

(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2004-511753

(P2004-511753A)

(43) 公表日 平成16年4月15日(2004.4.15)

(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 2 G O 5 4
CO 7 K 17/08	GO 1 N 33/53	N 4 B O 3 3
CO 7 K 17/12	CO 7 K 17/08	4 H O 4 5
C 1 2 N 11/08	CO 7 K 17/12	
C 1 2 N 11/14	C 1 2 N 11/08	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 120 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2001-580434 (P2001-580434)	(71) 出願人	500114601 イエール ユニバーシティー
(86) (22) 出願日	平成13年5月4日 (2001.5.4)		アメリカ合衆国 06520 コネチカッ
(85) 翻訳文提出日	平成14年11月1日 (2002.11.1)		ト州、ニュー ヘイブン、 カレッジ ス
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/014526		トリート 451
(87) 国際公開番号	W02001/083827	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開日	平成13年11月8日 (2001.11.8)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(31) 優先権主張番号	60/201,921	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(32) 優先日	平成12年5月4日 (2000.5.4)	(72) 発明者	スナイダー, マイケル
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 06430 コネティカ
(31) 優先権主張番号	60/221,034		ット州, フェアフィールド, サマーセット
(32) 優先日	平成12年7月27日 (2000.7.27)		アベニュー 230
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質活性のスクリーニング用タンパク質チップ

(57) 【要約】

本発明は、タンパク質機能の大規模研究に有用なタンパク質チップであって、高密度に詰め込まれた反応ウェルを備えている該チップに関する。本発明はまた、1つのタンパク質サンプル中もしくは1つのタンパク質チップ上に存在するタンパク質の存在、量および／または機能を同時にアッセイするための、または該チップ上のタンパク質の各々に対するプローブ混合物中の各プローブの存在、相対的特異性および結合親和性をアッセイするための、タンパク質チップの使用方法に関する。本発明はまた、高密度で小容量の化学反応のための該タンパク質チップの使用方法に関する。また、本発明は、タンパク質チップ基材として有用なポリマーおよびタンパク質チップの製造方法に関する。本発明は更に、タンパク質チップ基材の誘導体化に有用な化合物に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在する位置アドレス可能なアレイであって、複数種の異なる物質が 1 cm^2 当たり少なくとも 100 種の異なる物質から構成される、上記アレイ。

【請求項 2】

複数種の異なる物質が、 1 cm^2 当たり 100～1,000 種の異なる物質から構成される、請求項 1 に記載のアレイ。

10

【請求項 3】

複数種の異なる物質が、 1 cm^2 当たり 1,000～10,000 種の異なる物質から構成される、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 4】

複数種の異なる物質が、 1 cm^2 当たり 10,000～100,000 種の異なる物質から構成される、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 5】

複数種の異なる物質が、 1 cm^2 当たり 100,000～1,000,000 種の異なる物質から構成される、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 6】

複数種の異なる物質が、 1 cm^2 当たり 1,000,000～10,000,000 種の異なる物質から構成される、請求項 1 に記載のアレイ。

20

【請求項 7】

複数種の異なる物質が、 1 cm^2 当たり 10,000,000～25,000,000 種の異なる物質から構成される、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 8】

複数種の異なる物質が、 1 cm^2 当たり少なくとも 25,000,000 種の異なる物質から構成される、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 9】

複数種の異なる物質が、 1 cm^2 当たり少なくとも 10,000,000,000 種の異なる物質から構成される、請求項 1 に記載のアレイ。

30

【請求項 10】

複数種の異なる物質が、 1 cm^2 当たり少なくとも 10,000,000,000,000 種の異なる物質から構成される、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 11】

固相支持体がスライドガラスである、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 12】

各々の異なる物質が、固相支持体の表面の異なるウェル内に存在する、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 13】

異なるウェル内の各々の異なる物質が、固相支持体の表面に結合されている、請求項 12 に記載のアレイ。

40

【請求項 14】

異なるウェル内の各々の異なる物質が、固相支持体の表面に結合されていない、請求項 12 に記載のアレイ。

【請求項 15】

異なるウェル内の各々の異なる物質が、溶液の状態である、請求項 12 に記載のアレイ。

【請求項 16】

各ウェルが、タンパク質または分子の生物学的活性をアッセイするための試薬を含む、請求項 12 に記載のアレイ。

50

【請求項 17】

複数種の異なるタンパク質または該タンパク質の機能性ドメインを含む分子を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なるタンパク質または分子が固相支持体上の異なる位置に存在する位置アドレス可能なアレイであって、複数種のタンパク質または分子が、生物のゲノム中の同タイプの生物学的活性を有する全ての発現タンパク質の少なくとも50%から構成される、上記アレイ。

【請求項 18】

複数種のタンパク質または分子が、生物のゲノム中の同タイプの生物学的活性を有する全ての発現タンパク質の少なくとも75%から構成される、請求項17に記載のアレイ。

【請求項 19】

複数種のタンパク質または分子が、生物のゲノム中の同タイプの生物学的活性を有する全ての発現タンパク質の少なくとも90%から構成される、請求項17に記載のアレイ。

【請求項 20】

生物が細菌、酵母、昆虫および哺乳動物からなる群から選ばれる、請求項17に記載のアレイ。

【請求項 21】

目的の生物学的活性を有する発現タンパク質が、キナーゼ、ホスファターゼ、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、アセチラーゼ、他の官能基転移酵素、核酸結合タンパク質、ホルモン結合タンパク質、およびDNA結合タンパク質からなる群から選ばれる、請求項17に記載のアレイ。

【請求項 22】

タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在する位置アドレス可能なアレイであって、固相支持体が、セラミック、非晶質炭化ケイ素、不定形酸化物、ポリイミド、ポリメチルメタクリレート、ポリスチレンおよびシリコーンエラストマーからなる群から選ばれる、上記アレイ。

【請求項 23】

固相支持体がシリコーンエラストマーである、請求項22に記載のアレイ。

【請求項 24】

固相支持体がポリジメチルシロキサンである、請求項23に記載のアレイ。

【請求項 25】

タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在する位置アドレス可能なアレイであって、複数種の異なる物質が、固相支持体に3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシランリンカーを介して結合されている、上記アレイ。

【請求項 26】

固相支持体の表面に複数のウェルを備えたアレイであって、ウェルの密度が少なくとも100ウェル/cm²である上記アレイ。

【請求項 27】

ウェルの密度が100~1,000ウェル/cm²である、請求項26に記載のアレイ。

【請求項 28】

ウェルの密度が1,000~10,000ウェル/cm²である、請求項26に記載のアレイ。

【請求項 29】

ウェルの密度が10,000~100,000ウェル/cm²である、請求項26に記載のアレイ。

【請求項 30】

ウェルの密度が100,000~1,000,000ウェル/cm²である、請求項26

10

20

30

40

50

に記載のアレイ。

【請求項 3 1】

ウェルの密度が 1, 0 0 0, 0 0 0 ~ 1 0, 0 0 0, 0 0 0 ウェル / cm^2 である、請求項 2 6 に記載のアレイ。

【請求項 3 2】

ウェルの密度が 1 0, 0 0 0, 0 0 0 ~ 2 5, 0 0 0, 0 0 0 ウェル / cm^2 である、請求項 2 6 に記載のアレイ。

【請求項 3 3】

ウェルの密度が少なくとも 2 5, 0 0 0, 0 0 0 ウェル / cm^2 である、請求項 2 6 に記載のアレイ。

10

【請求項 3 4】

ウェルの密度が少なくとも 1 0, 0 0 0, 0 0 0, 0 0 0 ウェル / cm^2 である、請求項 2 6 に記載のアレイ。

【請求項 3 5】

ウェルの密度が少なくとも 1 0, 0 0 0, 0 0 0, 0 0 0, 0 0 0 ウェル / cm^2 である、請求項 2 6 に記載のアレイ。

【請求項 3 6】

タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質がウェル内に存在し、かつ、各々の異なる物質が異なるウェル内に存在する、請求項 2 6 に記載のアレイ。

20

【請求項 3 7】

異なるウェル内の各々の異なる物質が固相支持体の表面に結合されている、請求項 3 6 に記載のアレイ。

【請求項 3 8】

異なるウェル内の各々の異なる物質が、共有結合により固相支持体の表面に結合されている、請求項 3 7 に記載のアレイ。

【請求項 3 9】

異なるウェル内の各々の異なる物質が、リンカーを介して共有結合により固相支持体の表面に結合されている、請求項 3 8 に記載のアレイ。

【請求項 4 0】

リンカーが 3 - グリシドオキシプロピルトリメトキシシランである、請求項 3 9 に記載のアレイ。

30

【請求項 4 1】

異なるウェル内の各々の異なる物質が、非共有結合により固相支持体の表面に結合されている、請求項 3 6 に記載のアレイ。

【請求項 4 2】

異なるウェル内の各々の異なる物質が、固相支持体の表面に結合されていない、請求項 3 6 に記載のアレイ。

【請求項 4 3】

異なるウェル内の各々の異なる物質が溶液の状態である、請求項 3 6 に記載のアレイ。

40

【請求項 4 4】

各ウェルが、タンパク質または分子の生物学的活性をアッセイするための試薬を含んでいる、請求項 2 6 に記載のアレイ。

【請求項 4 5】

ウェルの容積が 1 p l ~ 5 μ l である、請求項 2 6 に記載のアレイ。

【請求項 4 6】

ウェルの容積が 1 n l ~ 1 μ l である、請求項 2 6 に記載のアレイ。

【請求項 4 7】

ウェルの容積が 1 0 0 n l ~ 3 0 0 n l である、請求項 2 6 に記載のアレイ。

【請求項 4 8】

50

ウェルの底部が四角形、丸形、V字形またはU字形である、請求項26に記載のアレイ。

【請求項49】

固相支持体の表面に複数のウェルを備えた位置アドレス可能なアレイの製造方法であって、
固相表面に100ウェル/cm²を上回る密度のウェルが形成されるように設計された微細加工鋳型からアレイを成型する工程を含む上記方法。

【請求項50】

固相支持体の表面に複数のウェルを備えた位置アドレス可能なアレイの製造方法であって、

(a) 固相表面に100ウェル/cm²を上回る密度のウェルが形成されるように設計された微細加工鋳型から二次鋳型を成型する工程、および

(b) その二次鋳型から少なくとも1つのアレイを成型する工程を含む上記方法。

【請求項51】

アレイの成型工程が更に、

(a) 前記鋳型を液体成型材料で被覆する工程、および

(b) 成型物が固体になるまで、その成型材料を硬化させる工程を含む、請求項49または50に記載の方法。

【請求項52】

ウェルの密度が100～1,000ウェル/cm²である、請求項49～51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項53】

ウェルの密度が1,000～10,000ウェル/cm²である、請求項49～51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項54】

ウェルの密度が10,000～100,000ウェル/cm²である、請求項49～51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項55】

ウェルの密度が100,000～1,000,000ウェル/cm²である、請求項49～51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項56】

ウェルの密度が1,000,000～10,000,000ウェル/cm²である、請求項49～51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項57】

ウェルの密度が10,000,000～25,000,000ウェル/cm²である、請求項49～51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項58】

ウェルの密度が25,000,000ウェル/cm²よりも高い、請求項49～51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項59】

ウェルの密度が10,000,000,000ウェル/cm²よりも高い、請求項49～51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項60】

ウェルの密度が10,000,000,000,000ウェル/cm²よりも高い、請求項49～51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項61】

アレイがシリコンエラストマーから成型される、請求項49または50に記載の方法。

【請求項62】

アレイがポリジメチルシロキサンから成型される、請求項49または50に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 6 3】

液体成型材料がシリコンエラストマーである、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 6 4】

液体成型材料がポリジメチルシロキサンである、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 6 5】

タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在し、複数種の異なる物質が 1 cm^2 当たり少なくとも 100 種の異なる物質からなる位置アドレス可能なアレイの使用

10

方法であって、

(a) プローブを上記アレイと接触させる工程、および

(b) タンパク質／プローブ相互作用を検出する工程

を含む上記方法。

【請求項 6 6】

複数種の異なるタンパク質または該タンパク質の機能性ドメインを含む分子を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なるタンパク質または分子が固相支持体上の異なる位置に存在し、複数種の異なるタンパク質または分子が、生物のゲノム中の同タイプの生物学的活性を有する全ての発現タンパク質の少なくとも 50 % から構成される位置アドレス可能なアレイの使用

20

方法であって、

(a) プローブを上記アレイと接触させる工程、および

(b) タンパク質／プローブ相互作用を検出する工程

を含む上記方法。

【請求項 6 7】

タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在し、固相支持体が、セラミックス、非晶質炭化ケイ素、不定形酸化物、ポリイミド、ポリメチルメタクリレート、ポリスチレンおよびシリコンエラストマーからなる群から選ばれる、位置アドレス可能なアレイの使用

30

方法であって、

(a) プローブを上記アレイと接触させる工程、および

(b) タンパク質／プローブ相互作用を検出する工程

を含む上記方法。

【請求項 6 8】

タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在し、複数種の異なる物質が固相支持体に 3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシランリンカーを介して結合されている位置アドレス可能なアレイの使用

40

方法であって、

(a) プローブを上記アレイと接触させる工程、および

(b) タンパク質／プローブ相互作用を検出する工程

を含む上記方法。

【請求項 6 9】

プローブが酵素の基質またはインヒビターである、請求項 6 5 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 0】

プローブが、キナーゼ、ホスファターゼ、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、アセチラーゼ、および他の官能基転移酵素からなる群から選ばれる酵素の基質またはインヒビターである、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

プローブが、タンパク質、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、小

50

分子基質、薬剤候補、受容体、抗原、ステロイド、リン脂質、抗体、グルタチオン、免疫グロブリンのドメイン、マルトース、ニッケル、ジヒドロトリプシン、およびビオチンからなる群から選ばれる、請求項 65～68 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 72】

タンパク質／プローブ相互作用の検出が質量分析による、請求項 65～68 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 73】

タンパク質／プローブ相互作用の検出が、化学発光法、蛍光法、放射性標識法および原子間力顕微鏡法からなる群から選ばれる方法による、請求項 65～68 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 74】

位置アドレス可能なアレイの使用方法であって、

(a) タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に固着させる工程であって、但し、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在し、複数種の異なる物質が 1 cm^2 当たり少なくとも 100 種の異なる物質から構成される、該工程

(b) プローブを上記アレイと接触させる工程、および

(c) タンパク質／プローブ相互作用を検出する工程

を含む上記方法。

20

【請求項 75】

固相支持体がスライドガラスである、請求項 74 に記載の方法。

【請求項 76】

位置アドレス可能なアレイの使用方法であって、

(a) 複数種の異なるタンパク質または該タンパク質の機能性ドメインを含む分子を固相支持体上に固着させる工程であって、但し、各々の異なるタンパク質または分子が固相支持体上の異なる位置に存在し、複数種のタンパク質または分子が生物のゲノム中の同タイプの生物学的活性を有する全ての発現タンパク質の少なくとも 50% から構成される、該工程

(b) プローブを上記アレイと接触させる工程、および

(c) タンパク質／プローブ相互作用を検出する工程

を含む上記方法。

30

【請求項 77】

固相支持体がスライドガラスである、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 78】

位置アドレス可能なアレイの製造方法であって、

(a) 固相支持体上に $100\text{ ウェル}/\text{cm}^2$ を上回る密度のウェルが形成されるように設計された微細加工鋳型からアレイを成型する工程、および

(b) ウェル内で、タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に固着させる工程であって、但し、各々の異なる物質が固相支持体上の異なるウェル内に存在する、該工程

40

を含む上記方法。

【請求項 79】

位置アドレス可能なアレイの製造方法であって、

(a) 固相支持体上に $100\text{ ウェル}/\text{cm}^2$ を上回る密度のウェルが形成されるように設計された微細加工鋳型から二次鋳型を成型する工程、

(b) その二次鋳型から少なくとも 1 つのアレイを成型する工程、および

(c) ウェル内で、タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持

50

体上に固着させる工程であって、但し、各々の異なる物質が固相支持体上の異なるウェル内に存在する、該工程を含む上記方法。

【請求項 80】

リンパ球を活性化する抗原の同定方法であって、

(a) 位置アドレス可能なアレイを複数種のリンパ球と接触させる工程であって、但し、該アレイが複数種の可能性のある抗原を固相支持体上に含んでなり、各々の異なる抗原が固相支持体上の異なる位置に存在し、異なる抗原の密度が 1 cm^2 当たり少なくとも 100 種の異なる抗原である該工程、および

(b) リンパ球の活性化が起こっている固相支持体上での位置を検出する工程を含む上記方法。 10

【請求項 81】

リンパ球が患者に由来する、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 82】

抗原が、病原体の抗原、自家組織の抗原、組織特異的抗原、疾患特異的抗原、および合成抗原からなる群から選ばれる、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 83】

リンパ球の活性化が、抗体合成を測定することにより検出される、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 84】

リンパ球の活性化が、リンパ球による ^3H -チミジンの取込みを測定することにより検出される、請求項 80 に記載の方法。 20

【請求項 85】

リンパ球の活性化が、リンパ球の活性化により誘導または抑制される細胞表面分子の発現を測定することにより検出される、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 86】

リンパ球の活性化が、リンパ球の活性化により誘導される分泌型分子の発現を測定することにより検出される、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 87】

リンパ球の活性化が、 ^{51}Cr クロムの放出を測定することにより検出される、請求項 80 に記載の方法。 30

【請求項 88】

抗体調製物の特異性の判定方法であって、

(a) 位置アドレス可能なアレイを抗体調製物と接触させる工程であって、但し、該アレイが複数種の可能性のある抗原を固相支持体上に含んでなり、各々の異なる抗原が固相支持体上の異なる位置に存在し、異なる抗原の密度が 1 cm^2 当たり少なくとも 100 種の異なる抗原である該工程、および

(b) 該抗体調製物中の抗体による結合が起こっている固相支持体上での位置を検出する工程

を含む上記方法。 40

【請求項 89】

抗体調製物が、抗血清、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を含む、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 90】

抗体調製物が、Fab 断片、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体または合成抗体を含む、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 91】

抗体の結合が、前記抗体調製物中の抗体に結合する蛍光標識した二次抗体に前記アレイを接触させ、未結合の二次抗体を除去し、該アレイ上の結合標識を検出することにより検出される、請求項 88 に記載の方法。 50

【請求項 9 2】

マイトジェンの同定方法であって、

(a) 位置アドレス可能なアレイを細胞の集団と接触させる工程であって、但し、該アレイがタンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在し、異なる物質の密度が 1 cm^2 当たり少なくとも 100 種の異なる物質である該工程、および

(b) 細胞内でマイトジェン活性が誘導されている固相支持体上での位置を検出する工程を含む上記方法。

【請求項 9 3】

下記 (a) および (b) を含むキット。

(a) 固相支持体の表面に複数のウェルを備えた 1 以上のアレイであって、但し、該ウェルの密度が少なくとも $100 \text{ ウェル} / \text{cm}^2$ である該アレイ、および

(b) 1 つ以上の容器中の、1 種以上のプローブ、試薬または他の分子

【請求項 9 4】

1 つ以上の容器が、タンパク質の生物学的活性をアッセイするのに有用な試薬を含む、請求項 9 3 に記載のキット。

【請求項 9 5】

1 つ以上の容器が、プローブとタンパク質との間の相互作用をアッセイするのに有用な試薬を含む、請求項 9 3 に記載のキット。

【請求項 9 6】

試薬が溶液の状態である、請求項 9 4 または 9 5 に記載のキット。

【請求項 9 7】

試薬が固体の状態である、請求項 9 4 または 9 5 に記載のキット。

【請求項 9 8】

試薬が前記アレイの各ウェル内に収容されている、請求項 9 4 または 9 5 に記載のキット。

【請求項 9 9】

試薬が前記アレイの選択されたウェル内に収容されている、請求項 9 4 または 9 5 に記載のキット。

【請求項 100】

1 つ以上の容器が、タンパク質または分子の生物学的活性をアッセイするための溶液状の反応混合物を収容している、請求項 9 3 に記載のキット。

【請求項 101】

1 つ以上の容器が、前記生物学的活性をアッセイするための 1 種以上の基質を収容している、請求項 100 に記載のキット。

【請求項 102】

下記 (a) および (b) を含むキット。

(a) タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在し、複数種の異なる物質が 1 cm^2 当たり少なくとも 100 種の異なる物質から構成される、1 つ以上の位置アドレス可能なアレイ、および

(b) 1 つ以上の容器中の、1 種以上のプローブ、試薬または他の分子

【請求項 103】

前記物質が、固相支持体上のウェルの表面に結合されている、請求項 102 に記載のキット。

【請求項 104】

前記物質がタンパク質であり、かつ該タンパク質が、生物において同タイプの生物学的活性を有する全ての発現タンパク質の少なくとも 50 % である、請求項 103 に記載のキッ

10

20

30

40

50

ト。

【請求項 105】

前記物質がタンパク質または該タンパク質の機能性ドメインを含む分子であり、かつ、該タンパク質または該分子が、キナーゼ、ホスファターゼ、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、アセチラーゼ、核酸結合タンパク質およびホルモン結合タンパク質からなる群から選ばれる、請求項 104 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は、米国仮特許出願第 60/201,921 号（2000 年 5 月 4 日出願）および米国仮特許出願第 60/221,034 号（2000 年 7 月 27 日出願）の 35 U. S. C. 119 条（e）に基づく優先権の利益を請求するものであり、それら仮特許出願の各々は参照によりその全体が本明細書に組み入れられるものとする。

【0002】

本発明は、交付番号 D A R P A / O N R R 1 3 1 6 4 - 4 1 6 0 0 0 9 9 および N I H（国立衛生研究所）R O 1 C A 7 7 8 0 8 として政府の支援を受けてなされたものである。政府は本発明においてある一定の権利を有する。

【0003】

I. 発明の分野

本発明は、タンパク質機能の大規模な研究に有用なタンパク質チップに関し、該チップは高密度に詰め込まれた反応ウェルを含んでいる。本発明は、タンパク質サンプル中またはタンパク質チップ上に存在するタンパク質の存在、量および／もしくは機能を同時にアッセイするため、またはチップ上の各々のタンパク質についてのプローブの混合物中の各プローブの存在、相対的特異性および結合親和性をアッセイするための、タンパク質チップの使用方法に関する。本発明はまた、高密度で少容量の化学反応のための上記タンパク質チップの使用方法に関する。また、本発明は、タンパク質チップ基材として有用なポリマー、ならびにタンパク質チップの製造方法に関する。本発明は更に、タンパク質チップ基材の誘導体化に有用な化合物に関する。

【0004】

I I. 発明の背景

ゲノム全体の配列決定によって、多数のオープンリーディングフレーム（O R F）が同定された。現在、m R N A 発現パターンおよび遺伝子破壊表現型により遺伝子の機能を理解しようと相当な努力がなされている。こうした努力において大きな意義のある前進が可能になっているのは、一部には、遺伝子チップ技術を用いて 1 回の実験で何千もの遺伝子配列を分析することができるようになったためである。しかし、遺伝子機能に関する多くの情報が、コードされたタンパク質の生化学的活性の分析から得られる。

【0005】

現在、これらのタイプの分析は、研究者一人一人が 1 回に 1 つのタンパク質を調べることによってなされている。これは非常に時間がかかる方法である。何故ならば、1 つのタンパク質をその生化学的活性に基づいて精製および同定するには何年も要する場合があるからである。ゲノム配列全体が入手できれば、そのゲノムによってコードされるあらゆるタンパク質についての生化学的アッセイが実施できるようになる。

【0006】

このためには、1 つのタンパク質チップを用いて何百または何千ものタンパク質サンプルを分析することが有用であろう。そうしたアプローチは、大量のデータを生成および分析できるハイスループット実験に適している。当技術分野では多年にわたり、96 ウェルまたは 384 ウェルを含むマイクロタイタープレートが知られている。しかし、これらのプレートは、その大きさ（少なくとも 12.8 cm × 8.6 cm）のために、タンパク質の大規模な分析には不适当であり、これはウェルの密度が十分に高くないからである。

【0007】

上記で述べたように、D N A 合成およびハイブリダイゼーション反応で使用するための他

のタイプのアレイが考案されており、例えばWO89/10977に記載のものが挙げられる。しかし、これらのアレイは、別個の量のタンパク質分析には不適當である。何故ならば、これらのアレイは平坦な表面上に構築され、特徴物間で交差汚染しやすいからである。

【0008】

平坦な表面上のオリゴヌクレオチドアレイ (Peaseら, 1994, 「迅速なDNA配列分析用の光発生オリゴヌクレオチドアレイ (Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis)」, PNAS 91:5022-5026) から、チャンネル (channels) のアレイ (米国特許第5,843,767号)、チャンネルによって連結されているウェルのアレイ (Cohenら, 1999, 「プロテインキナーゼAのマイクロチップに基づく酵素アッセイ (A microchip-based enzyme assay for protein kinase A)」, Anal Biochem. 273:89-97) に及ぶ種々のアレイの製造にフォトリソグラフィー技法が応用されている。更に、半導体製造の分野では、微細加工 (microfabrication) 技法およびマイクロリソグラフィー技法が周知である。例えば、Moreau, 「半導体リソグラフィー：原理、実践および材料 (Semiconductor Lithography: Principals, Practices and Materials)」, Plenum Press, 1988を参照されたい。

10

【0009】

近年、出芽酵母サッカロミセス・セレビシアエ (Saccharomyces cerevisiae) 内で、生化学的ゲノミックスに有用である可能性のある多数のタンパク質を発現させるために考案された方法が開発された。ORFを、GALプロモーターを用い、かつタンパク質をポリヒスチジン (例えばHISX6) 標識に融合させる発現ベクターにクローニングしている。したがって、この方法は、約2,000の酵母タンパク質融合体の調製およびその発現の確認にずっと用いられてきた (Heymanら, 1999, 「トポイソメラーゼI介在連結を用いた個々のオープンリーディングフレームのゲノム規模のクローニングおよび発現 (Genome-scale cloning and expression of individual open reading frames using topoisomerase I-mediated ligation)」, Genome Res. 9:383-392)。組み換えストラテジーを用いて、酵母ORFの約85%が、CUP1プロモーター (銅により誘導可能) を含むベクター内でGSTコード領域とインフレームでクローニングされており、そうしてGST融合タンパク質を産生している (Martzenら, 1999, 「遺伝子の、それらの産物の活性による同定のための生化学的ゲノミクスアプローチ (A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products)」, Science 286:1153-1155)。Martzenらは、融合タンパク質のコレクションを幾つかの生化学的活性 (例えば、ホスホジエステラーゼ活性およびAppr-1-P-プロセッシング活性) についてスクリーニングするのにプーリング (pooling) ストラテジーを用い、それらの活性をコードする関連遺伝子を同定した。しかし、多数の個々のタンパク質サンプルを分析するためのストラテジーは記載されていない。

20

30

40

【0010】

したがって、先行技術のチップおよび方法と比較して費用および時間の面で有利となるようにウェルがチップ上に高密度に詰め込まれているタンパク質チップが必要とされている。

【0011】

本出願の第II節または他の節におけるいずれの参考文献の引用または照合も、そうした参考文献が本発明の先行技術として利用できることを認めるものとしてみなされるべきではない。

50

【0012】

I I I . 発明の概要

本発明は、タンパク質機能の大規模研究に有用なタンパク質チップ、すなわち、固相支持体上のタンパク質の位置アドレス可能な（位置をアドレス可能である）アレイであって、高密度に詰め込まれた反応ウェルを備えている該タンパク質チップに関する。本発明はまた、少なくとも1つのサンプル中に存在するタンパク質の存在、量および／または機能をアッセイするためのタンパク質チップの使用方法に関する。本発明はまた、高密度で小容量の化学反応のためのタンパク質チップの使用方法に関する。また、本発明は、タンパク質チップ基材として有用なポリマー、およびタンパク質チップの製造方法に関する。本発明は、タンパク質チップの誘導体化に有用な化合物に関する。

10

【0013】

1つの実施形態において、本発明は、限定するものではないが例えばスライドガラスのような平坦表面を備えるタンパク質チップを提供する。高密度タンパク質アレイは、例えばスライドガラス上に作製されていて、化学反応およびアッセイを行うことによりタンパク質の存在、量および／または機能の大規模な並行分析ができるようなものである。1つの特定の実施形態において、その平坦表面アレイは、3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシラン（GPTS）リンカーを介してその表面に結合されているタンパク質を有する。

【0014】

更に、別の特定の実施形態において、本発明は、高密度に詰め込まれたウェル（その中で化学反応およびアッセイを実施できる）を有するタンパク質チップを提供し、それによりタンパク質の存在、量および／または機能の大規模な並行分析ができるようにすることにより、当業界で公知の方法および装置の欠点や制限を克服している。

20

【0015】

1つずつ行うアッセイと比較した場合のアレイに対するアッセイの全般的な利点としては、多数のタンパク質-プローブ相互作用を同時に同定できること、およびそれらの相互作用の相対的親和性を測定できること、が挙げられる。プローブの複合的混合物をチップに適用することの利点としては、細胞内での環境により近い環境で相互作用を検出できること、および多くの可能性のあるリガンドを同時に評価できること、が挙げられる。

【0016】

1つの実施形態において、本発明は、タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在する位置アドレス可能なアレイであって、複数種の物質が1 cm² 当たり少なくとも100種の異なる物質から構成される上記アレイである。

30

【0017】

別の実施形態において、本発明は、複数種の異なるタンパク質または該タンパク質の機能性ドメインを含む分子を固相支持体上に含んでなり、各々の異なるタンパク質または分子が固相支持体上の異なる位置に存在する位置アドレス可能なアレイであって、複数種の異なるタンパク質または分子が、生物のゲノム中の同タイプの生物学的活性を有する全ての発現タンパク質の少なくとも50%から構成される上記アレイである。

40

【0018】

更に別の実施形態において、本発明は、タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在する位置アドレス可能なアレイであって、固相支持体が、セラミック、非晶質炭化ケイ素、不定形酸化物、ポリイミド、ポリメチルメタクリレート、ポリスチレンおよびシリコーンエラストマーからなる群から選ばれる、上記アレイである。

【0019】

更に別の実施形態において、本発明は、タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含

50

む分子、細胞全体およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在する位置アドレス可能なアレイであって、複数種の異なる物質が、3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシランリンカーを介して固相支持体に結合されている、上記アレイである。

