

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-535873**(P2005-535873A)**

(43) 公表日 平成17年11月24日(2005.11.24)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 D	4 H O 4 5
CO 7 K 17/14	GO 1 N 33/53 N	
GO 1 N 33/543	CO 7 K 17/14	
GO 1 N 33/547	GO 1 N 33/543 5 2 5 C	
GO 1 N 37/00	GO 1 N 33/543 5 2 5 W	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-519921 (P2004-519921)	(71) 出願人	591076811
(86) (22) 出願日	平成15年7月3日(2003.7.3)		カイロン コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月23日(2005.2.23)		アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 6
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/021128		0 8, エミリービル, ホートン ストリー
(87) 国際公開番号	W02004/005477		ト 4 5 6 0
(87) 国際公開日	平成16年1月15日(2004.1.15)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	10/190,433		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成14年7月3日(2002.7.3)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 プロテオミクス分析を実施するための鏡面仕上げされた表面上のタンパク質マイクロアレイ

(57) 【要約】

タンパク質マイクロアレイ、これらの製造、使用、および適用が提供される。本発明に従うタンパク質マイクロアレイは、種々のプロテオミクス分析において有用である。本発明に従う種々のタンパク質アレイは、タンパク質の大きいアレイを固定し得、これは、タンパク質-タンパク質相互作用を研究して、疾患プロセスの理解を改善するため、薬物発見を容易にするため、またはワクチン開発のための潜在的な抗原を同定するために有用であり得る。本発明のタンパク質アレイ要素は、ネイティブのタンパク質または改変されたタンパク質（例えば、抗体または融合タンパク質）である。これらのタンパク質アレイ要素は、基板上の官能基（例えば、アミン）とタンパク質（例えば、活性化カルボン酸）との間での結合反応によって、有機官能基化した鏡面仕上げ基板に、直接付着され得る。アレイの化学的ブロッキングのための技術もまた、提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マイクロアレイであって、以下：

実質的に平坦な表面を有する固体基板であって、有機化学的に修飾された、誘電性コーティングされた反射性金属を備える、固体基板；および

該固体基板に安定に付着された異なるタンパク質を含む、複数のアレイ要素、を備える、マイクロアレイ。

【請求項 2】

前記複数の異なるタンパク質が、前記基板表面に直接付着している、請求項 1 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 3】

前記複数の異なるタンパク質が、化学アダプターを介して、前記基板表面に間接的に付着している、請求項 1 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 4】

前記金属が、アルミニウム、金、クロム、チタン、および白金からなる群より選択される、請求項 1 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 5】

前記金属がアルミニウムである、請求項 1 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 6】

前記誘電性コーティングが、酸化ケイ素、二酸化ケイ素、および酸化アルミニウムからなる群より選択される金属酸化物を含む、請求項 1 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 7】

前記誘電性コーティングが、約 800 オングストロームの厚さの二酸化ケイ素である、請求項 1 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 8】

前記有機化学的修飾が、官能基化されたシラン分子を含む、請求項 1 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 9】

前記官能基化されたシラン分子が、アミノ修飾されたシラン分子である、請求項 8 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 10】

前記反射性金属が、非金属固体支持体上に堆積されている、請求項 1 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 11】

前記非金属固体支持体が、ガラスおよびプラスチックからなる群より選択される、請求項 10 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 12】

前記非金属固体支持体が、顕微鏡用のスライドガラスである、請求項 11 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 13】

アレイ要素の間に前記基板表面に結合した、非タンパク質の、ポリマーまたはオリゴマーの化学ブロッキング剤をさらに備える、請求項 1 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 14】

前記化学ブロッキング剤が、ポリエチレングリコール、または前記基板表面に付着するための 1 つ以上の末端修飾を有するアナログ、および非特異的なタンパク質結合を阻害するペプトイドベースのポリマーまたはオリゴマーからなる群より選択される、請求項 13 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 15】

前記化学ブロッキング剤が、タンパク質ブロッキング剤と組み合わせられている、請求項 13 に記載のマイクロアレイ。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

前記金属が、スライドガラス上に堆積されたアルミニウムであり、前記酸化物コーティングが、約 800 オングストロームの厚さの二酸化ケイ素であり、そして前記有機化学的修飾が、官能基化されたシラン分子を含む、請求項 13 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 17】

前記タンパク質が、前記有機化学的に修飾された表面の官能基に直接結合している、請求項 2 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 18】

前記有機化学的に修飾された表面が、アミンを示し、そして前記タンパク質が、露出された活性化カルボン酸基を有する、請求項 17 に記載のマイクロアレイ。

10

【請求項 19】

前記アダプターが、1つの末端において、前記基板表面に安定に付着するように、そして他方の末端において、前記複数の異なるタンパク質の官能基に安定に付着するように、設計または選択された、ホモ二官能性有機リンカーを含む、請求項 3 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 20】

前記アダプターが、ビス-NHS 活性化エステルを含む、請求項 19 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 21】

前記アダプターが、1つの末端において、前記基板表面に安定に付着するように、そして他方の末端において、前記複数の異なるタンパク質の官能基に安定に付着するように、設計または選択された、ヘテロ二官能性有機リンカーを含む、請求項 3 に記載のマイクロアレイ。

20

【請求項 22】

前記アダプターが、修飾された NHS 活性化エステルを含む、請求項 21 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 23】

前記修飾が、前記アダプターの基板に結合しない方の末端におけるタンパク質結合官能基である、請求項 22 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 24】

前記タンパク質結合官能基が、マレイミド、ビオチン、アビジンもしくはアビジンアナログ、および前記タンパク質アレイ要素上の官能基に安定に付着するように設計または選択されたタンパク質からなる群より選択される、請求項 23 に記載のマイクロアレイ。

30

【請求項 25】

前記タンパク質結合官能基が、マレイミドであり、そして前記付着したタンパク質が、露出した還元されたチオール基を含む、請求項 24 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 26】

前記タンパク質結合官能基が、ビオチンであり、そして前記タンパク質が、アビジン結合体化している、請求項 24 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 27】

前記タンパク質結合官能基が、アビジンであり、そして前記付着したタンパク質が、ビオチン化されている、請求項 24 に記載のマイクロアレイ。

40

【請求項 28】

前記タンパク質結合官能基が、前記タンパク質アレイ要素上の官能基に安定に付着するように設計または選択されたタンパク質である、請求項 24 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 29】

前記タンパク質結合官能基が、プロテイン A またはプロテイン G であり、そして前記付着したタンパク質が、抗体である、請求項 28 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 30】

前記タンパク質結合官能基が、グルタチオンであり、そして前記付着したタンパク質が

50

、G S Tタンパク質融合物である、請求項 29 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 31】

固体支持体の表面と安定に会合した複数の異なるタンパク質アレイ要素を備えるアレイを作製するための方法であって、該方法は、以下：

固体支持体を結合のために調整する工程であって、該固体支持体は、有機化学的に修飾された、誘電性コーティングされた反射性金属を含む、実質的に平坦な表面を有する、工程；および

複数の異なるタンパク質を、該タンパク質が該基板表面にアレイ要素として結合するために十分な条件下で、該基板と接触させる工程、

を包含し；

これによって、該アレイが作製される、方法。

10

【請求項 32】

前記接触させる工程が、前記タンパク質アレイ要素の各々の溶液の液滴を、前記基板表面上の異なる位置に、該基板表面への該タンパク質アレイ要素の結合が該液滴の蒸発の前に完了するような条件下でスポッティングすることを包含する、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

非タンパク質のポリマーまたはオリゴマーの化学ブロッキング剤を、アレイ要素の間で、前記基板表面に適用する工程をさらに包含する、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 34】

前記化学ブロッキング剤が、ポリエチレングリコール、または前記基板表面に付着するための 1 つ以上の末端修飾を有するアナログ、および非特異的なタンパク質結合を阻害するペプトイドベースのポリマーまたはオリゴマーからなる群より選択される、請求項 33 に記載の方法。

20

【請求項 35】

前記化学ブロッキング剤が、タンパク質ブロッキング剤と組み合わせられる、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

差示的結合アッセイを実施する方法であって、以下：

タンパク質含有生物学的サンプル溶液中で、タンパク質を標識する工程；

該標識されたタンパク質含有生物学的サンプル溶液のアリコートをし、請求項 1 に記載のアレイと接触させる工程；および

該アレイを分析して、該サンプル中のタンパク質の、該アレイのタンパク質アレイ要素への差示的結合を決定する工程、

を包含する、方法。

30

【請求項 37】

疾患状態に関連する潜在的なタンパク質抗原に対する、血清中の抗体を検出する方法であって、以下：

個体から得られた血清サンプルの溶液中で、タンパク質を標識する工程；

該標識されたタンパク質含有血清サンプル溶液のアリコートをし、請求項 1 に記載のアレイと接触させる工程；および

該アレイを分析して、該サンプル中の抗体タンパク質の、該アレイの抗原タンパク質アレイ要素への差示的な結合を決定する工程、

を包含する、方法。

40

【請求項 38】

前記タンパク質アレイ要素が、融合タンパク質である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記アッセイによって同定された抗原が、ワクチン開発プログラムにおいて使用される、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】

50

プロテオミクス結合アッセイを実施する際に使用するためのキットであって、該キットは、以下：

固体支持体であって、有機化学的に修飾された、誘電性コーティングされた反射性金属を含む実質的に平坦な表面を有する、固体支持体；

該基板表面に安定に付着した異なるタンパク質を含む、複数のアレイ要素；および結合アッセイ試薬を備えるアレイを備える、キット。

【請求項 4 1】

前記金属が、スライドガラス上に堆積されたアルミニウムであり、そして酸化物コーティングが、約 800 オングストロームの厚さの二酸化ケイ素である、請求項 4 0 に記載のキット。 10

【請求項 4 2】

アレイ要素の間で、前記基板表面に結合した、非タンパク質の、ポリマーまたはオリゴマーの化学ブロッキング剤をさらに含む、請求項 4 1 に記載のキット。

【請求項 4 3】

前記化学ブロッキング剤が、ポリエチレングリコール、または前記基板表面に付着するための 1 つ以上の末端修飾を有するアナログ、および非特異的なタンパク質結合を阻害するペプトイドベースのポリマーまたはオリゴマーからなる群より選択される、請求項 4 2 に記載のキット。

【請求項 4 4】

前記化学ブロッキング剤が、タンパク質ブロッキング剤と組み合わされている、請求項 4 2 に記載のキット。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

（発明の背景）

（発明の分野）

本発明は、細胞産物分析および物質に関する。より具体的には、本発明は、タンパク質提示マイクロアレイ、これらを作製する方法および高感度のプロテオミクス分析を行うためにこれらを使用する方法に関する。 30

【背景技術】

【0002】

（関連技術の説明）

近年、マイクロアレイ技術は、専門化した亜分野から、分子生物学、微生物学、製剤学、農学、および多数の他の生物工学における基礎および応用研究のための重要な手段へと発達してきた。DNA マイクロアレイ技術は、生物または細胞のゲノムを、発現した表現型またはタンパク質機能に結び付けようと試みる。

【0003】

マイクロアレイ技術に関する大量の出版物および特許文献は、ガラススライド（しばしば、「チップ」といわれる）などの固体表面上に提示される DNA（または他の核酸形態（例えば、cDNA または RNA））のアレイを記載する。アレイ化 DNA は、代表的には、短いオリゴヌクレオチド（例えば、約 8 ～ 25 塩基）の形態であるかまたはより長いクローンであるかまたは PCR 産物（約 500 ～ 2000 塩基）である。前者は、代表的には、固体支持体上で合成されるが、後者は、アレイ型式中の固体支持体上に自動的に「スポットされる」。 40

【0004】

固体表面上のペプチドアレイおよびタンパク質アレイの報告は存在するが、これらは、DNA アレイと比較してあまり注目を受けてこなかった。これは、界面において複雑な生物学的マトリックスの存在下でのこれらの物質に固有の不安定性に起因するようである。例えば、多数のタンパク質が、固体表面との接触の際に変性することが周知である。さら 50

に、タンパク質が提示される様式は、結合相手と相互作用する方法に顕著に影響を及ぼし得る。例えば、タンパク質の結合部位は、界面と逆方向に向けられ得、このことが、特異的な結合相互作用を妨げる。従って、アレイ表面でのタンパク質の配向は、タンパク質アレイデバイスの適用性において重要な役割を果たし得る。

【0005】

現在、生物学的サンプルのプロテオームを分析する最も一般的な手段は、2次元（「2-D」）ゲル電気泳動を利用する。この結果は、実験プロトコル（例えば、ゲルの展開時間および他のパラメーター）に非常に敏感であるため、この方法は問題がある。従って、2-Dゲルから再現性のあるデータを得ることは非常に難しい。また、これらのゲルで使用される銀染色の感度は制限されており、そして、マイクロアレイ技術で使用する蛍光標識の感度より小さい。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従って、タンパク質コンテキストにおいて有用な、効果的なマイクロアレイ技術を開発する非常に大きい必要性が存在する。多くの場合では、機能的経路は、特定の遺伝子に直接関連し得ない。タンパク質は、しばしば、最終的に機能を決定する種々の翻訳後修飾、相互作用、または分解を受ける。タンパク質の存在度という見かけ上単純な評価でさえ、対応するmRNAのレベルと直接関連し得ない。唯一の解決法は、細胞、組織または生物の状態をタンパク質レベルで評価することである。従って、細胞、組織、血清などの複合混合物における差示的なタンパク質の迅速な提示を可能にする高処理能様式は、DNAマイクロアレイ技術に対する強力な対応物および相補物を提供する。

20

【課題を解決するための手段】

【0007】

（発明の要旨）

上記のことを達成するために、本発明は、タンパク質提示マイクロアレイ（本明細書中で「タンパク質マイクロアレイ」ともいう）、これらの製造、使用、および適用を提供する。特に、本発明は、アッセイにおいて鏡面仕上げされた（mirrored）アレイ基板表面の使用に起因する増強した信号を生成するアレイを提供し、このアッセイにおいて、蛍光標識された結合相手は、基板表面に結合されたアレイ要素（例えば、Cy3またはCy5、他の蛍光プローブ）と相互作用し、このアッセイは、本明細書中で「蛍光アレイスキャニング」または「スキャニング」といわれる。種々の市販のアレイスキャナは、主にcDNAアレイスキャニングにおける使用のために利用可能である。本発明に従うこのような高感度なタンパク質マイクロアレイは、種々のプロテオミクス解析において有用である。本発明に従う種々のタンパク質アレイは、タンパク質の大きなアレイを固定し得、このタンパク質の大きなアレイは、タンパク質-タンパク質相互作用を研究して疾患プロセスの理解を向上させることについてか、薬物送達を容易にすることについてか、またはワクチン開発のために潜在的抗原を同定することについて有用であり得る。

30

【0008】

本発明に従うマイクロアレイによって提示されるタンパク質アレイ要素は、天然のタンパク質または改変されたタンパク質（例えば、抗体）である。タンパク質アレイ要素は、基板上の官能基（例えば、アミンまたはマレイミド）とタンパク質（活性化カルボン酸または活性化チオール）との間の結合反応によって、有機的に官能基化された基板に対して直接的にかまたは間接的に結合され得るか、あるいは表面上に提示された同族のリガンドまたはタンパク質（例えば、グルタチオン）と非共有結合的に相互作用するタンパク質におけるタグ（例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）を使用し得る。本発明は、鏡面仕上げされた固体平面基板上にアレイ要素をスポットすること、複合タンパク質混合物の標識化、タンパク質生物マーカーの検出、およびアレイに対するタンパク質結合の差示的分析を検討する。本発明はまた、アレイスクリーニングによって差示的に同定されるタンパク質の富化もしくは精製、およびその後の配列決定もしくは構造分析を可能にす

