1,000 spots per cm².

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 34 -

- 1 41. A method for labeling an antigen, said method comprising:
2 digesting an antigen with a protease thereby to produce multiple peptides such that at
3 least one of said peptides is capable of receiving a label at a region of said peptide that does not
4 interfere with binding between an epitope on said peptide and an antibody or antibody fragment.
- 1 42. The method of claim 41, further comprising using a succinimidyl ester dye to label said
2 peptide.
- 1 43. The method of claim 42, wherein said succinimidyl ester dye is Cy3, Cy5 or an Alexa
2 dye.
- 1 44. The method of claim 41, further comprising labeling only a terminal primary amine of
2 said peptide, wherein said epitope is internal.
- 1 45. The method of claim 41, further comprising digesting said antigen with trypsin.
- 1 46. A method for detecting a phosphorylated protein, the method comprising the steps of:
2 (a) fragmenting a candidate protein into a plurality of peptides comprising a target
3 peptide, the target peptide comprising a phosphorylation site;
4 (b) exposing said plurality of peptides to an antibody or antibody fragment having affinity
5 for an epitope on said target peptide adjacent to said phosphorylation site;
6 (c) selecting said target peptide based on affinity of said target peptide for said antibody
7 or antibody fragment; and
8 (d) conducting mass spectrometry on said target peptide to detect the presence of a subset
9 of said protein that has been phosphorylated.
- 1 47. The method of claim 46 wherein step (a) comprises digesting said candidate protein with
2 a protease.
- 1 48. The method of claim 47, wherein the protease is trypsin.
- 1 49. The method of claim 46 further comprising panning an scFv against said epitope.
- 1 50. The method of claim 46 wherein step (c) comprises immobilizing said antibody or
2 antibody fragment to a solid support.
- 1 51. The method of claim 46 wherein step (d) comprises detecting a change in the molecular
2 weight of a subset of said target peptide.
- 1 52. The method of claim 46 wherein step (d) comprises conducting MALDI mass
2 spectrometry.
- 1 53. The method of claim 46, further comprising immunizing a monoclonal antibody against
2 the epitope.

WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 35 -

- 1 54. The method of claim 46, further comprising immunizing a polyclonal antibody against
2 the epitope.
- 1 55. The method of claim 46 wherein the epitope is less than 15 amino acids away from the
2 phosphorylation site.
- 1 56. The method of claim 46 wherein the epitope is less than 10 amino acids away from the
2 phosphorylation site.
- 1 57. The method of claim 46 wherein the epitope is less than 10 amino acids.
- 1 58. The method of claim 46 wherein the epitope is less than 5 amino acids
- 1 59. A method of studying a cellular event, the method comprising the steps of:
2 (a) attaching a capture molecule on a support surface, said capture molecule having
3 affinity for a ligand;
4 (b) exposing said substrate surface to a solution containing a cellular organelle, said
5 ligand associated with a surface of said organelle; and
6 (c) capturing said organelle through binding between said capture molecule and said
7 ligand.
- 1 60. The method of claim 59, wherein said capture molecule comprises a protein.
- 1 61. The method of claim 59, wherein said capture molecule comprises an antibody or a
2 fragment thereof.
- 1 62. The method of claim 59, further comprising studying a protein associated with said
2 captured organelle.
- 1 63. The method of claim 59, wherein said organelle is a mitochondria.
- 1 64. The method of claim 63, wherein said ligand is a voltage dependent anion channel
2 receptor that is uniquely associated with the mitochondria membrane.
- 1 65. The method of claim 59 wherein said solution is a whole-cell extract.
- 1 66. The method of claim 59 wherein said solution is a fraction of a whole-cell extract.
- 1 67. The method of claim 59, further comprising detecting said capturing through a
2 fluorescent dye.
- 1 68. The method of claim 67, wherein said fluorescent dye comprises a hydrophilic polymer
2 moiety.
- 1 69. The method of claim 68, wherein said moiety is a polyethyleneglycol.
- 1 70. The method of claim 67 wherein the dye has potentiometric quality for recognizing intact
2 voltage gradient of said organelle.