【0020】

別の実施形態において、本発明は、固相支持体の表面に複数のウェルを備えるアレイであって、ウェルの密度が少なくとも100ウェル/cm²である上記アレイである。

【0021】

また、本発明は、固相支持体の表面に複数のウェルを備えた位置アドレス可能なアレイの製造方法であって、固相表面に100ウェル/cm²を上回る密度となるように設計された微細加工鋳型からアレイを成型する工程を含む上記方法に関する。別の実施形態において、本発明は、固相支持体の表面に複数のウェルを備えた位置アドレス可能なアレイの製造方法であって、固相表面に100ウェル/cm²を上回る密度のウェルが形成されるように設計された微細加工鋳型から二次鋳型を成型し、その二次鋳型から少なくとも1つのアレイを成型する工程を含む上記方法である。

10

【0022】

更に別の実施形態において、本発明は、タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在し、複数種の異なる物質が1cm²当たり少なくとも100種の異なる物質から構成される位置アドレス可能なアレイの使用方法であって、プローブを上記アレイと接触させる工程、およびタンパク質/プローブ相互作用を検出する工程を含む上記方法である。

20

【0023】

更に別の実施形態において、本発明は、複数種の異なるタンパク質または該タンパク質の機能性ドメインを含む分子を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なるタンパク質または分子が固相支持体上の異なる位置に存在し、複数種のタンパク質および分子が、生物のゲノム中の同タイプの生物学的活性を有する全ての発現タンパク質の少なくとも50%から構成される位置アドレス可能なアレイの使用方法であって、プローブを上記アレイと接触させる工程、およびタンパク質/プローブ相互作用を検出する工程を含む上記方法である。

30

【0024】

別の実施形態において、本発明は、タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在し、固相支持体が、セラミックス、非晶質炭化ケイ素、不定形酸化物、ポリイミド、ポリメチルメタクリレート、ポリスチレンおよびシリコンエラストマーからなる群から選ばれる位置アドレス可能なアレイの使用方法であって、プローブを上記アレイと接触させる工程、およびタンパク質/プローブ相互作用を検出する工程を含む上記方法である。

40

【0025】

更に別の実施形態において、本発明は、タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在し、複数種の異なる物質が固相支持体に3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシランリンカーを介して結合されている位置アドレス可能なアレイの使用方法であって、プローブを上記アレイと接触させる工程、およびタンパク質/プローブ相互作用を検出する工程を含む上記方法である。

【0026】

50

更に別の実施形態において、本発明は、位置アドレス可能なアレイの使用方法であって、タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に固着させる工程（但し、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在し、複数種の異なる物質が 1 cm^2 当たり少なくとも100種の異なる物質から構成される）、プローブを上記アレイと接触させる工程、およびタンパク質／プローブ相互作用を検出する工程を含む上記方法である。

【0027】

1つの特定の実施形態において、本発明は、位置アドレス可能なアレイの使用方法であって、タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に固着させる工程（但し、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在し、複数種の異なる物質が 1 cm^2 当たり少なくとも100種の異なる物質から構成され、固相支持体がスライドガラスである）、プローブを上記アレイと接触させる工程、およびタンパク質／プローブ相互作用を検出する工程を含む上記方法である。

10

【0028】

別の実施形態において、本発明は、位置アドレス可能なアレイの使用方法であって、複数種の異なるタンパク質または該タンパク質の機能性ドメインを含む分子を固相支持体上に固着させる工程（但し、各々の異なるタンパク質または分子が固相支持体上の異なる位置に存在し、複数種の異なるタンパク質または分子が生物のゲノム中の同タイプの生物学的活性を有する全ての発現タンパク質の少なくとも50%から構成される）、プローブを上記アレイと接触させる工程、およびタンパク質／プローブ相互作用を検出する工程を含む上記方法である。

20

【0029】

別の実施形態において、本発明は、位置アドレス可能なアレイの使用方法であって、複数種の異なるタンパク質または該タンパク質の機能性ドメインを含む分子を固相支持体上に固着させる工程（但し、各々の異なるタンパク質または分子が生物のゲノム中の同タイプの生物学的活性を有する全ての発現タンパク質の少なくとも50%から構成され、固相支持体がスライドガラスである）、プローブを上記アレイと接触させる工程、およびタンパク質／プローブ相互作用を検出する工程を含む上記方法である。

30

【0030】

別の実施形態において、本発明は、位置アドレス可能なアレイの製造方法であって、固相表面に $100\text{ ウェル}/\text{cm}^2$ を上回る密度のウェルが形成されるように設計された微細加工鋳型からアレイを成型する工程、ウェル内で、タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に固着させる工程（但し、各々の異なる物質が固相支持体上の異なるウェル内に存在する）を含む上記方法である。

【0031】

別の実施形態において、本発明は、位置アドレス可能なアレイの製造方法であって、固相表面に $100\text{ ウェル}/\text{cm}^2$ を上回る密度のウェルが形成されるように設計された微細加工鋳型から二次鋳型を成型する工程、その二次鋳型から少なくとも1つのアレイを成型する工程、およびウェル内で、タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体に固着させる工程（但し、各々の異なる物質が固相支持体上の異なるウェル内に存在する）、を含む上記方法である。

40

【0032】

別の実施形態において、本発明は、位置アドレス可能なアレイの製造方法であって、固相表面に $100\text{ ウェル}/\text{cm}^2$ を上回る密度のウェルが形成されるように設計された微細加工鋳型から二次鋳型を成型する工程、その二次鋳型から少なくとも1つのアレイを成型す

50

る工程、およびウェル内で、タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固着させる工程（但し、各々の異なる物質が異なるウェル内に存在する）、を含む上記方法である。

【0033】

A. 定義

本出願において用いられる「タンパク質」とは、全長タンパク質、タンパク質の部分、またはペプチドをいう。タンパク質は、生物（好ましくは細菌、酵母、昆虫細胞または哺乳動物細胞）における組換えによる過剰発現により調製することもできるし、大きなタンパク質の断片化により作製することもできるし、あるいは化学的に合成することもできる。

10

【0034】

本出願において用いられる「機能性ドメイン」とは、所望の機能活性をもたらすのに必要かつ十分なタンパク質のドメインである。機能性ドメインの例としては、特に、キナーゼ、プロテアーゼ、ホスファターゼ、グリコシダーゼ、アセチラーゼ、転移酵素、または他の酵素の活性を示すドメインが挙げられる。機能性ドメインの他の例としては、DNA、RNA、タンパク質、ホルモン、リガンドまたは抗原に対する結合活性を示すそれらのドメインが挙げられる。

【0035】

本出願において用いられる「プローブ」とは、核酸（例えばDNAもしくはRNA）またはタンパク質に結合する任意の化学的試薬をいう。プローブの例としては、特に、別のタンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、小分子基質、ならびにインヒビター、薬剤候補、受容体、抗原、ホルモン、ステロイド、リン脂質、抗体、補因子、サイトカイン、グルタチオン、免疫グロブリンのドメイン、糖鎖、マルトース、ニッケル、ジヒドロトリプシンおよびビオチンが挙げられる。

20

【0036】

チップ上の各タンパク質または各プローブは、好ましくは、固相支持体上の既知で予め決められている位置に置かれており、各タンパク質または各プローブの正体が固相支持体上のその位置から決定できるようになっている。更に、そのタンパク質またはプローブは、固相支持体上で位置アドレス可能なアレイを形成している。

【0037】

30

I V. 図面の説明

図1a。図示された組換え法を用いて、119種の酵母プロテインキナーゼを、ガラクトース誘導型GAL10プロモーターの制御下でGST融合タンパク質を産生する高コピーURA3発現ベクター（pEGKG）にクローニングした。GST：キナーゼ構築物を大腸菌にレスキューし、各構築物の5'末端での配列を決定した。突然変異が見つかったら、全ての手順を繰り返した。

【0038】

図1b。記載されているようにして精製したGST：キナーゼ融合タンパク質のイムノブロット。3回の試みから、106種のキナーゼタンパク質が精製された。繰り返し試みたにもかかわらず、119種のGST融合体のうち最後の14種はイムノブロット分析で検出できなかった（例えば、星印をつけたレーンのMps1）。

40

【0039】

図2a。キナーゼの研究に用いたタンパク質チップを、次のプロセス（概略的に図示されている）に従って作製した。ポリジメチルシロキサン（PDMS）をアクリル製のマスター鋳型に注いだ。硬化させた後、ウェルを備えた該チップを剥がし、スライドガラスに載せた。次に、該チップの表面を誘導体化し、次にタンパク質をウェルに結合させた。ウェルをまず1%BSAでブロックした後、キナーゼ、³³P-γ-ATPおよび緩衝液を添加した。30℃にて30分間インキュベートした後、タンパク質チップを十分に洗浄し、X線フィルムおよびMolecular Dynamics Phosphor Imager（解像度が50μm）の双方に暴露し、定量する。12種の基質について、それぞれの

50

キナーゼアッセイを少なくとも2回繰り返し、残りの5種の基質については、そのアッセイを1回実施した。

【0040】

図2b。タンパク質チップの拡大図である。

【0041】

図3。タンパク質チップおよびキナーゼアッセイの結果。各チップの19位は、ネガティブ対照のシグナルを示す。B4位のMps1は、12種のキナーゼ反応の全てにおいて強いキナーゼ活性を示したが、ウェスタンブロットでは目に見えるシグナルは検出できなかった(図1b)。

【0042】

図4a。プロテインキナーゼ反応の定量分析。キナーゼ活性は、Molecular Dynamics PhosphorImagerを用いて測定し、データをExcelスプレッドシートにエクスポートした。次に、そのデータをネガティブ対照に対して標準化することにより、キナーゼのシグナルを増大率(倍)(fold increases)に変換した。4つの反応における119種のキナーゼのシグナルをlogスケールで示す。増大率(倍)は1~1000倍の範囲である。

【0043】

図4b。基質特異性を調べるために、次の式を用いて特異性指数(SI)を算出した： $SI_{i,r} = F_{i,r} / [(F_{i,1} + F_{i,2} + \dots + F_{i,r}) / r]$ (式中、iは用いたキナーゼの正体を表わし、rは基質の正体を表わし、 $F_{i,r}$ はGST単独の場合と比較した基質rについてのキナーゼiの増大率(倍)を表わす)。キナーゼの特性の幾つかの例は、SIが3より大きい場合に示される。

【0044】

図5a。キナーゼのコアドメインの多重配列アライメントから得られた系統樹であり、ポリ(Tyr-Glu)キナーゼの機能特異性とアミノ配列との相関関係を示している。ポリ(Tyr-Glu)を基質として使用できるキナーゼは、配列比較系統樹の特定の領域にマッピングされることが多い。ポリ(Tyr-Glu)を効率的にリン酸化できるキナーゼは、影付きで示す。この基質を微弱にしか使用しない2種のキナーゼは、四角に示す。Rad53およびSte7(ポリ(Tyr-Glu)をリン酸化できなかった)はアスタリスクで示す。図示のように、これらのキナーゼの70%が4つの配列群(丸で囲まれている)に入っている。

【0045】

図5b。ウサギ筋肉のホスホリラーゼキナーゼ(PHK)28の構造。ポリ(Tyr-Glu)を基質として使用できるキナーゼに特に見い出される3つの塩基性残基およびメチオニン(Met)残基の位置を示している。アスパラギン(Asp)残基は通常、ポリ(Tyr-Glu)を使わないキナーゼに見い出される。

【0046】

図6。タンパク質チップの製造プロセスにおけるリソグラフィー工程の断面図。

【0047】

a. 酸化物層の両面に2層のシリコンを有するシリコンウェハ。

【0048】

b. 上面にレジスタントマスク層を有するシリコンウェハ。

【0049】

c. エッチングプロセスにより、表面がレジスタントマスクにより保護されていないシリコンを除去する。エッチングの深度は酸化物層の位置により調節する(すなわち、エッチングプロセスでは酸化物層は除去されない)。

【0050】

d. マスク層を取り除き、エッチングされたシリコンウェハを残す。

【0051】

e. タンパク質チップの材料を鋳型に塗布する。

10

20

30

40

50

【0052】

f. 硬化させた後、タンパク質チップを鋳型から外す。タンパク質チップは鋳型の凹部（陰画）である像を有する。

【0053】

図7。タンパク質チップ上でのキナーゼ／インヒビターアッセイ。ヒト・プロテインキナーゼA（PKA）、ヒト・mapキナーゼ（MAPK）、3種の酵母PKA相同体（TPK1、TPK2およびTPK3）、ならびに2種の他の酵母プロテインキナーゼ（HSL1およびRCK1）を、各種濃度の特定のヒトPKAインヒビターPKI α またはMAPKインヒビターSB202190を用いて、2種の基質（すなわち、PKAのタンパク質基質および一般に用いられるキナーゼ基質MBP）について試験した。図に示すように、PKI α は、双方のペプチドとMBPを基質として用いて、PKA活性を特異的に抑制できる。しかし、SB202190は、PKA活性に対して抑制作用を示さなかった。また、興味深い点として、PKI α が、試験した3種の酵母PKA相同体（TPK1、TPK2、TPK3）または他の2種の酵母プロテインキナーゼ（HSL1およびRCK1）を抑制しなかったことにも注目されたい。

10

【0054】

V. 詳細な説明

本発明は、タンパク質機能の大規模な研究に有用なタンパク質チップ、すなわち固相支持体上のタンパク質の位置アドレス可能なアレイに関するものであり、そのタンパク質チップは、高密度に詰め込まれた反応ウェルを含む。位置アドレス可能なアレイは、目的の各プローブまたは各タンパク質が固相支持体上の既知で所定の位置に配置されて、各プローブまたは各タンパク質の正体が該アレイ上でのその位置から決定できるような構成を提供する。本発明はまた、少なくとも1つのサンプル中に存在するタンパク質の存在、量および／または機能をアッセイするためのタンパク質チップの使用法に関する。本発明はまた、高密度で小容量の化学反応のためのタンパク質チップの使用法に関する。また、本発明は、タンパク質チップ基材として有用なポリマー、ならびにタンパク質チップの製造方法に関する。本発明は更に、タンパク質チップ基材の誘導体化に有用な化合物に関する。

20

【0055】

1つの実施形態において、本発明は、タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なる物質が該固相支持体上の異なる位置に存在する位置アドレス可能なアレイであって、複数種の異なる物質が1cm²当たり少なくとも100種の異なる物質から構成される上記アレイである。1つの実施形態において、上記の複数種の異なる物質は、1cm²当たり100～1,000種の異なる物質から構成される。別の実施形態において、上記の複数種の異なる物質は、1cm²当たり1,000～10,000種の異なる物質から構成される。別の実施形態において、上記の複数種の異なる物質は、1cm²当たり10,000～100,000種の異なる物質から構成される。更に別の実施形態において、上記の複数種の異なる物質は、1cm²当たり100,000～1,000,000種の異なる物質から構成される。更に別の実施形態において、上記の複数種の異なる物質は、1cm²当たり1,000,000～10,000,000種の異なる物質から構成される。更に別の実施形態において、上記の複数種の異なる物質は、1cm²当たり10,000,000～25,000,000種の異なる物質から構成される。更に別の実施形態において、上記の複数種の異なる物質は、1cm²当たり少なくとも25,000,000種の異なる物質から構成される。更に別の実施形態において、上記の複数種の異なる物質は、1cm²当たり少なくとも10,000,000種の異なる物質から構成される。更に別の実施形態において、上記の複数種の異なる物質は、1cm²当たり少なくとも10,000,000,000種の異なる物質から構成される。

30

40

【0056】

50

別の実施形態において、本発明は、タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在する位置アドレス可能なアレイであって、複数種の異なる物質が 1 cm^2 当たり少なくとも 100 種の異なる物質から構成され、かつ固相支持体がスライドガラスである上記アレイである。

【0057】

別の実施形態において、本発明は、タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体、およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在する位置アドレス可能なアレイであって、複数種の異なる物質が 1 cm^2 当たり約 30～100 種の異なる物質から構成される上記アレイである。1つの特定の実施形態において、上記の複数種の異なる物質は、 1 cm^2 当たり 30 種の異なる物質から構成される。1つの特定の実施形態において、上記の複数種の異なる物質は、 1 cm^2 当たり 30～50 種の異なる物質から構成される。別の特定の実施形態において、上記の複数種の異なる物質は、 1 cm^2 当たり 50～100 種の異なる物質から構成される。

【0058】

種々の特定の実施形態において、本発明は、複数種の異なるタンパク質または該タンパク質の機能性ドメインを含む分子を固相支持体上に含んでなり、各々の異なるタンパク質または分子が固相支持体上の異なる位置に存在する位置アドレス可能なアレイであって、複数種の異なるタンパク質または分子が、生物のゲノム中の同タイプの生物学的活性を有する全ての発現タンパク質の少なくとも 50%、75%、90% または 95% から構成される上記アレイである。例えば、そのような生物は、真核生物でも原核生物でもよく、好ましくは、哺乳動物、ヒトまたはヒト以外の動物、霊長類、マウス、ラット、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ニワトリ、真菌（例えば酵母）、ショウジョウバエ (*Drosophila*)、線虫 (*C. elegans*) などである。そのような目的の生物学的活性のタイプは、限定するものではないが、酵素活性（例えばキナーゼ活性、プロテアーゼ活性、ホスファターゼ活性、グリコシダーゼ、アセチラーゼ活性および他の化学基転移酵素活性）、核酸結合性、ホルモン結合性などとすることができる。

【0059】

A. タンパク質チップの製造

本発明のアレイに高密度のウェルを有するタンパク質チップは、好ましくは、慣用の微細加工技法またはマイクロリソグラフィ技法を用いて、型押しされ、ミリングまたはエッチング加工したマスター鋳型から成型される。好ましくは、慣用のマイクロリソグラフィ技法および材料が、マスター鋳型の製造に用いられる。マスター鋳型を製造したら、次にそのマスター鋳型を直接使用してタンパク質チップ自体を成型することができる。あるいはまた、マスター鋳型から二次または三次の鋳型を成型してもよく、これらの二次または三次の鋳型からタンパク質チップが成型される。

【0060】

マスター鋳型は、微細加工またはマイクロリソグラフィに適するどのような材料からも製造でき、シリコン、ガラス、石英、ポリイミドおよびポリメチルメタクリレート（ルーサイト）が好ましい。マイクロリソグラフィの場合、好ましい材料はシリコンウェハ（silicon wafers）である。

【0061】

適切なマスター鋳型、二次鋳型または三次鋳型が製造されたら、タンパク質チップを成型する。タンパク質チップは、成型に適するいずれの固相支持体にも成型することができ、多孔質または非多孔質の固相支持体が挙げられる。セラミック、非晶質炭化ケイ素、硬化すると SiO_2 の成型物を生じる不定形酸化物、ポリイミド、ポリメチルメタクリレートおよびポリスチレンが好ましい固相支持体であり、シリコーンエラストマー（silicone elastomeric）材料が最も好ましい。シリコーンエラストマー材料の

中でも、ポリジメチルシロキサン（P D M S）が最も好ましい固相支持体である。シリコーンエラストマー材料の利点は、それらの可撓性の性質のために、鋳型から外し易い点である。

【0062】

図6に、本発明によるタンパク質チップ上のウェルの高密度アレイを実現するのに有用な方法の一例を示す。シリコンの層の間に酸化層が挟まれているシリコンウェハを用意する（図6a）。シリコン-オン-インシュレーター（s i l i c o n - o n - i n s u l a t o r ; S O I）ウェハとして知られているこれらのウェハは一般にウェハ供給会社（例えば、B e l l e M e a d R e s e a r c h , B e l l e M e a d , N J および V i r g i n i a S e m i c o n d u c t o r , F r e d e r i c k s b u r g , V 10 A）から入手可能である。

【0063】

次に、そのシリコンウェハをパターニングし、エッチング工程によりエッチングする（図6b～d）。埋設されている酸化層は、非常に効果的なエッチングストップとして役立ち、ウェハ全体にわたり非常に均一なエッチング深度が得られる。エッチング深度はエッチング工程には依存せず、上部のシリコン層の厚みによってのみ決まる。

【0064】

湿式化学的エッチング工程（例えばK O H またはテトラメチルヒドラジン（T M A H）を用いるもの）が利用できる。しかし、この技法は、シリコンウェハの結晶配向にわずかに依存する。したがって、反応性イオンエッチング（R I E）において希ガス（典型的にはS F ₆）を用いる技法が好ましい。R I Eエッチング技法は、シリコン中に、シリコンウェハの結晶配向に依存しない高度に異方性のウェルを実現することができる。参考文献、G . K o v a c s , 「微細機械加工されたトランスデューサー資料集（M i c r o m a c h i n e d T r a n s d u c e r s S o u r c e b o o k）」, A c a d e m i c P r e s s （1998）およびM . M a d o u , 「微細加工の基礎（F u n d a m e n t a l s o f M i c r o f a b r i c a t i o n）」, C R C P r e s s （1997）にエッチング技法のバックグラウンドが載っている。 20

【0065】

1つのチップに対して両タイプのマイクロリソグラフィーを用いて、所望のウェル形状の組合せを得ることができる。湿式化学的エッチングは、U字形のウェルが得られる等方性の工程であるが、R I Aは底部が四角形のウェルが得られる異方性の工程である。 30

【0066】

ウェハをエッチングしてマスター鋳型を得た後、それを用いてタンパク質チップを成型できる（図6e～f）。これらの構造体をタンパク質チップとしてもよいし、あるいはそれら自体を、そこからタンパク質チップの更なる成型を行う二次もしくは三次鋳型としてもよい。

【0067】

したがって、1つの実施形態において、複数のウェルを固相支持体の表面上に含む位置アドレス可能なアレイの製造方法は、固相表面に100ウェル／c m ² を上回る密度のウェルが形成されるように設計された微細加工鋳型からアレイを成型することを含む。別の実施形態において、複数のウェルを固相支持体の表面に含む位置アドレス可能なアレイの製造方法は、固相表面に100ウェル／c m ² を上回る密度のウェルが形成されるように設計された微細加工鋳型から二次鋳型を成型し、その二次鋳型から少なくとも1つのアレイを成型することを含む。更に別の実施形態において、位置アドレス可能なアレイの製造方法は、上記の鋳型を液体成型材料で被覆し、成型物が固形になるまでその成型材料を硬化させることを含む。液体成型材料は、好ましくはシリコーンエラストマー（s i l i c o n e e l a s t o m e r）であり、最も好ましくはポリジメチルシロキサンである。これらの位置アドレス可能なアレイのいずれにも、タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を、各々の異なる物質が固相支持体上の異なるウェル内に見出されるよう 50

に置くことができる。

【0068】

B. タンパク質チップの特徴

本発明のタンパク質チップは、物理的な大きさに限定されるものではなく、簡便ないずれの大きさのものであってもよい。現行の実験室装置と適合させるためには、標準的な顕微鏡用スライドかまたはそれより小さい大きさのタンパク質チップが好ましい。最も好ましいのは、2つのチップが1枚の顕微鏡用スライドに取り付けられるような大きさのタンパク質チップである。また、質量分析計のサンプルチャンバーに適合する大きさのタンパク質チップも好ましい。

【0069】

本発明のタンパク質チップにおけるウェルは、どのような形状であってもよく、例えば、矩形、正方形または楕円形が挙げられ、円形が好ましい。タンパク質チップにおけるウェルは四角形もしくは円形の底部、V字形の底部、またはU字形の底部を有することができる。四角形の底部はわずかに好ましい。何故ならば、好ましい反応性イオンエッチング（RIE）工程（異方性である）によって、底部が四角形のウェルが得られるからである。ウェル底部の形状は、特定のチップ上で均一である必要はないが、該チップ上で実施される特定のアッセイでの必要に応じて様々なものであり得る。

【0070】

本発明のタンパク質チップのウェルは、いずれの幅－深度比のものであってもよく、約10：1～約1：10の幅－深度比が好ましい。本発明のタンパク質チップのウェルは、いずれの容積のものであってもよく、1 p l～5 μ lの容積を有するウェルが好ましく、1 n l～1 μ lの容積を有するウェルがより好ましい。ウェルの最も好ましい容積は100 n l～300 n lである。非常に高密度のウェルを備えるタンパク質チップの場合、好ましいウェルの容積は10 p l～100 n lである。

【0071】

本発明のタンパク質チップは、非常に様々なウェルの密度（ウェル／ cm^2 ）を有することができる。好ましいウェルの密度は約25ウェル／ cm^2 ～約10,000,000,000,000ウェル／ cm^2 である。レーザーミリングしたルーサイトのマスター鑄型から成型されるタンパク質チップでのウェルの密度は、通常、1ウェル／ cm^2 ～2,500ウェル／ cm^2 である。適切なミリング装置を使えば、直径が100 μ mと小さく100 μ m間隔のウェルが得られる。湿式化学的マイクロリソグラフィー技法によりエッチングされたマスター鑄型から成型されるタンパク質チップでは、ウェルの密度が通常50ウェル／ cm^2 ～10,000,000,000,000ウェル／ cm^2 である。湿式化学的エッチングでは、深さ10 μ mで10 μ m間隔のウェルを得ることができ、そしてまた、直径が10 μ m未満のウェルが得られる。RIEマイクロリソグラフィー技法によりエッチングされたマスター鑄型から成型されるタンパク質チップでは、ウェルの密度が通常100ウェル／ cm^2 ～25,000,000,000,000ウェル／ cm^2 である。RIEを光学的リソグラフィーと組み合わせれば、直径500 nmで500 nm間隔のウェルを作製することができる。電子ビームリソグラフィーをRIEと組み合わせると、直径50 nmで50 nm間隔のウェルを作製することができる。この大きさおよびそれと等しい間隔を有するウェルでは、ウェルの密度が10,000,000,000,000,000ウェル／ cm^2 のタンパク質チップが得られる。好ましくは、RIEを用いて、直径20 μ mで20 μ m間隔のウェルを作製する。この大きさで間隔もそれと等しいウェルでは、25,000,000,000ウェル／ cm^2 の密度となろう。

【0072】

上記で記載した微細加工技法およびマイクロリソグラフィー技法は、ウェルの大きさが560 μ mまたは280 μ mで約1 mm間隔であるシリコンウェハを湿式化学的にエッチングするのに成功裏に用いられている。ウェルと間隔のこの組合せにより、それぞれ約410,000ウェル／ cm^2 および約610,000ウェル／ cm^2 のアレイが得られる。ウェルの大きさと間隔が等しい場合、約3,190,000ウェル／ cm^2 および12,

10

20

30

40

50

750, 000 ウェル / cm^2 のタンパク質チップが得られる。

【0073】

1つの実施形態において、上記アレイは、固相支持体の表面に複数のウェルを含んでおり、ウェルの密度は少なくとも100 ウェル / cm^2 である。別の実施形態において、上記のウェルの密度は100～1000 ウェル / cm^2 である。別の実施形態において、上記のウェルの密度は1000～10,000 ウェル / cm^2 である。別の実施形態において、上記のウェルの密度は10,000～100,000 ウェル / cm^2 である。更に別の実施形態において、上記のウェルの密度は100,000～1,000,000 ウェル / cm^2 である。更に別の実施形態において、上記のウェルの密度は1,000,000～10,000,000 ウェル / cm^2 である。更に別の実施形態において、上記のウェルの密度は10,000,000～25,000,000 ウェル / cm^2 である。更に別の実施形態において、上記のウェルの密度は少なくとも25,000,000 ウェル / cm^2 である。更に別の実施形態において、上記のウェルの密度は少なくとも10,000,000,000 ウェル / cm^2 である。更に別の実施形態において、上記のウェルの密度は少なくとも10,000,000,000,000,000 ウェル / cm^2 である。

10

【0074】

C. タンパク質チップの利用

1つの実施形態において、本発明は、限定するものではないがスライドガラスのような平坦表面を含むタンパク質チップを提供する。高密度タンパク質アレイは、化学反応およびアッセイが実施できて、タンパク質（例えばプロテインキナーゼ）の存在、量および／または機能の大規模な平行分析が可能になるように、例えばスライドガラス上に作製することができる。タンパク質またはプローブは共有結合または非共有結合により固相支持体の平坦表面に結合させる。タンパク質またはプローブは、固相支持体の平坦表面に直接結合させてもよいし、あるいは固相支持体にリンカー分子または化合物を介して付着させてもよい。リンカーは、タンパク質またはプローブの固相支持体表面への付着を容易にするように固相支持体の表面を誘導体化するいずれかの分子または化合物とすることができる。リンカーは、タンパク質またはプローブを固相支持体表面に共有結合または非共有結合により結合させることができる。更に、リンカーは、無機分子でも有機分子でもよい。好ましいリンカーは、遊離アミンを有する化合物である。リンカーの中で最も好ましいものは3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシラン（GPTS）である。

20

30

【0075】

別の実施形態において、本発明のタンパク質チップには、平坦表面アレイと比較して幾つかの利点がある。すなわち、ウェルを用いることにより、ウェルの内容物についての交差汚染の可能性が解消または軽減される。平坦表面と比較したもう1つの利点は、ノイズに対するシグナル比（signal-to-noise ratios）が増大することである。ウェルにより、大容量の反応溶液をより高密度の配置で使用できるようになり、したがって、より大きなシグナルが可能になる。更に、ウェルにより、平坦表面アレイと比較してチップからの反応溶液の蒸発速度が低下し、したがって、より長い反応時間が可能になる。

【0076】

平坦表面と比較したウェルのもう1つの利点は、ウェルを使用すれば、チップ上の各ウェルについて固定かつ限定量のプローブを用いた関連研究が可能になるのに対し、平坦な表面を用いた場合には、通常、基材全体にわたりプローブが無差別に適用されてしまう点である。プローブ混合物中の1つのプローブが高い親和性を有するが特異性が低い場合、基材全体にわたってプローブ混合物が無差別に適用されることによって、タンパク質の多くがその高親和性のプローブで飽和されてしまうだろう。この飽和は、混合物中の他のタンパク質の検出を実質上制限する。ウェルを用いれば、チップ上の個々のウェルに限定量のプローブを適用できる。したがって、個々のタンパク質に適用されるプローブの量が制御でき、そのプローブは（異なるウェルに入っている）異なるタンパク質に対して個別のものとすることができる。

40

50

【0077】

上記のようにしてタンパク質チップが製造されたら、それを用いて、アッセイおよび他の化学反応を行うことができる。アッセイの場合、タンパク質またはプローブは通常、ウェルに配置するだろう。タンパク質またはプローブの存在または不在は、タンパク質チップにそれぞれプローブまたはタンパク質を適用することにより検出されるだろう。タンパク質-プローブ相互作用は、当技術分野で公知の種々の技法を用いて可視化でき、それらの技法の幾つかは下記で述べる。

【0078】

本発明において有用なタンパク質は、融合タンパク質（所定のドメインが種々の天然タンパク質の1つに結合されている）であってもよいし、または完全なままの状態の非融合タンパク質であってもよい。