40

50

る。本発明に従うプロテオミクス分析のためのタンパク質結合マイクロアレイを備えるキットもまた、提供される。

【0009】

1つの局面において、本発明は、固体支持体の表面上に提示されたタンパク質のアレイに関する。このアレイは、反射性（「鏡面仕上げされた」）金属表面において、特定の波長からの蛍光を増幅させるように最適化された厚さを有する実質的に平面な誘電体のコーティング層を有する固体基板を含む。この誘電体は、好ましくは、酸化物、例えば、二酸化ケイ素（ SiO_2 ）である。この誘電体のコーティング層は、有機的に官能基化されて、複数の異なるタンパク質アレイ要素が基板表面に結合することを可能にする。各々のアレイ要素は、目的のタンパク質であり、天然の形態または改変された形態で基板表面に安定に結合される。アレイ要素の結合は、必要に応じて、安定に結合されたアダプターを介し得、基板表面に安定に結合され得る。 10

【0010】

本発明の特定の実施形態において、このアレイは化学ブロックをさらに含み、この化学ブロックは、非特異的なタンパク質吸着を阻害するために基板表面上に提示された相補的な分子に対して特異的に結合する1以上の種での基板表面のさらなる誘導体化である。この化学ブロックは、一般的には、合成ホモポリマーまたは合成ホモオリゴマーである。例としては、ポリエチレングリコール（PEG）、および基板に結合する末端を有するオリゴマーのN置換グリシンもしくはペプトイド（例えば、他の不活性な親水性ポリマー）に基づくPEGアナログが挙げられる。アレイ要素のスポットの後のこのような化学ブロックを用いる基板表面の処理は、アレイに対する非特異的タンパク質結合を減少させる（そしてそのことによって、アレイの感度および分解能を高める）ことが示されている。このような処理は、複合タンパク質混合物（例えば、複合生体混合物（例えば、細胞溶解物、血清、全血、尿、および他の体液））中の標識化タンパク質の検出を可能にし、この複合タンパク質混合物は、処理されなければ、標識化混合物の広範な非特異的結合に起因して蛍光信号を混乱させる。このような極端な事象において、従来のブロック化剤（例えば、カゼイン、ウシ血清アルブミンなど（タンパク質ブロック））は、非特異的タンパク質結合の十分なブロック化を提供し得ない。 20

【0011】

他の局面において、本発明は、鏡面仕上げされた固体支持体の表面に安定に会合された複数の異なるタンパク質を含むアレイを作製する方法に関する。この方法は、実質的に平面の表面を有する固体基板を結合形成のために調製する工程、および複数の異なるタンパク質アレイ要素を、タンパク質アレイ要素が基板表面と結合を生じるために十分な条件下でこの基板と接触させる工程を包含する。このアレイは、実質的に平面な誘電体でコートされかつ官能基化された反射性金属表面を有する固体基板、およびこの基板表面に結合された複数の異なるタンパク質アレイ要素を含む。誘電体層の厚さは調整されて、実際のタンパク質結合の分析中に、特異的な励起および蛍光波長の最大限の検出を可能にする。各々のアレイ要素は、タンパク質を含み、そして必要に応じて、安定に基板表面と結合される安定な結合アダプターを含む。このアレイはさらに、アレイ要素のスポットの後に、タンパク質吸着を阻害する種（例えば、PEGまたはアナログ（基板表面に結合する末端を有する他の不活性ポリマー））を1以上用いる基板表面のさらなる誘導体化を含み得る。上記で言及したように、このような処理は、複合生体混合物（例えば、細胞溶解物、血清、全血、尿、および他の体液）中の標識化タンパク質の検出を可能にし、この複合生体混合物は、処理されなければ、標識化混合物の広範な非特異的結合に起因して蛍光信号を混乱させる。このような極端な事象において、従来のブロック化剤（例えば、カゼイン、ウシ血清アルブミンなど（タンパク質ブロック））は、非特異的タンパク質結合の十分なブロック化を提供し得ない。 30 40

【0012】

本発明のさらなる局面は、差示的結合アッセイを実施する方法に関する。この方法は、タンパク質含有生物学的サンプル溶液中のタンパク質を標識化する工程、標識化タンパ 50

ク質含有生物学的サンプル溶液のアリコートをし、本明細書中に記載されるようなアレイと接触させる工程、およびアレイを分析して、アレイのタンパク質結合剤に対するサンプル中のタンパク質の差示的結合を決定する工程を包含する。この様式において、複合混合物中の他のタンパク質の非特異的結合の障害が、特に重要である。

【0013】

本発明の別の局面は、本明細書中に記載されるような差示的結合アッセイを実施することにおける使用のためのキットに関する。このキットは、基板に結合された複数の異なるタンパク質因子を有し、実質的に平面の表面を有する固体基板を有するアレイを備える。

【0014】

本発明はまた、混合物中で生物学的マーカーとして作用し得る特定のタンパク質の検出に関する。例えば、薬物または他の処理に応じて一連のタンパク質の濃度が増加または減少する場合、これらのタンパク質の運命を追跡し得る。 10

【0015】

本発明のアレイは、このアレイ上にスポットされた潜在的なタンパク質抗原に対する血清中の抗体の検出のために、有用に適用され得る。これらの研究は、免疫刺激抗原を同定するためにこれらの患者における免疫応答を決定することを助け得る。適切な抗原を発見することによって、新しいワクチンが開発され得る。

【0016】

本発明のこれらの特徴および利点、ならびに他の特徴および利点は、以下の本発明の明細書および本発明の原理を一例として図示する添付の図面においてより詳細に示される。 20

【0017】

(発明の特定の実施形態の説明)

ここで、本発明の材料および関連技術および装置が、いくつかの実施形態を参照して記載される。記載される実施形態の重要な性質および特性は、本明細書の本文および添付の図面における構成中に示される。本発明は、これらの実施形態と関連して記載されるが、本発明が、これらの実施形態に限定されることを意図されないことが理解されるべきである。反対に、添付の特許請求の範囲によって規定されるような本発明の精神および範囲内に含まれ得る代替物、改変体、および等価物を網羅することが意図される。以下の記載において、多くの特定の詳細が、本発明の徹底的な理解を提供するために示される。本発明は、これらの特定の詳細のいくつか、またはすべてを有さずに実施され得る。他の事例において、周知のプロセス作業は、本発明を不必要に不明瞭にしないために、詳細には記載されていない。 30

【0018】

本明細書および添付の特許請求の範囲において、「含む (comprising)」、「～を包含する方法 (a method comprising)」、「～を備える装置 (an apparatus comprising)」または類似の言葉と共に使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が明確に他を示さない限り、複数の参照を含む。他に定義されなければ、本明細書中に使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の一般的に理解される意味と同じ意味を有する。

【0019】

(緒言)

本発明は、タンパク質提示マイクロアレイ (本明細書中で「タンパク質マイクロアレイ」ともいう)、それらの製造方法、使用および適用を提供する。本発明の異なるタンパク質アレイ要素は、鏡面仕上げされた固体支持体に直接的かまたは間接的に安定に結合される。本発明に従うタンパク質マイクロアレイは、種々のプロテオミクス分析に有用である。本発明に従う種々のタンパク質アッセイは、タンパク質 (例えば、抗体) の大きなアレイを固定化し得、これは、疾患プロセスの理解を改善するためのタンパク質-タンパク質相互作用を研究するのに有用であり得、混合物中の特定のタンパク質のレベルをモニタリングすることによって薬物作用の機構を推論するか、薬物送達を容易にするか、またはワクチン開発のための強力な抗原を同定するのに有用であり得る。本発明はまた、濃縮また 50

は精製、ならびにその後のアレイスクリーニングによって差示的であると同定される部分配列のタンパク質または構造分析を可能にする。本発明に従うプロテオミクスマイクロアレイを含むキットがまた、提供される。

特に、本発明は、蛍光標識された結合パートナー（例えば、Cy 3またはCy 5の他の蛍光プローブ）が支持体の表面に結合したアレイ要素と相互作用するアッセイにおいて鏡面仕上げされたアレイ支持体表面の使用によって増強した信号を生成するアレイ（本明細書中で「蛍光アレイスキャニング」または「スキャニング」と言われる）を提供する。種々の市販のアレイスキャナは、cDNAアレイスキャニングにおける使用のために主に入手可能である。本発明に従うこのような感受的なタンパク質マイクロアレイは、種々のプロテオミクス分析に有用である。本発明に従う種々のタンパク質アレイは、タンパク質の大きなアレイを固定化し得、これは、疾患のプロセスの理解を改善するためのタンパク質-タンパク質相互作用の研究のため、新規薬物標的の開発による薬物送達の促進のため、疾患の状態に関連するバイオマーカーを同定するため、薬物または他の刺激物に応答するタンパク質レベルをモニタリングするためにまたはワクチン開発の強力な抗原を同定するために有用であり得る。

10

【0020】

本発明に従うマイクロアレイによって提示されたタンパク質アレイ要素は、ネイティブなタンパク質または改変されたタンパク質（例えば、抗体またはタンパク質融合物）である。タンパク質アレイ要素は、基板（例えば、アミンまたはマレイミド）の官能基とタンパク質（例えば、活性化カルボン酸またはチオール）との結合反応によって有機官能基化基板に直接的にかもしくは間接的に結合され得るか、または表面に提示される同族リガンドもしくはタンパク質（例えば、グルタチオン）と非共有的に相互作用するタンパク質（例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）に対するタグを使用し得る。本発明は、鏡面仕上げされた固体平面基板のアレイ要素のスポッティング、複合タンパク質混合物の標識化、タンパク質バイオマーカーの検出およびアレイに結合する異なるタンパク質の分析を意図する。本発明はまた、濃縮または精製ならびにその後のアレイスクリーニングにより差異として同定されるタンパク質の部分配列の配列決定または構造分析を可能にする。本発明に従うプロテオミクス分析のためのタンパク質結合マイクロアレイを含むキットもまた提供される。

20

30

【0021】

1つの局面において、本発明は、固体支持体の表面に提示されたタンパク質のアレイに関連する。アレイは、反射的な（「鏡面仕上げされた」）金属表面上の特定の波長からの蛍光を増幅するように最適化された厚さを有する、実質的に平面の誘電性コーティング層を有する固体支持体を含む。誘電体は、好ましくは酸化物（例えば、二酸化ケイ素（SiO₂））である。誘電性コーティング層は、複数の異なるタンパク質アレイ要素が基板表面に結合するのを可能にするように必要に応じて官能基化される。各アレイ要素は、目的のタンパク質であり、基板表面に安定に結合されたネイティブな形態であるかまたは改変された形態である。アレイ要素の結合は、必要に応じて安定な結合アダプター（これによって基板表面に安定に結合される）を介し得る。種々の特定の実施形態において、本発明に従うアレイは、官能基化された基板表面に直接的に結合されたタンパク質；二官能基化アダプターを介して基板表面に結合されたタンパク質；基板表面のビオチン官能基を介して基板表面に結合したタンパク質-アビジン結合体；基板表面のアビジン官能基に結合したビオチン化タンパク質；基板表面の相補的なタンパク質官能基に結合されたタンパク質（例えば、アレイ要素は抗体であり得、そして基板表面は、プロテインAまたはプロテインGのアダプター末端を用いて官能基化され得る）；各アレイ要素は、基板表面の相補的なタンパク質官能基に結合される融合タンパク質であり得る（例えば、アレイ要素は、GST融合タンパク質であり得、そして基板表面はグルタチオンのアダプター末端を用いて官能基化され得るか、または基板上の抗glu抗体に結合するEYMPME（glu）ペプチドの融合、または基板上の金属キレート（例えば、ニッケル）に結合したHis-6

40

50

との融合、表面上の抗FLAGに結合したDYKDDDDKペプチド（「FLAG」）との融合、または表面上のマルトースもしくはマルトデキストリンに結合されるマルトース結合タンパク質との融合；あるいは組換えタンパク質を発現する場合代表的に作製される他の公知のタンパク質融合）の形態を取り得る。

【0022】

本発明の特定の実施形態において、アレイは、化学的ブロック剤；非特異的タンパク質吸収を阻害するための基板表面上に提示される相補的な分子に特異的に結合する1種以上の種を用いる基板表面のさらなる誘導体化をさらに含む。本発明に従う化学的ブロック剤（化学的ブロッキング剤）は、ポリマーの非タンパク質、オリゴマーの非タンパク質、一般的な合成ホモポリマー（例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、PEGアナログ）10、または基板に結合する1つ以上の末端を有する他の不活性化親水性ポリマー（例えば、親水性N置換グリシンまたはペプチド）である。例えば、マレイミドで官能基化した基板表面に対する化学的遮断剤は、チオール改変ポリエチレングリコール（PEG）であり得る。1つの特定の例は、ジチオール改変PEG（SH-PEG-SH）（例えば、これは、約3400～5000の分子量を有する）（例えば、Shearwater Polymersから市販される）である。オリゴマーのブロック剤（例えば、親水性N置換グリシンまたはペプチド）は、非常に十分に規定された分子量および純度の化学的ブロックポリマーまたは化学的ブロックオリゴマーを提供する。アレイ要素のスポッティングに次ぐこのような化学的ブロックを用いる基板表面の処理は、アレイに結合する非特異的タンパク質を減少すること（そして、従ってアレイの感度および分解能を増加した）を示20した。このような処理は、標識された混合物の広範な非特異的結合に起因して、蛍光信号を混乱させる複合生物学的混合物（例えば、細胞溶解物、血清、全血、尿および他の体液）中の標識されたタンパク質の検出を可能にする。このような極端な場合において、簡便なブロッキング剤（例えば、カゼイン、ウシ血清アルブミン、など（本発明に従って使用される化学的ブロック剤からこれらを区別するために、タンパク質ブロック剤と本明細書中で呼ばれる））は、非特異的タンパク質結合の十分なブロッキングを提供し得ない。

【0023】

別の局面において、本発明は、鏡面仕上げされた固体支持体の表面に安定に結合する複数の異なるタンパク質を含むアレイを作製する方法を提供する。この方法は、実質的に平面の表面を有する固体支持体を結合するために調製する工程、およびタンパク質要素を基板表面に結合するようするための十分な条件下、基板と複数の異なるタンパク質アレイ要素を接触する工程を包含する。このアレイは、実質的に平面の誘電体でコートされ、かつ官能基化された反射性の金属表面を有する固体基板および基板表面に結合した複数の異なるタンパク質アレイ要素を含む。誘電層の厚さは、タンパク質結合の実際の分析の間、特定の励起および蛍光波長の最大の検出を可能にするように調節される。各アレイ要素は、タンパク質および必要に応じて安定な結合アダプター（これによって基板表面に安定に結合される）を含む。アレイは、アレイ要素のスポッティングに次いで、タンパク質吸着を阻害する1つ以上の種（例えば、PEGまたはアナログ（基板表面に結合する末端を有する他の不活性化ポリマー））を用いる基板表面のさらなる誘導体化をさらに含む得る。上記のように、このような処理は、標識された混合物の広範な非特異的な結合に起因して、40 蛍光信号を他に混乱させる複合生物学的混合物（例えば、細胞溶解物、血清、全血、尿および他の体液）中の標識されたタンパク質の検出を可能にする。このような極端な場合において、簡便なブロッキング剤（例えば、カゼイン、ウシ血清アルブミン、など（タンパク質ブロック剤））は、非特異的タンパク質結合の十分なブロッキングを提供し得ない。