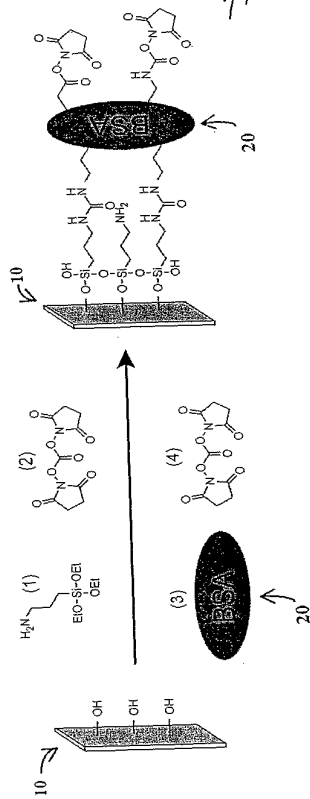
WO 02/12893

PCT/US01/24264

- 36 -

- 1 71. The method of claim 70 wherein said organelle is a mitochondria.
- 1 72. The method of claim 59, further comprising detecting said capturing through a labeled
- 2 phage particle displaying an antibody fragment.

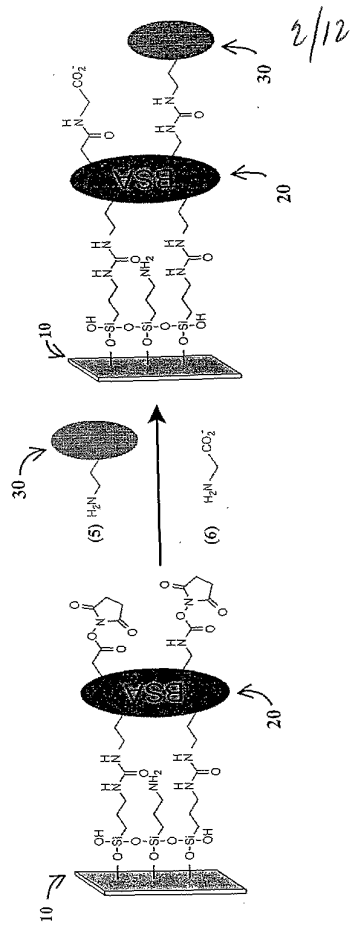
1/12



WO 02/12893

PCT/US01/24264

FIG. 1B

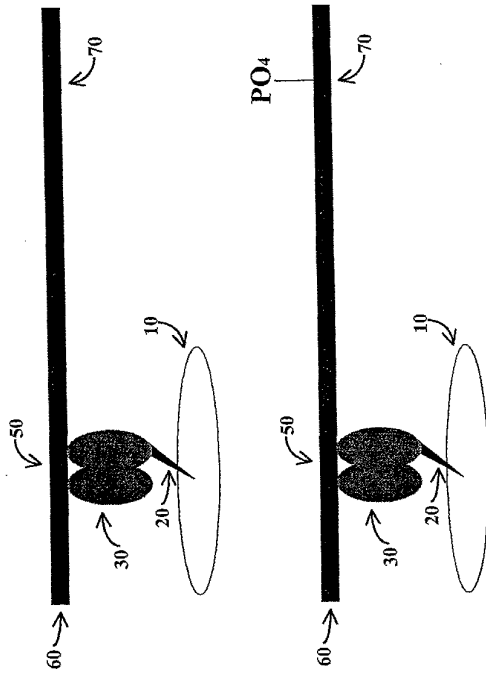


WO 02/12893

PCT/US01/24264

3/12

FIG. 2



WO 02/12893

PCT/US01/24264

FIG. 3A

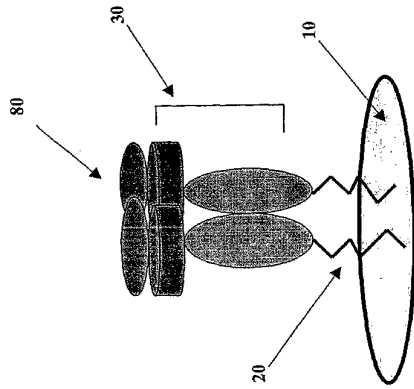
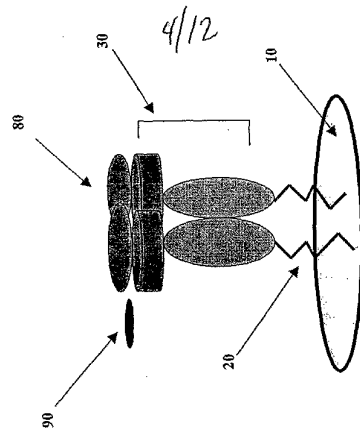