10

【0079】

別の実施形態では、タンパク質含有細胞性物質（限定するものではないが、例えば小胞、エンドソーム、細胞内小器官（subcellular organelles）および膜断片）をタンパク質チップ（例えばウェル内）に配置することができる。別の実施形態では、細胞全体をタンパク質チップ（例えばウェル内）に配置する。さらなる実施形態では、タンパク質、タンパク質含有細胞性物質または細胞全体をタンパク質チップの固相支持体に付着させる。

【0080】

タンパク質は、タンパク質チップに配置する前に精製してもよいし、あるいは、該チップに配置している間に、特定のタンパク質に結合する試薬（予めタンパク質チップに配置されている）を用いて精製してもよい。部分精製されたタンパク質含有細胞性物質または細胞は、標準的な技法（例えば、アフィニティーまたはカラムクロマトグラフィー）または遠心分離サンプル（例えばP1またはP2画分）の単離により得ることができる。

20

【0081】

更に、タンパク質、タンパク質含有細胞性物質または細胞は、タンパク質チップに配置する前または配置する時点で、人工または天然の膜に埋設することができる。別の実施形態では、タンパク質、タンパク質含有細胞性物質または細胞は、タンパク質チップに配置する前または配置する時点で、細胞外マトリックス成分（例えばコラーゲンや基底板）に埋設することができる。本発明のタンパク質は、溶液の状態であってもよいし、固相支持体表面（例えばウェル内または平坦表面上）に結合されていてもよいし、あるいは固相支持体のウェルに配置されている基材（例えばビーズ）に結合させてもよい。

30

【0082】

タンパク質またはプローブのウェル内での配置は、バブルジェット式もしくはインクジェット式プリンターヘッドなどのいずれの供給手段を用いて行うことができる。マイクロピペットディスペンサーが好ましい。タンパク質またはプローブの配置は、手作業で行うか、またはその工程を機械に接続したコンピューターを用いて自動的に行うことができる。

【0083】

ウェルが内蔵されている（self-contained）ので、タンパク質またはプローブは固相支持体表面に付着または結合されている必要はなく、むしろタンパク質またはプローブは単にウェルに配置されているか、ウェル内に配置されている基材（例えばビーズ）に結合されていればよい。他の基材としては、限定するものではないが、ニトロセルロース粒子、ガラスビーズ、プラスチックビーズ、磁性粒子およびラテックス粒子が挙げられる。あるいはまた、タンパク質またはプローブは、ウェル内の固相支持体表面に共有結合または非共有結合により結合される。タンパク質またはプローブは、（ウェル内の）固相支持体表面に直接結合されてもよいし、またはリンカー分子もしくは化合物を介して固相支持体に付着されてもよい。リンカーは、タンパク質またはプローブの固相支持体表面への付着を容易にするように固相支持体表面を誘導体化するいずれの分子または化合物とすることもできる。リンカーは、タンパク質またはプローブを共有結合により固相支持体表面に結合させることができるか、あるいはリンカーは、非共有結合性の相互作用によ

40

50

り結合させることができる。更に、リンカーは、無機または有機分子とすることもできる。好ましいリンカーは、遊離アミンを有する化合物である。リンカーの中で最も好ましいものは、3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシラン (GP TS) である。

【0084】

ウェル表面に非共有結合により結合されているタンパク質またはプローブは、ウェル表面への付着を達成するために種々の分子相互作用を利用することができ、例えば、水素結合、ファンデルワールス結合、静電的、または金属キレート配位結合が挙げられる。更に、DNA-DNA、DNA-RNAおよび受容体-リガンドの相互作用が、非共有結合による結合を利用する相互作用のタイプである。受容体-リガンド相互作用の例としては、抗体と抗原、DNA結合タンパク質とDNA、酵素と基質、アビジン（またはストレプトアビジン）とビオチン（またはビオチン化分子）との間の相互作用、ならびに脂質結合タンパク質とリン脂質の膜もしくは小胞との相互作用が挙げられる。例えば、タンパク質は、ウェルの表面に付着されている基質に対して親和性を有する融合タンパク質ドメインと共に発現できる。融合タンパク質結合に対する好適な基質としては、トリプシン／アンヒドロトリプシン、グルタチオン、免疫グロブリンドメイン、マルトース、ニッケルまたはビオチンおよびその誘導体が挙げられ、それらはそれぞれウシ膵臓トリプシンインヒビター、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、抗原、マルトース結合タンパク質、ポリヒスチジン（例えばHis X6タグ）およびアビジン／ストレプトアビジンに結合する。

10

【0085】

D. タンパク質チップ上でのアッセイ

20

1つの実施形態において、タンパク質チップは、化学発光もしくは蛍光を生じる標準的な酵素アッセイを用いることによるアッセイに用いられる。種々のタンパク質および分子修飾の検出は、例えば光ルミネセンス、非タンパク質基質を用いる蛍光、酵素的発色、質量分析シグネチャーマーカー (signature marker) およびオリゴヌクレオチドタグの増幅（例えばPCRによるもの）を用いて行うことができる。したがって、タンパク質／プローブ相互作用は、特に、化学発光、蛍光、放射性標識または原子間力顕微鏡法 (atomic force microscopy) により検出できる。またアレイ中の特定の要素に結合するプローブは直接質量分析によっても同定できる。例えば、非分解的な方法（プローブをアレイの要素から解離させる）により溶液中に放出されるプローブは、質量分析によって同定できる（例えばWO 98/59361を参照）。別の例では、アレイ要素の酵素消化により溶液中に放出されるペプチドまたは他の化合物を質量分析により同定できる。

30

【0086】

アッセイの種類は幾つかの大まかなカテゴリーに分かれる。第1の例として、アレイ上の各ウェルは、その結合を検出および定量しようとする1つのプローブに暴露される。これらのアッセイの結果は、限定するものではないが以下の方法を含む方法により可視化される：1) 放射性標識したリガンド、続いてオートラジオグラフィーおよび／またはホスホイメージャー (phospho imager) による分析を用いること；2) ハプテンを結合させ、次いでそれを蛍光標識または酵素標識した抗体または高親和性ハプテンリガンド（例えばビオチンまたはストレプトアビジン）により検出すること；3) 質量分析；4) 原子間力顕微鏡法；5) 蛍光偏光法；6) ローリングサークル型増幅検出方法 (Hatchら, 1999, 「固相表面に固定されたDNAのローリングサークル型増幅および多重突然変異検出へのその適用 (Rolling circle amplification of DNA immobilized on solid surfaces and its application to multiplex mutation detection)」, Genet. Anal. 15 (2) : 35-40)；7) 競合的PCR (Finira, 1999, 「マイクロプレートルミノメーターを用いるパルボウイルスB19 DNAの検出および定量のための化学発光競合PCRの開発 (Development of a chemiluminescence competitive PCR for the detection and quantification of

40

50

parvovirus B19 DNA using a microplate luminometer)」、Clin Chem. 45 (9):1391-6; Kruseら, 1999, 「半ネステッド競合PCRアッセイを用いるトランスフォーミング増殖因子-β1 (TGF-β1) 遺伝子発現の検出および定量的測定 (Detection and quantitative measurement of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) gene expression using a semi-nested competitive PCR assay)」、Cytokine 11 (2):179-85; GuenthererおよびHart, 1998, 「マイクロプレートに基づく検出系を用いるHIV-1についての定量的で競合的なPCRアッセイ (Quantitative, competitive PCR assay for HIV-1 using a microplate-based detection system)」、Biotechniques 24 (5):810-6; 8) 比色法; および9) 生物学的アッセイ (例えばウイルス力価についてのもの)。

【0087】

第2の例として、アレイ上の各ウェルは、その結合を検出および定量しようとする複数種のプローブに同時に暴露される (幾つかの供給源からプローブをプールすることを含む)。これらのアッセイの結果は、限定するものではないが以下の方法を含む方法により可視化される: 1) 質量分析; 2) 原子間力顕微鏡法; 3) 赤外もしくは蛍光標識した化合物またはタンパク質; 4) 増幅可能なオリゴヌクレオチド、ペプチドまたは分子の質量標識; ならびに5) タンパク質酵素活性の刺激もしくは阻害。本発明のアレイには位置のアドレス可能な性質があるために、情報はプローブの混合物から収集される。すなわち、規定のタンパク質をタンパク質チップ上の既知の位置に配置することにより、結合したプローブが結合する相手についての情報が判る。そのように望まれる場合、次に、結合を示すアレイ上の位置を個々のプローブでプロービングして、目的の特定の相互作用を同定することができる。

【0088】

有用な情報はまた、例えば、タンパク質チップを細胞抽出物と共にインキュベートすることによっても得ることができ、その場合、チップ上の各ウェルは、目的の酵素活性をアッセイするための反応混合物を含み、複数の異なる酵素活性および/または基質活性がアッセイされて、それによって、特定の酵素活性の細胞性レパートリーが同定および測定される。同様に、タンパク質チップは、細胞全体または形質膜の調製物と共にインキュベートして、例えば膜関連タンパク質もしくは分子の発現または細胞表面タンパク質もしくは分子の結合特性についてアッセイすることができる。タンパク質チップ上の特定の位置に結合する細胞、細胞上のマーカーまたは細胞によって分泌される物質は、当技術分野で公知の技法を用いて検出できる。例えば、抗原のアレイを含むタンパク質チップは、B細胞またはT細胞を用いてスクリーニングでき、その場合、その抗原は、合成抗原、組織特異的抗原、疾患特異的抗原、病原体の抗原、および自己組織の抗原からなる群から選ばれる。リンパ球により認識される抗原または抗原決定基は、アレイ上のどの位置で抗原による細胞の活性化が起こるのかを確定することにより決定できる。リンパ球の活性化は、種々の手段によりアッセイでき、例えば、限定するものではないが、抗体の合成を検出すること、³H-チミジンの取込みを検出もしくは測定すること、標識した抗体で細胞表面分子をプロービングして抗原認識および活性化により誘導または抑制される分子 (例えばIgD、CD3b受容体、IL-2受容体、トランスフェリン受容体、膜クラスII MHC分子、CD23、CD38、PCA-1分子、HLA-DR) を同定すること、および発現および/または分泌されるサイトカインを同定することが挙げられる。

【0089】

別の例において、特定の細胞型についてのマイトジェンは、細胞を、推定のマイトジェンのアレイを含むタンパク質チップと共にインキュベートすることにより測定でき、位置アドレス可能なアレイを細胞集団と接触させ (但し、そのアレイは、タンパク質、該タンパ

ク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、各々の異なる物質は固相支持体上の異なる位置に存在し、異なる物質の密度は 1 cm^2 当たり少なくとも100種の異なる物質である) ;そして細胞においてミトジェン活性が誘導される固相支持体上での位置を検出するステップを含む。細胞分裂は、例えば細胞による³Hーチミジンの取込みを検出もしくは測定することによりアッセイできる。細胞は同じ細胞型(すなわち、均質な集団)のものであってもよいし、または異なる細胞型のものであってもよい。

【0090】

更に別の例において、タンパク質チップ上でのタンパク質の細胞取込みおよび/またはタンパク質のプロセッシングは、例えば、放射性標識したタンパク質基質を用い、放射性基質濃度の低下または細胞による放射性基質の取込みを測定することによりアッセイできる。これらのアッセイは、診断目的または治療目的で利用できる。当業者であれば、種々のタイプの細胞相互作用を検出するための多くの適切なアッセイを理解できる。

10

【0091】

したがって、幾つかのクラスのプローブ(例えば、既知のプローブの混合物、細胞抽出物、細胞内小器官、細胞膜調製物、細胞全体など)を用いることにより、細胞活性の大規模または網羅的な分析が提供できる。特に、1種または数種のスクリーンが、細胞型または細胞、組織、器官もしくは系の生理学的状態の「フットプリント」の同定の基礎をなし得る。例えば、(形態学上または機能上)異なる細胞型は、タンパク質チップにより測定される細胞活性または発現のパターンにより区別できる。またこのアプローチは、例えば細胞周期の異なる段階、疾患状態、生理学的状態の変化(例えば低酸素症)、治療(例えば薬物治療)の前もしくは後での生理学的状態、代謝状態、分化もしくは発生の段階、環境的刺激(例えば光、熱)に対する応答、細胞-細胞相互作用、細胞特異的遺伝子および/もしくはタンパク質の発現、ならびに疾患特異的遺伝子および/もしくはタンパク質の発現を測定するのに使用できる。

20

【0092】

酵素反応を行い、本発明のタンパク質チップを用いて酵素活性を測定することができる。1つの特定の実施形態では、チップ上のタンパク質(1つまたは複数)の酵素活性をモジュレートする化合物を同定できる。例えば、酵素活性レベルの変化が、タンパク質チップのウェル内での化合物もしくは化合物の混合物と酵素反応混合物とのインキュベーションにより検出および定量され、この場合、(例えば酵素活性により蛍光性になる基質から)シグナルが生じる。化合物の存在と不在との差異に注目する。更に、異なるタンパク質の酵素活性に対する化合物の効果の違いは、タンパク質チップ内およびチップ間で、サンプルに対するそれらの相対的效果を比較することによって容易に検出される。

30

【0093】

上記で詳述した本発明の高密度タンパク質チップを用いる種々のストラテジーを用いて、タンパク質の種々の物理的および機能的特性を決定することができる。例えば、上記のタンパク質チップは、抗体でプロービングすることにより存在するタンパク質の存在および量を評価するのに使用できる。1つの実施形態において、GST融合タンパク質のポリジメチルシロキサン(PDMS)チップをプロービングして、タンパク質の存在および/またはその活性レベルを測定することができる。タンパク質は、発光法、化学発光法、蛍光法または化学蛍光法などの標準的な検出アッセイを用いて検出できる。例えば、目的のタンパク質に対する一次抗体は、蛍光標識した二次抗体により認識され、次にそれを、蛍光産物を光源で励起させてその後の蛍光を検出する機器(例えばMolecular Dynamics スキャナー)で測定する。より高い感度のためには、目的のタンパク質に対する一次抗体は、アルカリホスファターゼや西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素にコンジュゲートしている二次抗体により認識される。発光基質(化学発光法の場合)または蛍光発生性(fluorogenic)基質(化学蛍光法の場合)の存在下で、酵素で開裂させると、例えばMolecular Dynamics スキャナーを用いて検出および定量できる高度に発光性または蛍光性の産物が生じる。あるいはまた、蛍光標識した二

40

50

次抗体のシグナルを、アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートしている三次抗体を用いて増幅させることができる。

【0094】

また、プロテインキナーゼ、ホスファターゼ、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、アセチラーゼまたは他の官能基転移酵素の基質の同定も、本発明のタンパク質チップで行うことができる。例えば、非常に様々な異なるプローブをタンパク質チップに付着させて、特定の酵素に対する基質として作用するそれらの能力についてアッセイする（例えばプロテインキナーゼによりリン酸化されるそれらの能力についてアッセイする）。キナーゼ活性の検出方法としては、限定するものではないが、放射性標識（例えば $^3\text{ }^3\text{ P}-\text{A T P}$ および $^3\text{ }^5\text{ S}-\gamma-\text{A T P}$ ）またはホスホアミノ酸に結合する蛍光抗体プローブの使用が挙げられる。例えば、1つのアッセイでは放射性標識したリンがタンパク質に取り込まれると、キナーゼ活性があることが示され、一方、別のアッセイでは、放射性標識したリンの媒体への放出が測定でき、それによってホスファターゼ活性が示される。別の例では、プロテアーゼ活性が、標準的なアッセイ（例えば質量分析、ペプチド断片に対する放射性標識した抗体、または蛍光タグ付けした基質からの蛍光シグナルの喪失）を用いて、プロテアーゼ活性により生じ媒体へ放出されるペプチド断片を同定することにより検出できる。こうして、官能基転移酵素の活性は、幾つかのアプローチおよび多くの独立した検出手段を用いて容易にアッセイでき、それらは当業者には理解されるだろう。

【0095】

タンパク質チップは、該チップ上で特定の活性（例えば特定のキナーゼ活性、プロテアーゼ活性、核酸結合特性、ヌクレオチド加水分解、ホルモン結合性およびDNA結合性）を有するタンパク質を同定するのに使用できる。したがって、チップは、所望の活性の存在を示すプローブでプロービングできる。例えば、DNA結合性が目的の活性である場合、候補のDNA結合タンパク質を含むチップをDNAでプロービングする。

【0096】

タンパク質のアレイのタンパク質リガンドもしくは核酸リガンドである（天然または合成の）プローブの探索は、タンパク質チップ上で並行して行うことができる。プローブは、細胞、タンパク質含有細胞性物質、タンパク質、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、小分子基質、薬剤候補、受容体、抗原、ステロイド、リン脂質、抗体、免疫グロブリンドメイン、グルタチオン、マルトース、ニッケル、ジヒドロトリプシンまたはビオチンであってよい。あるいは、プローブは、酵素の基質またはインヒビターであってよい。例えば、プローブは、キナーゼ、ホスファターゼ、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、アセチラーゼおよび他の官能基転移酵素からなる群から選ばれる酵素の基質またはインヒビターであってよい。チップ上のタンパク質を核酸またはタンパク質のプローブと組み合わせてインキュベートした後、結合した核酸またはタンパク質のプローブを、質量分析により同定すればよい（Lakeyら、1998、"Measuring protein-protein interactions（タンパク質-タンパク質相互作用の測定）", Curr Opin Struct Biol. 8:119-23）。

【0097】

病原体（例えばウイルス、細菌、真菌又は寄生虫などの感染性疾患原因）に由来する標的タンパク質の正体、または回復期にある患者もしくは回復期にない患者の免疫応答における抗原として作用する異常細胞（例えば新生物細胞、罹患細胞もしくは損傷細胞）に由来する標的タンパク質の特性を、本発明のタンパク質チップを用いて判定することができる。例えば、患者から単離されたリンパ球は、タンパク質チップ上に病原体のタンパク質のアレイを含むタンパク質チップをスクリーニングするのに使用できる。通常、これらのスクリーニングは、位置アドレス可能なアレイを複数種のリンパ球と接触させ（但し、そのアレイは、固相支持体上に複数種の可能性のある抗原を含んでおり、かつ、各々の異なる抗原は固相支持体上の異なる位置に存在し、異なる抗原の密度は、 1 cm^2 当たり少なくとも100種の異なる抗原である）、リンパ球の活性化が生じている固相支持体上での位

10

20

30

40

50

置を検出することを含む。1つの特定の実施形態では、リンパ球をアレイ上の病原体のタンパク質と接触させ、その後、抗原もしくは抗原の混合物によるB細胞もしくはT細胞の活性化をアッセイして、病原体から誘導された標的抗原を同定する。

【0098】

あるいはまた、タンパク質チップは、例えば可能性のある抗原のアレイをスクリーニングして患者のB細胞および／またはT細胞の標的を同定することにより、免疫応答の特性決定するのに使用できる。例えば、B細胞を可能性のある抗原（例えば抗原決定基を有する分子）のアレイと共にインキュベートして、体液による免疫の抗原標的を同定することができる。抗原の供給源は、例えば、自己組織、（例えば病原性微生物の）既知もしくは未知の抗原のコレクション、組織特異的もしくは疾患特異的な抗原のコレクション、または合成の抗原因由来であってよい。

10

【0099】

別の実施形態において、患者から単離したリンパ球を用いて、患者自身の組織から誘導したタンパク質のアレイを含むタンパク質チップをスクリーニングすることができる。そのようなスクリーニングは、自己免疫の基質またはアレルギーの原因となるタンパク質を同定し、それによって自己免疫またはアレルギー反応を診断し、かつ／または可能性のある標的薬剤の候補を同定することができる。

【0100】

別の実施形態において、本発明のタンパク質チップは、B細胞またはT細胞を活性化できる物質を同定するのに使用できる。例えば、リンパ球をチップ上の試験分子もしくは試験タンパク質のアレイと接触させ、リンパ球の活性をアッセイして、B細胞もしくはT細胞またはリンパ球亜群（例えば細胞障害性T細胞）を総合的に活性化できる物質を同定する。

20

【0101】

抗原認識によるB細胞の活性化の誘導は、種々の手段によりアッセイできる。アッセイとしては、限定するものではないが、抗体の合成、³H-チミジンの取込み、標識した抗体の新たに発現もしくは抑制された細胞表面分子への結合、およびB細胞活性化の指標となる因子（例えばサイトカイン）の分泌の検出または測定が挙げられる。同様に、本発明のタンパク質チップを用いるスクリーニングにおけるT細胞の活性化は、種々のアッセイにより調べることができる。例えば、クロム（⁵¹Cr）放出アッセイは、抗原の認識およびその後の細胞障害性T細胞の活性化を検出できる（例えば、Palladinoら、1987, Cancer Res. 47: 5074-9; Blacherら、1993, J. Immunotherapy 14: 352-6を参照）。

30

【0102】

抗体調製物の特異性は、本発明のタンパク質チップを使用して調べることができ、該使用は、位置アドレス可能なアレイを抗体調製物と接触させ（但し、そのアレイは可能性のある複数種の抗原を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なる抗原は固相支持体上の異なる位置に存在し、異なる抗原の密度は1cm²当たり少なくとも100種の異なる抗原である）、抗体調製物中の抗体による結合が起こる固相支持体上での位置を検出することを含む。抗体調製物は、限定するものではないが、Fabフラグメント、抗血清、およびポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体もしくは合成抗体であってよい。例えば、抗血清は、疾患特異的な抗原のコレクション、組織特異的な抗原のコレクションまたは他の同定済みの抗原のコレクションをスクリーニングし、どの抗原が認識されるかを判定することにより特性決定できる。1つの特定の実施形態において、類似または関連する抗原を含むタンパク質チップアレイは、モノクローナル抗体を用いてスクリーニングし、該アレイ上のどの抗原にモノクローナル抗体が結合するかを判定することにより特異性の程度を評価する。

40

【0103】

特定の細胞活性の標的の正体（identity）は、タンパク質チップを複合的なタンパク質混合物（例えば細胞抽出物）で処理し、タンパク質の活性を測定することによりアッ

50

セイできる。例えば、異なるキナーゼのアレイを含むタンパク質チップは、化合物（例えば薬剤）で処理した細胞からの細胞抽出物と接触させ、キナーゼ活性についてアッセイすることができる。別の例では、異なるキナーゼのアレイを含むタンパク質チップは、特定の細胞分化段階（例えば多能性期）にある細胞または特定の代謝段階（例えば有糸分裂期）にある細胞からの細胞抽出物と接触させ、キナーゼ活性についてアッセイできる。そうしたアッセイから得られた結果（例えば薬剤の存在下もしくは不在下にある細胞同士、または幾つかの分化段階にある細胞同士、または異なる代謝段階にある細胞同士を比較しての結果）から、異なる条件間での細胞における生理学的変化に関する情報を得ることができる。

【0104】

あるいはまた、特定の細胞活性の標的の正体は、多数の異なるタンパク質（例えばペプチドライブラリー）を含んでいる本発明のタンパク質チップを複合的タンパク質混合物（例えば細胞抽出物）で処理し、チップ上のタンパク質の改質についてアッセイすることによりアッセイできる。例えば、異なるタンパク質のアレイを含むタンパク質チップは、化合物（例えば薬剤）で処理した細胞からの細胞抽出物と接触させ、例えばキナーゼ、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、アセチラーゼ、ホスファターゼまたは他の転移酵素の活性についてアッセイできる。別の例では、異なるタンパク質のアレイを含むタンパク質チップは、特定の細胞分化段階（例えば多能性期）にある細胞または特定の代謝段階（例えば有糸分裂期）にある細胞からの細胞抽出物と接触させることができる。そうしたアッセイから得られた結果（例えば薬剤の存在下または不在下での細胞同士、幾つかの分化段階にある細胞同士、または異なる代謝段階にある細胞同士を比較した結果）から、これらの条件下で細胞に及ぼす生理学的作用に関する情報を得ることができる。

【0105】

上記タンパク質チップは、生物学的な目的の特定の分子（限定するものではないが、可能性のあるリガンド分子の受容体、ウイルス受容体、およびオーファン受容体のリガンドが挙げられる）に結合するプローブを同定するのに有用である。

【0106】

上記タンパク質チップはまた、タンパク質チップ上のタンパク質へのDNA結合またはRNA結合の検出、および結合特異性の判定にも有用である。更に、RNA結合タンパク質またはDNA結合タンパク質の特定のクラス（例えば亜鉛フィンガータンパク質）が、上記タンパク質チップを用い、これらのタンパク質のアレイを核酸配列を用いてスクリーニングして結合特異性および結合強度を測定することにより調べることができる。

【0107】

同様の生物学的現象の機能、リガンド結合性または酵素活性が異なっているタンパク質の正体は、本発明のタンパク質チップを用いて分析できる。例えば、異なる対立遺伝子に由来するタンパク質アイソフォームの違いは、それらの活性について相互にアッセイされる。

【0108】

上記の高密度タンパク質チップは、薬剤の発見、薬剤の作用様式の分析、薬剤の特異性、および薬剤毒性の予測に使用できる。例えば、薬剤に結合するタンパク質の正体およびそれらの相対的親和性は、異なるアッセイ条件下でチップ上のタンパク質を薬剤または薬剤候補と共にインキュベートし、アレイ上のどこで薬剤が結合されているのかを調べ、各々の異なるタンパク質により結合されている薬剤の量を測定することによって薬剤特異性を判定することによりアッセイできる。あるいはまた、結合アッセイではなく生物学的活性をアッセイするバイオアッセイを、それと同じチップ上で、あるいは同一の第2のチップ上で行うことができる。したがって、本発明のタンパク質チップを用いるこれらのタイプのアッセイは、薬剤特異性の研究、薬剤の可能性のある副作用の予測、および薬剤の分類に有用である。更に、本発明のタンパク質チップは、薬剤候補の複合的ライブラリーのスクリーニングに適する。具体的には、チップ上のタンパク質を薬剤候補のライブラリーと共にインキュベートし、次に、結合している成分を（例えば質量分析により）同定して、

10

20

30

40

50

タンパク質の特定のサブセットに優先的に結合する、またはチップ上の幾つかのタンパク質又は全てのタンパク質に結合する全てのライブラリー成分の同時同定が可能になる。更に、アレイ上の異なるタンパク質に対する薬剤候補の相対親和性が測定できる。

【0109】

更に、本発明のタンパク質チップは、前もって確認されている相互作用、酵素活性または生物学的応答の可能性のあるインヒビター、触媒、モジュレーターまたはエンハンサーの存在下でプロービングできる。このようにして、例えば、薬剤の結合の遮断、またはウイルスもしくは生理学的作用物質の特定のカテゴリーのタンパク質への破壊が、本発明のタンパク質チップを用いて分析できる。

【0110】

本発明のタンパク質チップは、複合的タンパク質混合物（例えば細胞全体、細胞抽出物、または組織ホモジネート）による複数の標的の改質に及ぼす薬剤の作用を調べるのに使用できる。薬剤の基本的な作用は、1つ以上のタンパク質チップを薬剤処理した細胞、組織または抽出物でスクリーニングすることにより分析でき、それにより、次にその薬剤処理した状態についての「シグネチャー（signature）」を得ることができ、未処理状態の「シグネチャー」と比較した場合、例えば効力、毒性および副作用についての予測値とすることができる。更に、薬剤の時間依存的な作用は、例えばその薬剤を細胞、細胞抽出物、組織ホモジネートまたは生物全体に添加し、薬剤処理した細胞または抽出物を種々の処理時点にてタンパク質チップに適用することによりアッセイできる。

【0111】

ファージディスプレイライブラリーのスクリーニングは、ライブラリーを本発明のタンパク質チップと共にインキュベートすることにより実施できる。陽性クローンの結合は、当業界で公知の種々の方法（例えば質量分析）により測定でき、それによって、目的のクローンを同定した後で、その目的のクローンをコードするDNAを標準的方法により同定することができる（例えば、Amesら、1995、J. Immunol. Methods 184:177-86; Kettleboroughら、1994、Eur. J. Immunol. 24:952-8; Persicら、1997、Gene 187:9-18を参照）。このようにして、上記チップは、チップ上の特定のタンパク質に結合する表面成分を有する細胞の選択に有用である。あるいはまた、ファージディスプレイライブラリーをチップに結合させて、該ライブラリーの位置アドレス可能なアレイが作製されるようにしてもよく、その後で、そのアレイはプローブの各種混合物で繰り返しスクリーニングすることができる。

【0112】

本発明はまた、本発明のアッセイレジュメを実施するためのキットを提供する。1つの特定の実施形態において、本発明のキットは、1つ以上の本発明のアレイを含む。そのようなキットは更に、1つ以上の容器内に、タンパク質もしくは分子の生物学的活性のアッセイに有用な試薬、プローブとタンパク質もしくは分子との相互作用のアッセイに有用な試薬、目的の生物学的活性を有するタンパク質もしくは分子の生物学的活性のアッセイに有用な試薬、および／または1種以上のプローブ、タンパク質もしくは他の分子を含んでなる。タンパク質もしくは分子の生物学的活性のアッセイまたはプローブとタンパク質もしくは分子との相互作用のアッセイに有用な試薬は、タンパク質チップ上の各ウェルまたは指定のウェルに含まれ得る。そのような試薬は、溶液または固体の状態であってよい。試薬としては、タンパク質もしくは分子と目的のアッセイを実施するのに必要なプローブのいずれか一方を含んでいてもよく、また両者が含まれていてもよい。

【0113】

1つの実施形態において、キットは、1以上のタンパク質チップ（すなわち、タンパク質、該タンパク質の機能性ドメインを含む分子、細胞全体およびタンパク質含有細胞性物質からなる群から選ばれる複数種の異なる物質を固相支持体上に含んでなり、かつ、各々の異なる物質が固相支持体上の異なる位置に存在する位置アドレス可能なアレイであって、複数種の異なる物質が1 cm² 当たり少なくとも100種の異なる物質から構成されてい

10

20

30

40

50

る)と、1つ以上の容器内に、1種以上のプローブ、試薬または他の分子を含んでいる。アレイの物質は、固相支持体上のウェルの表面に結合させることができる。別の実施形態において、キット中のタンパク質チップは、既に固相支持体のウェルに結合させてあるタンパク質又はプローブを有することができる。更に別の実施形態では、キット中のタンパク質チップは、タンパク質もしくは分子の生物学的活性のアッセイ、またはプローブとタンパク質もしくは分子(既に固相支持体のウェルに結合させてある)との相互作用のアッセイに有用な試薬もしくは反応混合物を含むことができる。更に別の実施形態において、試薬は、固相支持体のウェルに結合されているのではなく、ウェル内に収容することができる。更に別の実施形態において、試薬は固相支持体のウェルに結合されているのではなく、1つ以上の容器内に収容することができ、固相支持体のウェルに添加することができる。更に別の実施形態において、上記キットは更に、タンパク質もしくは分子の生物学的活性をアッセイするための溶液状の反応混合物を入れている1つ以上の容器を含む。さらに別の実施形態において、上記キットは、プローブ、目的のタンパク質もしくは分子、および/または1つ以上のアッセイを実施するのに有用な他の試薬が結合できる基材(例えばビーズ)を提供し、その後で、プローブ、タンパク質または他の試薬が結合しているその基材をチップのウェルに入れることができる。