【0024】

（1. タンパク質マイクロアレイ）

本発明に従うタンパク質マイクロアレイは、固体支持体の鏡面仕上げされた表面に結合された多数の異なる提示されたタンパク質アレイ要素（例えば、抗体または融合タンパク質および他の合成タンパク質が挙げられる）から構成される。この異なる各アレイ要素は、基板表面に直接結合され得るか、または1つ以上の化学種（本明細書中で「アダプター50

」といわれる)を介して基板表面に間接的に結合され得る。本願において使用される場合、用語「～結合される (a t t a c h e d t o)」または「～結合される (b o u n d t o)」または「～結合される (a s s o c i a t e d w i t h)」とは、マイクロアレイが供される処理の間の、通常、操作条件下での分子種間の安定な関係をいう。従って、本発明に従って、適切な基板表面の適切なタンパク質アレイ要素の濃度および密度は、例えば、本明細書中に記載されるようなその通常、操作条件下でマイクロアレイが供される処理の間、維持される。本発明に従うマイクロアレイの表面に存在する異なるタンパク質アレイ要素の数は、少なくとも2であり、10以上であり得るか、または100以上であり得、そしてはるかそれ以上であり得、一般的に、少なくとも約1,000であり、そして本明細書の以下にさらに記載されるように、約5,000～約50,000 (例えば、約5,000～約10,000)であり得る。 10

【0025】

図1Aおよび1Bは、それぞれ、本発明に従うアレイ要素の型および1つのアレイの型を示す。図1Aに示されるように、タンパク質アレイ要素100は、固体基板106の表面に結合されるタンパク質102である。このタンパク質は、そのネイティブな状態であり得るか、またはそのネイティブな結合特性を理想的に保存するいくつかの方法において改変され得る。このような改変は、特定の官能基の化学的還元または活性化 (例えば、それぞれ、チオール基またはカルボン酸基)を含み、基板への結合または融合タンパク質 (例えば、GST-タンパク質融合)の形成を促進する。アレイ要素のタンパク質102は、基板に直接的にかまたは適切な分子実体104 (本明細書中で「アダプター」といわれる)を介して結合され得、固体基板106の表面へのタンパク質アレイ要素の結合を促進するのに適している。 20

【0026】

基板は、一般的に、反射性金属 (「鏡面仕上げされた」) 表面層112、誘電 (例えば、酸化) 層110および基板106へのアレイ要素102の結合を促進するのに適した有機表面改変層106 (必要に応じてアダプター104を介する)を有する固体支持層114を含む複数の層から構成される。図1Bは、図1Aに例示されるような、平面基板106に結合される複数の異なるアレイ要素100を含むタンパク質アレイの簡単な図を示す。本発明に従うアレイの他の特性 (例えば、要素内の分子種は、基板に適用され、アレイのタンパク質の非特異的結合を減少する)は、この高レベルの描写において可視でない。 30
これらのアレイ要素型および成分、ならびに本発明に従うアレイの形態および組成の各々は、以下により詳細に別々に記載される。

【0027】

(A. アレイ基板) 本発明に従うアレイで使用される固体基板 (図1Aおよび1B、要素106)は、生産される産物の意図された使用に大いに依存して変化し得る。この固体支持体114は、鏡面仕上げされた表面を提供し、そしてこのアレイが使用される任意の分析方法とまた適合する反射性金属層112を支持するための任意の適切な材料であり得、そして不浸透性の剛性の材料を含む。適合性は、界面化学または材料化学分野の当業者に公知の方法および材料を使用して決定され得る。1つの好ましい実施形態において、この固体支持体は、顕微鏡用のスライドガラスである。適切な材料としてはまた、ガラス (例えば、石英から形成されるガラス)、またはシリコン; および金属 (合金を含む) (例えば、金、白金、銀、銅、アルミニウム、チタン、クロム、ロジウム)などが挙げられる。他の適切な固体支持体材料としては、プラスチック (例えば、ポリマー (例えば、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリアクリレート、ポリカルボネートおよびそれらのコポリマー (例えば、塩化ビニル/プロピレンポリマー、塩化ビニル/酢酸ビニルポリマー、スチレンコポリマー)))などが挙げられる。 40

【0028】

上記のように、本発明に従うアレイに使用されるための適切な基板106は、誘電体でコートされた鏡面仕上げされた表面を有する。基板106は、一般的に、複数の異なる材料層の複合体であり、ここでこの複合体は、塩基性の強固な、実質的に平面の固体支持体 50

材料（例えば、図1A中の要素114によって示される）および複数の固体支持体上の層（例えば、図1A中の要素108、110および112によって示される）を含む。固体支持体114は、反射性金属層112を有する（反射性金属の場合）かまたは反射性金属層112でコートされる。反射性金属によって、目的の波長領域における少なくとも90%の入射光、一般的に可視光（400～800nm）および近赤外線（例えば、800～1100nm）のより長い波長をおそらく含み、媒体中へと反射される非常にわずかな（0%かまたは0%に近い）光を反射する金属を意味する。適切な例としては、アルミニウム、クロム、銅、金、銀、白金、チタン、ロジウムなどが挙げられる。

【0029】

反射性金属は、誘電体110（例えば、酸化ケイ素（silicon oxide）または二酸化ケイ素（シリカ）またはアルミナまたはMgF₂のようなフッ化物、または二酸化チタン）でオーバーコートされる。二酸化ケイ素は、多くの実施形態において好ましい。この層の厚さは、国際特許出願番号WO98/53304（本明細書中で全ての目的のために参照として援用される）にさらに詳細に記載されるように、蛍光種からの信号を最適化するように調節され得る。誘電層（例えば、二酸化ケイ素）は、二官能性有機表面層108（例えば、アミノ改変シラン）を用いて官能基化され、基板106へのアレイ要素100の結合を促進するのに適している。適切なアルミニウム／オキシド／アミノプロピルシラン（APS）でコートしたガラススライドは、Amersham-Pharmacia, Amersham, Englandから市販される。基板は、例えば、標準的な3インチ×1インチ顕微鏡スライドの寸法、または3インチもしくは5インチの直径の円形ウエハの形状であり得る。他の外形は、界面化学または材料化学の分野の当業者に明らかである。

【0030】

上記のスライドの平面矩形の実施形態において、支持体の長さは、一般に、少なくとも約1cmであり、そして、約40cm以上程度であり得るが、通常、約30cmは超えず、そしてしばしば、約20cmを超えない。支持体の幅は、一般に、少なくとも約1cmであり、そして、約40cm以上であり得るが、通常、約30cmは超えず、そしてしばしば、約20cmを超えない。支持体の高さは、一般に、強固な基板が製造される材料の部に少なくとも依存し、かつ、必要とされる強固さを提供するために必要とされる材料の厚さに依存して、約0.01mm～約10mmの範囲である。多くの実施形態において、特に興味深いのは、支持体が、標準的な顕微鏡用スライドの寸法を有していることである。1つの代表的な基板の大きさは、約2.54cm×7.62cmであり、約1～2mmの厚さである。しかし、任意の適切な寸法が採用され得る。

【0031】

上に示すように、本発明にしたがって、ベース固体支持体材料の表面は、反射性金属（例えば、アルミニウム）の層を有するか、または、反射性金属の層でコーティングされている。いくつかの実施形態において、固体支持体は、完全に、反射性表面を有する金属材料から構成され得る。より一般的には、固体支持体は、金属以外の材料（例えば、ガラス）から構成され、反射性金属層でコーティングされた表面を有する。金属層の厚さは一般に、約300Å～約10,000Å、より具体的には、約750Å～約2,000Å、そして、なおより具体的には、約1,000Å～約1,500Åの範囲である。本発明に適した1つの具体的な厚さは、1000Åである。金属層は、当業者に公知のように、電子線堆積、蒸着、スパッタリング、電気メッキなどを含む、任意の適切なプロトコルを使用して、基板表面上に堆積され得る。特に、非付着性金属（例えば、金）が堆積される場合、付着金属層が、金属層と基板との間に存在し得、目的の付着金属としては、チタン、クロムなどが挙げられる。存在する場合、付着金属層は代表的には、約5Åと約100Åとの間の厚さ、通常は、約25Åと約75Åとの間の厚さ、そして、多くの実施形態においては、約50Åである。いくつかの実施形態において、上記の付着層は、分子付着層であり得る。本発明に従う分子付着層を形成するのに適切な材料の例としては、当該分野で公知のように、以下が挙げられる：メルカプトプロピルトリエチルオキシシランおよび他の

メルカプトアルコキシシラン（例えば、メルカプトプロピルトリメチルオキシシラン、メルカプトプロピルトリクロロシラン、または他の鎖長（例えば、メルカプトヘキシルトリエトキシシラン、および、他のメルカプトヘキシルアルコキシシラン。付着層が分子付着層である場合、付着層の厚さは代表的には約 5 Å～約 50 Å の範囲である。

【0032】

上記のように、タンパク質アレイ要素は、基板の酸化コーティングされた反射性金属上に存在する二官能性の有機層（図 1 A、要素 108）を介して基板に取り付けられる。二官能性層の有機分子の末端は、一端で基板表面に安定に付着し得る反応性基で官能基化され、この反応性基は、もう一方の端で、必要に応じてアダプターを介して、タンパク質アレイ要素に安定に付着し得る。有機層反応性基の重要な特徴は、タンパク質アレイ要素上に示される対応する官能基とのその反応が、機械式アレイスポッタにより表面に堆積される液滴の平均寿命内に完了するように、十分容易であることである。シランは、誘電体（例えば、酸化金属表面、および、次いで、安定に種々のタンパク質もしくはリンカー分子に結合し得るか、または、さらに化学的もしくは生物学的に修飾されて結合を可能にし得る多くの分子種を安定に結合するのに適したアミノ基）に結合するのに、特に十分に適している。従って、1つの特定の実施形態に従って、アミノアルキルトリアルコキシシラン（例えば、アミノプロピルトリエトキシシラン（APS）、トリクロロシラン、トリメトキシシランまたは他のトリアルコキシシラン）の層が、誘電体 110 の表面上にコーティングされる。さらに、表面化学技術分野の当業者により理解されるように、他のアミノシランが（例えば、より長いアルキル基（例えば、オクチル、デシル、ヘキサデシルなど）を有する化合物、または、アルキルオキシ基（例えば、高次のシラン層を形成し得る 1 つ以上のエチレンオキシド単位（例えば、3））を有する化合物）がまた使用され得る。このシラン層の厚さは、約 3 Å～約 100 Å、より好ましくは、約 5 Å～約 50 Å、なおより好ましくは、約 7 Å～約 20 Å であり得る。1つの適切な例は、約 7 Å の厚さの APS 層である。アミノ修飾金属オキシド表面は、以下にさらに記載されるようなタンパク質アレイ要素に結合するアダプターの部分を形成する反応性基で、さらに官能基化され得る。

【0033】

本発明の 1 つの具体的な実施形態において、基板は、約 1000 Å 厚のアルミニウム層でコーティングされたガラス顕微鏡スライドから構成され得る。このアルミニウムコーティングスライドは次いで、約 800 Å の厚さを有する二酸化ケイ素の層でコーティングされ得る。この厚さは、国際特許出願番号 WO 98/53304（以前に、本明細書中に参考として援用した）にさらに記載されるように、放射光もしくは励起光の波長の約 1/4、または、2つの異なる波長の間の中継点（compromise）に、大まかに対応するように選択される。この層の厚さは、反射に起因する光の推定干渉を可能にし、そしてまた、定常波がオキシド層において発生することを可能にし得るように仮定される。信号強度が振幅の 2 乗に相関するので、このような定常波は、単反射により得られる信号に加えて、少なくとも 4 倍以上強い信号を生じる（ガラススライドと比較して、光の損失が全くないか、または光の損失が非常に減少しているためである）。実際、20～50 倍の信号増幅が、ガラススライドと比較して、面仕上げされたスライドについて観察される。約 7 Å 厚のアミノプロピルトリエトキシシラン（APS）の層が、オキシドの表面でコーティングされる。

【0034】

（B. アダプター）

上記のように、本発明に従うマイクロアレイは、基板、アレイ要素、および、必要に応じて、アダプターから構成される。使用される場合、アダプターは、単独または組み合わせて二官能性の分子部分を形成する、一般的に有機物である 1 つ以上の分子種から構成され得る。この有機分子種を介して、タンパク質アレイ要素が、本発明に従う基板に安定に取り付けられる。当業者に認識されるように、一端でアレイ要素に、そして、他端で基板表面に安定に結合し得るパラメーター内で、可能性のある分子の巨大なアレイを使用して、本発明に従うアダプターを形成し得る。無数の可能な配置において、アダプターは、1

つ以上の分子から構成され得る。アダプターの分子は、ホモ二官能性またはヘテロ二官能性であり得る。アダプター分子は、一般に、1もしくは2～3の総分子量約1000未満（「低分子」）の別個の分子種、または、より大きなタンパク質から構成され得る。

【0035】

アダプターは、基板上の有機層に安定に結合する。こうして、アダプター分子部分は、基板表面上の有機層により示される官能基（例えば、アミノ）に結合して、引き続いて、直接または、最初に基板もしくはアレイ要素のタンパク質に結合されたさらなる分子種を介してのいずれかでタンパク質アレイ要素に結合するはずである。例えば、適切なアダプターは、一端に活性化されたエステルを有し、他端にマレイミドを有する分子（例えば、スクシンイミジル-4-（N-マレイミドメチル）-シクロヘキサノ-1-カルボキシレート（SMCC））であり得、この分子は、エステル末端で反応して、基板表面により示されるアミノ基と、共有アミド結合を形成し得、そして、露出されているマレイミド末端で、タンパク質アレイ要素中のチオール（スルフヒドリル）基を還元し得る。

10

【0036】

一般に、基板表面上の官能基（例えば、アミン）と反応して、安定な（例えば、アミド）結合を形成し得る任意の基が、本発明に従うアダプターの基板結合末端として使用され得る。アダプターにおいて使用され得るこのような分子種の例としては、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）のような活性化されたエステルが挙げられる。1つの実施形態において、ホモ二官能性NHSエステル（ビス-NHSエステル）をアダプターとして使用して、露出されたアミンを有するタンパク質を、基板のアミン表面へと接続し得る。代替的な実施形態において、種々の官能基を有するヘテロ二官能性NHSエステル分子、または、アミンと反応する、当業者に公知の他の活性化エステルもしくは無水物が使用され得る。他の可能な官能基としては、タンパク質アレイ要素、または、アレイ要素においてタンパク質に結合される別の分子種に依存して、アレイ要素においてアルデヒド部分またはケトン部分と反応して共有結合を形成し得るヒドラジド、アレイ要素においてケトン部分と反応して共有結合を形成し得るアミノオキシ、無水物、アルデヒド、ジスルフィド、チオール、アジド、ホスフィン、ビオチンもしくはアビジン、ストレプトアビジン、ノイトラビジン、または、ビオチンに結合するタンパク質アビジンの他の変更された形態が挙げられる。別の適切なアダプター種は、官能基化デキストランである。これらの種は、化学分野の当業者に周知であり、容易に確認可能な技術により、そして、化学分野の当業者に周知であり、容易に確認可能な他の必須の分子を使用することによって、有機官能基化基板表面を形成し、かつ、結合し得る。

20

30

【0037】

1つの具体的な例において、ビオチンのNHSエステルが基板表面上のアミンに結合され、一端でアミド結合を形成し、他端でビオチン化部分を形成する。この表面を、次いで、アビジンで処理して、ビオチン化タンパク質をその上にスポッティングし得る。

【0038】

タンパク質アレイ要素をアミノ修飾基板表面上に結合させるための他の適切なアダプターとしては、抗体を結合させるためのプロテインAもしくはプロテインG、または、タンパク質-GST融合を結合させるためのグルタチオンのようなタンパク質が挙げられ、これらは、以下にさらに記載される。