FIG. 3B



WO 02/12893

PCT/US01/24264

FIG. 4A

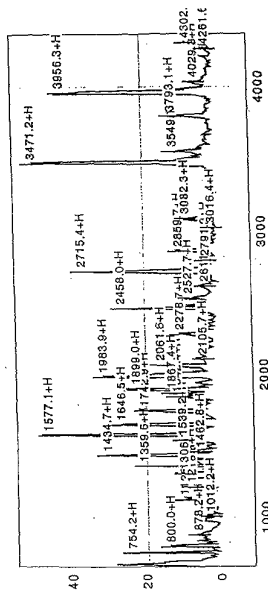


FIG. 4B

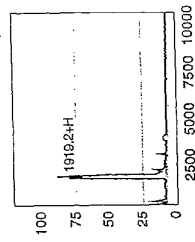
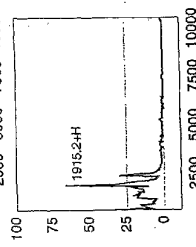


FIG. 4C



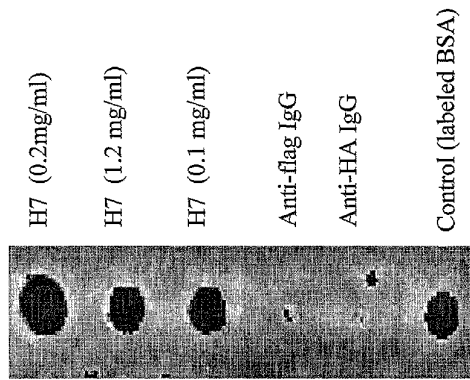
5/12

WO 02/12893

PCT/US01/24264

6/12

FIG. 4D



WO 02/12893

PCT/US01/24264

7/12

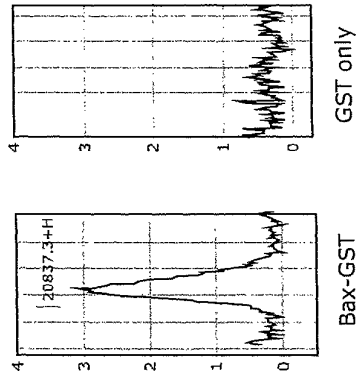
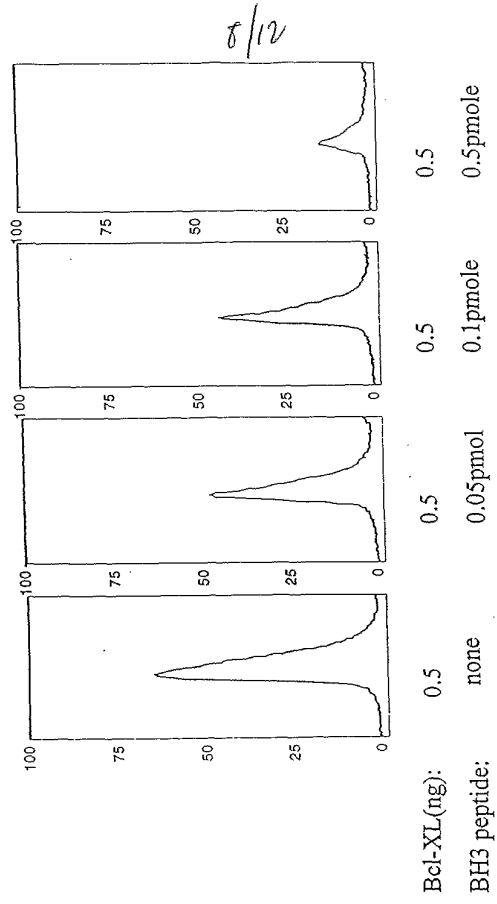