10

20

40

50

【0114】

別の実施形態において、上記キット中の1つ以上のタンパク質チップは、目的の生物学的活性を有するタンパク質を、該固相支持体のウェルに結合されている状態で含む。別の実施形態において、上記キット中の1つ以上のタンパク質チップは、生物のゲノム中の同タイプの生物学的活性を有する全ての発現タンパク質の少なくとも50%、75%、90%または95%を、固相支持体のウェルに結合されている状態で含む。1つの特定の実施形態において、上記キット中の1つ以上のタンパク質チップは、生物のゲノム中の全ての発現されたキナーゼ、ホスファターゼ、グリコシダーゼ、プロテアーゼ、アセチラーゼ、他の官能基転移酵素、核酸結合タンパク質、ホルモン結合タンパク質またはDNA結合タンパク質の少なくとも50%、75%、90%または95%を、固相支持体のウェルに結合されている状態で含む。

【0115】

E. タンパク質チップと共に有用なタンパク質

全長タンパク質、全長タンパク質の部分、およびペプチド(生物における組換え体の過剰発現から調製されたものでも、長めのタンパク質の断片化により作製されたものでも、化学的に合成されたものでもよい)を本発明において使用して、タンパク質チップを作製する。タンパク質が過剰発現される生物としては、限定するものではないが、細菌、酵母、昆虫、ヒトおよびヒト以外の哺乳動物(例えばマウス、ラット、ネコ、イヌ、ブタ、ウシおよびウマ)が挙げられる。更に、種々の天然または合成のタンパク質の1つに所定のドメインが結合している融合タンパク質が利用できる。本発明において用いられるタンパク質は、タンパク質チップのウェルに結合または固着させる前に精製してもよいし、あるいは、タンパク質チップのウェルに予め結合または固着させてある試薬の使用により結合させている間に精製してもよい。これらの試薬としては、通常タンパク質に特異的に結合するもの、またはタンパク質の特定の基に結合するものが挙げられる。タンパク質は、タンパク質チップへ結合させる前または結合させる時点に、人工または天然の膜(例えばリポソーム、膜小包)に包埋することができる。あるいはまた、タンパク質は、タンパク質チップのウェルに送達されてもよい。

【0116】

本発明のタンパク質チップに用いられるタンパク質は、好ましくは、当業界で公知の方法により発現される。Invitrogen社(Carlsbad, CA, カタログNo. K800-01)のInsect Select系は、高品質のタンパク質の発現を簡素化し、ウイルスストックを作製し増幅しなくても済む、非溶解性の単一ベクター昆虫発現系であり、これが好ましい発現ベクターである。この系における好ましいベクターは、pIB/V5-His TOPOT Aベクター(カタログNo. K890-20)であ

る。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の産物を、製造元により記載されているプロトコルを用いて、このベクターに直接クローニングすることができ、次に、そのタンパク質を、N末端ヒスチジン（His）標識（発現されたタンパク質を精製するのに使用できる）を用いて発現させる。

【0117】

BAC-TO-BAC（商標）系は、Life Tech（Rockville, MD）から入手可能な昆虫細胞におけるもう1つの真核性発現系であり、これも好ましい発現系である。相同組換えを用いる場合とは違って、BAC-TO-BAC（商標）系は、大腸菌における部位指定転位に基づいて組換えバキュロウイルスを生じる。遺伝子発現は、非常に活性なポリヘドリンプロモーターにより駆動され、したがって、感染させた昆虫細胞における細胞性タンパク質の25%以下となり得る。

10

【0118】

VI. 実施例 I：タンパク質チップを用いた酵母プロテインキナーゼの分析

A. 緒言

以下の実施例により、本発明のタンパク質チップの製造およびタンパク質チップの使用方法の様々な態様を例示する。本発明のタンパク質チップ技術は、多数のサンプルの迅速な分析に適し、したがって、このアプローチをほぼ全ての酵母プロテインキナーゼの分析に適用した。プロテインキナーゼは、タンパク質のリン酸化を触媒し、細胞周期の調節、シグナル伝達、DNA複製、遺伝子転写、タンパク質翻訳およびエネルギー代謝などの基本的な細胞機能の調節において重要な役割を担っている⁷。完全なゲノム配列が入手できれば、生物によってコードされる全てのプロテインキナーゼを分析し、それらの*in vitro*基質を決定することが可能になる。

20

【0119】

酵母のゲノムは配列決定されており、長さが100コドンを超える約6200のオープンリーディングフレームを含む。これらのうちの122がプロテインキナーゼをコードすると推定される。これらのプロテインキナーゼ遺伝子のうち24種はこれまで研究されていなかった⁸。2種のヒスチジンプロテインキナーゼを除いて、全ての酵母プロテインキナーゼがSer/Thrファミリーのメンバーである。チロシンキナーゼファミリーのメンバーは存在しないが、セリン/トレオニンおよびチロシンをリン酸化する7種のプロテインキナーゼが報告されている⁸。

30

【0120】

本発明のタンパク質チップ技術の開発により、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）に由来するほぼ全てのプロテインキナーゼの生化学的活性のハイスループット分析を、本明細書に記載されているようにして行なった。用いたタンパク質チップは、顕微鏡用スライドガラスの上面に置いたシリコンエラストマーシートの300nl容ウェルの使い捨てアレイとした。このウェルは高密度で小サイズであるために、多くの個々のサンプルのハイスループットのバッチ処理および同時分析が可能になり、ほんの少量のタンパク質しか必要としない。本発明のタンパク質チップを用いて、サッカロミセス・セレビシエのキナーゼタンパク質（全部で119種の異なるキナーゼ）をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）に融合させ、酵母内で過剰発現させ、精製し、17種の異なる基質をリン酸化する能力についてアッセイした。これまでに特性決定されていなかった24種のキナーゼのうちの18種を含む被験キナーゼのほぼ全部（93%）が、1種以上の基質について、対照よりも少なくとも5倍高い活性を示した。32種のキナーゼが1種以上の基質の選択的リン酸化を示した。27種のキナーゼは、ポリ（Ty-Glu）を容易にリン酸化した。これまでは、これらのキナーゼのうち5種だけが二重機能性キナーゼ（すなわち、Ser/ThrとTyの双方をリン酸化する）として分類されていたので、これらの発見から、チロシン残基をリン酸化できるキナーゼについての知見を大きく広げた。興味深いことに、これらの二重特異性のキナーゼは、触媒領域の近傍に存在する共通するアミノ酸残基を有することが多い。これらの結果から、本発明のタンパク質チップ技術は、タンパク質の生化学的活性のハイスループ

40

50

ットスクリーニング、ならびにプロテオーム全体の分析に有用であることが示される。

【0121】

B. 方法

1. 細胞培養、構築物およびタンパク質精製

Hudsonら⁹の組換え法を用いて、122種の酵母プロテインキナーゼ遺伝子のうち119種を高コピーURA3発現ベクター（pEG(KG)）（ガラクトース誘導型GALL10プロモーター¹⁰の制御下でGST融合タンパク質を産生する）にクローニングした。簡単に説明すると、各ORFの末端に相補的なプライマーをResearch Geneticsから購入した。これらのプライマーの末端は、共通する20bpの配列を含んでいる。第2ラウンドのPCRにおいて、これらの産物の末端を、上記ベクターに相同な配列を付加することにより修飾した。末端にそのベクター配列を含むPCR産物を該ベクターと共にpep4酵母株（幾つかの酵母プロテアーゼを欠く）¹⁰に形質転換し、Ura⁺コロニーを選択した。プラスミドを大腸菌にレスキューし、制限酵素消化によって確認し、該ベクターに相補的なプライマーを用いてベクター挿入物の連結点まで及ぶDNA配列を決定した。GST::Cla4構築物では、アミノ末端コード領域のポリ(A)ストレッチにフレームシフト突然変異が見られた。3つの独立したクローンは、リーディングフレームを維持している正しいものを見つける必要があった。これらの遺伝子のうち5つでは、2種の重複PCR産物が得られ、酵母細胞に導入した。キナーゼタンパク質の精製のために、確認したプラスミドをpep4酵母株に再導入した。

10

20

【0122】

96ウェルフォーマットを用いてサンプルを調製するために、0.75mlの細胞をラフィノースを含有する培地中でO.D.（600）が約0.5になるまで、2ml容ウェルを含むボックス内で増殖させた。各株について2ウェルずつ用いた。ガラクトースを最終濃度4%まで添加して、タンパク質発現を誘導し、細胞を4時間インキュベートした。同じ株の培養物を合わせて1つにし、500μlの溶解緩衝液で1回洗浄し、200μlの溶解緩衝液に再懸濁し、100μlの冷却ガラスビーズを含む96×0.5mlのプレート（Dot Scientific, USA）に移した。細胞を、4℃でボルテックス処理を繰り返すことにより該ボックス内で溶解させ、これらの株から、96ウェルフォーマットでグルタチオンビーズおよび標準的プロトコル²⁰を用いてGST融合タンパク質を精製した。5種の精製されたGST::キナーゼタンパク質（Swe1、Ptk2、Pkh1、Hog1、Pbs2）の純度は、それら精製タンパク質のクーマシー染色パターンを、抗GST抗体を用いたイムノブロット分析により得られたパターンと比較することにより求めた。結果から、精製されたタンパク質が90%を上回る純度であることが示された。Hog1の活性型を精製するために、上記の誘導の最後の5分間に細胞を0.4M NaClでチャレンジした。プロテインキナーゼの活性は、-70℃で少なくとも2ヶ月は安定であり、キナーゼ活性の喪失はほとんど、あるいは全くなかった。

30

【0123】

2. チップの製造およびタンパク質の結合

チップを、シリコンエラストマー、ポリジメチルシロキサン（PDMS）（Dow Chemical, USA）から製造したが、それらは微細加工鋳型に対して成型された。液状のPDMSを該鋳型に注ぎ、硬化させた後（65℃で少なくとも4時間）、再使用可能な鋳型から可撓性のシリコンエラストマーのアレイシートを剥がした。PDMSはマイクロリソグラフィにより作製された構造体に対して容易に成型されうるが、本明細書に記載されているキナーゼアッセイのためには、アクリル系のシートから作製した、コンピューター制御レーザーミリング装置（Universal Laser Systems, USA）でパターンニングした鋳型で十分だった。

40

【0124】

30種を超える各種アレイを試験した。試験した変数は、ウェルの幅と深さ（幅は100μm～2.5mm、深さは100μm～1mm）、ウェル間の間隔（100μm～1mm）、構成（矩形のアレイ、または最も密に詰め込まれているもの）、およびウェルの形状

50

(四角形 v s 丸形) とした。レーザーでミリングしたアクリル系鋳型を使用することにより、様々なパラメーターの多数のひな型を実現するための迅速で安価な方法が得られた。

【0125】

ウェルへのタンパク質の結合を最大にする条件を決定するために、PDMSを、5 M H_2SO_4 、10 M NaOH、過酸化水素または3-グリシドオキシプロピルメトキシシランリンカー (GPTS) (Aldrich, USA) のいずれかで処理した^{11, 12}。GPTS処理により、未処理のPDMSまたは別のやり方で処理されたPDMSと比較して、ウェルへのタンパク質の吸着が最大になった。簡単に述べると、100% EtOHで室温にて3回洗浄した後、チップを1% GPTS溶液 (95% EtOH、16 mM HOAc) に室温で1時間、振盪しながら浸漬した。95% EtOHで3回洗浄した後、チップを減圧下で135℃で2時間硬化させた。硬化させたチップは乾燥アルゴン中で数ヶ月間は保存できる¹²。タンパク質をチップに結合させるために、タンパク質溶液をウェルに添加し、氷上で1~2時間インキュベートした。冷HEPES緩衝液 (10 mM HEPES、100 mM NaCl, pH 7.0) で3回濯いだ後、ウェルをBSAの1% PBS溶液 (Sigma, USA) で氷上で1時間より長くブロッキングした。GPTSを使用したので、第1級アミン基を含む試薬は避けた。

【0126】

処理したPDMSに結合できるタンパク質の濃度を決定するために、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 抗マウスIg (Amersham, USA) を酵素の連続希釈液を用いてチップに結合させた。PBSで十分に洗浄した後、結合した抗体を、増強化学発光 (ECL) 検出法 (Amersham, USA) を用いて検出した。最大 $8 \times 10^{-9} \mu g / \mu m^2$ のタンパク質が表面に結合でき、本発明者らの免疫染色法による検出には、最低でも $8 \times 10^{-13} \mu g / \mu m^2$ が必要である。

【0127】

3. イムノブロットイング、キナーゼアッセイおよびデータの獲得

イムノブロット分析は記載³⁴ されているようにして実施した。GST: : プロテインキナーゼは、³³ P- γ -ATPを用いて *in vitro* キナーゼ活性¹³ について試験した。自動リン酸化アッセイでは、GST: : キナーゼは、GPTS処理したPDMSに直接結合させ、*in vitro* 反応を、適当な緩衝液中の³³ P- γ -ATPを用いて行った。基質反応において、基質はGPTSを介してウェルに結合させ、ウェルはHEPES緩衝液で洗浄し、1% BSAでブロッキングした後で、キナーゼ、³³ P- γ -ATPおよび緩衝液を添加した。全体の反応容量は、反応当たり0.5 μl 以下に維持した。30℃で30分間インキュベートした後、チップを十分に洗浄し、X線フィルムおよびMolecular Dynamics PhosphorImager (解像度が50 μm で、定量用である) の双方に暴露した。12種の基質については、各キナーゼアッセイを少なくとも2度繰り返し、残りの5種については、アッセイは一度行った。

【0128】

基質特異性を調べるために、次の式を用いて特異性指数 (SI) を算出した: $SI_{i,r} = F_{i,r} / [(F_{i,1} + F_{i,2} + \dots + F_{i,r}) / r]$ (式中、iは用いたキナーゼのIDを表わし、rは基質のIDを表わし、 $F_{i,r}$ はGST単独の場合と比較した基質rに対するキナーゼiの増大率 (倍) を表わす)。

【0129】

4. キナーゼの配列アライメントおよび系統樹

107種のプロテインキナーゼのコアキナーゼ触媒ドメインの配列に基づく多重配列アライメントを、CLUSTAL Wアルゴリズム³⁵ により、Gonnet 250スコアリング用マトリックス³⁶ を用いて作製した。キナーゼの触媒ドメインの配列は、SWISS-PROT³⁷、PIR³⁸ およびGenBank³⁹ のデータベースから入手した。触媒ドメインが判っていないキナーゼ (DBF4/YDR052CおよびSLIN1/YIL147C) では、可能性の高いキナーゼ配列を、FASTAアルゴリズム^{40, 41} を用いて設定されたデータにおける他のキナーゼ配列とのアライメントから、BLOSUM

M50スコアリング用マトリックス^{4 2}を用いて推定した。11種のコア触媒サブドメイン^{4 3}に対応するタンパク質サブ配列は上記のアライメントから抽出し、PROTPARS^{4 4}プログラムを用いてコンピューターにより系統樹を構築した(図5a)。

【0130】

5. タンパク質チップのデータの機能的グルーピング

実験データに基づくプロテインキナーゼ同士のおおよその機能的相関関係を可視化するために、キナーゼを、12種の異なる基質をリン酸化する能力(2000年8月17日現在のウェブサイト<http://bioinfo.mbb.yale.edu/genome/yeast/chip>で入手可能なデータ)に基づいて、分類体系的に順序付けした。基質の各々に対する107種のプロテインキナーゼの-/+活性に対応するプロフィールを記録し、[0, 1]で打切り値とした。マトリックスは、実験プロフィール間のペアワイズハミング距離から導き、無根系統樹をFitch-Margoliaashの最小二乗推定法^{4 5}を用いて、PHYLI Pソフトウェアパッケージ^{4 4}のFITCHプログラム^{3 4}で実行されているようにして算出した。それぞれの場合、データセットの体系化における固有のバイアスをなくすために、分類群の入力順序は無作為にし、最適なカテゴリーは、系統樹構造の全体的な再配列により得た。

10

【0131】

C. 結果

1. 酵母キナーゼのクローニングおよびタンパク質の精製

組換え特異的クローニング法⁹を用いて、高コピー発現ベクター(pEG(KG))(ガラクトース誘導型GAL10プロモーター^{1 0}の制御下でGST融合タンパク質を産生するもの)における122種の酵母プロテインキナーゼ遺伝子のコード領域全体のクローニングを試みた(図1a)。GST::キナーゼ構築物を大腸菌にレスキューし、各構築物の5'末端における配列を決定した。この方法を用いて、122種の酵母キナーゼ遺伝子のうち119種がインフレームでクローニングされた。クローニングされなかった3種のキナーゼ遺伝子は非常に大きいものである(4.5~8.3kb)。

20

【0132】

GST::キナーゼ融合タンパク質を酵母内で過剰産生させ、50mlの培養物からグルタチオンビーズおよび標準的プロトコル^{1 1}を用いて精製した。Hog1の場合、酵母細胞を高塩で処理して、誘導の少なくとも最後の5分間で該酵素を活性化した。残りのキナーゼでは、合成培地(URA⁻/ラフィノース)を用いた。抗GST抗体を用いて119種の融合体全てのイムノブロット分析をしたところ、酵母株のうち105種が検出可能なGST::融合タンパク質を産生し、多くの場合、その融合体は全長であることが明らかになった。出発培養物1ml当たり最大1μgの融合タンパク質が得られた(図1b)。しかし、119種のGST::キナーゼサンプルのうち14種はイムノブロット分析では検出されなかった。おそらく、これらのタンパク質は、使用したpep4プロテアーゼ欠損株において安定に過剰産生されていないか、あるいは、これらのタンパク質は本発明者らの方法を用いて精製されない不溶性の凝集物を形成している可能性がある、と考えられる。この方法はうまくいったが、培養物50mlを用いたGST融合タンパク質の精製は時間がかかる方法であり、何千ものサンプルの調製には適用できない。したがって、96ウェルフォーマットで細胞を増殖させる方法を開発した(「方法」を参照)。この方法を用いて、119種のGST融合体を調製し、6時間で精製した。出発培養物1ml当たり、上記の50ml法と比較して約2倍高い収率となった。

30

40

【0133】

2. タンパク質チップの設計

タンパク質チップは、119種の酵母プロテインキナーゼのハイスループット生化学アッセイを実施するように開発した(図2)。これらのチップは、使い捨て用シリコーンエラストマーポリジメチルシロキサン(PDMS)上のウェルのアレイからなる^{1 1}。ウェルのアレイにより、少容量の異なるプローブが1つのチップ上に高密度に充填されるが、その後のバッチ式処理の間は物理的に隔離されたままとすることができる。タンパク質は、

50

リンカー 3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシラン (GP TS) ^{1 2} を用いて共有結合によりウェルに結合させた。最大 $8 \times 10^{-9} \mu\text{g} / \mu\text{m}^2$ のタンパク質が表面に結合できる (「方法」を参照)。

【0134】

プロテインキナーゼアッセイのために、タンパク質チップ技術を、標準的なサンプル取扱い／記録装置に適合するように設定した。放射性同位体による標識化 (³³P) を用いて、後述するキナーゼアッセイ、および手作業によるローディング、種々のアレイ構造を試験した。以下のチップは、最良の結果をもたらした：直径 1.4 mm で深さ 300 μm (約 300 nm) の丸形ウェルで、ピッチが 1.8 mm の 10 × 14 個の矩形のアレイ構造。これらのアレイの 12 枚のマスター鋳型を製造し、プロテインキナーゼ分析用に多数のアレイを繰り返し成型した。チップを顕微鏡用スライドガラスの上面に載せ (図 2 a)；このアレイを標準的な顕微鏡用スライドガラスの 1/3 をわずかに多めに被覆し、典型的にはスライドガラス当たり 2 つのアレイを使用した (図 2 b)。タンパク質を各ウェル内に入れるために手作業によるピペット法を用いたが、自動化法も使用可能である。さらに、このタンパク質チップの構造は、他の標識方法 (例えばリンタンパク質に対する蛍光標識した抗体によるもの) およびその後の免疫蛍光の検出と共に用いることができる。

【0135】

3. タンパク質チップを用いた大規模キナーゼアッセイ

119 種の GP TS：キナーゼの全てを、³³P-γ-ATP を用いる 17 種の異なるアッセイおよび 17 種の異なるチップにおいて、*in vitro* キナーゼアッセイ ^{1 3} について試験した。各チップは、次のような異なる基質を用いてアッセイした：1) 自己リン酸化、2) ウシ・ヒストン H1 (一般的なキナーゼ基質)、3) ウシ・カゼイン (一般的な基質)、4) ミエリン塩基性タンパク質 (一般的な基質)、5) Ax12 C 末端 GST (Ax12 は出芽に関する膜貫通リンタンパク質) ^{1 4}、6) Rad9 (DNA 損傷チェックポイントに関するリンタンパク質) ^{1 5}、7) Gic2 (出芽に関するリンタンパク質) ^{1 6}、8) Rad1 (染色体対合にとって重要な減数分裂リンタンパク質) ^{1 7}、9) Mek1 (染色体の対合にとって重要な減数分裂タンパク質キナーゼ) ^{1 8}、10) ポリ (チロシン-グルタミン酸 1:4) (ポリ (Ty r-G l u)；チロシンキナーゼの基質) ^{1 9}、11) Ptk2 (小分子輸送タンパク質) ^{2 0}、12) Hs11 (細胞周期の調節に関するプロテインキナーゼ) ^{2 1}、13) Swi6 (G1/S の調節に関するホスホ転写因子) ^{2 2}、14) Tub4 (微小細の核形成に関するタンパク質) ^{2 3}、15) Hog1 (浸透調節に関するプロテインキナーゼ) ^{2 4}、16) Hog1 (該キナーゼの非活性型)、および 17) GST (対照)。自己リン酸化アッセイでは、キナーゼを処理済みの PDMS ウェルに直接結合させ、³³P-γ-ATP を添加した。基質反応では、基質をウェルに結合させ、次にキナーゼおよび ³³P-γ-ATP を添加した。反応が完了したら、スライドを洗浄し、リン酸化シグナルを得て、高解像度ホスホイメジャーを用いて定量した。図 3 に例を示す。キナーゼ活性を同定するために、定量したシグナルを、GST 対照に対する増大率 (倍) に変換し、更なる分析のためにプロットした (図 4 a)。

【0136】

図 4 a に示すように、大部分 (93.3%) のキナーゼが、少なくとも 1 種の基質に対し、バックグラウンドと比較して 5 倍以上の活性を示した。予想どおり、Hrr25、Pbs2 および Mek1 はそれらの既知の基質 ^{2 5 - 2 7} である Swi6 (GST 対照よりも 400 倍高い)、Hog1 (10 倍高い) および Red1 (10 倍高い) をそれぞれをリン酸化した。このアッセイの結果から、ヒスチジンキナーゼ (Sl n1、Yil1042c) およびリン脂質キナーゼ (例えば Mec1) を含むこれまで研究されていなかった 24 種の推定プロテインキナーゼのうち 18 種が、幾つかの一般的でないキナーゼ ⁸ と同様に、1 種以上の基質をリン酸化することが実証された。

【0137】

基質特異性を調べるために、特定のキナーゼの活性を、全ての基質に対するその活性の平

10

20

30

40

50

均に対して更に標準化した。いくつかの例を図4bに示す。全てのデータは、で入手可能である。32種のキナーゼが特定の基質に対して基質特異性を示し、その際の特異性指数(SI:「方法」を参照)は2以上であり、同様に、大部分の基質は、特定のプロテインキナーゼまたは一連のプロテインキナーゼによって優先的にリン酸化される。例えば、Ax12(酵母細胞の出芽に関するタンパク質)のC末端は、他のタンパク質よりもDbf20、Kin2、Yak1およびSte20によって優先的にリン酸化される。興味深いことに、従来の研究では、Ste20はAx12と同様に出芽途中にある芽の先端に存在することが判っており、ste20Δ/c1a4^{ts}突然変異体は、出芽もできず、十分に分極化されたアクチンのパッチもしくはケラブルを形成することもできない²⁸。もう1つの例は、リンタンパク質であるGic2(これも出芽に関する)¹⁶である。Ste20およびSkm1はGic2を強くリン酸化する(図4b)。従来の研究から、Cdc42がGic2、C1a4²⁹、Ste20およびSkm1と相互作用することが示唆された。本発明者らの結果から、Cdc42がSte20および/またはSkm1をリクルートすることによってGic2のリン酸化を促進するように機能する可能性が出てきた。

10

【0138】

4. 酵母は多くの二重特異性キナーゼを含む

特に関心が持たれるのは、二重特異性キナーゼ、すなわち、Ser/Thrおよびチロシンの双方をリン酸化する酵素である。配列分析に基づく、2種を除く全ての酵母プロテインキナーゼがプロテインキナーゼのSer/Thrファミリーに属する。しかし、本研究の時点で、7種のプロテインキナーゼ(Mps1、Rad53、Swe1、Ime2、Ste7、Hrr25およびMck1)は二重特異性キナーゼであることが報告された¹⁹。本発明者らは、Swe1、Mps1、Ime2およびHrr25がポリ(Tyr-Glu)を容易にリン酸化することを確認したが、Ste7、Rad53またはMck1についてはチロシンキナーゼ活性は検出されなかった。Mck1は本発明者らのアッセイのいずれにおいても強い活性を示さなかった。しかし、Ste7およびRad53は他のアッセイでは非常に活性である。したがって、それらがポリ(Tyr-Glu)をリン酸化できないことから、それらが全般的に非常に弱いチロシンキナーゼであるか、あるいは少なくともポリ(Tyr-Glu)基質には弱いことが示される。後者の可能性と一致して、他の研究者らは、ポリ(Tyr-Glu)がRad53にとって非常に不十分な基質であることを見出した(参考文献19; D. Stern, pers. comm.)。興味深いことに、本発明者らは、23種の他のキナーゼもまた、ポリ(Tyr-Glu)を基質として効率的に使用することを見出し、このことは、酵母にはin vitroで二重特異性キナーゼとして作用できる少なくとも27種のキナーゼが存在することを示している。それらのうちの1種であるRim1は、近年、そのin vivo基質のTyr残基をリン酸化することが示され、Ime2については、それが真の二重特異性キナーゼであることが示された³⁰。つまり、この実験では、二重特異性キナーゼとして作用できるキナーゼの数がほぼ3倍になり、そのようなキナーゼとして分類されたものの中には問題があることも提示された。

20

30

【0139】

5. ポリ(Tyr-Glu)キナーゼの機能特異性とアミノ酸配列との相互関係

酵母プロテインキナーゼの大規模分析により、プロテインキナーゼ同士の機能的な関係の比較が可能になる。本発明者らは、ポリ(Tyr-Glu)をリン酸化するキナーゼの多くがそれらのアミノ酸配列において互いに関連があることを見出した。ポリ(Tyr-Glu)キナーゼの70%が、樹状図(キナーゼはそれらの保存されたプロテインキナーゼドメインの配列類似性に基づいて互いに系統付けられている)の異なる4つのグループに分けられる(図5a)。アミノ酸配列を更に調べたところ、基質としてポリ(Tyr-Glu)を使用しないキナーゼと比較してポリ(Tyr-Glu)クラスのキナーゼの方に専ら見い出される4種のアミノ酸が明らかになる(3つはリシンで1つはメチオニン)。1つの残基(アスパラギン)は主に基質としてポリ(Tyr-Glu)を容易に使用し

40

50

ないキナーゼに存在した（図 5 b）。残基の大部分は分子の触媒位置の近傍に存在し（図 5 b）^{3 1}、それらが基質の認識においてある役割を担っていることを示唆している。

【0140】

D. 考察

1. プロテインキナーゼの大規模分析

この研究は、新規なタンパク質チップ技術を用いて、17種の異なる基質に対する119種のキナーゼの活性を特性決定した。特定のタンパク質が特定のプロテインキナーゼにとって好ましい基質であり、逆に特定のプロテインキナーゼが特定のタンパク質にとって好ましく、多くのプロテインキナーゼが特定の基質にとって好ましいことが判った。これらの研究の1つの懸念は、目的とする酵素以外のキナーゼが調製物中に混入している可能性があることである。これは厳密には除外することはできないが、本発明者らのサンプルのうち5種のクーマシー染色および抗GSTを用いたイムノプロット染色による分析では、GST融合体ではない本発明者らのサンプル中に検出可能なバンドは見られない（「方法」を参照）。 10

【0141】

*in vitro*アッセイは、*in vitro*における特定のキナーゼの基質が*in vivo*で同じキナーゼによってリン酸化されることを保証しないことに注目することが重要である。その代わり、これらの実験から、特定のタンパク質が特定のキナーゼの基質となり得、そのため、更なる分析が可能になることが示される。これに関して、これらのアッセイは、候補の相互作用を検出するツーハイブリッド研究と類似している。このプロセスが通常*in vivo*でも起こるのか否かを判定するためには、更なる実験が必要である。 20

【0142】

基質の多くが*in vivo*での真の基質である可能性がある、という考え方と一致しているのは、本発明者らのアッセイにおいて、3種のキナーゼ（Hrr25、Pbs2およびMek1）がそれらの既知の基質をリン酸化するという知見である。更に、キナーゼの多く（例えばSte20）がそれらの*in vitro*での基質（例えばAx12）と共に局在している。したがって、本発明者らの*in vitro*アッセイにおいて基質をリン酸化するキナーゼの多くがおそらく*in vivo*でもそのようにリン酸化するであろうことが予想される。 30

【0143】

本発明者らのアッセイでは上記キナーゼの大部分が活性であったが、幾つかは活性ではなかった。おそらく、これらの後者のキナーゼの本発明者らの調製物は、十分な量のアクチベーターがなかったか、あるいは活性化条件下で精製されなかったと考えられる。例えば、Cdc28は、本発明者らのアッセイでは活性ではなく、その活性化サイクリンを欠いていたと思われる。Hog1の場合、細胞は高塩で処理してその酵素を活性化した。本発明者らのキナーゼ調製物のほぼ全部が活性を示さなかったのも、それらの調製物中の酵素の少なくとも幾つかが適切に活性化されていたか、かつ／または必須の補因子を含んでいたと予測される。これらの酵素がそれらの本来の生物において過剰発現されることが、活性な酵素を得ることに大成功するのに大きく関与していると考えられる。 40