40

【0039】

このアダプターは、アレイ要素の固体表面への安定な結合を提供する。多くの例において、アダプターは、スポッティング技術によるタンパク質アレイ要素の結合の前に、基板表面上に示される官能基を介して基板に結合される。上記のように、アダプターが使用されない場合、基板有機層の観点から、アダプターの重要な特徴は、タンパク質アレイ要素に提示される対応する官能基との反応が、十分に容易であり、その結果、この反応が、機械式アレイスポッタにより表面上に堆積される液滴の平均寿命内に完了することである。例えば、表面上のアダプターがマレイミドである場合、タンパク質アレイ要素上の適切な対応する基は、チオールであり、約10 nLの滴が蒸発する前に、約60%の湿度にて、

50

約 15～20 分が、結合反応の完了に必要とされる。もちろん、液滴の寿命は、温度、湿度および、反応が起こるのにより長い時間またはより短い時間を可能にする他の条件により変化する。

【0040】

いくつかの実施形態において、アダプターは、タンパク質と分析物溶液（マイクロアレイが接触する溶液）との間の相互作用を促進するのに十分な、固体表面とタンパク質アレイ要素との間の分離を提供するように選択され得る。例えば、十分な分離は、基板表面とタンパク質アレイ要素との間に提供され得、その結果、この表面は、タンパク質アレイ要素において（引き続き）生じるタンパク質結合を干渉しない。アダプターはまた、表面上のタンパク質アレイ要素を互いに分離し、それによって、アレイ上のタンパク質結合の間の可能な立体障害を緩和するように機能し得る。代表的なアダプターとしては、約 2～約 200 原子、好ましくは、約 6～約 30 原子の間の骨格を有する分子が挙げられ得る。この骨格は、例えば、脂肪族鎖（例えば、アミノヘキサン酸のようなアミノアルカン酸）、エチレンオキシド、スルホキシド、または、アレイの各要素に絶えず残る「非結合」（「直交性」）の短いペプトイド要素もしくはペプチド要素、あるいは、これらの構成要素のいくつかの組み合わせから構成され得る。1つの実施形態において、2-炭素アダプター骨格が使用され得る。別の実施形態において、3つのエチレンオキシドが使用され得る。一例として、各タンパク質アレイ要素に絶えず残る、メトキシエチル側鎖の短いペプトイド（2マー～12マー（例えば、4マー）である）が使用され得る。適切なペプチドアダプター骨格は、2マー～12マー（例えば、5マー）のグリシンである。

10

20

【0041】

アダプターの性質は、基板の官能基およびアレイに組み込まれるタンパク質の性質に依存して高度に可変性であり得ることが認識されるべきである。本発明に従う適切な基板／アダプター／タンパク質の組み合わせのいくつかの例は、以下の第 E 節において記載する。

【0042】

（C. タンパク質アレイ要素）

上記のように、本発明のタンパク質アレイ要素は、固体基板に直接または間接的（アダプターを介して）結合されるタンパク質である。タンパク質アレイ要素は、抗体および融合タンパク質を含む、任意の型の未修飾タンパク質または修飾タンパク質であり得る。タンパク質アレイ要素は、有機修飾基板表面上の官能基と、タンパク質の官能基との間の直接結合によってか、または、より一般的には、本明細書中でアダプターとして証される、基板表面および／もしくはタンパク質上に存在する適切な分子種を介して、固体基板の表面に結合され得、固体基板の表面へのアレイ要素の結合を容易にする。

30

【0043】

上記のように、アレイの表面上に存在する異なる型のタンパク質アレイ要素の数は、少なくとも 2 である。「異なる」とは、異なるアレイ要素のタンパク質が同じでないことを意味する。アレイの表面上に存在する異なる種のタンパク質アレイ要素の数は少なくとも 2、少なくとも約 10、少なくとも約 50、または、少なくとも約 100 である一方、この数は、代表的には、より多く、一般には、少なくとも約 1,000 であり、通常は、少なくとも約 5,000 であり、より通常は、少なくとも約 10,000 である。この数は、500,000 と同程度またはそれ以上であり得るが、代表的には、約 100,000 を超えず、通常は、約 50,000 を超えない。

40

【0044】

（D. 表面化学ブロッキング）

アレイ基板（チップ）上へのアレイ要素のスポッティングの後、チップの残りのコーティングしていない表面が、親水性末端を示す分子で官能基化され得る。これらの親水性末端は、複合体混合物中のタンパク質の非特異的な結合を減少または排除することが予測される。親水性部分は、アルコール、炭化水素、アミノ酸、スルホキシド、アクリルアミド、および、エーテルのような親水性末端を有するアルコール、スルホキシド、炭化水素、

50

アクリルアミド、または、他の低分子タンパク質結合基から構成され得る。親水性提示分子は、既にスポットティングされたタンパク質アレイ要素と同じ様式でチップに係合される。例えば、チップは、システイン、メルカプトエタノールまたは他の適切な親水性チオールを用いて化学的にブロックングされ得る。チップはまた、またはあるいは、2% BSA/ PBS、10%無脂肪粉ミルクもしくは1%カゼインのようなタンパク質で、少なくとも1時間ブロックングされ、水でリンスされ、そして乾燥され得る。他の可能なブロックング剤は上記される。ブロックング剤は、当業者に周知の方法（例えば、ブロックング剤溶液中にチップを浸漬すること、ブロックング剤溶液を用いてチップの表面を塗布すること、または、スピンコーティングすること）によって、チップに適用され得る。

【0045】

あるいは、タンパク質アレイ要素を囲む表面領域が、タンパク質のバックグラウンド非特異的結合を最小化するためにポリマー化学ブロック剤またはオリゴマー化学ブロック剤で修飾され得、複合体サンプル（例えば、溶解産物または血清）が単一の工程で試験されることを可能にする。タンパク質アレイ要素を、アレイに対する非特異的タンパク質結合を還元または削除する親水性ポリマー分子またはオリゴマー分子をスポットした後、この表面は、化学的にブロックされ得る。BSAおよびカゼインのような従来のタンパク質ブロkkerとは対照的に、ポリマー性化学ブロkkerまたはオリゴマー化学ブロkkerは、そのみでまたはタンパク質ブロkkerと共に使用され得る合成分子である。特定の実施形態において、化学ブロkkerおよびタンパク質ブロkkerは、共に使用され得（例えば、順に化学ブロックに続いてタンパク質ブロックまたはタンパク質ブロックと混合された化学ブロック）、次いでスポット後にアレイ表面に適用され得る。ポリマー性化学ブロック（例えば、その末端で修飾されて基板表面上に表示される官能基と結合するPEG）が、タンパク質アレイチップ上の複合体混合物からタンパク質の特異的結合を分解するためにより効果的であることが見出されてきた。ポリマー性化学ブロック剤またはオリゴマー性化学ブロック剤が、スポット後に側面をブロック剤に浸漬することによりアレイに接着し得る。

【0046】

例えば、特定の実施形態において、化学ブロック剤は、少なくとも1つの末端で修飾されるポリエチレングリコール（PEG）アナログであり、その結果、これは、アレイ要素により占められていない有機官能基化された基板表面と反応し、そして結合する。例えば、マレイミド官能基化表面に対する化学ブロック剤は、チオールで修飾されるポリエチレングリコール（PEG）であり得る。1つの特定の例は、ジチオールで修飾されたPEG（SH-PEG-SH）（例えば、約3400~5000の分子量を有する）（例えば、Shearwater Polymersから市販されている）である。ブロック剤は、以下に記載されるようにアレイ要素スポットティングが完了した後に、またはその前の工程で、カゼインと共に適用され得る。ブロkker末端に対する可能性のある官能基は、上に列挙されるアダプター（例えば、ビオチン、アミン、活性エステルなどであり得る）に対する官能基と同じである。

【0047】

本発明に従う別の種類の化学ブロックは、種々の表面官能基と容易に接着され得る親水性側鎖で誘導体化されるN-置換グリシンの明確な単分散オリゴマー（ペプトイド）により提供される。適切な側鎖は、1つ以上のエチレングリコール単位を有し得るか、またはヒドロキシル、スルホキシド、またはタンパク質吸着を阻止する他の親水性基（例えば上記されるような）からも構成され得る。これらの分子は、タンパク質結合を阻止するように設計され、タンパク質アレイの特定のタンパク質結合分子（例えば、抗体、融合タンパク質など）と共に散在される。これらの化学ブロkkerは、タンパク質抵抗性部分（protein-resistant moiety）の高密度充填が最適であり得、従って非特異的タンパク質結合（NSPB）に対する改善された抵抗性を提供する。これらのペプトイド化学ブロkkerならびにその合成および適用は、図3を参照して以下にさらに記載される。

10

20

30

40

50

【0048】

(E. アレイの一般的特徴)

代表的に、アレイは、固体基板上に複数のタンパク質スポットを有することにより特徴付けられ、ここで各々のスポットは、支持表面に結合した同一のタンパク質の1つ以上（通常は複数）を有することにより、特徴付けられる。アレイの表面上の異なるスポットの数は、アレイ上の異なるタンパク質の数と同じでも同じでなくても良い（例えば、同じタンパク質が、アレイ表面上の2つ以上のスポットで表示され得る）。1つの実施形態において、各々のタンパク質が、アレイ中で2連で表示される。アレイ要素のタンパク質の性質、支持表面のサイズ、製造方法およびアレイの意図された使用に依存して、アレイ表面上の異なるスポットの数が、大きく変わり得る。支持表面が標準的な顕微鏡スライドガラスの寸法（約3インチ×1インチ）を有する場合、支持表面上のスポットの数は、代表的に少なくとも約3,000、通常少なくとも約6,000、そしてより通常では少なくとも約10,000～50,000である。この数は、100,000以上もの多さであり得るが、代表的には約75,000を超えず、そして通常約50,000を超えない。

10

【0049】

各々のスポットの直径は、代表的に、約100 μm ～約300 μm 、通常約200 μm ～約300 μm の範囲である。任意の2つの所定のスポットの間隔は、一般に、約1 μm と約50 μm または100 μm との間である。スポットの密度は一般に、約1～約5,000スポット/ cm^2 、通常約100～2,000スポット/ cm^2 の範囲である。代表的に、スポットは、あるパターンで、スパーサー層の表面にわたって整列される。このパターンは、スポットの組織化された行（row）および列（column）の形態（例えば、基板表面にわたるスポットの格子、基板表面にわたる一連の曲線の行（例えば、スポットの一連の同心円またはスポットの一連の半円）など）であり得る。密度をさらに増大するため、これらのスポットはまた、六角形に整列され得る。スポットの他の整列はなお、本発明の範囲内である。

20

【0050】

上に記述されるように、タンパク質アレイ要素の基板への接着は、種々の形態を採りうる。ほとんどの場合において、タンパク質アレイ要素は、アダプターを介して基板に接着される。しかし、本発明に従ういくつかの場合において、接着が、アダプターを使用することなしに直接起こり得る。例えば、図2Aに示されるように、基板表面上のアミンは、タンパク質アレイ要素中の活性化カルボン酸（標準的なタンパク質化学技術によりエステルに変換される）基と直接反応し得る。この技術は、本発明に従うタンパク質の接着のために別のやり方で一般的に使用されるチオール基（システイン残基）を有さない、小さなタンパク質について特に有用であり得る。

30

【0051】

本発明に従うアダプターを介するタンパク質アレイ要素の基板への接着の多くの様式が、存在する。いくつかの例が、本明細書で以下にさらに詳細に記載される。

【0052】

図2Bに示されるように、アミン官能基化基板表面は、基板表面上に表示されるアミン基をヘテロ二官能架橋剤と反応させることにより、マレイミド基で誘導体化され得る。1つの例は、1つの末端にN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）エステル、およびもう一方の端にマレイミド基を有する分子である。NHSエステルは、基板上的アミンと反応し、マレイミド官能基化スライドを作製する。

40

【0053】

露出した、還元したチオール残基を含むタンパク質が、このようなスライド上にスポットされ、共有結合したタンパク質マイクロアレイを作製し得る。還元された全タンパク質（例えば、抗体）がまた、この様式で接着され得、ここで抗体のFc領域におけるジスルフィド基は、抗体の可変領域の活性に作用することなく、アダプターのマレイミドとの反応に利用可能なチオールに還元され得る（例えば、Levison, M. E. ら（1969）, *Experientia*, vol 25, 126-127およびBlauenste

50

in, P. ら (1995), Eur. J. Nuclear Med., vol 22, 690-698に記載されるように)。

【0054】

図2Cに記載されるように、アミン官能基化基板表面は、基板表面上に表示されるアミン基をホモ二官能架橋剤と反応させることにより活性化エステルで誘導体化され得る。1つの例は、ビス-NHSエステル分子である。アダプター的一端におけるNHSエステルは、基板上的アミンと反応して、NHSエステル官能基化スライドを作製する。露出したアミン基を含むタンパク質(例えば、プロテインA)は、このようなスライド上にスポットされて、共有結合したタンパク質マイクロアレイを作製し得る。

【0055】

図2Dに示されるように、アミン官能基化された基板表面は、アミン基を活性化ビオチン分子と反応させることにより、ビオチンで誘導体化され得る。1つの例は、一端にNHSエステルを有し、もう一方の端にビオチン基を有する分子である。NHSエステルは、スライド上のアミンと反応して、ビオチン化した(biotinylated)表面を作製する。このような表面を使用して、ロボット利用のスポットティングを介して、タンパク質アレイを表示するための種々のタンパク質-アビジン結合体を接着し得る。

【0056】

図2Eに示されるように、図2Dを参照して上記されるようなビオチン化スライドがまた、単にスライドをタンパク質溶液に浸漬することにより、アビジン、ストレプトアビジンまたは任意の他のアビジンアナログの層でコーティングされ得る。アビジンタンパク質の四量体の性質のために、部位は、アビジンがビオチン化スライドと結合した後でさえ部位が、依然として利用可能であり、従って、次いで、ビオチン化タンパク質が、アビジン処理されたスライド上でスポットされ得る。

【0057】

図2Eを参照して上に記載されるようなアビジン処理化スライドが、種々のビオチン化タンパク質溶液中に浸漬コーティングすることにより、さらに誘導体化され得る。1つの例は、アビジンでコーティングされたスライドをプロテインAまたはプロテインGの溶液中に浸漬コーティングすることである。この様式において、プロテインA/G誘導体化表面が、作製される。これらは、高度に指向された、かつ特定の様式において抗体をスポットするために使用され得る。抗体のFc部分は、プロテインAまたはプロテインGと結合することが知られている。従って、Fabフラグメントは、表面上に固定されずに表示される。またはあるいは、アビジン処理されたスライドが、ビオチン化タンパク質でスポットされる。

【0058】

また、アビジンでコーティングされたスライドの合成擬態(mimic)が、使用され得る。このモチーフにおいて、アビジンと類似の嵩高さおよび厚みのオリゴマーが、アミン誘導体化基板スライド上で浸漬コーティングされる。これらのオリゴマーは、ヘテロ二官能基であり、その結果、一端が、表面上のアミンと反応する一方、他端は、スポットしたタンパク質(例えば、マレイミドまたはチオールを有する)を結合するために活性化される。タンパク質の固体支持体への直接の接着と比べて有意に低い密度でタンパク質が表示される点において、オリゴマーにより占められる大きな領域は、アビジンのディスプレイモチーフを擬態すると予想される。

【0059】

図2Fに描かれるように、別の実施形態において、アミン官能基化基板表面(202)は、融合タンパク質と反応性であるアダプターで誘導体化され得る。例えば、GST(グルタチオンシンターゼトランスフェラーゼ、30kd)が、グルタチオン列を使用して発現されたタンパク質を精製するハンドルを提供するので、GST融合物としてのタンパク質の発現が、多くの場合所望される。さらに、GSTは、His-6のような他の融合システムと比較してはるかに大きな程度でタンパク質の溶解を補助する。最後に、GST融合物は、より低い温度で発現され得、溶解度および発現したタンパク質の適切なフォール