FIG. 5

WO 02/12893

PCT/US01/24264

FIG. 6



WO 02/12893

PCT/US01/24264

9/12

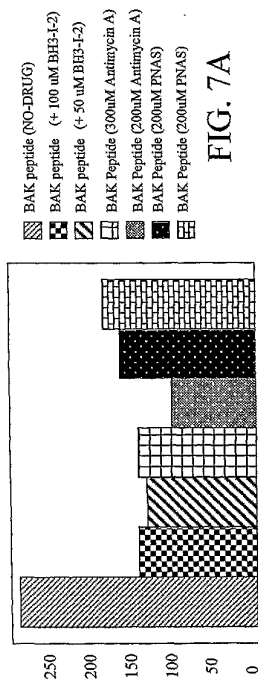


FIG. 7A

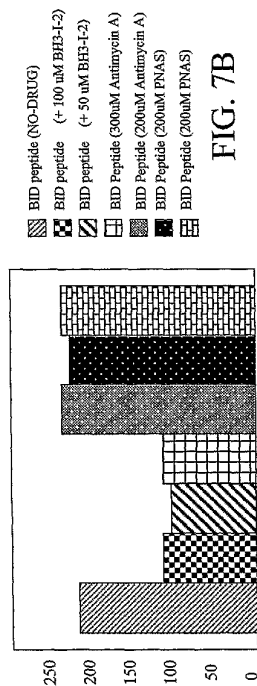


FIG. 7B

WO 02/12893

PCT/US01/24264

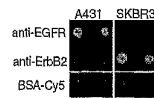
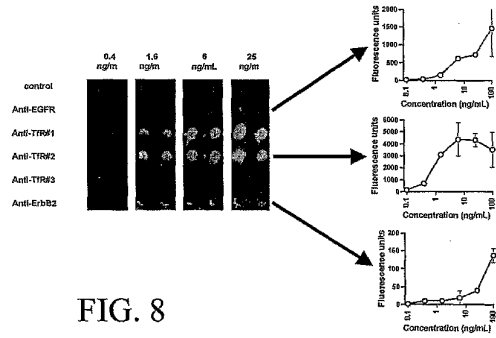


FIG. 9

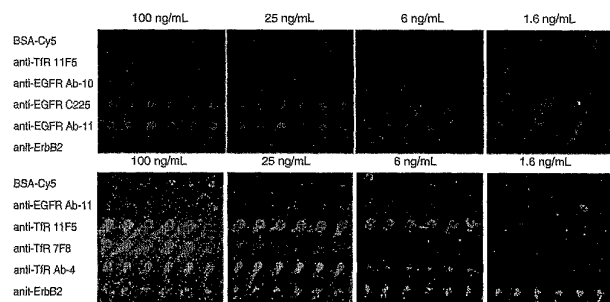


WO 02/12893

PCT/US01/24264

11/2

FIG. 10

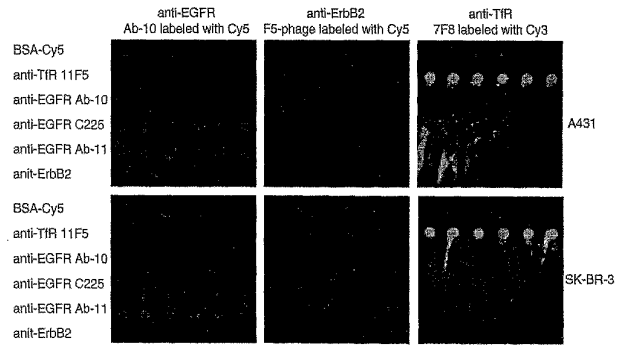


WO 02/12893

PCT/US01/24264

12/12

FIG. 11



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/012893 A3(51) International Patent Classification: B01J 19/00,
G01N 33/68(74) Agent: MEYERS, Thomas, C.; Wolf, Greenfield &
Sacks, P.C., 600 Atlantic Avenue, Boston, MA 02139
(US).

(21) International Application Number: PCT/US01/24264

(22) International Filing Date: 3 August 2001 (03.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/222,763 3 August 2000 (03.08.2000) US

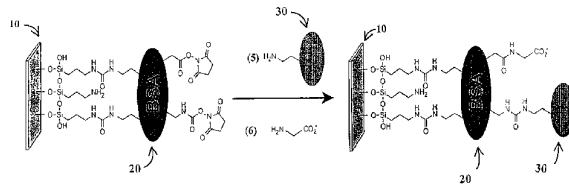
(71) Applicant: MASSACHUSETTS INSTITUTE OF
TECHNOLOGY [US/US]; 77 Massachusetts Avenue,
Cambridge, MA 02139 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report(88) Date of publication of the international search report:
10 October 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MICROARRAYS OF FUNCTIONAL BIOMOLECULES, AND USES THEREFOR