【0144】

タンパク質チップ上でのアッセイを用いて、ポリ（Ty r-G l u）を利用する多くのキナーゼが同定された。多くのキナーゼの大規模分析により、ポリ（Ty r-G l u）キナーゼの機能特異性と特定のアミノ酸配列とを互いに関連付ける新規なアプローチが可能になる。ポリ（Ty r-G l u）をリン酸化するキナーゼの残基の多くが塩基性残基を含む。これが予期できるのは、キナーゼ残基とG l u残基との間に静電的相互作用がある場合である。しかし、幾つかの他の残基の役割、例えば、ポリ（Ty r-G l u）をリン酸化するキナーゼに対するMe t残基の役割や、ポリ（Ty r-G l u）をリン酸化しないキナーゼに対するA s nの役割などは明らかではない。これらのキナーゼの残基は、それ以外の機構によって基質特異性を付与するのかもしれない。それでも、他の基質の分析は、 50

全てのプロテインキナーゼについての機能特異性とキナーゼ配列との更なる相関関係を可能にするはずである。

【0145】

2. タンパク質チップ技術

多数のサンプルの迅速な分析に加えて、本明細書に記載されているタンパク質チップ技術は、慣用の方法と比較して重要な利点を有する。1) チップによるアッセイは、高いシグナル・ノイズ比を有する。本発明者らは、このタンパク質チップを用いて示されるシグナル・ノイズ比が、従来のマイクロタイターディッシュアッセイで見られるもの（データは示さず）よりもずっと良好である（10倍以上）ことを見出した。おそらく、これは、³³P-γ-ATPがマイクロタイターディッシュほどにはPDM Sを結合しない、という事実によるものと考えられる。2) 必要とされる物質の量が非常に少なくて済む。反応物の容量は、384ウェルマイクロタイターディッシュで用いられる量の1/20～1/40である。各反応において、20ng未満のプロテインキナーゼが使用された。3) タンパク質チップを用いる酵素アッセイは感度が非常に高い。イムノブロット分析ではたった105種の融合体だけが検出可能であったが、112種が、少なくとも1種の基質について、バックグラウンドと比較して5倍を上回る酵素活性を示した。例えば、Mps1は、イムノブロット分析ではこの融合タンパク質を検出することはできなかったが、キナーゼアッセイの多くでは一貫して最大の活性を示す（図1bおよび3aを参照）。4) 最後に、このチップは安価である。各アレイにつき、材料の費用は8セント未満である。微細加工された鋳型もまた、製造が容易で、かつ安価である。

10

20

【0146】

プロテインキナーゼの分析に加え、このタンパク質チップ技術は、ATPおよびGTPの結合アッセイ、ヌクレアーゼアッセイ、ヘリカーゼアッセイ、タンパク質-タンパク質相互作用アッセイなどの多種多様な他のアッセイにも適用できる。近年、別の研究において、Phizickyとその共同研究者達は、ずっと弱いCUP1プロモーター下で酵母タンパク質をGST融合体として発現させた⁶。それらのクローンの質は立証されていないが、それらは、この融合タンパク質を含む酵母株のプールを用いて生化学的活性を同定できた。本発明者らのタンパク質チップアプローチの利点は、全てのサンプルが1回の実験で分析できることである。更に、この研究では、サンプルを隔離するという利点を持つウェルを使用した。別のアッセイには平坦なPDM Sチップおよびスライドガラスも使用

30

40

【0147】

一般に利用可能なサンプル処理・記録装置を用いた特定のプロテインキナーゼアッセイのためのタンパク質チップ技術を構成した。この目的のために、アレイの大きさは、微細加工したシリコンエラストマー構造体と共に容易に利用可能な大きさと比較して相対的に大きなままとした³²。本発明者らはマイクロリソグラフィにより製造した鋳型を用いて、本明細書において報告したものよりも特徴サイズが2桁小さいPDM S構造体を成型したが、その他の研究者達は、微細加工された構造体においてミクロン以下の特徴サイズを報告している³³。これらの結果から、微細加工されたタンパク質チップのウェル密度は、数桁分も容易に増大させることができることが示される。本明細書において報告されているタンパク質チップ技術は拡大縮小が容易に可能である。

【0148】

結論として、タンパク質の生化学的活性のハイスループットスクリーニングのための、安価で使い捨てのタンパク質チップ技術が開発された。有用性は、17種の各種の基質のリン酸化についてアッセイされたサッカロミセス・セレビシエ由来の119種のキナーゼの

50

分析により実証された。これらのタンパク質チップは、何百ものタンパク質サンプルの同時測定を可能にする。このチップ技術に基づく微細加工されたウェルのアレイの使用により、ウェルの密度を数桁分だけ容易に高くすることができる。適切なサンプル処理・測定技術を開発すれば、これらのタンパク質チップは、数千～数百万ものサンプルの同時アッセイに適用できる。

【0149】

E. 参考文献

1. Fields, S., Kohara, Y., および Lockhart, D. J. Functional genomics (機能的ゲノミックス). Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 8825-26 (1999). 10
2. Goffeau, A. ら, Life with 6000 genes (6000の遺伝子を持つ生命), Science 274, 563-567 (1996).
3. DeRisi, J. L., Iyer, V. R., および Brown, P. O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale (ゲノミックス規模での遺伝子発現の代謝調節および遺伝子調節の探索). Science 278, 680-686 (1997).
4. Winzler, E. A. ら. Functional characterization of the S. cerevisiae genome by gene deletion and parallel analysis (遺伝子欠失および並行分析によるS. セレビシエの機能の特性決定). Science 285, 901-906 (1999). 20
5. Heyman, J. A. ら. Genome-scale cloning and expression of individual open reading frames using topoisomerase I-mediated ligation (トポイソメラーゼI仲介連結を用いた個々のオープンリーディングフレームのゲノム規模でのクローニングおよび発現). Genome Res. 9, 383-392 (1999).
6. Martenzen, M. R. ら. A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products (産物の活性による遺伝子の同定のための生化学的ゲノミクスアプローチ). Science 286, 1153-1155 (1999). 30
7. Plowman G. D., Sudarsanam S., Bingham J., Whyte D., および Hunter T. The protein kinases of Caenorhabditis elegans: A model for signal transduction in multicellular organisms (カエノルハブディティス・エレガンスのプロテインキナーゼ: 多細胞生物におけるシグナル伝達のモデル). Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 13603-12610 (1999). 40
8. Hunter, T., & Plowman, G. D. The protein kinases of budding yeast: six score and more (出芽酵母のプロテインキナーゼ: 6スコア以上). TIBS 22, 18-22 (1997).
9. Hudson, J. R. ら. The complete set of predicted genes from Saccharomyces cerevisiae in a readily usable form (容易に使用可能な形態のサッカロミセス・セレビシエの推定遺伝子の完全セット). Genome Res. 7, 1169-1173 (1997).
10. Mitchell, D. A., Marshall, T. K., および Desc 50

- henes, R. J. Vector for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion protein in yeast (酵母におけるグルタチオンS-トランスフェラーゼ融合タンパク質の誘導的過剰発現のためのベクター). *Yeast* 9, 715-23 (1993).
11. Rogers, Y. -H., ら. Immobilization of oligonucleotides onto a glass support via disulfide bonds: a method for preparation of DNA microarrays (オリゴヌクレオチドのジスルフィド結合によるガラス支持体への固定: DNAマイクロアレイの調製方法). *Analy. Biochem.* 266, 23-30 (1999). 10
12. Stimpson, D. J., ら. Real-time detection of DNA hybridization and melting on oligonucleotide arrays by using optical wave guide (光導波路を用いることによるオリゴヌクレオチドアレイ上でのDNAのハイブリダイゼーションおよび融解のリアルタイム検出). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 6379-6383 (1995).
13. Hunter, T. & Sefton, B. M. Protein phosphorylation (タンパク質のリン酸化). *Meth. In Enzym.* 200, 35-83 (1991). 20
14. Roemer, T. K. et al. Selection of axial growth sites in yeast requires Ax12p, a novel plasma membrane glycoprotein (酵母における軸増殖部位の選択は、新規な形質膜糖タンパク質であるAx12pを必要とする). *Genes & Dev.* 10, 777-793 (1996).
15. Weinert, T. A. & Hartwell, L. H. Cell cycle arrest of cdc mutants and specificity of the RAD9 checkpoint (cdc突然変異体の細胞周期の休止およびRAD9チェックポイントの特異性). *Genetics* 134, 63-80 (1993). 30
16. Jaquenoud, M., Gulli, M. P., Peter, K., およびPeter, M. The Cdc42p effector Gic2p is targeted for ubiquitin-dependent degradation by the SCFGrr1 complex (Cdc42pエフェクターGic2pはSCFGrr1複合体によるユビキチン依存性分解についてターゲッティングされる). *EMBO J.* 17, 5360-5373 (1998).
17. Menees, T. M., Ross-MacDonald, P. B. およびRoeder, G. S. ME14, a meiosis-specific yeast gene required for chromosome synapsis (染色体対合に必要な減数分裂特異的酵母遺伝子ME14). *Mol. Cell Biol.* 12, 1340-1351 (1992). 40
18. Bailis, J. M., & Roeder, G. S. Synaptonemal complex morphogenesis and sister-chromatid cohesion require Mek1-dependent phosphorylation of a meiotic chromosomal protein (対合複合体の減数分裂および姉妹染色分体結合は減数分裂の染色体タンパク質のMek1依存的リン酸化を必要とする). *Genes & Dev.* 12, 3551-3561 (1998).
19. Stern, D. F., Zheng, P., Beidler, D. R., およびZerillo, C. Spk1, a new kinase from Sacch 50

- aromyces cerevisiae phosphorylates protein on serine, threonine, and tyrosine (サッカロミセス・セレビシエ由来の新規なキナーゼ Spk1 は、タンパク質をセリン、トレオニンおよびチロシンでリン酸化する). Mol. Cell. Biol. 11, 987-1001 (1991).
20. Kaouass, M. ら. The STK2 gene, which encodes a putative Ser/Thr protein kinase, is required for high-affinity spermidine transport in Saccharomyces cerevisiae (推定 Ser/Thr プロテインキナーゼをコードする STK2 遺伝子はサッカロミセス・セレビシエにおける高親和性スperlミジン輸送に必要である). Mol. Cell Biol. 17, 2994-3004 (1997). 10
21. Barral, Y., Parra, M., Bidlingmaier, S., および Snyder, M. Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast (Nim1 関連キナーゼは細胞周期の進行を酵母における末梢細胞骨格と協調させる). Genes & Dev. 13, 176-187 (1999).
22. Madden, K., Sheu, Y.-J., Baetz, K., Andrews, B., および Snyder, M. SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway (酵母 PKC-MAP キナーゼ経路の標的としての SBF 細胞周期調節物質). Science 275, 1781-1784 (1997). 20
23. Sobel, S. G. & Snyder, M. A highly divergent gamma-tubulin gene is essential for cell growth and proper microtubule organization in Saccharomyces cerevisiae (高度に分岐した γ チューブリン遺伝子はサッカロミセス・セレビシエにおける細胞の増殖および適切な微小管の構成に必須である). J. Cell Biol. 131, 1775-1788 (1995). 30
24. Ferrigno, P., Posae, F., Koeppe, D., Saito, H., および Silver, P. A. Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MARK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1 (HOG1 MARK の制御された核/細胞質交換はインポーチン β 相同体 NMD5 および XPO1 を必要とする). EMBO J. 17, 5605-5614 (1998).
25. Ho, U., Mason, S., Kobayashi, R., Heokstra, M., および Andrew, B. Role of the casein kinase I isoform, Hrr25, and the cell cycle-regulatory transcription factor, SBF, in the transcription response to DNA damage in Saccharomyces cerevisiae (サッカロミセス・セレビシエにおける DNA 損傷への転写応答におけるカゼインキナーゼ I アイソフォーム Hrr25 および細胞周期調節転写因子 SBF の役割). Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 581-586 (1997). 40
26. Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. A. および Saito, H. Regulation of the Saccharomyces cerevisiae HOG1 mutagen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosinase phosphatases (PTP2 および PTP3 プロテ 50

- インチロシナーゼホスファターゼによるサッカロミセス・セレビスエHOG1マイトジェン活性化プロテインキナーゼの調節). *Mol. Cell Biol.* 17, 1289-1297 (1997).
27. Santos, T. & Hollinsworth, N. M. Rad1p, a MEK1-dependent phosphoprotein that physically interacts with Hop1p during meiosis in yeast (Rad1p、酵母における減数分裂の際にHop1pと物理的に相互作用するMEK1依存性リンタンパク質). *J. Biol. Chem.* 274, 1783-1790 (1999).
28. Holly, S. P. & Blumer, K. J. PAL-family kinases regulate cell and actin polarization throughout the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae* (PALファミリーのキナーゼはサッカロミセス・セレビスエの細胞周期全体にわたって細胞およびアクチンの分極を調節する). *J. Cell Biol.* 147, 845-856 (1999).
29. Richman, T. J., Sawyer, M. M. およびJohnson, D. I. The Cdc42p GTPase is involved in a G2/M morphogenetic checkpoint regulating the apical-isotropic switch and nuclear division in yeast (Cdc42p GTPアーゼは、酵母における先端-等方性スイッチおよび核分裂を調節するG2/M形態発生的チェックポイントに関与する). *J. Biol. Chem.* 274, 16861-16870 (1999).
30. Malathi, K., Xiao, Y., およびMitchell, A. P. Catalytic roles of yeast GSK3 β /shaggy homolog Rim11p in meiotic activation (減数分裂活性化における酵母GSK3 β /シャギー相同体Rim11pの触媒的役割). *Genetics* 153, 1145-1152 (1999).
31. Owen, D. J., Noble, M. E., Garman, E. F., Papageorgiou, A. C., およびJohnson, L. N. Two structures of the catalytic domain of phosphorylase kinase: an active protein kinase complexed with substrate analogue and product (ホスホリラーゼキナーゼの触媒ドメインの2つの構造: 基質類似体および産物と複合させた活性なプロテインキナーゼ). *Structure*, 3, 467-474 (1995).
32. Xia, Y., & Whitesides, G. M., *Angew. Chem., Int. Ed.* 37, 550- (1997).
33. Jackman, R. J., Duffy, D. C., Cherniavskaya, O., およびWhitesides, G. M. Using elastomeric membranes as dry resists and for dry lift-off (乾燥レジストとして、およびドライリフトオフのためのエラストマー膜の使用). *Langmuir*, 15, 2973-2984 (1999).
34. Mylin, L. M., Hofmann, K. J., Schultz, L. D., およびHopper, J. E., Regulated GAL4 expression cassette providing controllable and high-level output from high-copy galactose promoters in yeast (酵母において高コピーガラクトースプロモーターからの調節可能で高レベル出力をもたらす調節されたGAL4発現カセット). *Methods Enzymol.* 185, 297-308 (1990).
35. Higgins, D. G., Thompson, J. D., およびGibso

- n, T. J., Using CLUSTAL for multiple sequence alignments (多重配列アライメントのためのCLUSTALの使用). *Methods Enzymol.* 266, 383-402 (1996).
36. Gonnet, G. H., Cohen, M. A., および Benner, S. A. Exhaustive matching of the entire protein sequence database (全タンパク質配列データベースの網羅的マッチング). *Science.* 256, 1443-1445 (1992).
37. Bairoch, A. & Apweiler, R. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL (SWISS-PROTタンパク質配列データバンクおよびその補足TrEMBL). *Nucleic Acids Res.* 27, 49-54 (1999).
38. Baker, W. C., ら. The PIR-International Protein Sequence Database (PIR国際タンパク質配列データベース). *Nucleic Acids Res.* 27(1), 39-43 (1999).
39. Benson, D. A., ら. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 27, 12-17 (1999).
40. Lipman, D. J. & Pearson, W. R. Rapid and sensitive protein similarity searches (迅速で高感度のタンパク質類似性検索). *Science.* 277, 1435-1441 (1985).
41. Pearson, W. R. & Lipman, D. J. Improved tools for biological sequence comparison (生物学的配列比較のための改善されたツール). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 2444-2448 (1988).
42. Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M., および Orcutt, B. C. A model of evolutionary change in proteins (タンパク質の進化上の変化のモデル). In *Atlas of Protein Sequence and Structure*, M. O. Dayhoff, 編. Washington, D. C.: National Biomedical Research Foundation, pp. 345-352 (1978).
43. Hanks, S. K. & Hunter, T. Protein Kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification (真核性プロテインキナーゼスーパーファミリー: キナーゼ(触媒)ドメインの構造および分類). *FASEB J.* 9, 576-596 (1995).
44. Felsenstein, J. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (バージョン3.2). *Cladistics.* 5, 164-166 (1989).
45. Fitch, W. M. & Margoliash, E. Construction of phylogenetic trees (系統樹の構築). *Science.* 155, 279-284 (1967).

VII. 実施例II: タンパク質チップを用いた酵母プロテインキナーゼ活性の分析A. 緒言

以下の実施例では、プロテインキナーゼ活性をアッセイするための本発明のタンパク質チップを用いた異なる方法を提供する3つのプロトコールを示すが、それらはそれらは単に説明のためにすぎない。

【0150】

1. プロテインキナーゼ活性のアッセイ方法

i. 自己リン酸化活性

(1) タンパク質チップを、100% EtOHで室温で3回洗浄した。次に、そのチップを、リンカーGPTS (95% EtOH中の1%溶液)で室温で1時間振盪してコーティングした。100% EtOHで3回洗浄した後、チップを減圧下で130℃で1.5時間乾燥した。

【0151】

(2) GST: : 酵母プロテインキナーゼ (ウェル当たり1種のキナーゼ) を、少なくとも1時間インキュベートすることによりタンパク質チップのウェルに結合させた。チップを更に1% BSAでブロッキングした。

10

【0152】

(3) キナーゼ緩衝液および ^{33}P - γ -ATPプローブを各ウェルに加え、30℃で30分間インキュベートした。リン酸化反応が完了した後、チップを十分に洗浄した。

【0153】

(4) 特異的な ^{33}P - γ -ATPシグナル (自己リン酸化を示す) を検出し、ホスホイメージャーで定量した。

【0154】

i i. キナーゼ活性-プロトコール I

(1) タンパク質チップを、100% EtOHで室温で3回洗浄した。次に、そのチップを、リンカーGPTS (95% EtOH中の1%溶液)で室温で1時間振盪してコーティングした。100% EtOHで3回洗浄した後、チップを減圧下で130℃で1.5時間乾燥した。

20

【0155】

(2) 基質 (例えばGST: : 酵母タンパク質) を、1時間以上インキュベートすることによりチップに結合させた。チップを更に1% BSAでブロッキングし、チップを洗浄した。

【0156】

(3) 異なるプロテインキナーゼを、タンパク質チップの各ウェルに、キナーゼ緩衝液および ^{33}P - γ -ATPと共に加え、30℃で30分間インキュベートした。リン酸化反応が完了した後、チップを十分に洗浄した。

30

【0157】

(4) 特異的な ^{33}P - γ -ATPシグナル (プロテインキナーゼプローブによる基質タンパク質のリン酸化を表わす) を検出し、ホスホイメージャーで定量した。

【0158】

i i i. キナーゼ活性-プロトコール I I

(1) タンパク質チップを、100% EtOHで室温で3回洗浄した。次に、そのチップを、リンカーGPTS (95% EtOH中の1%溶液)で室温で1時間振盪してコーティングした。100% EtOHで3回洗浄した後、チップを減圧下で130℃で1.5時間乾燥した。

【0159】

(2) 基質 (例えばGST: : 酵母タンパク質) を、1時間以上インキュベートすることによりチップに結合させた。チップを更に1% BSAでブロッキングし、チップを洗浄した。

40

【0160】

(3) 異なるプロテインキナーゼを、タンパク質チップの各ウェルに、キナーゼ緩衝液および ^{33}P - γ -ATPと共に加え、30℃で30分間インキュベートした。リン酸化反応が完了した後、チップを十分に洗浄した。チップをヨードアセチル-LC-ビオチンと共に、暗所にて室温で一夜インキュベートした。

【0161】

(4) 洗浄した後、チップを蛍光標識アビジンでプロービングして、リン酸化シグナルを

50

検出した。

【0162】

(5) 次に、チップを、Axon Genepix 4000A スキャナー（約300～400ミクロンに焦点深度を増大させたレンズに変更した）でスキャンした。この変更により、スライド（例えば本発明のPDMSマイクロアレイ）上に載っている表面のスキャンが可能になる（あるいは、焦点面から外れていてもよい）。変更を加えたAxon Genepix 4000A スキャナーを用いて、アレイをスキャンして、蛍光シグナルを得て定量した。

【0163】

VIII. 実施例III：タンパク質チップを用いたタンパク質－タンパク質相互作用の分析 10

目的のタンパク質（「プローブタンパク質」）を、標準的なプロトコルを用いて、標識した融合タンパク質として大腸菌から組換え発現させて精製する。標的タンパク質を各ウェルが異なる標的タンパク質を含むようにチップのウェルに結合させる。精製したプローブタンパク質をチップの各ウェルに導入し、数時間以上インキュベートする。チップを洗浄し、a) プローブタンパク質に対する抗体またはb) 融合タンパク質の標識に対する抗体のいずれかでプロービングする。抗体は、Cy3またはCy5などの蛍光標識で標識するか、あるいは、第1の抗体を検出する蛍光標識した二次抗体を用いて検出する。

【0164】

次の実施例は、単に説明のためにすぎないが、本発明のタンパク質チップを用いてプロテアーゼ、ヌクレアーゼまたはGタンパク質受容体についてアッセイする方法を提供する。タンパク質－タンパク質相互作用は、通常、以下の方法または同様の方法を用いてアッセイできる。 20

【0165】

A. プロテアーゼ活性の分析

プロテアーゼ活性は、次のようにしてアッセイする。まず、種々のアミノ酸の組合せからなり、C末端またはN末端に質量分析用標識を結合させてあるタンパク質プローブを調製する。この際の唯一の条件は、標識の分子量を、タンパク質の全ての標識された分解産物が検出できるように十分に大きなものにしなければならないことである。タンパク質プローブを、タンパク質チップに結合させたプロテアーゼと37℃で接触させる。37℃で適 30
当な時間にわたりインキュベートし、アセトニトリルおよびフルオロ酢酸で洗浄した後、タンパク質分解性生成物を質量分析により検出することによってプロテアーゼ活性を測定する。このアッセイにより、タンパク質溶解活性とタンパク質チップに結合したプロテアーゼの特異性の双方に関する情報が得られる。

【0166】

プロテアーゼ活性分析のためのもう1つの迅速なアッセイは、既知配列のタンパク質をチップに結合させることである。基質タンパク質は、チップに結合されていない方の末端で蛍光標識する。目的のプロテアーゼと共にインキュベートすると、タンパク質分解により 40
蛍光標識が喪失して、蛍光の低下がプロテアーゼ活性の存在および程度を示すようになっている。タンパク質基質がチップのウェルに入っているビーズに結合されている同じタイプのアッセイも行うことができる。

【0167】

B. ヌクレアーゼ活性の分析

ヌクレアーゼ活性は、タンパク質プローブ／基質を核酸プローブ／基質で置き換える以外は上記でプロテアーゼ活性について記載されているのと同様にして評価される。そのようにして、ヌクレアーゼ活性により放出される蛍光タグ付け核酸断片が蛍光により検出できるか、あるいは、その核酸断片は質量分析により直接検出できる。

【0168】

C. Gタンパク質を結合させた受容体の分析

もう1つのタイプのアッセイにおいて、Gタンパク質結合受容体を結合する化合物が同定 50

される。最初に、Gタンパク質受容体をG S T融合タンパク質としてクローニングし、その際、G S Tタンパク質は、Gタンパク質のC末端に結合される。何故ならば、そのC末端は一般に、プローブ特性の決定には関与しないからである。Gタンパク質：：G S T融合タンパク質をウェルに、好ましくはグルタチオンと結合させることにより結合させる。次に、Gタンパク質受容体をコンビナトリアル化学ライブラリーまたはペプチドライブラリーのような化合物の混合物と共にインキュベートする。洗浄した後、結合したプローブを（例えば25%アセトニトリル／0.05%トリクロロ酢酸の添加により）溶出させる。次に、溶出した物質をMALDI質量分析計にローディングし、結合したプローブの性質を同定する。

【0169】

10

I X. 実施例 I V：タンパク質チップを用いた特異的インヒビターによるプロテインキナーゼ抑制の分析

以下の説明は、単に例示の目的にすぎないが、プロテインキナーゼをプロテインキナーゼインヒビターに対する感度について調べるための本発明のタンパク質チップの使用方法を提供する。タンパク質－タンパク質相互作用は通常、以下の方法または類似の方法によりアッセイできる。

【0170】

基質を、タンパク質チップ上のG P T S処理マイクロウェルの表面に室温で1時間結合させ、次に1% B S Aおよび100mM T r i s (pH 7.5)でブロッキングし、T B S緩衝液で3回洗浄した。キナーゼおよび各種濃度のキナーゼインヒビターを、³³P-γ-A T Pの存在下でマイクロウェルに加えた。リン酸化反応を30℃で30分間行った。反応が完了した後、タンパク質チップを室温でT B S緩衝液で十分に洗浄し、次に乾燥させた。タンパク質チップをX線フィルムまたはホスホイメージャーに暴露することにより、リン酸化シグナルを得た。

20

【0171】

ヒト・プロテインキナーゼA (P K A)、ヒト・m a pキナーゼ (M A P K)、3種の酵母P K A相同体 (T P K 1、T P K 2およびT P K 3)、ならびに2種の他の酵母プロテインキナーゼ (H S L 1およびR C K 1)を、2種の基質（すなわちP K Aのタンパク質基質および一般に用いられるキナーゼ基質であるM B P）について、各種濃度のP K I α（特異的なヒトP K Aインヒビター）またはS B 2 0 2 1 9 0 (M A P Kインヒビター)を用いて試験した。図7に示すように、P K I αは、両者のペプチドおよびM B P基質に対するP K A活性を特異的に抑制した。しかし、P K I αは試験した3種の酵母P K A相同体 (T P K 1、T P K 2、T P K 3)も他の2種の酵母プロテインキナーゼ (H S L 1およびR C K 1)も抑制しなかった。更に、S B 2 0 2 1 9 0はP K A活性を抑制しなかった。

30

【0172】

X. 実施例 V：ガラス表面でのキナーゼアッセイ

1. スライドガラス (F i s h e r, U S A)を28~30%の水酸化アンモニウムに室温 (「R T」)で一夜、振盪しながら浸漬した。

【0173】

40

2. そのスライドを超純水で4回、それぞれ5分間すすぎ、次に大容量の100%エタノール (「E t O H」)で濯いで、水を完全に除去した。次に、スライドを95%エタノールで3回濯いだ。

【0174】

3. スライドを1% 3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシラン (G P S T) 溶液 (95% E t O H中)、16mM酢酸 (「H O A c」)に、振盪しながら室温で1時間浸漬した。スライドを95%エタノールで室温で3回濯いだ。

【0175】

4. スライドを135℃で2時間、減圧下で硬化させた。冷却した後、スライドは、使用するまで、アルゴン中で数ヶ月間保存した。

50

【0176】

5. 約10 μ lの各タンパク質基質(40%グリセロール中)を、氷上の96ウェルPCRプレートに並べた。手動式のスポッティング装置(V&P Scientific, USA)を用いて、約3nlの各サンプルをGPTS処理スライドガラスにスポットした。1つの実施形態では、768のサンプルを1つのスライドに室温でスポットする。スライドを、覆いがかかっている清潔なチャンバー内で室温で1時間インキュベートした。

【0177】

6. スライドを10mlのブロック用緩衝液(100mM グリシン、100nM Tris, pH 8.0、50nM NaCl)で室温で1時間ブロックした。スライドをTBS緩衝液(50mM Tris, pH 8.0、150mM NaCl)で3回洗浄し、1500rpmで5分間遠心乾燥した。

【0178】

7. スライド上の基質表面を、HybriWell Sealing System (Schleicher & Schuell, ドイツ)で被覆し、プロテインキナーゼおよび標識試薬としての³³P- γ -ATPを含有する40 μ lのキナーゼ混合物を氷上の基質に添加した。

【0179】

8. 反応物を、加湿チャンバー内で30℃で30分間インキュベートした。スライドからシールを剥がし、スライドを大容量の50mM EDTA含有PBS緩衝液に浸漬した。スライドを、同じ緩衝液で更に3回×15分間、室温で洗浄した。次に、洗浄したスライドをキムワイプで乾燥した。

【0180】

9. シグナルを得るために、スライドをホスホイメージャースクリーンに暴露し、データをImageQuantソフトウェアを用いて解析した。

【0181】

XI. 引用した参考文献

本明細書中で引用した全ての参考文献は、それぞれ個々の刊行物、特許または特許出願があらゆる目的で参照によりその全体が組み入れられる、と具体的かつ個々に示されているのと同程度に、あらゆる目的で参照によりそれらの全体が本明細書に組み入れられる。

【0182】

当業者であれば理解するように、本発明の多くの改変および種々の変法が、その精神および範囲から逸脱することなしに可能である。本明細書に記載されている特定の実施形態は単なる例にすぎず、本発明は、添付の請求の範囲ならびにそのような請求の範囲が権利を有する等価物の全範囲によってのみ限定されるものとする。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1Aは、組換え法を用いて、119種の酵母プロテインキナーゼを、ガラクトース誘導型GAL10プロモーターの制御下でGST融合タンパク質を産生する高コピーURA3発現ベクター(pEGKG)にクローニングすることを説明する概略図であり、図1Bは、記載されているようにして精製したGST::キナーゼ融合タンパク質のイムノプロットを示す。

【図2】

図2Aは、キナーゼの研究に用いたタンパク質チップの製造の概略的な説明図であり、図2Bは、タンパク質チップの拡大図である。

【図3】

タンパク質チップおよびキナーゼアッセイの結果を示す図である。

【図4】

図4Aは、プロテインキナーゼ反応の定量分析の結果を示すグラフであり、図4Bは、基質特異性を調べるために算出された特異性指数(SI)を示すグラフである。

【図5】

10

20

30

40

50

図 5 A は、キナーゼのコアドメインの多重配列アライメントから誘導された系統樹であり、図 5 B は、ウサギ筋肉のホスホリラーゼキナーゼ (P H K) 2 8 の構造の概略図である。