10

20

30

40

50

ディングをさらに補助する。次いで、適切なアダプターは、融合タンパク質と結合する非基板結合官能基を有し得る。GSTタンパク質融合物の場合において、グルタチオン基が、使用され得る。グルタチオン末端を、基板表面上に表示されるアミン基をヘテロ二官能架橋剤と反応させることにより、形成し得る。1つの例は、一端にN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルおよび他端にマレイミド基を有する分子である。NHSエステルは、基板上でアミンと反応して、マレイミド官能基化スライド(204)を作製する。グルタチオン上の遊離チオールが、マレイミドと反応してグルタチオン官能基化スライド(206)を提供するのに利用可能である。GST融合物として発現されるタンパク質に基づく機能性ドメインが、スライドを表示するグルタチオン上に容易にスポットされて、本発明に従うアレイを作製し得る。

10

【0060】

代替的な融合タンパク質アダプター戦略は、図2Eを参照して上に記載されるようなアビジン処置されたスライドを含み、このスライドは、ビオチン化したグルタチオンで官能基化され得る。このモチーフにおいて、その他端にビオチンを有するスパーサーを含むスルフヒドリル(sulthryl)で誘導体化されるグルタチオン分子が、使用され得る。アビジンでコーティングされたスライドを浸漬コーティングすることにより、グルタチオンで誘導体化される基板表面を生じ、これは、GST融合物をスポットするために使用される。

【0061】

界面化学分野の当業者に容易に明らかであるように、本発明に従うアダプターについての多数の可能性のある構成が存在し、そして本発明は、本発明の開示を明瞭化するために提供される上記の特定の実施形態および本明細書中で提供される実施例により限定されることは全くない。

20

【0062】

要約すると、本発明に従うタンパク質マイクロアレイは、タンパク質アレイとして以前に使用されていない型の固体基板、すなわち反応基で官能基化された酸化物コーティングされた反射性金属を組み込み、アレイを形成するタンパク質の接着を容易にする。特定の実施例は、アルミニウムでコーティングされ、二酸化シリコンおよびアミノシラン層のさらなるコーティングを有するスライドガラスであり、その結果、この基板は、タンパク質アレイ要素が結合するためのアミノ基を表示する。これらのタンパク質アレイ要素は、直接または多数の異なる可能性のあるアダプターを介して間接的に広範な可能性のあるタンパク質アレイ要素に接着されて、本発明のタンパク質マイクロアレイを形成し得る。

30

【0063】

(2. 本発明のタンパク質アレイを作製する方法)

本発明のアレイは、任意の都合の良いプロトコルを用いて調製され得る。当該プロトコルの1つは、以下：1)タンパク質アレイ要素の結合のために活性化された表面を有する固体支持体の獲得；および2)タンパク質アレイ要素が支持体表面に安定に会合するような条件下で、2つ以上の異なるタンパク質アレイ要素を支持体表面と接触させる工程を含む。本発明に適用可能な基板およびアレイ製造の多くの局面が、全ての目的のために参考として本明細書中に援用される出願番号09/874,091および対応する国際特許出願PCT/US01/18066に記載される。

40

【0064】

(A. 基板製造)

固体支持体は、任意の都合の良い方法論を用いて製造され得る。この方法論は、固体支持体の特定の性質に依存して変化する。本発明の1つの実施形態に従って、固体支持体(例えば、ガラス、プラスチックまたは金属)を反射性金属(例えば、アルミニウム、金、銀、白金、銅、チタン、またはクロム)の層でコーティングする。アルミニウムでコーティングされるガラスの固体支持体を調製するため、例えば、ガラスの表面を、アルミニウムの薄層を用いて上記のような厚み(例えば、約1,000Å)で、コーティングする。金属層を、任意の都合の良いプロトコルを用いて、基板表面に蒸着し得る。ここで適切な

50

プロトコルとしては、電子線蒸着、蒸着、スパッタリングなどが挙げられ、これらは、当業者に公知である。例えば、Moteschariら、J. Am. Chem. Soc. (1998) 120: 1328~1336; Bainら、J. Am. Chem. Soc. (1989) 111: 7155~7164; Leeら、Langmuir (1998) 14: 6419~6423; Folkersら、Langmuir (1992) 8: 1330~1341を参照のこと。都合の良い場合、接着金属層が、金属層と基板との間に存在し得、ここで目的の接着金属としては、上記のような厚みで蒸着された、チタン、クロムなどが挙げられる。反射性金属層が、金属固体支持体の表面であり得ることがまた、可能である。例えば、アルミニウムスライドが、使用され得る。

【0065】

10

反射性金属表面の調製後、上記の組成および厚さを有する酸化層は、金属層上に形成される（例えば、アルミニウム層上の約800 Åの二酸化ケイ素）。酸化物は、任意の適切な技術（例えば、電子線または金属層の上部でのスパッタ堆積）によって形成され得る。金属基板表面はまた、例えば、熱処理または化学処理によって酸化され得る。例えば、アルミニウムは、当該分野において周知であるように、電気化学的、熱的、または化学的に（例えば、 H_2O_2 を用いて）酸化され得る。酸化物はまた、本来薄い層（例えば、アルミニウムによって生じる）として存在し得る。

【0066】

次いで、金属酸化物は、ヘテロ二官能性シラン（例えば、上記のようなアミノプロピルトリエトキシシラン（APS）で官能基化され得、その結果、この表面は、タンパク質（タンパク質アレイ要素が挙げられる）の直接的または間接的な結合のために適切な、官能基（この場合には、アミン）を提示する。理想的には、APSは、実施例1において以下に記載されるように、真空オーブンを使用して、蒸気層で蒸着される。

20

【0067】

アルミニウム／酸化物／APSでコーティングされたスライドはまた、Amersham-Pharmacia, Amersham, Englandから市販されている（そして国際特許出願番号WO98/53304に記載されている）。

【0068】

いくつかの実施形態において、官能基化された有機分子は、規則的な単分子層を形成する。これらの有機分子の末端は、反応性基で官能基化されており、この反応性基は、タンパク質アレイ要素またはアダプターの適切な反応性基（例えば、上でさらに記載され、そして以下で例示されるような）に結合され得る。適切な末端基は、例えば、マレイミド、ヒドラジド、アミノオキシ、活性化エステル（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド）、無水物、アルデヒド、ジスルフィド、チオール、アジド、ホスフィン、ビオチン、アビジン、またはアビジンのアナログもしくは模倣物であり得る。

30

【0069】

1実施形態において、官能基化酸化アルミニウムスライドを用い得る。アルミニウム金属は、クリーンなガラス基板上に、電子線蒸着によって蒸着され得る。次いで、アルミニウムを、上記のように、発光または励起光の1/4の波長以下の厚さで、二酸化ケイ素（ SiO_2 ）または一酸化ケイ素によりオーバーコートする。約600~1000 Åの酸化物の厚さ（例えば、800 Å）を、標準的なCy5（650/670 nm）染料およびCy3（550~570 nm）染料のために使用し得る。なぜなら、これらの染料は、結合実験を実施する前に、酸化物を薄くする必要性を排除するからである。800~950の範囲が、Cy5染料およびCy3染料についてよく働き、そして他のものが使用される場合、各染料について調節および最適化され得る。アルミニウム／酸化物表面は、アミノ修飾されたシランで処理され得る。例えば、800~1,400オングストロームの二酸化ケイ素の層で新たにコーティングしたアルミニウムスライドを、直ちに、イソプロパノール中3%~40%のアミノプロピルトリエトキシシラン（これは、0.2 μMフィルター膜を通して以前に濾過されている）の槽中に浸し得、そして1時間までシラン処理し、続いてリンスおよび乾燥し得る。蒸気相が好ましい。あるいは、上記のように、シランでコ

40

50

ーティングしたアルミニウムスライド (APS) は、Amersham-Pharmacia, Amersham, England から入手可能である。いくつかの場合、このような市販のスライドは、信号対雑音比を改善するための結合実験を実施する前に、約 $200\text{ \AA}$ と約 $1,000\text{ \AA}$ との間、より詳細には、約 $800\text{ \AA}$ に酸化物層を薄くすることが必要であり得る。市販のスライド上の酸化物を薄くすることが必要とされる場合、この酸化物は、「エッチング」され得るか、またはこのスライドを SSC 緩衝液 (NaCl およびクエン酸 Na) 中 60°C でインキュベートすることによって、およそ $800\text{ \AA}$ まで薄くされ得る。

【0070】

最後のアミノ修飾 Al 表面は、ヘテロ二官能性活性化エステルで官能基化され得、適切な官能基を提示する表面を提供する。シランはまた、蒸着されるか、またはスピンコーティングされ得る。例えば、揮発性溶媒 (例えば、イソプロパノール、メタノール、THF) 中 $1\sim 10\%$ (例えば 5%) のシランの溶液が調製され得る。このスライドを、 $1,000\sim 8,000\text{ rpm}$ (例えば、 $5,000\text{ rpm}$) でスピンして、シランの均一な蒸着を提供し得る。次いで、ヘテロ二官能性分子 (例えば、スクシンイミジル 4- (N-マレイミドメチル) -シクロヘキサン-1-カルボキシレート (SMCC または LC-SMCC) (これは、一端では活性化エステルであり、そして他方ではマレイミドである)) を、アミノ基と接触させて、マレイミド終端表面を作製する。他のヘテロ二官能性架橋剤または分子の組み合わせ (例えば、上記のように、一端での NHS エステルと他方の端でのビオチンまたはマレイミドとの間の、長エチレンオキシドスペーサー (例えば、 $2\sim 4$ 単位)) がまた、用いられ得る。

【0071】

さらに、この実施形態に従って、本発明によるマイクロアレイで実行したアッセイにおいて用いられた蛍光信号の増幅は、約 $200\text{ \AA}\sim 900\text{ \AA}$ 、好ましくは約 $800\text{ \AA}$ の厚さの酸化物層を有する、官能基化されたそしてスポットされたアルミニウムスライドを使用することにより増強され得ることが見出された。最初はより厚い酸化物層を有するスライドを、例えば、約 $0.1\sim 0.2\%$ SDS / $5\times$ SSC ($0.75\text{ M NaCl} / 0.085\text{ M}$ クエン酸ナトリウム) および必要に応じて 5 mM EDTA のエッチング溶液を、約 $50\sim 80^\circ\text{C}$ 、好ましくは約 60°C で、約 $2\sim 4$ 時間適用してエッチングし得る。上記のように、適切な厚さの二酸化ケイ素層の手動による蒸着は、スライドを薄くすることの必要性を排除し得る。

【0072】

(B. アレイ製造)

基板の調製の後、上記のように、アレイ要素として表面に結合されて、アレイを生じる目的の 2 つ以上の異なるタンパク質を官能基化した基板表面と接触させる。接触とは、結合剤を表面近くに導き、その結果これらを、基板層の表面に対して実質的に安定に付着または結合させること意味する。

【0073】

タンパク質アレイ要素と基板表面との接触において、上記のようなタンパク質アレイ要素スポットの所望のパターンを生じる表面とタンパク質との接触についての任意の簡便な手段が、例えば、スポットティングによって用いられ得る。一般に、タンパク質の蒸発速度を遅くする薬剤を含む水溶液 (例えば、緩衝剤 / グリセロール (例えば、 $75 / 25$ トリス緩衝化生理食塩水 / グリセロールなど)) を、接触の間に用いる。ここで、この溶媒は、水およびタンパク質に加えて、1 つ以上の成分 (例えば、緩衝剤、塩など) を含み得る。より高い割合の緩衝剤をこの水溶液において用いる場合、液滴サイズは、この溶液のより高い表面張力に起因してより小さくなり得る。液滴サイズ (従って密度) をある程度までこの様式で調整し得る。代表的には、接触を、支持体表面の別々の位置に異なるタンパク質アレイ要素の溶液を沈着させることにより達成し、その結果、タンパク質アレイ要素の各々の異なる型を、基板表面上のそれ自身の固有の位置に沈着させる。

【0074】

結合剤を、任意の簡便な手段を用いて（例えば、ピペッティングにより）支持体表面上に沈着させ得る。多数のデバイスおよびプロトコルが、支持体表面の正確な位置上に水溶液を沈着させるために開発されており、そして本発明の方法において用いられ得る。このようなデバイスとしては、「インクジェット」印刷デバイス、機械式沈着デバイス、またはピペッティングデバイスなど（例えば、米国特許第4,877,745号；同第5,338,688号；同第5,474,796号；5,449,754号；同第5,658,802号；同第5,700,637号；および同第5,807,552号、を参照のこと、これらの開示は本明細書中で参考として援用される）が挙げられる。支持体表面の別々の位置上に水性容積を正確に沈着させるための自動デバイス（すなわち、アレイ）はまた、Genetic Microsystems；Molecular Dynamics；Cartesian Technologies；Beecher Instruments；Genomic Solutions；およびBioRoboticsを含む多数の販売元から市販されている。あるいは、Okamoto、SuzukiおよびYamamoto、Nature Biotechnology、第18巻（2000年4月）、483により最近記載されているバブルジェット（登録商標）技術が、用いられ得る。

【0075】

上記のように、本発明に従うプロセスの重要な特徴は、タンパク質アレイ要素と、任意のアダプターと、基板表面との間の反応が、表面上に自動アレイスポットにより沈着させた液滴の平均寿命内で完了されるために十分容易でなければならないことである。例えば、この表面を官能基化し、そしてアダプターの一部としてマレイミドを提示する場合、適切なアンカー基はチオール基であり、そして約60%の湿度にて約15～20分が結合反応の完了に必要とされる。上記のように、他の表面提示／アンカーの組合せが可能である（これらは、安定で、さらに電子対を共有しない結合を形成する組合せ（例えば、アビジンおよびビオチン）を含む）。

【0076】

（C．チップのブロッキング）

アレイ基板（チップ）上へのタンパク質アレイ要素のスポットティングの後、残留するチップの未コート表面を、化学ブロkker（アレイの非特異的タンパク質結合を減少または排除する、親水性の、一般にポリマーまたはオリゴマーの分子）で官能基化し得る。従来のタンパク質ブロkker（例えば、BSAおよびカゼイン）とは異なり、化学ブロkkerは、単独でかまたはタンパク質ブロkkerと一緒に使用され得る、合成分子である。特定の実施形態において、化学ブロkkerおよびタンパク質ブロkkerは、一緒に使用され得る。例えば、化学ブロックに続いてタンパク質ブロックを順番に使用し得るか、または化学ブロックをタンパク質ブロックと混合し、次いで、スポットティング後に、アレイ表面に適用し得る。化学ブロック（例えば、末端で修飾されて基板表面上に提示された官能基に結合するPEG）は、タンパク質の特異的結合を、タンパク質アレイチップ上の複雑な混合物から分解するために、より効果的であることが見出された。化学ブロッキング剤は、スライドを、スポットティング後にブロッキング剤に浸漬することによって、このアレイに付着され得る。

【0077】

上記のように、特定の実施形態において、化学ブロッキング剤は、ポリエチレングリコール（PEG）アナログであり、少なくとも1つの末端で修飾されており、その結果、これは、アレイ要素によって示されていない、有機官能基化基板表面と反応し、そして結合する。1つの特定の例は、ジチオールで修飾されたPEG（SH-PEG-SH）である。このブロッキング剤は、以下に記載されるように、アレイ要素スポットティングが完了した後に、カゼインとともに適用され得るか、または前の工程において適用され得る。ブロkkerの末端について可能な官能基化は、上記アダプターについての官能基化と同じであり、例えば、ビオチン、アミン、活性化エステルなどであり得る。