WO 02/012893 A3



(57) Abstract: Disclosed are products and methods to facilitate the identification of compounds that are capable of interacting with biological macromolecules of interest, especially when such macromolecules are attached to a support surface in microarray. Aspects of the invention concern attachment chemistry, peptide labeling, antibody preparation, applications and so on.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/24264
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 B01J19/00 G01N33/68		
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 B01J 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) EP0-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PIRRUNG M C ET AL: "A General Method for the Spatially Defined Immobilization of Biomolecules on Glass Surfaces Using Caged Biotin" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 7, no. 3, May 1996 (1996-05), pages 317-321, XP002095758 ISSN: 1043-1802	1-40
Y	abstract page 317, right-hand column, last paragraph -page 318, left-hand column, last paragraph --- -/--	59-72
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt 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 release *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 27 May 2002		Date of mailing of the international search report 17.06.02
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Luis Alves, D

Form PCT/ISA/C10 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/24264

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MACBEATH, G ET AL: "Printing small molecules as microarrays and detecting protein-ligand interactions en masse" J AM CHEM SOC, vol. 121, 1999, pages 7967-7968, XP001056469 the whole document	1-10, 17-21, 23-38, 40
X	WO 00 04382 A (ZYOMYX INC) 27 January 2000 (2000-01-27) page 24, paragraph 3 -page 31, paragraph 1; figures 4,5	1-10, 17-21, 23-38, 40
X	ALEXANDER, J E ET AL: PNAS, vol. 88, no. 11, 1 June 1991 (1991-06-01), pages 4685-4689, XP001071262 abstract page 4686, left-hand column, paragraph 4 -page 4689, left-hand column, last paragraph	46-58
Y	SHIMIZU S ET AL: "Bcl - 2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 399, no. 6735, 3 June 1999 (1999-06-03), pages 483-487, XP002130761 ISSN: 0028-0836 abstract; figure 1	59-72
P,X	MACBEATH, G AND SCHREIBER, SL: "Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination" SCIENCE, vol. 289, 8 September 2000 (2000-09-08), pages 1760-1763, XP002190973 abstract page 1760, paragraph 1 -page 1761, middle column, paragraph 2	1-40, 59-72
E	WO 01 61325 A (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND) 23 August 2001 (2001-08-23) page 8, line 10 - line 19; figure 1 page 13, line 26 -page 15, paragraph 1 page 17, last paragraph -page 18, paragraph 1 -/--	1-40

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/24264

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 01 94946 A (ZUCKERMANN RONALD N ;CHIRON CORP (US); BEAUSOLEIL ERIC (US); CHARY) 13 December 2001 (2001-12-13) abstract page 10, last paragraph -page 12, paragraph 1; claims; figure 7B; examples 2,3 page 18, paragraph 1 - paragraph 2 page 19, last paragraph -page 20, line 3 page 33, paragraph 2 - paragraph 3 ---	1-10, 17-21, 23-38, 40
A	WILKINS M R ET AL: "HIGH-THROUGHPUT MASS SPECTROMETRIC DISCOVERY OF PROTEIN POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 289, no. 3, 11 June 1999 (1999-06-11), pages 645-657, XP001014117 ISSN: 0022-2836 abstract page 646, left-hand column, line 1 -page 647, right-hand column, paragraph 2; figure 1 ---	46-58
A	DAVIES, H ET AL: BIOTECHNIQUES, vol. 27, no. 6, 1999, pages 1258-1261, XP001080226 the whole document ---	46-58
A	MARCUS, K ET AL: ELECTROPHORESIS, vol. 21, no. 13, July 2000 (2000-07), pages 2622-2636, XP001080220 abstract page 2631, left-hand column, paragraph 2 -right-hand column, paragraph 3 -----	46-58

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 01/24264
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
see additional sheet	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input checked="" type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1-40, 46-72	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	
<input checked="" type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/US 01 24264

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-40, 59-72

Protein microarrays, methods of preparing them and screening methods using said microarrays.

2. Claims: 41-45

Methods of labelling an antigen.