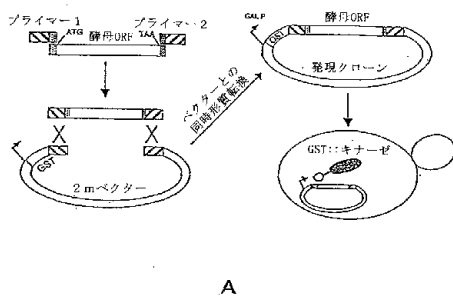
【図 6】

図 6 は、タンパク質チップの製造プロセスにおけるリソグラフィー工程の断面図である。

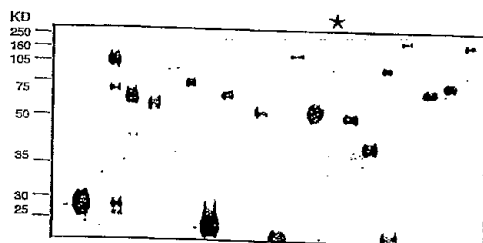
【図 7】

図 7 は、タンパク質チップ上でのキナーゼ／インヒビターアッセイの結果を示す図である。

【図 1】

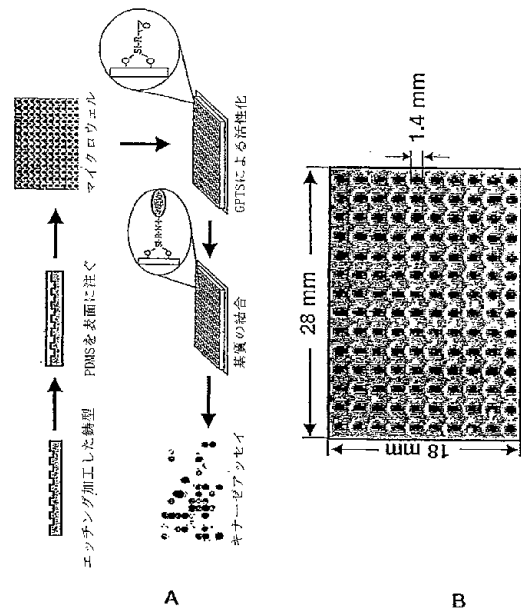


A



B

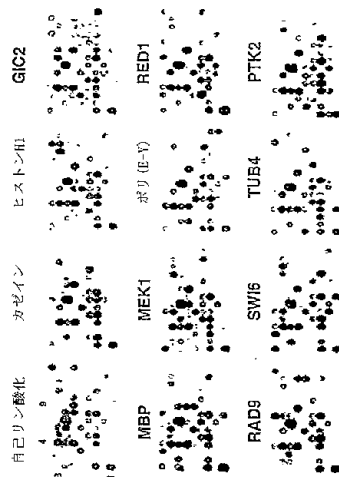
【図 2】



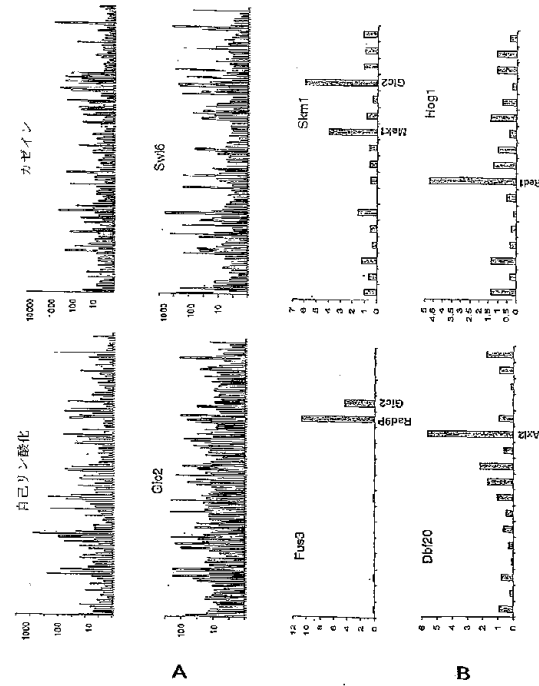
A

B

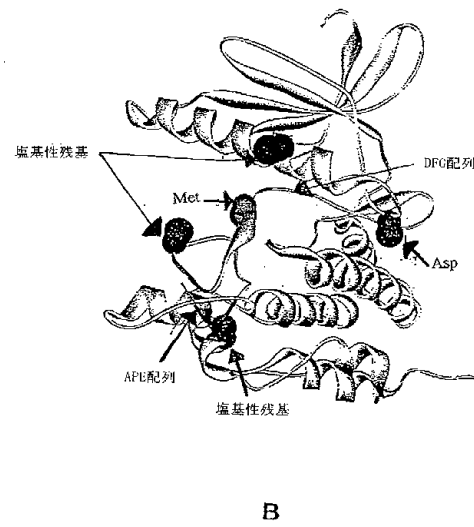
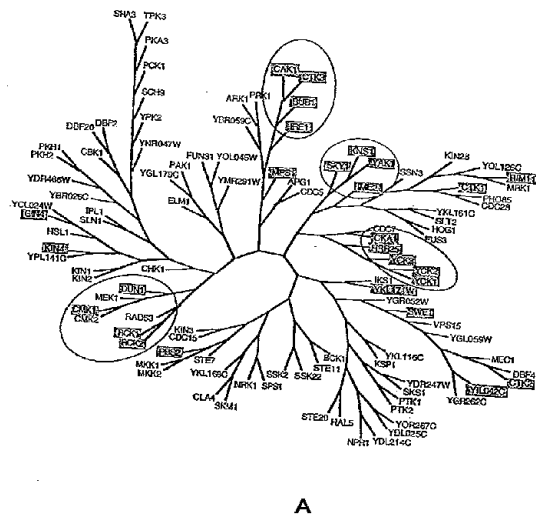
【図 3】



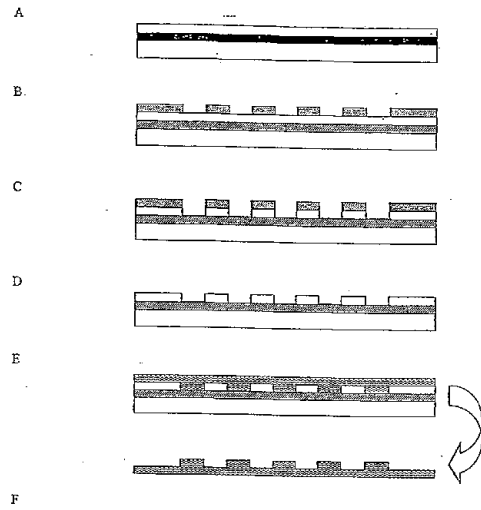
【図 4】



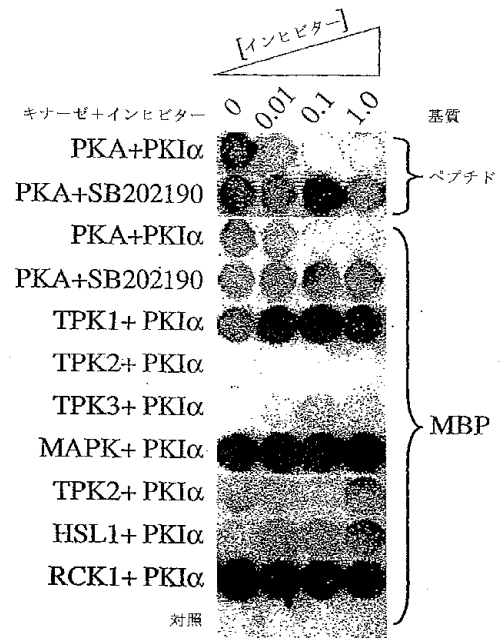
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【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
8 November 2001 (08.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/83827 A1

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68 (74) Agents: ANTILER, Adriane, M. et al., Pennie & Edwards LLP, 1155 Avenue of the Americas, New York, NY 10036 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/14526
- (22) International Filing Date: 4 May 2001 (04.05.2001) (81) Designated States (national): AB, AG, AL, AM, AI, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, NC, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TL, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/201,921 4 May 2000 (04.05.2000) US
60/221,034 27 July 2000 (27.07.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): YALE UNIVERSITY [US/US]; 451 College Street, New Haven, CT 06520 (US).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GL, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, UZ, 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, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): SNYDER, Michael [US/US]; 230 Somerset Avenue, Fairfield, CT 06430 (US); REED, Mark [US/US]; 129 Guinea Road, Monroe, CT 06068 (US); ZHU, Heng [US/US]; 48 Pease Street, New Haven, CT 06511 (US); KLEMIC, James, Frank [US/US]; 260 Willow Street, New Haven, CT 06511 (US).
- Published:
— with international search 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 01/83827 A1

(54) Title: HIGH DENSITY PROTEIN ARRAYS FOR SCREENING OF PROTEIN ACTIVITY

(57) Abstract: The present invention relates to protein chips useful for the large-scale study of protein function where the chip contains densely packed reaction wells. The invention also relates to methods of using protein chips to assay simultaneously the presence, amount, and/or function of proteins present in a protein sample or on one protein chip, or to assay the presence, relative specificity, and binding affinity of each probe in a mixture of probes for each of the proteins on the chip. The invention also relates to methods of using the protein chips for high density and small volume chemical reactions. Also, the invention relates to polymers useful as protein chip substrates and methods of making protein chips. The invention further relates to compounds useful for the derivatization of protein chip substrates.

WO 01/83827

PCT/US01/14526

**PROTEIN CHIPS FOR HIGH THROUGHPUT
SCREENING OF PROTEIN ACTIVITY**

5 This application claims the benefit under 35 U.S.C. § 119 (e) of U.S. provisional patent application Serial No. 60/201,921, filed on May 4, 2000, and U.S. provisional patent application Serial No. 60/221,034, filed on July 27, 2000, each of which is incorporated herein, by reference, in its entirety.

10 This invention was made with government support under grant numbers DARPA/ONR R13164-41600099 and NIH (National Institutes of Health) RO1CA77808. The government has certain rights in the invention.

I. Field of the Invention

15 The present invention relates to protein chips useful for the large-scale study of protein function where the chip contains densely packed reaction wells. The invention relates to methods of using protein chips to assay simultaneously the presence, amount, and/or function of proteins present in a protein sample or on one protein chip, or to assay the presence, relative specificity, and binding affinity of each probe in a mixture of probes
20 for each of the proteins on the chip. The invention also relates to methods of using the protein chips for high density and small volume chemical reactions. Also, the invention relates to polymers useful as protein chip substrates and methods of making protein chips. The invention further relates to compounds useful for the derivatization of protein chip substrates.

25

II. Background of the Invention

30 The sequencing of entire genomes has resulted in the identification of large numbers of open reading frames (ORFs). Currently, significant effort is devoted to understanding gene function by mRNA expression patterns and by gene disruption phenotypes. Important advances in this effort have been possible, in part, by the ability to analyze thousands of gene sequences in a single experiment using gene chip technology. However, much information about gene function comes from the analysis of the biochemical activities of the encoded protein.

35 Currently, these types of analyses are performed by individual investigators studying a single protein at a time. This is a very time-consuming process since it can take years to

WO 01/83827

PCT/US01/14526

purify and identify a protein based on its biochemical activity. The availability of an entire genome sequence makes it possible to perform biochemical assays on every protein encoded by the genome.

To this end, it would be useful to analyze hundreds or thousands of protein samples using a single protein chip. Such approaches lend themselves well to high throughput experiments in which large amounts of data can be generated and analyzed. Microtiter plates containing 96 or 384 wells have been known in the field for many years. However, the size (at least 12.8 cm x 8.6 cm) of these plates makes them unsuitable for the large-scale analysis of proteins because the density of wells is not high enough.

As noted above, other types of arrays have been devised for use in DNA synthesis and hybridization reactions, e.g., as described in WO 89/10977. However, these arrays are unsuitable for protein analysis in discrete volumes because the arrays are constructed on flat surfaces which tend to become cross-contaminated between features.

Photolithographic techniques have been applied to making a variety of arrays, from oligonucleotide arrays on flat surfaces (Pease *et al.*, 1994, "Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis," PNAS 91:5022-5026) to arrays of channels (U.S. Patent No. 5,843,767) to arrays of wells connected by channels (Cohen *et al.*, 1999, "A microchip-based enzyme assay for protein kinase A," Anal Biochem. 273:89-97). Furthermore, microfabrication and microolithography techniques are well known in the semiconductor fabrication area. See, e.g., Moreau, Semiconductor Lithography: Principles, Practices and Materials, Plenum Press, 1988.

Recently devised methods for expressing large numbers of proteins with potential utility for biochemical genomics in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* have been developed. ORFs have been cloned into an expression vector that uses the *GAL* promoter and fuses the protein to a polyhistidine (e.g., HISX6) label. This method has thus far been used to prepare and confirm expression of about 2000 yeast protein fusions (Heyman *et al.*, 1999, "Genome-scale cloning and expression of individual open reading frames using topoisomerase I-mediated ligation," Genome Res. 9:383-392). Using a recombination strategy, about 85% of the yeast ORFs have been cloned in frame with a GST coding region in a vector that contains the *CUP1* promoter (inducible by copper), thus producing GST fusion proteins (Martzen *et al.*, 1999, "A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products," Science 286:1153-1155). Martzen *et al.* used a pooling strategy to screen the collection of fusion proteins for several biochemical activities (e.g., phosphodiesterase and Appr-1-P-processing activities) and identified the relevant genes encoding these activities. However, strategies to analyze large numbers of individual protein samples have not been described.

WO 01/83827

PCT/US01/14526

Thus, the need exists for a protein chip in which the wells are densely packed on the chip so as to gain cost and time advantage over the prior art chips and methods.

Citation or identification of any reference in Section II or any other section of this application shall not be considered as admission that such reference is available as prior art to the present invention.

III. Summary of the Invention

The invention is directed to protein chips, *i.e.*, positionally addressable arrays of proteins on a solid support, useful for the large-scale study of protein function wherein the protein chip contains densely packed reaction wells. The invention is also directed to methods of using protein chips to assay the presence, amount, and/or functionality of proteins present in at least one sample. The invention also is directed to methods of using the protein chips for high density and small volume chemical reactions. Also, the invention is directed to polymers useful as protein chip substrates and methods of making protein chips. The invention is directed to compounds useful for the derivatization of protein chips.

In one embodiment, the present invention provides a protein chip comprising a flat surface, such as, but not limited to, glass slides. Dense protein arrays can be produced on, for example, glass slides, such that chemical reactions and assays can be conducted, thus allowing large-scale parallel analysis of the presence, amount, and/or functionality of proteins. In a specific embodiment, the flat surface array has proteins bound to its surface via a 3-glycidooxypropyltrimethoxysilane (GPTS) linker.

Furthermore, in another specific embodiment, the present invention overcomes the disadvantages and limitations of the methods and apparatus known in the art by providing protein chips with densely packed wells in which chemical reactions and assays can be conducted, thus allowing large-scale parallel analysis of the presence, amount, and/or functionality of proteins.

The general advantages of assaying arrays rather than one-by-one assays include the ability to simultaneously identify many protein-probe interactions, and to determine the relative affinity of these interactions. The advantages of applying complex mixtures of probes to a chip include the ability to detect interactions in a milieu more representative of that in a cell, and the ability to simultaneously evaluate many potential ligands.

In one embodiment, the invention is a positionally addressable array comprising a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being at a different position on

WO 01/83827

PCT/US01/14526

the solid support, wherein the plurality of substances consists of at least 100 different substances per cm².

In another embodiment, the invention is a positionally addressable array comprising a plurality of different proteins, or molecules comprising functional domains of said
5 proteins, on a solid support, with each different protein or molecule being at a different position on the solid support, wherein the plurality of different proteins or molecules consists of at least 50% of all expressed proteins with the same type of biological activity in the genome of an organism.

In yet another embodiment, the invention is a positionally addressable array
10 comprising a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being at a different position on the solid support, wherein the solid support is selected from the group consisting of ceramics, amorphous silicon carbide, castable oxides, polyimides,
15 polymethylmethacrylates, polystyrenes and silicone elastomers.

In still another embodiment, the invention is a positionally addressable array comprising a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being
20 at a different position on the solid support, wherein the plurality of different substances are attached to the solid support via a 3-glycidooxypropyltrimethoxysilane linker.

In another embodiment, the invention is an array comprising a plurality of wells on the surface of a solid support wherein the density of the wells is at least 100 wells/cm².

The present invention also relates to a method of making a positionally addressable
25 array comprising a plurality of wells on the surface of a solid support comprising the step of casting an array from a microfabricated mold designed to produce a density of greater than 100 wells/cm² on a solid surface. In another embodiment, the invention is a method of making a positionally addressable array comprising a plurality of wells on the surface of a solid support comprising the steps of casting a secondary mold from a microfabricated mold
30 designed to produce a density of wells on a solid surface of greater than 100 wells/cm² and casting at least one array from the secondary mold.

In yet another embodiment, the invention is a method of using a positionally addressable array comprising a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole
35 cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being at a different position on the solid support, wherein the plurality of different

WO 01/83827

PCT/US01/14526

substances consists of at least 100 different substances per cm^2 , comprising the steps of contacting a probe with the array, and detecting protein/probe interaction.

In still another embodiment, the invention is a method of using a positionally addressable array comprising a plurality of different proteins, or molecules comprising
5 functional domains of said proteins, on a solid support, with each different protein or molecule being at a different position on the solid support, wherein the plurality of proteins and molecules consists of at least 50% of all expressed proteins with the same type of biological activity in the genome of an organism, comprising the steps of contacting a probe with the array, and detecting protein/probe interaction.

10 In another embodiment, the invention is a method of using a positionally addressable array comprising a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being at a different position on the solid support, wherein the solid support is
15 selected from the group consisting of ceramics, amorphous silicon carbide, castable oxides, polyimides, polymethylmethacrylates, polystyrenes and silicone elastomers, comprising the steps of contacting a probe with the array, and detecting protein/probe interaction.

In yet another embodiment, the invention is a method of using a positionally addressable array comprising a plurality of different substances, selected from the group
20 consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being at a different position on the solid support, wherein the plurality of different substances are attached to the solid support via a 3-glycidooxypropyltrimethoxysilane linker, comprising the steps of contacting a probe with the array, and detecting
25 protein/probe interaction.

In still another embodiment, the invention is a method of using a positionally addressable array comprising the steps of depositing a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with
30 each different substance being at a different position on the solid support, wherein the plurality of different substances consists of at least 100 different substances per cm^2 , contacting a probe with the array, and detecting protein/probe interaction.

In a specific embodiment, the invention is a method of using a positionally addressable array comprising the steps of depositing a plurality of different substances,
35 selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with

WO 01/83827

PCT/US01/14526

each different substance being at a different position on the solid support, wherein the plurality of different substances consists of at least 100 different substances per cm^2 , and wherein the solid support is a glass slide, contacting a probe with the array, and detecting protein/probe interaction.

- 5 In another embodiment, the invention is a method of using a positionally addressable array comprising the steps of depositing a plurality of different proteins, or molecules comprising functional domains of said proteins, on a solid support, with each different protein or molecule being at a different position on the solid support, wherein the plurality of different proteins or molecules consists of at least 50% of all expressed proteins
10 with the same type of biological activity in the genome of an organism, contacting a probe with the array, and detecting protein/probe interaction.

- In another embodiment, the invention is a method of using a positionally addressable array comprising the steps of depositing a plurality of different proteins, or molecules comprising functional domains of said proteins, on a solid support, with each
15 different protein or molecule being at a different position on the solid support, wherein the plurality of different proteins or molecules consists of at least 50% of all expressed proteins with the same type of biological activity in the genome of an organism, and wherein the solid support is a glass slide, contacting a probe with the array, and detecting protein/probe interaction.

- 20 In another embodiment, the invention is a method of making a positionally addressable array comprising the steps of casting an array from a microfabricated mold designed to produce a density of wells on a solid surface of greater than 100 wells/ cm^2 and depositing in the wells a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and
25 protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substances being in a different well on the solid support.

- In another embodiment, the invention is a method of making a positionally addressable array comprising the steps of casting a secondary mold from a microfabricated mold designed to produce a density of wells on a solid surface of greater than 100
30 wells/ cm^2 , casting at least one array from the secondary mold, and depositing in the wells a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, not attached to a solid support, with each different substances being in a different well.

- 35 In yet another embodiment, the invention is a method of making a positionally addressable array comprising the steps of casting a secondary mold from a microfabricated

WO 01/83827

PCT/US01/14526

mold designed to produce a density of wells on a solid surface of greater than 100 wells/cm², casting at least one array from the secondary mold, and depositing in the wells a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, with each different substance being in a different well.

A. Definitions

As used in this application, "protein" refers to a full-length protein, portion of a protein, or peptide. Proteins can be prepared from recombinant overexpression in an organism, preferably bacteria, yeast, insect cells or mammalian cells, or produced via fragmentation of larger proteins, or chemically synthesized.

As used in this application, "functional domain" is a domain of a protein which is necessary and sufficient to give a desired functional activity. Examples of functional domains include, *inter alia*, domains which exhibit kinase, protease, phosphatase, glycosidase, acetylase, transferase, or other enzymatic activity. Other examples of functional domains include those domains which exhibit binding activity towards DNA, RNA, protein, hormone, ligand or antigen.

As used in this application, "probe" refers to any chemical reagent which binds to a nucleic acid (e.g., DNA or RNA) or protein. Examples of probes include, *inter alia*, other proteins, peptides, oligonucleotides, polynucleotides, DNA, RNA, small molecule substrates and inhibitors, drug candidates, receptors, antigens, hormones, steroids, phospholipids, antibodies, cofactors, cytokines, glutathione, immunoglobulin domains, carbohydrates, maltose, nickel, dihydrotrypsin, and biotin.

Each protein or probe on a chip is preferably located at a known, predetermined position on the solid support such that the identity of each protein or probe can be determined from its position on the solid support. Further, the proteins and probes form a positionally addressable array on a solid support.

IV. Brief Description of the Drawings

Figure 1a. Using the depicted recombination strategy, 119 yeast protein kinases were cloned in a high copy *URA3* expression vector (pEGKG) that produces GST fusion proteins under the control of the galactose-inducible *GAL10* promoter. GST::kinase

WO 01/83827

PCT/US01/14526

constructs were rescued into *E. coli*, and sequences at the 5'-end of each construct were determined. The whole procedure was repeated when mutations were discovered.

Figure 1b. Immunoblots of GST:kinase fusion proteins purified as described.

- 5 From three attempts, 106 kinase proteins were purified. In spite of repeated attempts, the last 14 of 119 GST fusions were undetectable by immunoblotting analysis, (e.g., Mps1 in the lane labeled with star).

- Figure 2a.** The protein chips used in the kinase study were produced according to the following process, schematically depicted. The polydimethylsiloxane (PDMS) was poured over an acrylic master mold. After curing, the chip containing the wells was peeled away and mounted on a glass slide. Next, the surface of the chip was derivatized and proteins were then attached to the wells. Wells were first blocked with 1% BSA, after which kinase, 32 P-ATP, and buffer were added. After incubation for 30 minutes at 30°C, the protein chips were washed extensively, and exposed to both X-ray film and a Molecular Dynamics PhosphorImager, which has a resolution of 50 μ m and is quantitative. For twelve substrates, each kinase assay was repeated at least twice; for the remaining five substrates, the assays were performed once.

- 20 **Figure 2b.** An enlarged picture of a protein chip.

- Figure 3.** Protein chip and kinase assay results. Position I9 on every chip indicates the signal of negative control. Mps1 at position B4 showed strong kinase activities in all 12 kinase reactions, although no visible signal could be detected on a western blot (Figure 1b).

- 25 **Figure 4a.** Quantitative analysis of protein kinase reactions. Kinase activities were determined using a Molecular Dynamics PhosphorImager, and the data were exported into an Excel spreadsheet. The kinase signals were then transformed into fold increases by normalizing the data against negative control. Signals of 119 kinases in four reactions are shown in log scale. The fold increases ranges from 1 to 1000 fold.

- Figure 4b.** To determine substrate specificity, specificity index (SI) was calculated using the following formula: $SI_{ir} = F_{ir} / [(F_{i1} + F_{i2} + \dots + F_{ir}) / r]$, where i represents the identity of the kinase used, r represents the identity of the substrate, and F_{ir} represents the fold increase of a kinase i on substrate r compared with GST alone. Several examples of kinase specificity are shown when SI is greater than three.

WO 01/83827

PCT/US01/14526

Figure 5a. Phylogenetic tree derived from the kinase core domain multiple sequence alignment, illustrating the correlation between functional specificity and amino sequences of the poly(Tyr-Glu) kinases. Kinases that can use poly(Thr-Glu) as a substrate often map to specific regions on a sequence comparison dendrogram. The kinases that efficiently phosphorylate poly(Tyr-Glu) are indicated by shading; two kinases that weakly use this substrate are indicated in boxes. Rad53 and Sic7, which could not phosphorylate poly(Tyr-Glu), are indicated by asterisks. As shown, 70% of these kinases lie in four sequence groups (circled).

Figure 5b. Structure of the rabbit muscle phosphorylase kinase (PHK)28. The positions of three basic residues and a methionine (Met) residue, which are preferentially found in kinases that can use poly(Tyr-Glu) as a substrate, are indicated. The asparagine (Asp) residue is usually found in kinases that do not use poly(Tyr-Glu).

Figure 6. Cross sectional views of lithographic steps in a process of making protein chips.

- a. A silicon wafer with two layers of silicon on either side of an oxide layer.
- b. The silicon wafer with a resistant mask layer on top.
- c. The etching process removes silicon where the surface is unprotected by the resistant mask. The depth of the etching is controlled by the position of the oxide layer, *i.e.*, the etching process does not remove the oxide layer.
- d. The mask layer is removed, leaving the etched silicon wafer.
- e. The protein chip material is applied to the mold.
- f. After curing, the protein chip is removed from the mold. The protein chip has an image that is the negative of the mold.

Figure 7. Kinase/inhibitor assays on a protein chip. A human protein kinase A (PKA), a human map kinase (MAPK), three yeast PKA homologs (TPK1, TPK2 and TPK3), and two other yeast protein kinases (HSL1 and RCK1) were tested against two substrates (*i.e.*, a protein substrate for PKA and a commonly used kinase substrate, MBP) using different concentrations of a specific human PKA inhibitor, PKI α , or a MAPK inhibitor, SB202190. As shown in the figure, PKI α can specifically inhibit PKA activities using both peptide and MBP as substrates. However, SB202190 did not show any inhibitory effect on PKA activity. It is also interesting to note that PKI α did not inhibit the three yeast PKA homologs (TPK1, TPK2, TPK3) or the other two yeast protein kinases tested, HSL1 and RCK1.

WO 01/83827

PCT/US01/14526

V. Detailed Description of the Invention

The invention is directed to protein chips, *i.e.*, positionally addressable arrays of proteins on a solid support, useful for the large-scale study of protein function, wherein the protein chip contains densely packed reaction wells. A positionally addressable array provides a configuration such that each probe or protein of interest is located at a known, predetermined position on the solid support such that the identity of each probe or protein can be determined from its position on the array. The invention is also directed to methods of using protein chips to assay the presence, amount, and/or functionality of proteins present in at least one sample. The invention also is directed to methods of using the protein chips for high density and small volume chemical reactions. Also, the invention is directed to polymers useful as protein chip substrates and methods of making protein chips. The invention further relates to compounds useful for the derivatization of protein chip substrate.

In one embodiment, the invention is a positionally addressable array comprising a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being at a different position on the solid support, wherein the plurality of different substances consists of at least 100 different substances per cm^2 . In one embodiment, said plurality of different substances consists of between 100 and 1000 different substances per cm^2 . In another embodiment, said plurality of different substances consists of between 1000 and 10,000 different substances per cm^2 . In another embodiment, said plurality of different substances consists of between 10,000 and 100,000 different substances per cm^2 . In yet another embodiment, said plurality of different substances consists of between 100,000 and 1,000,000 different substances per cm^2 . In yet another embodiment, said plurality of different substances consists of between 1,000,000 and 10,000,000 different substances per cm^2 . In yet another embodiment, said plurality of different substances consists of between 10,000,000 and 25,000,000 different substances per cm^2 . In yet another embodiment, said plurality of different substances consists of at least 25,000,000 different substances per cm^2 . In yet another embodiment, said plurality of different substances consists of at least 10,000,000,000 different substances per cm^2 . In yet another embodiment, said plurality of different substances consists of at least 10,000,000,000,000 different substances per cm^2 .

In another embodiment, the invention is a positionally addressable array comprising a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular

WO 01/83827

PCT/US01/14526

material, on a solid support, with each different substance being at a different position on the solid support, wherein the plurality of different substances consists of at least 100 different substances per cm^2 , and wherein the solid support is a glass slide.

In another embodiment, the invention is a positionally addressable array comprising
 5 a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being at a different position on the solid support, wherein the plurality of different substances consists of about 30 to 100 different substances per cm^2 . In a specific embodiment, said plurality of different
 10 substances consists of 30 different substances per cm^2 . In a particular embodiment, said plurality of different substances consists of between 30 and 50 different substances per cm^2 . In another particular embodiment, said plurality of different substances consists of between 50 and 100 different substances per cm^2 .

In various specific embodiments, the invention is a positionally addressable array
 15 comprising a plurality of different proteins, or molecules comprising functional domains of said proteins, on a solid support, with each different protein or molecule being at a different position on the solid support, wherein the plurality of different proteins or molecules consists of at least 50%, 75%, 90%, or 95% of all expressed proteins with the same type of biological activity in the genome of an organism. For example, such organism can be
 20 eukaryotic or prokaryotic, and is preferably a mammal, a human or non-human animal, primate, mouse, rat, cat, dog, horse, cow, chicken, fungus such as yeast, *Drosophila*, *C. elegans*, etc. Such type of biological activity of interest can be, but is not limited to, enzymatic activity (e.g., kinase activity, protease activity, phosphatase activity, glycosidase, acetylase activity, and other chemical group transferring enzymatic activity), nucleic acid
 25 binding, hormone binding, etc.

A. Production of Protein Chips

The protein chips with densities of wells in an array of the present invention are
 30 preferably cast from master molds which have been stamped, milled, or etched using conventional microfabrication or microlithographic techniques. Preferably conventional microlithographic techniques and materials are utilized in the production of the master molds. Once a master mold has been produced, the master mold may then be used directly to mold the protein chips per se. Alternatively, secondary or tertiary molds can be cast from
 35 the master mold and the protein chips cast from these secondary or tertiary molds.