【0078】

本発明に従う、別の型の化学ブロッキングは、親水性側鎖（これは、種々の表面官能基

10

20

30

40

50

に容易に付着し得る)で誘導体化されたN置換グリシン(ペプチド)の、十分に規定された単分散オリゴマーによって提供される。適切な側鎖は、1つ以上のエチレングリコール単位を有し得るか、またはヒドロキシル、スルホキシド、もしくはタンパク質吸着に抵抗する他の親水性基(例えば、上記のような)からなり得る。これらの分子は、タンパク質結合に抵抗するように設計され、そしてタンパク質アレイの特定のタンパク質結合分子(例えば、抗体、融合タンパク質など)と共に散在される。これらの化学ブロッカーは、タンパク質抵抗性部分の高密度充填のために最適であり得、従って、非特異的なタンパク質結合(NSPB)に対する改善された抵抗を提供し得る。

【0079】

これらの化学ブロッカーのオリゴマーは、出願番号09/874,091および対応する国際特許出願PCT/US01/18066(全ての目的で、本明細書中に参考として援用される)に記載される、サブモノマーペプチド合成方法を使用して調製され得る。ペプチドは、自動固相合成技術(例えば、Chiron Corporation of Emeryville, CAによって開発されたもの)を使用して合成され得る。ペプチドの組成は、ペプチド合成において使用されるアミンサブモノマー(ブromo酢酸および置換アミン)上の親水性のR基(例えば、アルコール、炭水化物、アミノ酸、スルホキシド、アクリルアミドのような親水性末端を有する、アルコール、スルホキシド、炭水化物、アクリルアミド、およびエーテルまたは上記のような他の低分子量タンパク質結合基)の性質および選択の配置によって、制御され得る。

【0080】

上記のように、ペプチドベースの化学ブロッキング剤について、N置換は、非特異的なタンパク質結合に非常に抵抗性であることが公知の部分である(例えば、エチレンオキシド、スルホキシド、ヒドロキシルなど)。N末端は、以前に記載されたように、種々の表面固定器(例えば、ビオチン、チオール、ヒドラジド、アルデヒド、エポキシド、トリエトキシシランなど)で修飾され得る。

【0081】

ペプチドブロッカーの長さは、約2~100まで容易に変動し得、ここで、15~30が好ましく、そして引き続く精製工程なしで、純粋な材料を生じる。側鎖の長さは、1~10まで変動し得、1~5が、ペプチド骨格への容易な結合を提供する。さらに、C末端とN末端との両方が、種々の化学ライゲーション試薬で修飾され得る。分子量は、500~5000、一般的には、およそ2000~3000の範囲であり得る。

【0082】

合成が完了した後に、NSPBペプチドを、95% TFA/5%水のような従来の切断試薬を使用して、切断され得る。この方法は、NSPBペプチドを、複数グラムの量で生じ得、これは、かなり大きいバッチ(例えば、200mLのコーティング溶液を使用して、1度に20個のスライド)で、マイクロアレイスライドをコーティングするために容易に使用され得る。マイクロアレイ結合実験の経過において、NSPBペプチドは、タンパク質ブロッキング溶液(例えば、カゼイン、脱脂乳、BSAなど)に直接組み込まれ得る。あるいは、NSPBペプチドは、タンパク質ブロッキングの前または後の、別個のコーティング工程として使用され得る。マイクロアレイ要素(例えば、抗体またはタンパク質融合物)を表面に付着させる様式は、使用されるNSPBペプチドのモチーフを決定するようである。例えば、ビオチン化タンパク質が、自動スポッティングを介して、アビジンでコーティングされたスライドに付着される場合、ビオチン化NSPBペプチドが、NSPBをブロックするためのコーティングとして使用される。

【0083】

図3は、本発明に従う、ペプチドベースの化学ブロッキング剤を示す。ペプチドベースのポリマー化学ブロッカーは、水和された状態を保ち、そしてタンパク質の非特異的な結合に抵抗するように設計される。この図において、 $R^1 = H$ またはMeであり、 $m = 2 \sim 100$ であり、 $n = 1 \sim 10$ である。「アンカードメイン」とは、本明細書中に記載されるような基板表面(一般に、アダプター)への付着の様式をいう。

10

20

30

40

50

【0084】

(D. 要旨)

図4Aおよび図4Bは、上記の手順に従う本発明のいくつかの実施形態のためのタンパク質アレイを作製するためのプロセスを簡単に示す。図4Aにおいて、アルミニウム／酸化物表面を有する平坦な基板402が提供される。この表面は、上記のような、官能基化アミノ修飾シラン層（例えば、APS）を適用することによって、結合のために調製される。基板表面層結合官能基に相補的な反応性基の官能基（例えば、マレイミドの場合には還元チオール）を有するタンパク質アレイ要素404が、基板上にスポッティングされる。図4Bに示されるように、一旦、タンパク質アレイ要素404の結合が完了すると、化学ブロッキング材406（この場合には、マレイミド官能基化された表面に対するジチオール修飾PEG（SH-PEG-SH））が、この基板の、タンパク質結合剤が結合していない表面に適用される。

10

【0085】

(3. 本発明のタンパク質アレイの使用の方法)

本発明のアレイは、アレイの表面に結合したタンパク質と試験サンプルにおける目的的分析物との間の結合事象が検出される、種々の異なる適用における用途を見出す。換言すれば、本発明のアレイは結合アッセイにおける用途を見出す。このような適用では、支持体に結合したタンパク質は、一般に、試験サンプルにおける分析物「プローブ」についての「標的」として作用する。分析物プローブは、代表的には、標識される。例えば、ここで、標識は、直接的に検出可能な標識（例えば、放射性同位体、蛍光標識、化学発光標識など）、または間接的に検出可能な標識（例えば、標識抗体についてのリガンドのような信号生成系のメンバーであって、ここで、この標識は、基質を色素原産物へと転換するなど酵素的であり得、ここで、この標識抗体は二次標識抗体であり得る）であり得、その結果、結合事象は、容易に検出され得る。

20

【0086】

特に、本発明に従うアレイが、複合体タンパク質サンプルのプロテオミクス分析を行う際に有用である。本明細書中で用いられる場合、プロテオミクスとは、サンプル中の1つ以上のタンパク質の分離および／または定量および／または同定である。サンプルは、細胞（例えば、細胞の細胞質ゾル、膜、または細胞外タンパク質）、組織（例えば、解剖またはレーザー顕微解剖した）、体液（尿、血液、脊髄液など）、あるいはタンパク質を含む任意の他のサンプル由来であり得る。このような分離／定量／同定の結果、薬物スクリーニングのための新規のタンパク質標的、診断のためのタンパク質、またはアッセイもしくはタンパク質精製のための新規の合成リガンドを生成し得る。このアレイは、差示的タンパク質結合アッセイにおいて非常に有効に用いられ得る。例えば、複合体タンパク質混合物の2（以上）一色素蛍光標識、および蛍光画像化によりアレイに結合する差示的タンパク質の分析を行い得る。下記のように、このアレイを同定のための他の技術と組み合わせて用いて、配列決定し得、そして目的の差示的に発現されたタンパク質またはペプチドを構造的に同定し得る。このアレイをDNAアレイと並行して実行し、かつ差示的な結合結果を比較して、遺伝子活性とタンパク質発現との間の相関関係を同定し得る。また、混合アレイ（ここでアレイを作る分子は抗体などを含む）を調製し、そして結合アッセイを行うために用い得る。

30

40

【0087】

種々の技術を用いて、本発明に従うアレイ（「プロテオミクスマイクロアレイ」）を用いる差示的結合アッセイを行い得る。本発明の実施形態において用いられる場合のこれらの技術のいくつかを、以下に記載する：

(A. タンパク質標識)

複合体タンパク質サンプルを標準的な技術を用いて標識する。これらの技術の多くは、タンパク質混合物の2-Dゲル分析のために開発されている。例えば、サンプルAは、アミン反応性シアニン3色素（「Cy3」）（ $\lambda_{ex} = 550 \text{ nm}$ / $\lambda_{em} = 570 \text{ nm}$ ）で標識され得、そしてサンプルBは、アミン反応性シアニン5色素（Cy5）（ $\lambda_{ex} =$

50

650nm/ λ_{em} = 670nm) で標識される (色素試薬はAmersham-Pharmaciaから入手可能)。サンプルAおよびBは、例えば、正常または罹患した、処置または未処置などの、組織または細胞株にそれぞれ由来し得る。未反応色素を、標準的な方法 (例えば、ゲル濾過、透析など) を用いて標識タンパク質から分離し得る。勿論、上記のように、テトラメチルローダミン-イソチオシアネート (TRITC)、フルオレセイン-イソチオシアネート (FITC)、およびこれらのスクジミジルエステル誘導体、またはアミノ酸側鎖 (例えば、アミン側鎖 (リジン)、チオール側鎖 (システイン)、または他の適切な官能基を介してタンパク質に反応し得る任意の他の色素分子を含むがこれらに限定されない、種々の異なる標識が、当業者に公知である。

【0088】

10

(B. 結合アッセイおよびチップ読み出し)

標識タンパク質サンプルは、タンパク質マイクロアレイチップと共に、アレイの要素に対する種々のタンパク質の親和性を調節すると予想される、時間、かつ種々のpH、塩含有量、および温度の条件下でインキュベートされる。一般に、サンプルは、アレイ表面上の適切な容量の液体サンプルの導入によりマイクロアレイと接触される。ここで、導入とは、サンプルと表面の充満、表面上のサンプルの沈着 (例えば、ピペットを用いる)、サンプル中のアレイ全体の浸漬などである。多くの実施形態では、溶液は表面上に沈着され、次いでカバーガラスの下、またはシールされたチャンバ中に挟まれる。

【0089】

例えば、各プローブ溶液の25 μ L~100 μ L (代表的には、50 μ L) のアリコート
を代表的な顕微鏡スライドサイズのチップの表面に適用し得、そして洗浄したカバー
ガラスを上部に配置し、チップ表面上のプローブ溶液のサンドイッチを形成する。次いで、
このタンパク質溶液を、チップと共に少なくとも1時間、または一晩同時インキュベート
し得る。インキュベーションの後、カバーガラスを除去し、そしてチップを、例えば、1
X PBS/0.05% Tweenまたは界面活性剤を含む他の適切な緩衝液の中で洗
浄する。このチップを、ストリンジェンシーを減少または増加する種々の条件を用いて洗
浄し得る。これらの条件を再びカスタマイズして、例えば、最も強結合したタンパク質の
みの保持を可能にし得る。あるいは、保証される場合、より低いストリンジェンシーの洗
浄を用いて、比較的弱い結合タンパク質の可視化を可能にし得る。この選択は、チップ上
およびタンパク質混合物の特性に提示される、アレイの複雑性および多様性により決定さ
れるようである。次いで、洗浄したチップを、例えば、アルゴンまたは窒素の気流下で乾
燥する。

20

30

【0090】

適切な洗浄の後、チップを、当業者に周知であるようなアレイスキャナで読み取る。各
スポットについてのCy3対Cy5の割合を、市販のソフトウェアを用いて決定する。あ
るスポットよりも、かなり高いまたは低い割合を示すスポットを観察し、そして「差示的
」であると考えた。

【0091】

図5は、上記の手順に従う本発明の1つの実施形態についてのタンパク質アレイを用い
る差示的プロテオミクス結合アッセイを行うためのプロセスを簡単に示す。図5において
、プロセス(500)は、比較のために2つの生体サンプル (例えば、「未処理」細胞株
502aおよび「処理」細胞株502b) の獲得で開始する。細胞溶解物504a、bを
細胞株サンプルから単離する。この溶解物を標識する。例えば、「未処理」細胞溶解物5
04aを、蛍光性緑色色素で標識し、一方「処理」細胞溶解物504bを蛍光性赤色色素
で標識する。次いで、標識サンプル506a、bを、本発明に従うタンパク質アレイチッ
プ508 (例えば、抗体のアレイ) 上で同時インキュベートする。サンプル中のタンパク
質は、変性またはネイティブのいずれかであり得る。例えば、1-2% SDSの添加によ
り、サンプル中のタンパク質を変性させ得、そしてクラスターまたは疎水性相互作用を最
小化または排除し得る。あるいは、このクラスター (これはタンパク質間結合経路の解明
において重要であり得る) およびタンパク質は、ネイティブ状態および研究した結果を維

40

50

持し得る。次いで、このチップをアレイスキャナで読み取る。

【0092】

勿論、本発明に従ってアレイを使用して、種々の代替のアッセイが可能である。例えば、非標識タンパク質または混合物（例えば、細胞溶解物かまたは血清サンプル）が、アレイに適用され得、そして検出は、二次標識タンパク質（例えば、二次標識抗体）によって達成され得る。

【0093】

（C．アレイ処理後：タンパク質の単離、精製、および同定）

一旦、タンパク質またはタンパク質のセットが、サンプルAとBとの間で異なるか、または特定の刺激に反応性であることを決定すると、チップ上で同定される同じタンパク質から構成されるクロマトグラフィー支持体を調製することにより、これを単離し得る。タンパク質ベースのクロマトグラフィー支持体、これらの調製およびこれらの使用は、当該分野で周知である。

10

【0094】

一旦、タンパク質が単離されると、その配列は、MALDIのような標準的な技術を用いて決定され得る。また、トリプシン消化が、タンデム式MS技術によって分析され得る。

【0095】

図6は、上記および下記の手順に従うアレイ処理後の局面を簡単に示す。図6において、プロセス(600)は、本発明に従うタンパク質マイクロアレイを用いて行ったプロテオミクス差示的結合アッセイにおける目的物として同定されるタンパク質を用いるクロマトグラフィー分離カラム602の調製で開始する。次いで、マイクロアレイ上で本来実行される複合体サンプルのアリコート、カラムを介して実行する。目的のタンパク質は、カラムに優先的に結合し、そしてそれによって、サンプルの他の成分から分離される。結合タンパク質を溶出し、そして次いで、さらなる分析604（例えば、タンパク質配列決定、三次構造決定など）に用い得る。さらに、タンパク質の同定に関するデータを、さらなる研究についてのバイオインフォマティクスデータベースに入力し得る。

20

【0096】

あるいは、差示的に発現されるタンパク質を結合する同じタンパク質を、チップ上に繰り返しスポットし得、そして同じ溶解物のアリコートと共にインキュベートし得る。同じタンパク質は、アレイ（しかし、本来のチップ上の1つのスポットよりもはるかに大きい面積）に結合すべきである。次いで、レーザー脱離質量分析を用いて、チップから直接タンパク質を配列決定し得る（例えば、CiphergenによるSELDI技術の適用による）。

30

【0097】

（D．ワクチン開発）

本発明のアレイは、アレイ上にスポットされた、血清中の潜在的タンパク質抗原に対する抗体を検出するために有用に適用され得る。この技術は、上述および下の実施例9で記載するように、ワクチン開発のために適用され得る。例えば、上記の図2Fに関して記載したように、病原体に感染した患者からの血清を、そしてGST融合体（他の融合体）として発現される特定の病原体に対する抗原のアレイに適用し得る。これらの研究は、免疫刺激抗原を同定するため、これらの患者における免疫応答を測定することを助け得る。適切な抗原の発見により、新規のワクチンが開発され得る。

40

【0098】

抗体または他のタンパク質アレイがまた、特定のタンパク質またはタンパク質群（10, 000～50, 000など）のレベルをモニターするために使用され得る。例えば、細胞の薬物処理または無処理に反応する特定の経路における特定のタンパク質の増加または減少を、モニターし得る。あるいは、薬物のような外部刺激に反応する動物血清または患者血清におけるタンパク質レベルを、モニターし得る。タンパク質における推定薬物処理の影響の測定は、薬物の作用機構の発見を助け得る。