3. Claims: 46-58

Methods of detecting a phosphorylated protein.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/24264

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0004382	A	27-01-2000	AU 5102399 A	07-02-2000
			AU 5102599 A	07-02-2000
			EP 1097377 A2	09-05-2001
			EP 1097380 A1	09-05-2001
			WO 0004389 A2	27-01-2000
			WO 0004382 A1	27-01-2000
			US 6329209 B1	11-12-2001
			US 6365418 B1	02-04-2002
WO 0161325	A	23-08-2001	AU 4719801 A	27-08-2001
			WO 0161325 A2	23-08-2001
			US 2002055093 A1	09-05-2002
WO 0194946	A	13-12-2001	AU 6817301 A	17-12-2001
			WO 0194946 A2	13-12-2001
			US 2002055125 A1	09-05-2002

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,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100080137

弁理士 千葉 昭男

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100117813

弁理士 深澤 憲広

(72)発明者 カードン, マイケル・エイチ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02115, ボストン, ゲインズボロ・ストリート 84, アパートメント 206

(72)発明者 マクピース, ギャヴィン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02476, アーリントン, オークランド・アベニュー 146, ナンバー 1

(72)発明者 ニールセン, ウルリク

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02138, ケンブリッジ, ホーソーン・ストリート 48

(72)発明者 マークス, ジェームズ・ディー

アメリカ合衆国カリフォルニア州94143, サンフランシスコ, ポトレロ・アベニュー 1001, ビルディング 1, ルーム 170

(72)発明者 ソージャー, ピーター

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139, ケンブリッジ, ハーヴァード・ストリート 336, ユニット イー

(72)発明者 シンスキー, アンソニー

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02115, ボストン, コモンウェルス・アベニュー 285

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QQ20 QR48 QR51 QR55 QR79 QR80 QS32

专利名称(译)	功能性生物分子的微阵列及其用途		
公开(公告)号	JP2004506201A	公开(公告)日	2004-02-26
申请号	JP2002517526	申请日	2001-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	麻省理工学院		
申请(专利权)人(译)	麻省理工学院		
[标]发明人	カードンマイケルエイチ マクビースギャヴィン ニールセンウルリク マークスジェームズディー ソージャーピーター シンスキーアンソニー		
发明人	カードン,マイケル・エイチ マクビース,ギャヴィン ニールセン,ウルリク マークス,ジェームズ・ディー ソージャー,ピーター シンスキー,アンソニー		
IPC分类号	G01N27/62 C07K17/06 C12Q1/02 C40B30/04 C40B40/10 G01N27/64 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	C40B30/04 B01J2219/00527 B01J2219/00585 B01J2219/00596 B01J2219/00605 B01J2219/00612 B01J2219/00619 B01J2219/00626 B01J2219/00637 B01J2219/00659 B01J2219/00707 B01J2219/00725 C07K17/06 C40B40/10 G01N33/5079 G01N33/54353 G01N33/68 G01N33/6842 G01N33/6845 G01N33/6848 G01N33/6851		
FI分类号	G01N33/53.D C12Q1/02 G01N27/62.V G01N27/64.B G01N37/00.102		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ20 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR55 4B063/QR79 4B063/QR80 4B063/QS32		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/222763 2000-08-03 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于促进能够与大分子相互作用的化合物的鉴定的产品和方法，特别是当目标生物聚合物与微阵列中的支持表面结合时。本发明的一个方面涉及缀合化学，肽标记，抗体制备，应用等。

it.Cl. ⁷	F 1	テーマコード (参考)
31N 33/53	GO 1N 33/53	4B063
12Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
31N 27/62	GO 1N 27/62	V
31N 27/64	GO 1N 27/64	B
31N 37/00	GO 1N 37/00	I O 2
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 86 頁)		
[願番号] 特願2002-517526 (P2002-517526)		
[22] 出願日 平成13年8月3日 (2001. 8. 3)		
[説文提出日] 平成15年2月3日 (2003. 2. 3)		
[際出願番号] PCT/US2001/024264		
[際公開番号] W02002/012893		
[際公開日] 平成14年2月14日 (2002. 2. 14)		
[先権主張番号] 60/222, 763		
[先日] 平成12年8月3日 (2000. 8. 3)		
[先権主張国] 米国 (US)		
(71) 出願人 591013573 マサチューセッツ・インスティテュート オブ・テクノロジー MASSACHUSETTS INST TUTE OF TECHNOLOGY アメリカ合衆国マサチューセッツ州O2 39, ケンブリッジ, マサチューセッ ・アベニュー 77		
(74) 代理人 100089705 弁理士 社本 一夫		
(74) 代理人 100076691 弁理士 増井 忠武		
(74) 代理人 100075270 弁理士 小林 崇		
最終頁に続く		
[発明の名称] 機能性生体分子のマイクロアレイおよびその使用		