WO 01/83827

PCT/US01/14526

The master mold can be made from any material that is suitable for microfabrication or microlithography, with silicon, glass, quartz, polyimides, and polymethylmethacrylate (Lucite) being preferred. For microlithography, the preferred material is silicon wafers.

Once the appropriate master, secondary, or tertiary mold has been produced, the protein chip is cast. The protein chip can be cast in any solid support that is suitable for casting, including either porous or non-porous solid supports. Ceramics, amorphous silicon carbide, castable oxides that produce casts of SiO₂ when cured, polyimides, polymethylmethacrylates, and polystyrenes are preferred solid supports, with silicone elastomeric materials being most preferred. Of the silicone elastomeric materials, polydimethylsiloxane (PDMS) is the most preferred solid support. An advantage of silicone elastomeric materials is the ease with which they are removed from the mold due to their flexible nature.

Figure 6 illustrates an example of one method useful for realizing high-density arrays of wells on protein chips according to this invention. A silicon wafer with an oxide layer sandwiched between layers of silicon is provided (Figure 6a). Known as silicon-on-insulator or SOI wafers, these wafers are commonly available from wafer supply companies (e.g., Belle Mead Research, Belle Mead, NJ, and Virginia Semiconductor, Fredericksburg, VA).

The silicon wafer is then patterned and etched via an etch process (Figures 6b-d). The buried oxide layer acts as a very effective etch stop and results in highly uniform etch depth across the wafer. Etch depth is independent of the etch process and merely is determined by the thickness of the top silicon layer.

A wet chemical etch process (e.g., using KOH or tetra-methyl hydrazine (TMAH)) can be utilized. However, this technique is slightly more dependent on the crystal orientation of the silicon wafer. Thus, a technique using a rarefied gas (typically SF₆) in a reactive ion etch (RIE) is preferred. RIE etching techniques are capable of realizing highly anisotropic wells in silicon that are independent of the crystal orientation of the silicon wafer. The references G. Kovacs, *Micromachined Transducers Sourcebook*, Academic Press (1998) and M. Madou, *Fundamentals of Microfabrication*, CRC Press (1997) provide background on etching techniques.

Both types of microlithography can be utilized on a single chip to obtain the desired combination of well shapes. Wet-chemical etching is an isotropic process which gives U-shaped wells, while RIE is an anisotropic process which gives square bottomed wells.

After etching the wafer to realize a master mold, it can be used to cast protein chips (Figures 6e-f). These structures can be the protein chips or themselves be secondary or tertiary molds from which additional casting of protein chips occurs.

WO 01/83827

PCT/US01/14526

Thus, in one embodiment, a method of making a positionally addressable array, comprising a plurality of wells on the surface of a solid support, comprises casting an array from a microfabricated mold designed to produce a density of wells on a solid surface of greater than 100 wells/cm². In another embodiment, a method of making a positionally addressable array, comprising a plurality of wells on the surface of a solid support, comprises casting a secondary mold from said microfabricated mold designed to produce a density of wells on a solid surface of greater than 100 wells/cm² and casting at least one array from the secondary mold. In yet another embodiment, a method of making a positionally addressable array comprises covering the mold with a liquid cast material, and curing the cast material until the cast is solid. The liquid cast material is preferably silicone elastomer, most preferably polydimethylsiloxane. Into any of these positionally addressable arrays, a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, can be deposited such that each different substance is found in a different well on the solid support.

B. Features of Protein Chips

The protein chips of the present invention are not limited in their physical dimensions and may have any dimensions that are convenient. For the sake of compatibility with current laboratory apparatus, protein chips the size of a standard microscope slide or smaller are preferred. Most preferred are protein chips sized such that two chips fit on a microscope slide. Also preferred are protein chips sized to fit into the sample chamber of a mass spectrometer.

The wells in the protein chips of the present invention may have any shape such as rectangular, square, or oval, with circular being preferred. The wells in the protein chips may have square or round bottoms, V-shaped bottoms, or U-shaped bottoms. Square bottoms are slightly preferred because the preferred reactive ion etch (RIE) process, which is anisotropic, provides square-bottomed wells. The shape of the well bottoms need not be uniform on a particular chip, but may vary as required by the particular assay being carried out on the chip.

The wells in the protein chips of the present invention may have any width-to-depth ratio, with ratios of width-to-depth between about 10:1 and about 1:10 being preferred. The wells in the protein chips of the present invention may have any volume, with wells having volumes of between 1 pL and 5 μ L preferred and wells having volumes of between 1 nL and 1 μ L being more preferred. The most preferred volume for a well is between 100 nL and 300

WO 01/83827

PCT/US01/14526

nl. For protein chips with very high densities of wells, the preferred volume of a well is between 10 pl and 100 nl.

The protein chips of the invention can have a wide variety of density of wells/cm². The preferred density of wells is between about 25 wells/cm² and about 10,000,000,000 wells/cm². Densities of wells on protein chips cast from master molds of laser milled Lucite are generally between 1 well/cm² and 2,500 wells/cm². Appropriate milling tools produce wells as small as 100 μm in diameter and 100 μm apart. Protein chips cast from master mold etched by wet-chemical microlithographic techniques have densities of wells generally between 50 wells/cm² and 10,000,000,000 wells/cm². Wet-chemical etching can produce wells that are 10 μm deep and 10 μm apart, which in turn produces wells that are less than 10 μm in diameter. Protein chips cast from master mold etched by RIE microlithographic techniques have densities of wells generally between 100 wells/cm² and 25,000,000 wells/cm². RIE in combination with optical lithography can produce wells that are 500 nm in diameter and 500 nm apart. Use of electron beam lithography in combination with RIE can produce wells 50 nm in diameter and 50 nm apart. Wells of this size and with equivalent spacing produces protein chips with densities of wells 10,000,000,000 wells/cm². Preferably, RIE is used to produce wells of 20 μm in diameter and 20 μm apart. Wells of this size that are equivalently spaced will result in densities of 25,000,000 wells/cm².

The microfabrication and microlithographic techniques described above have been used successfully to wet-chemically etch silicon wafers with well sizes of 560 μm or 280 μm with spacing of about 1 mm. This combination of wells and spacing produces arrays of about 410,000 wells/cm² and about 610,000 wells/cm², respectively. When well size and spacing are equivalent, protein chips with about 3.19 million wells/cm² and 12.75 million wells/cm² are produced.

In one embodiment, the array comprises a plurality of wells on the surface of a solid support wherein the density of wells is at least 100 wells/cm². In another embodiment, said density of wells is between 100 and 1000 wells/cm². In another embodiment, said density of wells is between 1000 and 10,000 wells/cm². In another embodiment, said density of wells is between 10,000 and 100,000 wells/cm². In yet another embodiment, said density of wells is between 100,000 and 1,000,000 wells/cm². In yet another embodiment, said density of wells is between 1,000,000 and 10,000,000 wells/cm². In yet another embodiment, said density of wells is between 10,000,000 and 25,000,000 wells/cm². In yet another embodiment, said density of wells is at least 25,000,000 wells/cm². In yet another embodiment, said density of wells is at least 10,000,000,000 wells/cm². In yet another embodiment, said density of wells is at least 10,000,000,000,000 wells/cm².

WO 01/83827

PCT/US01/14526

C. Utilization of Protein Chips

In one embodiment, the present invention provides a protein chip comprising a flat surface, such as, but not limited to, glass slides. Dense protein arrays can be produced on, for example, glass slides, such that chemical reactions and assays can be conducted, thus allowing large-scale parallel analysis of the presence, amount, and/or functionality of proteins (e.g., protein kinases). Proteins or probes are bound covalently or non-covalently to the flat surface of the solid support. The proteins or probes can be bound directly to the flat surface of the solid support, or can be attached to the solid support through a linker molecule or compound. The linker can be any molecule or compound that derivatizes the surface of the solid support to facilitate the attachment of proteins or probes to the surface of the solid support. The linker may covalently or non-covalently bind the proteins or probes to the surface of the solid support. In addition, the linker can be an inorganic or organic molecule. Preferred linkers are compounds with free amines. Most preferred among linkers is 3-glycidooxypropyltrimethoxysilane (GPTS).

In another embodiment, the protein chips of the present invention have several advantages over flat surface arrays. Namely, the use of wells eliminates or reduces the likelihood of cross-contamination with respect to the contents of the wells. Another advantage over flat surfaces is increased signal-to-noise ratios. Wells allow the use of larger volumes of reaction solution in a denser configuration, and therefore greater signal is possible. Furthermore, wells decrease the rate of evaporation of the reaction solution from the chip as compared to flat surface arrays, thus allowing longer reaction times.

Another advantage of wells over flat surfaces is that the use of wells permit association studies using a fixed, limited amount of probe for each well on the chip, whereas the use of flat surfaces usually involves indiscriminate probe application across the whole substrate. When a probe in a mixture of probes has a high affinity, but low specificity, the indiscriminate application of the probe mixture across the substrate will saturate many of the proteins with the high affinity probe. This saturation effectively limits the detection of other probes in the mixture. By using wells, a limited amount of a probe can be applied to individual wells on the chip. Thus, the amount of the probe applied to individual proteins can be controlled, and the probe can be different for different proteins (situated in different wells).

Once a protein chip is produced as described above, it can be used to conduct assays and other chemical reactions. For assays, proteins or probes will generally be placed in the wells. The presence or absence of proteins or probes will be detected by the application of probes or proteins, respectively, to the protein chip. The protein-probe interaction can be

WO 01/83827

PCT/US01/14526

visualized using a variety of techniques known in the art, some of which are discussed below.

Proteins useful in this invention can be fusion proteins, in which a defined domain is attached to one of a variety of natural proteins, or can be intact non-fusion proteins.

5 In another embodiment, protein-containing cellular material, such as but not limited to vesicles, endosomes, subcellular organelles, and membrane fragments, can be placed on the protein chip (e.g., in wells). In another embodiment, a whole cell is placed on the protein chip (e.g., in wells). In a further embodiment, the protein, protein-containing cellular material, or whole cell is attached to the solid support of the protein chip.

10 The protein can be purified prior to placement on the protein chip or can be purified during placement on the chip via the use of reagents that bind to particular proteins, which have been previously placed on the protein chip. Partially purified protein-containing cellular material or cells can be obtained by standard techniques (e.g., affinity or column chromatography) or by isolating centrifugation samples (e.g., P1 or P2 fractions).

15 Furthermore, proteins, protein-containing cellular material, or cells can be embedded in artificial or natural membranes prior to or at the time of placement on the protein chip. In another embodiment, proteins, protein-containing cellular material, or cells can be embedded in extracellular matrix component(s) (e.g., collagen or basal lamina) prior to or at the time of placement on the protein chip. The proteins of the invention can be in solution, 20 or bound to the surface of the solid support (e.g., in a well, or on a flat surface), or bound to a substrate (e.g., bead) placed in a well of the solid support.

The placement of proteins or probes in the wells can be accomplished by using any dispensing means, such as bubble jet or ink jet printer heads. A micropipette dispenser is preferred. The placement of proteins or probes can either be conducted manually or the 25 process can be automated through the use of a computer connected to a machine.

Since the wells are self-contained, the proteins or probes need not be attached or bound to the surface of the solid support, but rather the proteins or probes can simply be placed in the wells, or bound to a substrate (e.g., bead) that is placed in the wells. Other substrates include, but are not limited to, nitrocellulose particles, glass beads, plastic beads, 30 magnetic particles, and latex particles. Alternatively, the proteins or probes are bound covalently or non-covalently to the surface of the solid support in the wells. The proteins or probes can be bound directly to the surface of the solid support (in the well), or can be attached to the solid support through a linker molecule or compound. The linker can be any molecule or compound that derivatizes the surface of the solid support to facilitate the 35 attachment of proteins or probes to the surface of the solid support. The linker may covalently bind the proteins or probes to the surface of the solid support or the linker may

WO 01/83827

PCT/US01/14526

bind via non-covalent interactions. In addition, the linker can be an inorganic or organic molecule. Preferred linkers are compounds with free amines. Most preferred among linkers is 3-glycidooxypropyltrimethoxysilane (GPTS).

Proteins or probes which are non-covalently bound to the well surface may utilize a variety of molecular interactions to accomplish attachment to the well surface such as, for example, hydrogen bonding, van der Waals bonding, electrostatic, or metal-chelate coordinate bonding. Further, DNA-DNA, DNA-RNA and receptor-ligand interactions are types of interactions that utilize non-covalent binding. Examples of receptor-ligand interactions include interactions between antibodies and antigens, DNA-binding proteins and DNA, enzyme and substrate, avidin (or streptavidin) and biotin (or biotinylated molecules), and interactions between lipid-binding proteins and phospholipid membranes or vesicles. For example, proteins can be expressed with fusion protein domains that have affinities for a substrate that is attached to the surface of the well. Suitable substrates for fusion protein binding include trypsin/anthrotrypsin, glutathione, immunoglobulin domains, maltose, nickel, or biotin and its derivatives, which bind to bovine pancreatic trypsin inhibitor, glutathione-S-transferase, antigen, maltose binding protein, poly-histidine (e.g., HisX6 tag), and avidin/streptavidin, respectively.

D. Assays on Protein Chips

In one embodiment, the protein chips are used in assays by using standard enzymatic assays that produce chemiluminescence or fluorescence. Detection of various proteins and molecular modifications can be accomplished using, for example, photoluminescence, fluorescence using non-protein substrates, enzymatic color development, mass spectroscopic signature markers, and amplification (e.g., by PCR) of oligonucleotide tags. Thus, protein/probe interaction can be detected by, *inter alia*, chemiluminescence, fluorescence, radiolabeling, or atomic force microscopy. Probes binding to specific elements in the array can also be identified by direct mass spectrometry. For example, probes released into solution by non-degradative methods, which dissociate the probes from the array elements, can be identified by mass spectrometry (see, e.g., WO 98/59361). In another example, peptides or other compounds released into solution by enzymatic digests of the array elements can be identified by mass spectrometry.

The types of assays fall into several general categories. As a first example, each well on the array is exposed to a single probe whose binding is detected and quantified. The results of these assays are visualized by methods including, but not limited to: 1) using radioactively labeled ligand followed by autoradiography and/or phosphorimager analysis;

WO 01/83827

PCT/US01/14526

- 2) binding of hapten, which is then detected by a fluorescently labeled or enzymatically labeled antibody or high affinity hapten ligand such as biotin or streptavidin; 3) mass spectrometry; 4) atomic force microscopy; 5) fluorescent polarization methods; 6) rolling circle amplification-detection methods (Hatch et al., 1999, "Rolling circle amplification of DNA immobilized on solid surfaces and its application to multiplex mutation detection", Genet. Anal. 15(2):35-40); 7) competitive PCR (Fini et al., 1999, "Development of a chemiluminescence competitive PCR for the detection and quantification of parvovirus B19 DNA using a microplate luminometer", Clin Chem. 45(9):1391-6; Kruse et al., 1999, "Detection and quantitative measurement of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) gene expression using a semi-nested competitive PCR assay", Cytokine 11(2):179-85; Guenther and Hart, 1998, "Quantitative, competitive PCR assay for HIV-1 using a microplate-based detection system", Biotechniques 24(5):810-6); 8) colorimetric procedures; and 9) biological assays, e.g., for virus titers.

- As a second example, each well on the array is exposed to multiple probes concurrently, including pooling of probes from several sources, whose binding is detected and quantified. The results of these assays are visualized by methods including, but not limited to: 1) mass spectrometry; 2) atomic force microscopy; 3) infrared red or fluorescently labeled compounds or proteins; 4) amplifiable oligonucleotides, peptides or molecular mass labels; and 5) by stimulation or inhibition of the protein's enzymatic activity. Information is gleaned from mixtures of probes because of the positionally addressable nature of the arrays of the present invention, *i.e.*, through the placement of defined proteins at known positions on the protein chip, information about to what the bound probe binds is known. If so desired, positions on the array that demonstrate binding can then be probed with individual probes to identify the specific interaction of interest.
- Useful information also can be obtained, for example, by incubating a protein chip with cell extracts, wherein each well on the chip contains a reaction mix to assay an enzymatic activity of interest, and wherein a plurality of different enzymatic and/or substrate activities are assayed, and thereby identifying and measuring the cellular repertoire of particular enzymatic activities. Similarly, the protein chip can be incubated with whole cells or preparations of plasma membranes to assay, for example, for expression of membrane-associated proteins or molecules, or binding properties of cell surface proteins or molecules. Cells, markers on a cell, or substances secreted by a cell that bind to particular locations on the protein chip can be detected using techniques known in the art. For example, protein chips containing arrays of antigens can be screened with B-cells or T-cells, wherein the antigens are selected from the group consisting of synthetic antigens, tissue-specific antigens, disease-specific antigens, antigens of pathogens, and antigens of

WO 01/83827

PCT/US01/14526

autologous tissues. The antigen or antigenic determinant recognized by the lymphocytes can be determined by establishing at what position on the array activation of the cells by antigen occurs. Lymphocyte activation can be assayed by various means including, but not limited to, detecting antibody synthesis, detecting or measuring incorporation of ³H-thymidine, probing of cell surface molecules with labeled antibodies to identify molecules induced or suppressed by antigen recognition and activation (e.g., IgD, C3b receptor, IL-2 receptor, transferrin receptor, membrane class II MHC molecules, CD23, CD38, PCA-1 molecules, HLA-DR), and identify expressed and/or secreted cytokines.

In another example, mitogens for a specific cell-type can be determined by incubating the cells with protein chips containing arrays of putative mitogens, comprising the steps of contacting a positionally addressable array with a population of cells; said array comprising a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being at a different position on the solid support, wherein the density of different substances is at least 100 different substances per cm²; and detecting positions on the solid support where mitogenic activity is induced in a cell. Cell division can be assayed by, for example, detecting or measuring incorporation of ³H-thymidine by a cell. Cells can be of the same cell type (i.e., a homogeneous population) or can be of different cell types.

In yet another example, cellular uptake and/or processing of proteins on the protein chips can be assayed by, for example, using radioactively labeled protein substrates and measuring either a decrease in radioactive substrate concentration or uptake of radioactive substrate by the cells. These assays can be used for either diagnostic or therapeutic purposes. One of ordinary skill in the art can appreciate many appropriate assays for detecting various types of cellular interactions.

Thus, use of several classes of probes (e.g., known mixtures of probes, cellular extracts, subcellular organelles, cell membrane preparations, whole cells, etc.) can provide for large-scale or exhaustive analysis of cellular activities. In particular, one or several screens can form the basis of identifying a "footprint" of the cell type or physiological state of a cell, tissue, organ or system. For example, different cell types (either morphological or functional) can be differentiated by the pattern of cellular activities or expression determined by the protein chip. This approach also can be used to determine, for example, different stages of the cell cycle, disease states, altered physiologic states (e.g., hypoxia), physiological state before or after treatment (e.g., drug treatment), metabolic state, stage of differentiation or development, response to environmental stimuli (e.g., light, heat), cell-cell

WO 01/83827

PCT/US01/14526

interactions, cell-specific gene and/or protein expression, and disease-specific gene and/or protein expression.

Enzymatic reactions can be performed and enzymatic activity measured using the protein chips of the present invention. In a specific embodiment, compounds that modulate the enzymatic activity of a protein or proteins on a chip can be identified. For example, changes in the level of enzymatic activity are detected and quantified by incubation of a compound or mixture of compounds with an enzymatic reaction mixture in wells of the protein chip, wherein a signal is produced (e.g., from substrate that becomes fluorescent upon enzymatic activity). Differences between the presence and absence of the compound are noted. Furthermore, the differences in effects of compounds on enzymatic activities of different proteins are readily detected by comparing their relative effect on samples within the protein chips and between chips.

The variety of strategies of using the high density protein chips of the present invention, detailed above, can be used to determine various physical and functional characteristics of proteins. For example, the protein chips can be used to assess the presence and amount of protein present by probing with an antibody. In one embodiment, a polydimethylsiloxane (PDMS) chip of GST fusion proteins can be probed to determine the presence of a protein and/or its level of activity. The protein can be detected using standard detection assays such as luminescence, chemiluminescence, fluorescence or chemifluorescence. For example, a primary antibody to the protein of interest is recognized by a fluorescently labeled secondary antibody, which is then measured with an instrument (e.g., a Molecular Dynamics scanner) that excites the fluorescent product with a light source and detects the subsequent fluorescence. For greater sensitivity, a primary antibody to the protein of interest is recognized by a secondary antibody that is conjugated to an enzyme such as alkaline phosphatase or horseradish peroxidase. In the presence of a luminescent substrate (for chemiluminescence) or a fluorogenic substrate (for chemifluorescence), enzymatic cleavage yields a highly luminescent or fluorescent product which can be detected and quantified by using, for example, a Molecular Dynamics scanner. Alternatively, the signal of a fluorescently labeled secondary antibody can be amplified using an alkaline phosphatase-conjugated or horseradish peroxidase-conjugated tertiary antibody.

Identifying substrates of protein kinases, phosphatases, proteases, glycosidases, acetylases, or other group transferring enzymes can also be conducted on the protein chips of the present invention. For example, a wide variety of different probes are attached to the protein chip and assayed for their ability to act as a substrate for particular enzyme(s), e.g., assayed for their ability to be phosphorylated by protein kinases. Detection methods for

WO 01/83827

PCT/US01/14526

kinase activity, include, but are not limited to, the use of radioactive labels, such as ^{32}P -ATP and ^{35}S - γ -ATP, or fluorescent antibody probes that bind to phosphoamino acids. For example, whereas incorporation into a protein of radioactively labeled phosphorus indicates kinase activity in one assay, another assay can measure the release of radioactively labeled phosphorus into the media, which indicates phosphatase activity. In another example, protease activity can be detected by identifying, using standard assays (e.g., mass spectrometry, fluorescently labeled antibodies to peptide fragments, or loss of fluorescence signal from a fluorescently tagged substrate), peptide fragments that are produced by protease activity and released into the media. Thus, activity of group-transferring enzymes can be assayed readily using several approaches and many independent means of detection, which would be appreciated by one of ordinary skill in the art.

Protein chips can be used to identify proteins on the chip that have specific activities such as specific kinases, proteases, nucleic acid binding properties, nucleotide hydrolysis, hormone binding and DNA binding. Thus, the chip can be probed with a probe that will indicate the presence of the desired activity. For example, if DNA binding is the activity of interest, the chip containing candidate DNA-binding proteins is probed with DNA.

The search for probes (natural or synthetic) that are protein or nucleic acid ligands for an array of proteins can be carried out in parallel on a protein chip. A probe can be a cell, protein-containing cellular material, protein, oligonucleotide, polynucleotide, DNA, RNA, small molecule substrate, drug candidate, receptor, antigen, steroid, phospholipid, antibody, immunoglobulin domain, glutathione, maltose, nickel, dihydrotrypsin, or biotin. Alternatively, the probe can be an enzyme substrate or inhibitor. For example, the probe can be a substrate or inhibitor of an enzyme chosen from the group consisting of kinases, phosphatases, proteases, glycosidases, acetylases, and other group transferring enzymes. After incubation of proteins on a chip with combinations of nucleic acid or protein probes, the bound nucleic acid or protein probes can be identified by mass spectrometry (Lahey et al., 1998, "Measuring protein-protein interactions", *Curr Opin Struct Biol.* 8:119-23).

The identity of target proteins from pathogens (e.g., an infectious disease agent such as a virus, bacterium, fungus, or parasite) or target proteins from abnormal cells (e.g., neoplastic cells, diseased cells, or damaged cells) that serve as antigens in the immune response of recovering or non-recovering patients can be determined by using a protein chip of the invention. For example, lymphocytes isolated from a patient can be used to screen protein chips comprising arrays of a pathogen's proteins on a protein chip. In general, these screens comprise contacting a positionally addressable array with a plurality of lymphocytes, said array comprising a plurality of potential antigens on a solid support, with each different antigen being at a different position on the solid support, wherein the density

WO 01/83827

PCT/US01/14526

of different antigens is at least 100 different antigens per cm^2 , and detecting positions on the solid support where lymphocyte activation occurs. In a specific embodiment, lymphocytes are contacted with a pathogen's proteins on an array, after which activation of B-cells or T-cells by an antigen or a mixture of antigens is assayed, thereby identifying target antigens
5 derived from a pathogen.

Alternatively, the protein chips are used to characterize an immune response by, for example, screening arrays of potential antigens to identify the targets of a patient's B-cells and/or T-cells. For example, B-cells can be incubated with an array of potential antigens (*i.e.*, molecules having antigenic determinants) to identify antigenic targets for humoral-
10 based immunity. The source of antigens can be, for example, from autologous tissues, collections of known or unknown antigens (*e.g.*, of pathogenic microorganisms), tissue-specific or disease-specific antigen collections, or synthetic antigens.

In another embodiment, lymphocytes isolated from a patient can be used to screen protein chips comprising arrays of proteins derived from a patient's own tissues. Such
15 screens can identify substrates of autoimmunity or allergy-causing proteins, and thereby diagnose autoimmunity or allergic reactions, and/or identify potential target drug candidates.

In another embodiment, the protein chips of the invention are used to identify substances that are able to activate B-cells or T-cells. For example, lymphocytes are
20 contacted with arrays of test molecules or proteins on a chip, and lymphocyte activation is assayed, thereby identifying substances that have a general ability to activate B-cells or T-cells or subpopulations of lymphocytes (*e.g.*, cytotoxic T-cells).

Induction of B-cell activation by antigen recognition can be assayed by various means including, but not limited to, detecting or measuring antibody synthesis,
25 incorporation of ^3H -thymidine, binding of labeled antibodies to newly expressed or suppressed cell surface molecules, and secretion of factors indicative of B-cell activation (*e.g.*, cytokines). Similarly, T-cell activation in a screen using a protein chip of the invention can be determined by various assays. For example, a chromium (^{51}Cr) release assay can detect recognition of antigen and subsequent activation of cytotoxic T-cells (*see*,
30 *e.g.*, Palladino et al., 1987, *Cancer Res.* 47:5074-9; Blachere et al., 1993, *J. Immunotherapy* 14:352-6).

The specificity of an antibody preparation can be determined through the use of a protein chip of the invention, comprising contacting a positionally addressable array with an antibody preparation, said array comprising a plurality of potential antigens on a solid
35 support, with each different antigen being at a different position on the solid support, wherein the density of different antigens is at least 100 different antigens per cm^2 , and

WO 01/83827

PCT/US01/14526

detecting positions on the solid support where binding by an antibody in the antibody preparation occurs. The antibody preparation can be, but is not limited to, Fab fragments, antiserum, and polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, humanized, or synthetic antibodies. For example, an antiserum can be characterized by screening disease-specific, tissue-specific, or other identified collections of antigens, and determining which antigens are recognized. In a specific embodiment, protein chip arrays having similar or related antigens are screened with monoclonal antibodies to evaluate the degree of specificity by determining to which antigens on the array a monoclonal antibody binds.

The identity of targets of specific cellular activities can be assayed by treating a protein chip with complex protein mixtures, such as cell extracts, and determining protein activity. For example, a protein chip containing an array of different kinases can be contacted with a cell extract from cells treated with a compound (e.g., a drug), and assayed for kinase activity. In another example, a protein chip containing an array of different kinases can be contacted with a cell extract from cells at a particular stage of cell differentiation (e.g., pluripotent) or from cells in a particular metabolic state (e.g., mitotic), and assayed for kinase activity. The results obtained from such assays, comparing for example, cells in the presence or absence of a drug, or cells at several differentiation stages, or cells in different metabolic states, can provide information regarding the physiologic changes in the cells between the different conditions.

Alternatively, the identity of targets of specific cellular activities can be assayed by treating a protein chip of the invention, containing many different proteins (e.g., a peptide library), with a complex protein mixture (e.g., such as a cell extract), and assaying for modifications to the proteins on the chip. For example, a protein chip containing an array of different proteins can be contacted with a cell extract from cells treated with a compound (e.g., a drug), and assayed for kinase, protease, glycosidase, acetylase, phosphatase, or other transferase activity, for example. In another example, a protein chip containing an array of different proteins can be contacted with a cell extract from cells at a particular stage of cell differentiation (e.g., pluripotent) or from cells in a particular metabolic state (e.g., mitotic). The results obtained from such assays, comparing for example, cells in the presence or absence of a drug, or cells at several stages of differentiation, or cells in different metabolic states, can provide information regarding the physiologic effect on the cells under these conditions.

The protein chips are useful to identify probes that bind to specific molecules of biologic interest including, but not limited to, receptors for potential ligand molecules, virus receptors, and ligands for orphan receptors.

WO 01/83827

PCT/US01/14526

The protein chips are also useful to detecting DNA binding or RNA binding to proteins on the protein chips, and to determine the binding specificity. In addition, particular classes of RNA-binding or DNA-binding proteins (e.g., zinc-finger proteins) can be studied with the protein chips by screening arrays of these proteins with nucleic acid sequences, and determining binding specificity and binding strength.

The identity of proteins exhibiting differences in function, ligand binding, or enzymatic activity of similar biological entities can be analyzed with the protein chips of the present invention. For example, differences in protein isoforms derived from different alleles are assayed for their activities relative to one another.

The high density protein chips can be used for drug discovery, analysis of the mode of action of a drug, drug specificity, and prediction of drug toxicity. For example, the identity of proteins that bind to a drug, and their relative affinities, can be assayed by incubating the proteins on the chip with a drug or drug candidate under different assay conditions, determining drug specificity by determining where on the array the drug bound, and measuring the amount of drug bound by each different protein. Bioassays in which a biological activity is assayed, rather than binding assays, can alternatively be carried out on the same chip, or on an identical second chip. Thus, these types of assays using the protein chips of the invention are useful for studying drug specificity, predicting potential side effects of drugs, and classifying drugs. Further, protein chips of the invention are suitable for screening complex libraries of drug candidates. Specifically, the proteins on the chip can be incubated with the library of drug candidates, and then the bound components can be identified, e.g., by mass spectrometry, which allows for the simultaneous identification of all library components that bind preferentially to specific subsets of proteins, or bind to several, or all, of the proteins on the chip. Further, the relative affinity of the drug candidates for the different proteins in the array can be determined.

Moreover, the protein chips of the present invention can be probed in the presence of potential inhibitors, catalysts, modulators, or enhancers of a previously observed interaction, enzymatic activity, or biological response. In this manner, for example, blocking of the binding of a drug, or disruption of virus or physiological effectors to specific categories of proteins, can be analyzed by using a protein chip of the present invention.