50

【0099】

(E. 他の適用)

本発明に従うプロテオミクスマイクロアレイチップの予想される用途は、広範である。例としては、特定のタンパク質の発現レベルをモニタリングして薬物作用機構を解明することもしくは新規の疾患生物マーカーを発見すること、タンパク質間相互作用を研究すること、またはワクチン開発についての潜在的抗原を同定することが、挙げられる。

【0100】

一般に、この適用は、別の複合体の混合物に対してある複合体の混合物において、過剰発現または過少発現される（または診断タンパク質の場合のように、存在／非存在）タンパク質またはタンパク質のセットの同定に共通点を有する。当業者は、本発明の実施形態が、サンドイッチアッセイ（例えば、ELISA）を含む広範な種々のアッセイ形式と適合性であることを認識する。

10

【0101】

上記のように、タンパク質マイクロアレイを用いて、比較されるべき2つ以上のタンパク質溶液を二者択一的に標識する（例えば、あるサンプルについてCy3および別のサンプルについてCy5）ことにより、複合体溶液におけるタンパク質の差示的発現を測定し得る。このチップを用いて、より遅い高処理スクリーニングアッセイについて新規のタンパク質標的を見出し得る。別の特に強力な適用において、この方法論は、特定の宿主（例えば、酵母またはバキュロウイルス）において過剰発現される組換えタンパク質を精製するために用いられ得る。発現したタンパク質を含むサンプルを、チップ上に二者択一的標識サンプルを同時に結合させ、そして差異を探ることにより、発現したタンパク質を含まないサンプルと比較する。この手順は、発現したタンパク質に対して都合のよい親和性および特異性で結合するアレイ上のタンパク質を同定する。次いで、これらの同じタンパク質は、目的の組換えタンパク質の単離および精製のためのクロマトグラフィー樹脂を作製するために用いられる。

20

【0102】

類似の様式で、タンパク質マイクロアレイチップを使用し、血漿または血清中に、癌、HIVもしくは糖尿病のような特定の疾患状態を診断し得るタンパク質マーカーを見出し得るか、または薬物スクリーニングのための新規の標的を見出し得る。また、一旦、特定の群のタンパク質についてタンパク質間相互作用のセットが同定されると、これらのタンパク質の発現レベルのモニタリングが可能になり、薬物の作用機構を解明する。この点において、同定されたタンパク質は、現在タンパク質の存在量を決定するために抗体を使用する方法と同様の方法で、タンパク質の存在量のプローブとして使用され得る。さらに、細菌またはウイルスのビルレント株および非ビルレント株由来のタンパク質を試験することによって、感染性疾患を生じる独特のビルレンス因子を決定し得る。一旦、これらのビルレンス因子が同定されると、これらのタンパク質は、新規の抗菌薬剤または抗ウイルス薬剤をスクリーニングするための標的として使用され得る。

30

【0103】

1つの実施形態において、本発明のタンパク質マイクロアレイは、DNAアレイと平行して実行され、そして各々に由来する差示的な結合結果は、遺伝子活性およびタンパク質発現における相関関係を同定するために比較される。例えば、差示的結合アッセイは、複雑な生物学的サンプルについて、タンパク質アレイおよびDNAアレイの両方で行われる。サンプル由来の別のアリコートに標識し、そして本発明によるタンパク質マイクロアレイおよび当該分野で周知のDNAマイクロアレイと接触させる。タンパク質アレイ上の結合結果によって証明された差示的なタンパク質発現は、DNAアレイについての結合結果と比較された場合、発現するために活性化が必要である、タンパク質発現と遺伝子ファミリーとの間の関係を解明し得る。

40

【0104】

本発明のプロテオミクスマイクロアレイ技術と組合わされ得る別の技術は、MS/MS高分子構造分析技術であり、米国特許出願番号第09/580,380号に記載され、本

50

明細書中に参考として援用される。この方法において、技術の組合せは、目的のタンパク質を同定するため、それを濃縮および単離するため、そのタンパク質を配列決定するため、そしてその4次タンパク質構造の側面を解明するために使用され得る。

【0105】

目的のタンパク質の同定およびアレイ処理後に関するデータはまた、バイオインフォマテックスデータベースに入力され得る。このデータは、さらなる研究のために、その他の生物学的データと対応され得る。

【0106】

(4. キット)

対象のアレイを使用するプロテオミクス結合アッセイを行うためのキットもまた本発明によって提供される。本発明に従うこのようなキットは、本発明に従うタンパク質マイクロアレイを少なくとも含む。これらのキットは、分析または診断目的のために構成され得、そして、さらに、アレイが意図される方法において使用される1つ以上のさらなる試薬を備え得る。例えば、キットは、プロテオミクス結合アッセイを行うのに必要な種々の容器、標識、緩衝溶液、ツールおよび他の任意の物質を含み得る。本発明に従うキットはまた、分析用のサンプルを受けるために構成され得、その後、さらなるユーザーの操作なしで、本発明に従う結合アッセイに必要な工程を行う。

【実施例】

【0107】

以下の実施例は、本発明に従うタンパク質アレイの合成および特徴付け、それらの成分、ならびに適用に関する詳細を提供する。以下は代表であるだけであり、そして本発明は、これらの実施例に示される詳細に限定されないことが、理解されるべきである。

【0108】

(実施例1：シラン処理スライドを作製するために使用する方法)

スライド調製：ガラス顕微鏡スライドを、石鹼水浴中で10分間超音波処理することにより前洗浄し、その後、高圧脱イオン水で洗浄した。スライドをさらに、Nochromix/H₂SO₄中で5分間洗浄し、高圧脱イオン洗浄水でリンスした。最後に、それらをイソプロピルアルコール中に5分間浸漬し、N₂流で乾燥した。前洗浄したスライドもまた、例えば、Erie Scientific (Ultraclean) または Bioslide (Superclean) から市販されている。

【0109】

電子線：ガラス顕微鏡スライドの長方形の形状に適應させるために、プラネタリー (planetary) の特定のウェハの大きさの挿入物に、CHA SEC-600-RAP 電子線を合わせた。電子線のるつぼを、アルミニウム金属および高品質のSiO₂で充填した。チャンバを次いで、少なくとも2×10⁻⁷ トールまで減圧した。減圧後、スライドを備えるプラネタリーを回転させ (均一なコーティングを可能にするために)、その間、高電圧 (約10V) をかけた。電子線は、るつぼ内の物質を蒸発させた。最初に、1000 Å のアルミニウムを蒸着させた。冷却後、800 Å のSiO₂を蒸着させた。蒸着の間のフィルムの厚さを、振動金被覆水晶振動子微量天秤によりモニタリングした。

【0110】

気相シラン処理：減圧乾燥機を100℃に平衡化した。30～50 mLの高品質のアミノプロピルトリエトキシシラン (APSS) を、幅の広い (3～5インチ) TEFALON (登録商標) 蒸発皿に添加した。スライドを皿を備える乾燥機内に配置した。次いで、乾燥機を45分間で、-23 inHgまで減圧した。次いで、シラン皿を取り除き、スライドをさらに15分間100℃で、加熱した。約50℃～150℃の温度、-10 inHg～-50 inHgまでの圧力および15分間～2時間の加熱時間が利用され得る。

【0111】

(実施例2. ホモ二官能性アダプターの使用)

基板表面上に提示されたアミン基をホモ二官能性架橋ビス-NHSエステルと反応させることによって、アミン官能性基板表面を、活性化したエステルで誘導体化した。アダプ

ターの一方の末端にあるNHSEステルは、基板上のアミンと反応し、NHSEステル官能性スライドを以下のように作製した：50mgのアダプターを30mL DMFに溶解し、次いで、170mLの1×PBSまたは他の適切な緩衝液を添加した。これをスライドに適用し、混合しながら1～2時間インキュベートした。次いで、スライドを脱イオン水でリンスした。この溶液は、NHSEステルが加水分解されないことを確実にするために、用事調製であるべきである。露出したアミノ基を含有するタンパク質をこのようなスライド上にスポッティングし、共有結合したタンパク質マイクロアレイを作製した。

【0112】

（実施例3：ヘテロ二官能性マレイミドアダプターの使用）

基板表面上に提示されたアミン基をヘテロ二官能性架橋と反応させることによって、アミン官能性基板表面を、マレイミド基で誘導体化した。上の実施例2に記載されるプロトコルと同一のプロトコルを使用して、SMCC（一方の末端にN-ヒドロキシスクシニミド（NHSE）ステルを有し、もう一方の末端にマレイミド基を有する）を適用した。NHSEステルを基板上のアミンと反応させ、マレイミド官能性スライドを作製した。露出したチオール基を含有するタンパク質をこのようなスライド上にスポッティングし、共有結合したタンパク質マイクロアレイを作製した。

10

【0113】

（実施例4：ヘテロ二官能性ビオチンアダプターの使用）

アミン基を、一方の末端にNHSEステルを有し、もう一方の末端にビオチン基を有する活性化されたビオチン化分子と反応させることによって、アミン官能性基板表面を、ビオチンで誘導体化した。アミノシランでコーティングしたアルミニウム／酸化物スライドを、PBS緩衝液中で0.39mMであるNHSE-LC-LC-ビオチンの溶液（「LC」とは、6-アミノヘキサノイルをいい、「NHSE」とは、N-ヒドロキシスクシンイミジルをいう）（Pierceから市販されている）に浸漬した。スライドを80rpmで振盪しながら1.5時間コーティングした。この表面は、タンパク質アレイを並べるために、種々のタンパク質-アビジン結合物をロボットスポッティングにより結合するのに使用され得る。

20

【0114】

（実施例5：ヘテロ二官能性ビオチン／アビジンアダプターの使用）

実施例4に記載したビオチン化したスライドを、一層のアビジン、ストレプトアビジンもしくは他の任意のアビジンアナログでコーティングした。ビオチンの結合後、スライドを水でリンスし、次いで、1μg/ml～1mg/mlのアビジン、ストレプトアビジンもしくは中性アビジンのPBS緩衝溶液に、70rpmで攪拌しながら2時間浸漬した。スライドを水でリンスし、ビオチン化タンパク質のスポッティングに備えた。厚さの変化に注目するために偏光解析法を使用して、種々の表面修飾工程を行なった。アビジンを表面層に添加した後の40～45Åの厚さの増加は、再現的に記録された。アビジンタンパク質の四量体の性質のために、アビジンがビオチン化スライドに結合した後でさえ、部位は使用可能であり、従って、ビオチン化タンパク質は次いで、アビジン処理したスライド上にスポッティングされ得る。この反応は容易であり、1nLのスポッティングされた液滴の存在時間の間に首尾よく行なわれる。

30

40

【0115】

（実施例6：ビオチン化タンパク質のビオチン／アビジンアダプターへの添加）

実施例5のアビジン化したスライドを、ビオチン化タンパク質Aまたはビオチン化タンパク質Gの溶液に浸漬コーティングすることにより、さらに、誘導体化した。この様式で、タンパク質A／G誘導体化表面を作製した。アビジンで官能基化したチップをビオチン化タンパク質Aまたはビオチン化タンパク質G（Pierce製品番号29989zzおよび29988zz）（PBS緩衝液中で、0.5～1mg/mL）の溶液に、室温で2時間浸漬した。次いで、スライドを脱イオン蒸留水でリンスし、窒素またはアルゴンを使用してブロードライした。次いで、表面を、抗体のスポッティングに備えた。

【0116】

50

(実施例 7 : タンパク質標識)

タンパク質溶液を、0.1 M 炭酸ナトリウム中で 1 mg/mL の濃度、pH 9.3 および 0.1 ~ 1 mL の体積に調製し、二官能性もしくは単官能性アミン反応性シアニン色素 (Cy 3 または Cy 5、Amersham Pharmacia) と混合した。Sephadex G-25 を充填した 1 mL の装填、0.5 mL の画分および 3.5 の希釈係数を有する 5 cm 長、1.7 cm 直径のカラムを使用して、サイズ排除クロマトグラフィーによって、タンパク質を未反応の色素から精製した。

【0117】

(実施例 8 : チップ結合実験)

本発明に従ったタンパク質マイクロアレイを、アレイ要素によって占有されないアミノ修飾基質表面と反応し、そしてアレイ要素によって占有されないアミノ修飾基質表面に結合するように、各末端が修飾されたポリエチレングリコール (PEG) アナログで化学的にブロックする。例えば、ブロッキング剤は、上記のように、アレイ要素スポッティングが完了した後、カゼインとともに適用されるジチオール修飾 PEG (SH-PEG-SH) であり得る。プローブ溶液の 30 ~ 100 μ L のアリコート、チップ表面に適用し、上部にきれいなカバーガラスを配置し、チップ表面上でプローブ溶液のサンドイッチを形成する。タンパク質溶液を、少なくとも 1 時間チップでインキュベートする。カバースリッップを、1 $\times$ PBS / 0.05 % Tween または界面活性剤を含む他の適切な緩衝液中に取り出す。次いでチップを、1 $\times$ PBS / 0.05 % Tween または他の適切な緩衝液 / 界面活性剤系で洗浄する。チップをさらに水でリンスし、アルゴンまたは窒素気流下で乾燥し、そしてスキャンする。

【0118】

(実施例 9 : ワクチン開発のための融合タンパク質アレイ)

Chlamydia pneumoniae (C. pneumoniae) は、肺炎および上気道疾患 (例えば、気管支炎および副鼻腔炎) を引き起こす病原体であって、かつ C. pneumoniae 感染と心臓疾患および動脈硬化症との間の強い関係もある。1 つもしくはもう 1 つの (または両方の) 型の病理を発症している患者に、種々の体液性応答が存在するかどうか決定するために、インシリコでの分析により表面が露出されたか分泌されたか、もしくは C. pneumoniae に特異的であると予測される 200 の潜在的な抗原を使用して、GST-融合物として発現したタンパク質のアレイ (例えば、上記、図 2 F に関連して記載された) を構築した。病原体に感染した 50 人のヒト患者由来の血清ならびに肺炎、心臓疾患および動脈硬化を患う患者由来のサンプルをアレイに適用する。これらの研究の目的は、免疫刺激抗原を同定するために、これらの患者における免疫応答を確定することである。また、これらの研究は、肺炎などを呈する患者に対する、心臓疾患を呈する患者の免疫応答の違いの解明を補助する。適切な抗原を発見することによって、新規のワクチンが開発され得る。

【0119】

(実施例 10 : タンパク質-GST 融合アレイの概念の立証)

概念の立証として、組換え C. pneumoniae タンパク質-GST 融合物に対して惹起されたマウス血清を、コントロールとして使用した。公知のマウス抗原の GST 融合物を、グルタチオン処理基板上にスポットした。スライドをカゼイン中でブロックした。マウス血清 (スポッティングした抗原に対する抗体を含むことが公知である) を、カゼインを含有する 1 $\times$ TBS 中に 100 $\times$ で希釈し、スライドあたり 32 μ L を蒸着させ、カバースリッップの下にはさみ、一晚インキュベートした。次いで、アレイを、1 $\times$ TBS、0.05 % tween 20 で洗浄し、その後、脱イオン水で洗浄した。フィコエリトリンで標識した、希釈抗マウス抗体を、スライドあたり 32 μ L 適用した。スライドを約 2 時間インキュベートし、上記のように洗浄し、スキャンした。抗体を含有する血清の既知の組成物に基づいて予測されるように、マウス抗原スポットから強い信号が得られた。

【0120】

(実施例 11 : 「スパイク」実験概念の立証)

複雑な混合物（例えば、溶解物および血清）から、結合している特定のタンパク質を分離するための本発明に従うタンパク質アレイの使用に関する概念の検証として、「サンプル」溶解物および「コントロール」溶解物を調製し、本発明に従って、サンプルタンパク質アレイを行なった。非標識 V E G F タンパク質を、非標識溶解物中にスパイクすることにより、「サンプル」を調製した。「コントロール」は、V E G F スパイクされていない溶解物であった。サンプル中の全てのタンパク質を、C y 5（赤色）で標識し、コントロール中の全てのタンパク質を C y 3（緑色）で標識した。次いで、2つの溶解物を一緒に混合し、種々のスポットした抗体（F G F、V E G F、P S A、M M P 9、M M P 2）、およびマレイミド官能性表面上でブロックする従来のカゼインを提示する本発明に従うタンパク質アレイに適用することによって立証した。 10

【0121】

最初に、実験が失敗したのは、スパイクした V E G F を検出するには、サンプルを希釈しすぎたかまたはサンプルを濃縮しすぎて、非特異的なタンパク質結合が、非常に高いバックグラウンドを示すスライドを生じたためである。次いで、修飾されたブロック薬剤、すなわち、ジチオール修飾 P E G（S H - P E G - S H）（化学的ブロック）を添加したカゼイン（タンパク質ブロック）を使用してタンパク質アレイチップを調製した。サンプル溶解物およびコントロール溶解物は再度、修飾されたアレイを継続し、V E G F 抗原差異は、混合物中で検出可能な濃度であり、従来のブロックされたスライドは、非特異的なタンパク質結合のために黒色を読み取られ得る。 20

【0122】

A 1 コーティングしたガラススライド上に、種々の二酸化ケイ素厚さを有するスライド上で、実験を行なった。800~900 Å の酸化物（800 が最適であると判断されている）でコーティングしたスライドが、他の厚さより良い（約 1300 Å より厚い酸化物コーティングより特に良い）信号強度を提供することを観察した。

【0123】

(結論)

先の発明は、明白な理解を目的として幾分詳細に記載したが、特定の変化および改変が添付の特許請求の範囲内で行われ得ることは、明らかである。本発明のプロセスと組成物の両方を実施する多数の代替の方法が存在することに、注意すべきである。従って、本発明の実施形態は、限定ではなく、例示としてみなされるべきであり、そして本発明は、本明細書中に示される詳細に限定されるべきではなく、添付の特許請求の範囲内および添付の特許請求の範囲の等価物内で改変され得る。 30

【図面の簡単な説明】

【0124】

【図 1】図 1 A および図 1 B は、それぞれ、本発明の 1 つの実施形態に従うタンパク質結合剤アレイ要素およびアレイ部分の構造を概略的に示す。

【図 2 - 1】図 2 A ~ 図 2 C は、本発明の特定の実施形態に従うタンパク質アレイ要素が固体支持体に結合する代替的様式を概略的に示す。

【図 2 - 2】図 2 D ~ 図 2 E は、本発明の特定の実施形態に従うタンパク質アレイ要素が固体支持体に結合する代替的様式を概略的に示す。 40

【図 2 - 3】図 2 F は、本発明の特定の実施形態に従う融合タンパク質アレイ要素が固体支持体に結合する様式を概略的に示す。

【図 3】図 3 は、本発明に従って、非特異的タンパク質結合（N S P B）を阻害するためのペプチドベースの化学ブロック化剤を示す。

【図 4】図 4 は、官能基化した P E G を使用して本発明の 1 つの実施形態に従って、差示的タンパク質結合アッセイを行うためのブロック化タンパク質アレイの形態を概略的に示す。

【図 5】図 5 は、本発明の 1 つの実施形態に従って、タンパク質アレイを使用して差示的プロテオミクス結合アッセイを行うためのプロセスを簡単に示す。 50

FIG. 1B

FIG. 2C

プロテインAのようなタンパク質の一般的な結合のためのアミノ酸残基

抗体スポットが可能

図2Cは、抗体スポット法に使用可能なアミノ酸残基を示しています。図には、プロテインAのようなタンパク質の一般的な結合のためのアミノ酸残基（左側）と、抗体スポットが可能であるアミノ酸残基（右側）が示されています。両側とも、アミノ酸残基の化学構造と、それがタンパク質の表面にどのように結合するかを示す3Dモデルが描かれています。左側のアミノ酸残基は、プロテインAのようなタンパク質の一般的な結合のためのアミノ酸残基であり、右側のアミノ酸残基は、抗体スポットが可能であるアミノ酸残基です。

FIG. 2C

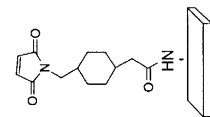


FIG. 2B

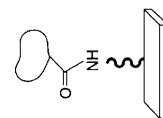


FIG. 2A

【图 2-2】

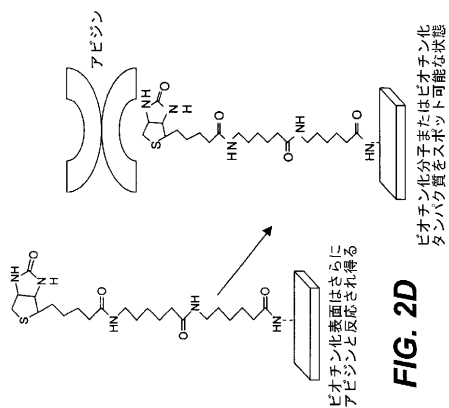


FIG. 2D

FIG. 2E

【图 2-3】

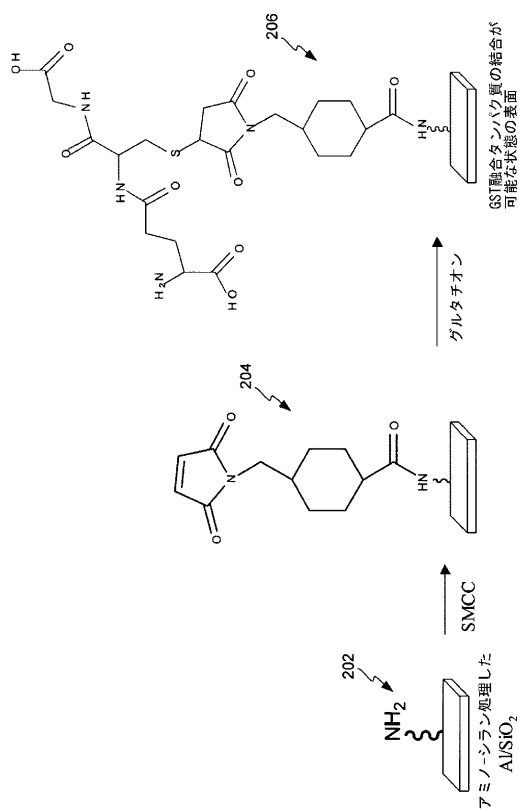


FIG. 2F

【图 3】

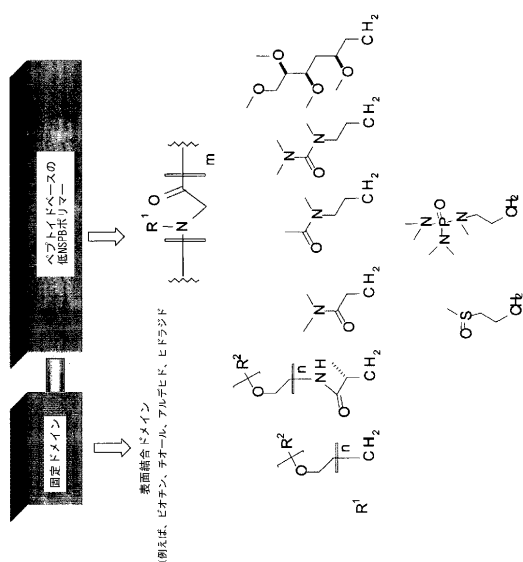


FIG. 3

【图 4】

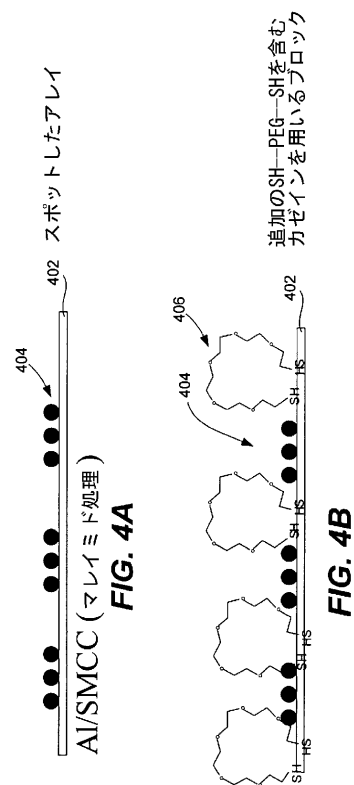


FIG. 4B

【図 5】

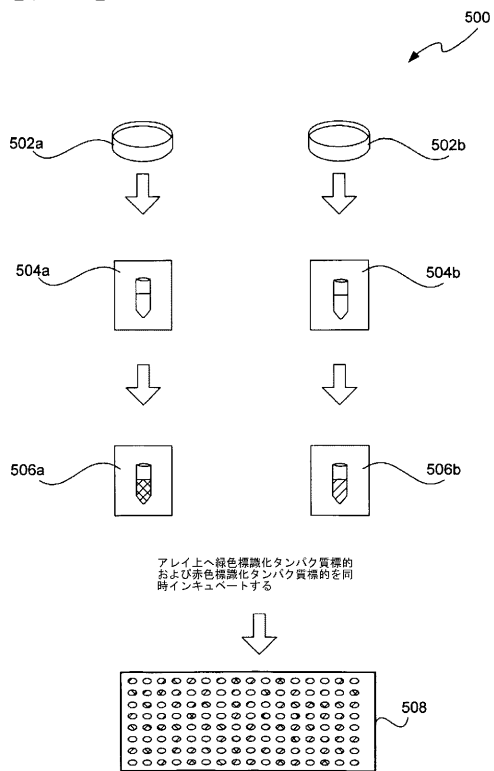


FIG. 5

【図 6】

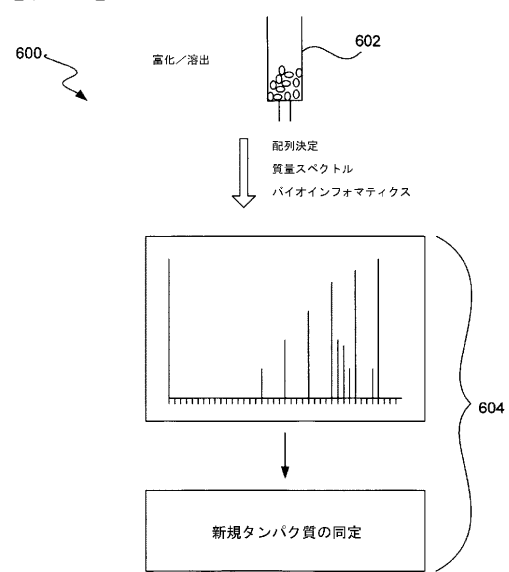


FIG. 6

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/21128
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : G01N 33/545, 543; C07H 21/00 US CL : 436/518; 536/25.3; 422/82.11 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) U.S. : 436/518; 536/25.3; 422/82.11		
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 practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,478,527 A (GUSTAFSON et al.) 26 December 1995 (26.12.1995), entire document.	1-36 and 40-44

Y		37-39
Y	US 5,482,867 A (BARRETT et al.) 09 January 1996 (09.01.1996), entire document.	1-44
Y	US 5,831,070 A (PEASE et al.) 03 November 1998 (03.11.1998), entire document.	1-44
X	US 6,406,921 B1 (WAGNER et al.) 18 June 2002 (18.06.2002), entire document.	1-44
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family 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 application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 July 2004 (09.07.2004)		Date of mailing of the international search report 17 AUG 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer MY-CHAU T TRAN <i>Janice Ford</i> Telephone No. 571-272-1600 <i>for</i>

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
// C O 7 K 19/00	G O 1 N 33/547	
	G O 1 N 37/00	1 0 2
	C O 7 K 19/00	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,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,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 チャリヒ, デボラ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94662-8097, エミリービル, カイロン コーポレイション ピーオーボックス 8097

(72)発明者 ズッカーマン, ロナルド エヌ.
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94662-8097, エミリービル, カイロン コーポレイション ピーオーボックス 8097

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA11 DA75 EA50 FA10 FA71
FA80 FA82

专利名称(译)	镜面抛光表面上的蛋白质微阵列，用于进行蛋白质组学分析		
公开(公告)号	JP2005535873A	公开(公告)日	2005-11-24
申请号	JP2004519921	申请日	2003-07-03
[标]申请(专利权)人(译)	希龙公司		
申请(专利权)人(译)	Chiron公司		
[标]发明人	チャリヒデボラ ズッカーマンロナルドエヌ		
发明人	チャリヒ, デボラ ズッカーマン, ロナルド エヌ.		
IPC分类号	G01N33/53 B01J19/00 C07K17/14 C07K19/00 C40B30/04 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/547 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	B01J19/0046 B01J2219/00387 B01J2219/00605 B01J2219/0061 B01J2219/00612 B01J2219/00617 B01J2219/00626 B01J2219/0063 B01J2219/00637 B01J2219/00659 B01J2219/00725 B01J2219/0074 B82Y30/00 C40B30/04 G01N33/543 G01N33/54386 G01N33/545 G01N33/552 G01N33/553 G01N33/ /6842 G01N33/6845 G01N2500/00		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.N C07K17/14 G01N33/543.525.C G01N33/543.525.W G01N33/547 G01N37/ /00.102 C07K19/00		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/ /EA50 4H045/FA10 4H045/FA71 4H045/FA80 4H045/FA82		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	10/190433 2002-07-03 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供蛋白质微阵列，其制造，使用和应用。根据本发明的蛋白质微阵列可用于各种前体外分析。根据本发明的各种蛋白质阵列可固定大蛋白质阵列，其可用于研究蛋白质 - 蛋白质相互作用以改善对疾病过程的理解，促进药物发现，或用于鉴定用于疫苗开发的潜在抗原。本发明的蛋白质阵列元件是天然或修饰的蛋白质（例如，抗体或融合蛋白质）。蛋白质阵列元件可以通过底物上的官能团（例如胺）和蛋白质（例如活化的羧酸）之间的结合反应直接连接到有机官能化的镜面基质上。还提供了用于阵列的化学阻挡的技术。本发明考虑将阵列元件点样到固体平面基底上，标记复杂蛋白质混合物，以及分析蛋白质与阵列的结合。本发明还使得能够通过阵列筛选鉴定为差异的蛋白质的富集或纯化以及随后的测序或结构分析。还提供了包括用于根据本发明的蛋白质组学分析的蛋白质结合微阵列的试剂盒。

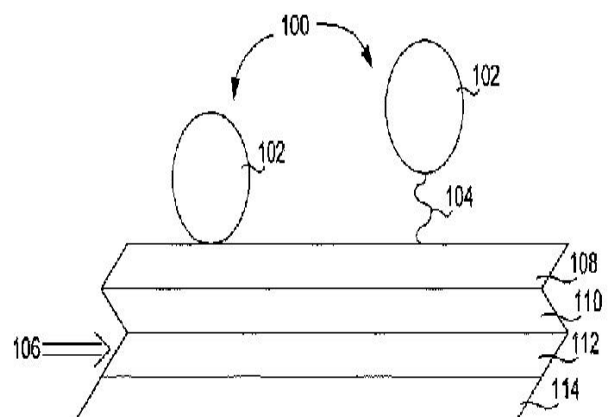


FIG. 1A