The protein chips of the invention can be used to determine the effects of a drug on the modification of multiple targets by complex protein mixtures, such as for example, whole cells, cell extracts, or tissue homogenates. The net effect of a drug can be analyzed by screening one or more protein chips with drug-treated cells, tissues, or extracts, which then can provide a "signature" for the drug-treated state, and when compared with the

WO 01/83827

PCT/US01/14526

"signature" of the untreated state, can be of predictive value with respect to, for example, potency, toxicity, and side effects. Furthermore, time-dependent effects of a drug can be assayed by, for example, adding the drug to the cell, cell extract, tissue homogenate, or whole organism, and applying the drug-treated cells or extracts to a protein chip at various
5 timepoints of the treatment.

Screening of phage display libraries can be performed by incubating a library with the protein chips of the present invention. Binding of positive clones can be determined by various methods known in the art (e.g., mass spectrometry), thereby identifying clones of interest, after which the DNA encoding the clones of interest can be identified by standard
10 methods (see, e.g., Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184:177-86; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-8; Persic et al., 1997, Gene 187:9-18). In this manner, the chips are useful to select for cells having surface components that bind to specific proteins on the chip. Alternatively, a phage display library can be attached to the chip, such that a positionally addressable array of the library is created, after which the array can be
15 screened repeatedly with different mixtures of probes.

The invention also provides kits for carrying out the assay regimens of the invention. In a specific embodiment, kits of the invention comprise one or more arrays of the invention. Such kits may further comprise, in one or more containers, reagents useful for assaying biological activity of a protein or molecule, reagents useful for assaying
20 interaction of a probe and a protein or molecule, reagents useful for assaying the biological activity of a protein or molecule having a biological activity of interest, and/or one or more probes, proteins or other molecules. The reagents useful for assaying biological activity of a protein or molecule, or assaying interactions between a probe and a protein or molecule, can be contained in each well or selected wells on the protein chip. Such reagents can be in
25 solution or in solid form. The reagents may include either or both the proteins or molecules and the probes required to perform the assay of interest.

In one embodiment, a kit comprises one or more protein chips (i.e., positionally addressable arrays comprising a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole
30 cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being at a different position on the solid support), wherein the plurality of different substances consists of at least 100 different substances per cm^2 , and in one or more containers, one or more probes, reagents, or other molecules. The substances of the array can be attached to the surface of wells on the solid support. In another embodiment, the
35 protein chip in the kit can have the protein or probe already attached to the wells of the solid support. In yet another embodiment, the protein chip in the kit can have the reagent(s) or

WO 01/83827

PCT/US01/14526

reaction mixture useful for assaying biological activity of a protein or molecule, or assaying interaction of a probe and a protein or molecule, already attached to the wells of the solid support. In yet another embodiment, the reagent(s) is not attached to the wells of the solid support, but is contained in the wells. In yet another embodiment, the reagent(s) is not
 5 attached to the wells of the solid support, but is contained in one or more containers, and can be added to the wells of the solid support. In yet another embodiment, the kit further comprises one or more containers holding a solution reaction mixture for assaying biological activity of a protein or molecule. In yet another embodiment, the kit provides a substrate (e.g., beads) to which probes, proteins or molecules of interest, and/or other
 10 reagents useful for carrying out one or more assays, can be attached, after which the substrate with attached probes, proteins, or other reagents can be placed into the wells of the chip.

In another embodiment, one or more protein chips in the kit have, attached to the wells of the solid support, proteins with a biological activity of interest. In another
 15 embodiment, one or more protein chips in the kit have, attached to the wells of the solid support, at least 50%, 75%, 90% or 95% of all expressed proteins with the same type of biological activity in the genome of an organism. In a specific embodiment, one or more protein chips in the kit have, attached to the wells of the solid support, at least 50%, 75%, 90% or 95% of all expressed kinases, phosphatases, glycosidase, proteases, acetylases, other
 20 group transferring enzymes, nucleic acid binding proteins, hormone-binding proteins or DNA-binding proteins, within the genome of an organism (e.g., of a particular species).

E. Proteins Useful with the Protein Chips

25 Full-length proteins, portions of full-length proteins, and peptides whether prepared from recombinant overexpression in an organism, produced via fragmentation of larger proteins, or chemically synthesized, are utilized in this invention to form the protein chip. Organisms whose proteins are overexpressed include, but are not limited to, bacteria, yeast, insects, humans, and non-human mammals such as mice, rats, cats, dogs, pigs, cows and
 30 horses. Further, fusion proteins in which a defined domain is attached to one of a variety of natural or synthetic proteins can be utilized. Proteins used in this invention can be purified prior to being attached to, or deposited into, the wells of the protein chip, or purified during attachment via the use of reagents which have been previously attached to, or deposited into, the wells of the protein chip. These reagents include those that specifically bind
 35 proteins in general, or bind to a particular group of proteins. Proteins can be embedded in artificial or natural membranes (e.g., liposomes, membrane vesicles) prior to, or at the time

WO 01/83827

PCT/US01/14526

of attachment to the protein chip. Alternatively, the proteins can be delivered into the wells of the protein chip.

Proteins used in the protein chips of the present invention are preferably expressed by methods known in the art. The InsectSelect system from Invitrogen (Carlsbad, CA, catalog no. K800-01), a non-lytic, single-vector insect expression system that simplifies expression of high-quality proteins and eliminates the need to generate and amplify virus stocks, is a preferred expression system. The preferred vector in this system is pIB/V5-His TOPO TA vector (catalog no. K890-20). Polymerase chain reaction (PCR) products can be cloned directly into this vector, using the protocols described by the manufacturer, and the proteins are then expressed with N-terminal histidine (His) labels which can be used to purify the expressed protein.

The BAC-TO-BAC™ system, another eukaryotic expression system in insect cells, available from Lifetech (Rockville, MD), is also a preferred expression system. Rather than using homologous recombination, the BAC-TO-BAC™ system generates recombinant baculovirus by relying on site-specific transposition in *E. coli*. Gene expression is driven by the highly active polyhedrin promoter, and therefore can represent up to 25% of the cellular protein in infected insect cells.

VI. Example I: Analysis of Yeast Protein Kinases Using Protein Chips

20

A. Introduction

The following example exemplifies the various aspects of protein chip production and a method of using the protein chips of the present invention. The protein chip technology of the present invention is suitable for rapidly analyzing large numbers of samples, and therefore this approach was applied to the analysis of nearly all yeast protein kinases. Protein kinases catalyze protein phosphorylation and play a pivotal role in regulating basic cellular functions, such as cell cycle control, signal transduction, DNA replication, gene transcription, protein translation, and energy metabolism⁷. The availability of a complete genome sequence makes it possible to analyze all of the protein kinases encoded by an organism and determine their *in vitro* substrates.

The yeast genome has been sequenced and contains approximately 6200 open reading frames greater than 100 codons in length; 122 of these are predicted to encode protein kinases. Twenty-four of these protein kinase genes have not been studied previously⁸. Except for two histidine protein kinases, all of the yeast protein kinases are

WO 01/83827

PCT/US01/14526

members of the Ser/Thr family; tyrosine kinase family members do not exist although seven protein kinases that phosphorylate serine/threonine and tyrosine have been reported⁸.

With the development of the protein chip technology of the present invention, the high throughput analysis of the biochemical activities of nearly all of the protein kinases from *Saccharomyces cerevisiae* has been conducted as described herein. Protein chips utilized were disposable arrays of 300 nl wells in silicone elastomer sheets placed on top of microscope slides. The high density and small size of the wells allows for high throughput batch processing and simultaneous analysis of many individual samples, requiring only small amounts of protein. Using protein chips of the present invention, *Saccharomyces cerevisiae* kinase proteins (119 different kinases in total) were fused to glutathione-S-transferase (GST), overexpressed in yeast, then purified and assayed for their ability to phosphorylate 17 different substrates. Nearly all of the kinases tested (93%) exhibited activities that were at least five-fold higher than controls, on one or more substrates, including 18 of 24 previously uncharacterized kinases. Thirty-two kinases exhibited preferential phosphorylation of one or two substrates. Twenty-seven kinases readily phosphorylated poly(Tyr-Glu). Since only five of these kinases were previously classified as dual function kinases (*i.e.*, they phosphorylate both Ser/Thr and Tyr), these findings greatly expand our knowledge as to which kinases are able to phosphorylate tyrosine residues. Interestingly, these dual specificity kinases often share common amino acid residues that lie near the catalytic region. These results indicate that the protein chip technology of the present invention is useful for high throughput screening of protein biochemical activity, and for the analysis of entire proteomes.

B. Methods

1. Cell Culture, Constructs and Protein Purification

Using the recombination strategy of Hudson *et al.*⁹, 119 of 122 yeast protein kinase genes were cloned into a high copy *URA3* expression vector (pEG(KG)), which produces GST fusion proteins under the control of the galactose-inducible *GAL10* promoter¹⁰. Briefly, primers complementary to the end of each ORF were purchased from Research Genetics; the ends of these primers contain a common 20 bp sequence. In a second round of PCR, the ends of these products were modified by adding sequences that are homologous to the vector. The PCR products containing the vector sequences at their ends were transformed along with the vector into a *pep4* yeast strain (which lacks several yeast proteases)¹⁰, and *Ura*⁺ colonies were selected. Plasmids were rescued in *E. coli*, verified by

WO 01/83827

PCT/US01/14526

restriction enzyme digestion and the DNA sequence spanning the vector-insert junction was determined using a primer complementary to the vector. For the GST::Cla4 construct, a frame-shift mutation was found in a poly(A) stretch in the amino terminal coding region. Three independent clones were required to find the correct one that maintained reading
5 frame. For five of these genes, two overlapping PCR products were obtained and introduced into yeast cells. Confirmed plasmids were reintroduced into the *pep4* yeast strain for kinase protein purification.

For preparing samples using the 96 well format, 0.75 ml of cells were grown in medium containing raffinose to O.D.(600) about 0.5 in boxes containing 2 ml wells; two
10 wells were used for each strain. Galactose was added to a final concentration of 4% to induce protein expression, and the cells were incubated for 4 hrs. The cultures of the same strain were combined, washed once with 500 µl of lysis buffer, resuspended in 200 µl of lysis buffer, and transferred into a 96 X 0.5 ml plate (Dot Scientific, USA) containing 100 µl chilled glass beads. Cells were lysed in the box by repeated vortexing at 4 °C and the
15 GST fusion proteins were purified from these strains using glutathione beads and standard protocols²⁰ in a 96 well format. The purity of five purified GST::kinase proteins (Swe1, Ptk2, Pkh1, Hog1, Pbs2) was determined by comparing the Coomassie staining patterns of the purified proteins with the patterns obtained by immunoblot analysis using anti-GST antibodies. The results indicated that the purified proteins were more than 90% pure. To
20 purify the activated form of Hog1, the cells were challenged with 0.4 M NaCl in the last five minutes of the induction. Protein kinase activity was stable for at least two months at -70°C with little or no loss of kinase activity.

2. Chip Fabrication and Protein Attachment

25

Chips were made from the silicone elastomer, polydimethylsiloxane (PDMS) (Dow Chemical, USA), which was cast over microfabricated molds. Liquid PDMS was poured over the molds and, after curing (at least 4 hours at 65 °C), flexible silicone elastomer array sheets were then peeled from the reusable molds. Although PDMS can be readily cast over
30 microlithographically fabricated structures, for the purposes of the kinase assay described herein, molds made from sheets of acrylic patterned with a computer-controlled laser milling tool (Universal Laser Systems, USA) sufficed.

Over 30 different arrays were tested. The variables tested were width and depth of the wells (widths ranging from 100 µm to 2.5 mm, depths from 100 µm to 1 mm), spacing
35 between wells (100 µm to 1 mm), configuration (either rectangular arrays or closest packed), and well shape (square versus round). The use of laser milled acrylic molds

WO 01/83827

PCT/US01/14526

offered a fast and inexpensive method to realize a large number prototype molds of varying parameters.

To determine the conditions that maximize protein attachment to the wells, PDMS was treated with either 5 M H_2SO_4 , 10 M NaOH, hydrogen peroxide or a 3-
 5 glycidooxypropyltrimethoxysilane linker (GPTS)(Aldrich, USA)^{11,12}. GPTS treatment resulted in the greatest adsorption of protein to the wells relative to untreated PDMS or PDMS treated other ways. Briefly, after washing with 100% EtOH three times at room
 10 temperatures, the chips were immersed in 1% GPTS solution (95% EtOH, 16 mM HOAc) with shaking for 1 hr at room temperature. After three washes with 95% EtOH, the chips
 15 were cured at 135°C for 2 hrs under vacuum. Cured chips can be stored in dry Argon for months¹². To attach proteins to the chips, protein solutions were added to the wells and incubated on ice for 1 to 2 hours. After rinsing with cold HEPES buffer (10 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.0) three times, the wells were blocked with 1% BSA in PBS (Sigma, USA) on ice for > 1 hr. Because of the use of GPTS, any reagent containing primary amine

groups was avoided.
 To determine the concentration of proteins that can be linked to the treated PDMS, horseradish peroxidase (HRP) anti-mouse Ig (Amersham, USA) was attached to the chip using serial dilutions of the enzyme. After extensive washing with PBS, the bound
 20 antibodies were detected using an enhanced chemiluminescent (ECL) detection method (Amersham, USA). Up to 8×10^{-9} $\mu g/\mu m^2$ of protein can be attached to the surface; a minimum 8×10^{-13} $\mu g/\mu m^2$ is required for detection by our immunostaining methods.

3. Immunoblotting, Kinase Assay and Data Acquisition

25 Immunoblot analysis was performed as described³⁴. GST::protein kinases were tested for *in vitro* kinase activity¹³ using ^{32}P - γ -ATP. In the autophosphorylation assay, the GST::kinases were directly adhered to GPTS-treated PDMS and the *in vitro* reactions
 30 carried out with ^{32}P - γ -ATP in appropriate buffer. In the substrate reactions, the substrate was adhered to the wells via GPTS, and the wells were washed with HEPES buffer and blocked with 1% BSA, before kinase, ^{32}P - γ -ATP and buffer were added. The total reaction
 35 volume was kept below 0.5 μl per reaction. After incubation for 30 minutes at 30°C, the chips were washed extensively, and exposed to both X-ray film and a Molecular Dynamics PhosphorImager, which has a resolution of 50 μm and is quantitative. For twelve substrates each kinase assay was repeated at least twice; for the remaining five, the assays were performed once.

WO 01/83827

PCT/US01/14526

To determine substrate specificity, specificity index (SI) was calculated using the following formula: $SI_{ir} = F_{ir} / [(F_{i1} + F_{i2} + \dots + F_{in}) / r]$, where i represents the ID of kinase used, r represents the ID of a substrate, and F_{ir} represents the fold increase of a kinase i on substrate r compared with GST alone.

5

4. Kinase Sequence Alignments and Phylogenetic Trees

Multiple sequence alignments based on the core kinase catalytic domain subsequences of the 107 protein kinases were generated with the CLUSTAL W algorithm³⁵, using the Gonnet 250 scoring matrix³⁶. Kinase catalytic domain sequences were obtained from the SWISS-PROT³⁷, PIR³⁸, and GenBank³⁹ databases. For those kinases whose catalytic domains are not yet annotated (DBF4/YDR052C and SLN1/YIL147C), probable kinase subsequences were inferred from alignments with other kinase subsequences in the data set with the FASTA algorithm^{40,41} using the BLOSUM 50 scoring matrix⁴². Protein subsequences corresponding to the eleven core catalytic subdomains⁴³ were extracted from the alignments, and the phylogenetic trees were computed with the PROTPARS⁴⁴ program (Figure 5a).

5. Functional Grouping of Protein Chip Data

20

To visualize the approximate functional relationships between protein kinases relative to the experimental data, kinases were hierarchically ordered based on their ability to phosphorylate the 12 different substrates (data available on web site <http://bioinfo.mbb.yale.edu/genome/yeast/chip> as of August 17, 2000). A profile corresponding to the +/- activity of the 107 protein kinases to each of the substrates was recorded, with discretized values in [0,1]. Matrices were derived from the pairwise Hamming distances between experimental profiles, and unrooted phylogenies were computed using the Fitch-Margoliash least-squares estimation method⁴⁵ as implemented in the FITCH program³⁴ of the PHYLIP software package⁴⁴. In each case, the input order of taxa was randomized to negate any inherent bias in the organization of the data set, and optimal hierarchies were obtained through global rearrangements of the tree structures.

C. Results

1. Yeast Kinase Cloning and Protein Purification

35

WO 01/83827

PCT/US01/14526

Using a recombination-directed cloning strategy⁹, we attempted to clone the entire coding regions of 122 yeast protein kinase genes in a high copy expression vector (pEG(KG)) that produces GST fusion proteins under the control of the galactose-inducible *GAL10* promoter¹⁰ (Figure 1a). GST::kinase constructs were rescued into *E. coli*, and sequences at the 5'-end of each construct were determined. Using this strategy, 119 of the 122 yeast protein kinase genes were cloned in-frame. The three kinase genes that were not cloned are very large (4.5-8.3 kb).

The GST:kinase fusion proteins were overproduced in yeast and purified from 50 ml cultures using glutathione beads and standard protocols¹¹. For the case of Hog1 the yeast cells were treated with high salt to activate the enzyme in the last five minutes of induction; for the rest of the kinases, synthetic media (URA/raffinose) was used. Immunoblot analysis of all 119 fusions using anti-GST antibodies revealed that 105 of the yeast strains produced detectable GST::fusion proteins; in most cases the fusions were full length. Up to 1 µg of fusion protein per ml of starting culture was obtained (Figure 1b). However, 14 of 119 GST::kinase samples were not detected by immunoblotting analysis. Presumably, these proteins are not stably overproduced in the *pep4* protease-deficient strain used, or these proteins may form insoluble aggregates that do not purify using our procedures. Although this procedure was successful, purification of GST fusion proteins using 50 ml cultures is a time-consuming process and not applicable for preparing thousands of samples. Therefore, a procedure for growing cells in a 96 well format was developed (see Methods). Using this procedure, 119 GST fusions were prepared and purified in six hours with about two-fold higher yields per ml of starting culture relative to the 50 ml method.

2. Protein Chip Design

Protein chips were developed to conduct high throughput biochemical assays of 119 yeast protein kinases (Figure 2). These chips consist of an array of wells in a disposable silicone elastomer polydimethylsiloxane (PDMS)¹¹. Arrays of wells allow small volumes of different probes to be densely packed on a single chip yet remain physically segregated during subsequent batch processing. Proteins were covalently attached to the wells using a linker 3-glycidooxypropyltrimethoxysilane (GPTS)¹². Up to 8×10^9 µg/µm² of protein can be attached to the surface (see Methods).

For the purposes of the protein kinase assays, the protein chip technology was configured to be compatible with standard sample handling and recording equipment. Using radioisotope labeling (³²P), the kinase assays described below, and manual loading, a variety of array configurations were tested. The following chips produced the best results:

WO 01/83827

PCT/US01/14526

round wells with 1.4 mm diameter and 300 μ m deep (approximately 300 nL), in a 10x14 rectangular array configuration with a 1.8 mm pitch. A master mold of twelve of these arrays were produced, and a large number of arrays were repeatedly cast for the protein kinase analysis. Chips were placed atop microscope slides for handling purposes (Figure 2a); the arrays covered slightly more than one third of a standard microscope slide and two arrays per slide were typically used (Figure 2b). Although a manual pipette method to place proteins in each well was employed, automated techniques may also be used. In addition, this protein chip configuration may also be used with other labeling methods, such as by using fluorescently labeled antibodies to phosphoproteins, and subsequent detection of immunofluorescence.

3. Large-scale Kinase Assays Using Protein Chips

All 119 GST::protein kinases were tested for *in vitro* kinase activity¹³ in 17 different assays using ³²P- γ -ATP and 17 different chips. Each chip was assayed using a different substrate, as follows: 1) Autophosphorylation, 2) Bovine Histone H1 (a common kinase substrate), 3) Bovine Casein (a common substrate), 4) Myelin basic protein (a common substrate), 5) Axl2 C terminus-GST (Axl2 is a transmembrane phosphoprotein involved in budding)¹⁴, 6) Rad9 (a phosphoprotein involved in the DNA damage checkpoint)¹⁵, 7) Gic2 (a phosphoprotein involved in budding)¹⁶, 8) Rad1 (a meiotic phosphoprotein important for chromosome synapsis)¹⁷, 9) Mek1 (a meiotic protein kinase important for chromosome synapsis)¹⁸, 10) Poly(tyrosine-glutamate 1:4) (poly(Tyr-Glu)); a tyrosine kinase substrate)¹⁹, 11) Ptk2 (a small molecule transport protein)²⁰, 12) Hsl1 (a protein kinase involved in cell cycle regulation)²¹, 13) Swi6 (a phosphotranscription factor involved in G1/S control)²², 14) Tub4 (a protein involved in microtubule nucleation)²³, 15) Hog1 (a protein kinase involved in osmoregulation)²⁴, 16) Hog1 (an inactive form of the kinase), and 17) GST (a control). For the autophosphorylation assay, the kinases were directly adhered to the treated PDMS wells and ³²P- γ -ATP was added; for substrate reactions, the substrates were bound to the wells, and then kinases and ³²P- γ -ATP were added. After the reactions were completed, the slides were washed and the phosphorylation signals were acquired and quantified using a high resolution phosphorimager. Examples are shown in Figure 3. To identify kinase activities, the quantified signals were converted into fold increases relative to GST controls and plotted for further analysis (Figure 4a).

As shown in Figure 4a, most (93.3%) kinases exhibited activity five-fold or greater over background for at least one substrate. As expected, Hrr25, Pbs2 and Mek1 phosphorylated their known substrates²⁵⁻²⁷, Swi6 (400-fold higher than the GST control),

WO 01/83827

PCT/US01/14526

Hog1 (10-fold higher) and Red1 (10-fold higher), respectively. The results of this assay demonstrated that 18 of the 24 predicted protein kinases have not been studied previously phosphorylate one or more substrates, as do several unconventional kinases⁸, including the histidine kinases (Sln1, Yih042c) and phospholipid kinases (e.g. Mcc1).

To determine substrate specificity, the activity of a particular kinase was further normalized against the average of its activity against all substrates. Several examples are shown in Figure 4b; all the data are available at <http://bioinfo.mbb.yale.edu/genome/yeast/chip>. Thirty-two kinases exhibited substrate specificity on a particular substrate with specificity index (SI; see Methods) equal or higher than 2, and reciprocally, most substrates are preferentially phosphorylated by a particular protein kinase or set of kinases. For example, the C terminus of Axl2, a protein involved in yeast cell budding, is preferentially phosphorylated by Dbf20, Kin2, Yak1 and Ste20 relative to other protein. Interestingly, previous studies found that Ste20 was localized at the tip of emerging buds similar to Axl2, and a *ste20Δcla4^Δ* mutant is unable to bud or form fully polarized actin patches or cables²³. Another example is the phosphoprotein Gic2, which is also involved in budding¹⁶. Ste20 and Skm1 strongly phosphorylate Gic2 (Figure 4b). Previous studies suggested that Cdc42 interacts with Gic2, Cla4²⁹, Ste20 and Skm1. Our results raise the possibility that Cdc42 may function to promote the phosphorylation of Gic2 by recruiting Ste20 and/or Skm1.

4. Yeast Contain Many Dual Specific Kinases

Of particular interest are the dual specificity kinases, *i.e.*, those enzymes that phosphorylate both Ser/Thr and tyrosine. Based on sequence analysis, all but two yeast protein kinases belong to the Ser/Thr family of protein kinases; however, at the time of the study, seven protein kinases (Mps1, Rad53, Swe1, Ime2, Ste7, Hrr25, and Mck1) were reported to be dual specificity kinases¹⁹. We confirmed that Swe1, Mps1, Ime2, and Hrr25 readily phosphorylate poly(Tyr-Glu), but we did not detect any tyrosine kinase activity for Ste7, Rad53 or Mck1. Mck1 did not show strong activity in any of our assays; however, Ste7 and Rad53 are very active in other assays. Thus, their inability to phosphorylate poly(Tyr-Glu) indicates that they are either very weak tyrosine kinases in general or at least are weak with the poly(Tyr-Glu) substrate. Consistent with the latter possibility, others have found that poly(Tyr-Glu) is a very poor substrate for Rad53 (Ref 19; D. Stern, pers. comm.). Interestingly, we found that 23 other kinases also efficiently use poly(Tyr-Glu) as a substrate, indicating that there are at least 27 kinases in yeast that are capable of acting *in vitro* as dual specificity kinases. One of these, Rim1, was recently shown to phosphorylate

WO 01/83827

PCT/US01/14526

a Tyr residue on its *in vivo* substrate, Ime2, indicating that it is a *bona fide* dual specificity kinase³⁰. In summary, this experiment roughly tripled the number of kinases capable of acting as dual specificity kinases, and has raised questions about some of those classified as such kinases.

5

5. Correlation Between Functional Specificity and Amino Sequences of the Poly(Tyr-Glu) Kinases

The large-scale analysis of yeast protein kinases allows us to compare the functional relationship of the protein kinases to one another. We found that many of the kinases that phosphorylate poly(Tyr-Glu) are related to one another in their amino acid sequences: 70% of the poly(Tyr-Glu) kinases cluster into distinct four groups on a dendrogram in which the kinases are organized relative to one another based on sequence similarity of their conserved protein kinase domains (Figure 5a). Further examination of the amino acid sequence reveals four types of amino acids that are preferentially found in the poly(Tyr-Glu) class of kinases relative to the kinases that do not use poly(Tyr-Glu) as a substrate (three are lysines and one is a methionine); one residue (an asparagine) was preferentially located in the kinases that do not readily use poly(Tyr-Glu) as a substrate (Figure 5b). Most of the residues lie near the catalytic portion of the molecule (Figure 5b)³¹, suggesting that they may play a role in substrate recognition.

20

D. Discussion

1. Large-scale Analysis of Protein Kinases

25

This study employed a novel protein chip technology to characterize the activities of 119 protein kinases for 17 different substrates. We found that particular proteins are preferred substrates for particular protein kinases, and vice versa, many protein kinases prefer particular substrates. One concern with these studies is that it is possible that kinases other than the desired enzyme are contaminating our preparations. Although this cannot be rigorously ruled out, analysis of five of our samples by Coomassie staining and immunoblot staining with anti-GST does not reveal any detectable bands in our preparation that are not GST fusions (see methods).

30

It is important to note that *in vitro* assays do not ensure that a substrate for a particular kinase *in vitro* is phosphorylated by the same kinase *in vivo*. Instead, these experiments indicate that certain proteins are capable of serving as substrates for specific

35

WO 01/83827

PCT/US01/14526

kinases, thereby allowing further analysis. In this respect, these assays are analogous to two-hybrid studies in which candidate interactions are detected. Further experimentation is necessary to determine if the processes normally occur *in vivo*.

Consistent with the idea that many of the substrates are likely to be bonafide substrates *in vivo* is the observation that three kinases, Hrr25, Pbs2 and Mek1, phosphorylate their known substrates in our assays. Furthermore, many of the kinases (e.g., Ste20) co-localize with their *in vitro* substrates (e.g., Axl2). Thus, we expect many of the kinases that phosphorylate substrates in our *in vitro* assays are likely also to do so *in vivo*.

Although most of the kinases were active in our assays, several were not. Presumably, our preparations of these latter kinases either lack sufficient quantities of an activator or were not purified under activating conditions. For example, Cdc28 which was not active in our assays, might be lacking its activating cyclins. For the case of Hog1, cells were treated with high salt to activate the enzyme. Since nearly all of our kinase preparations did exhibit activity, we presume that at least some of the enzyme in the preparation has been properly activated and/or contains the necessary cofactors. It is likely that the overexpression of these enzymes in their native organism contributes significantly to the high success of obtaining active enzymes.

Using the assays on the protein chip, many kinases that utilize poly(Tyr-Glu) were identified. The large-scale analysis of many kinases allowed the novel approach of correlating functional specificity of poly(Tyr-Glu) kinases with specific amino acid sequences. Many of the residues of the kinases that phosphorylate poly(Tyr-Glu) contain basic residues. This might be expected if there were electrostatic interactions between the kinases residues and the Glu residues. However, the roles of some of the other residues are not obvious such as the Met residues on the kinases that phosphorylate poly(Tyr-Glu) and the Asn on those that do not. These kinase residues may confer substrate specificity by other mechanisms. Regardless, analysis of additional substrates should allow further correlation of functional specificity with protein kinase sequence for all protein kinases.

2. Protein chip technology

In addition to the rapid analysis of large number of samples, the protein chip technology described here has significant advantages over conventional methods. 1) The chip-based assays have high signal-to-noise ratios. We found that the signal-to-noise ratio exhibited using the protein chips is much better (>10 fold) than that observed for traditional microtiter dish assays (data not shown). Presumably this is due to the fact that ^{32}P - γ -ATP

WO 01/83827

PCT/US01/14526

does not bind the PDMS as much as microtiter dishes. 2) The amount of material needed is very small. Reaction volumes are 1/20-1/40 the amount used in the 384-well microtiter dishes; less than 20 ng of protein kinase was used in each reaction. 3) The enzymatic assays using protein chips are extremely sensitive. Even though only 105 fusions were detectable by immunoblot analysis, 112 exhibited enzymatic activity greater than five-fold over background for at least one substrate. For example, Mps1 consistently exhibits the strongest activity in many of the kinase assays even though we have not been able to detect this fusion protein by immunoblot analysis (see Figures 1b and 3a). 4) Finally, the chips are inexpensive; the material costs less than eight cents for each array. The microfabricated molds are also easy to make and inexpensive.

In addition to the analysis of protein kinases, this protein chip technology is also applicable to a wide variety of additional assays, such as ATP and GTP binding assays, nuclease assays, helicase assays and protein-protein interaction assays. Recently, in an independent study, Phizicky and coworkers expressed yeast proteins as GST fusions under the much weaker *CUP1* promoter⁶. Although the quality of their clones has not been established, they were able to identify biochemical activities using pools of yeast strains containing the fusion proteins. The advantage of our protein chip approach is that all samples can be analyzed in a single experiment. Furthermore, although this study used wells which have the advantage of segregating samples, flat PDMS chips and glass slides can also be used for different assays; these have the advantage that they can be used with standard pinning tool microarrays. This technology can also be applied to facilitate high-throughput drug screening in which one can screen for compounds that inhibit or activate enzymatic activities of any gene products of interest. Since these assays will be carried out at the protein level, the results will be more direct and meaningful to the molecular function of the protein.

We configured the protein chip technology for a specific protein kinase assay using commonly available sample handling and recording equipment. For this purpose, array dimensions remained relatively large compared to dimensions readily available with microfabricated silicone elastomer structures³². We have cast PDMS structures with feature sizes two orders of magnitude smaller than those reported here using microlithographically fabricated molds, while others have reported submicron feature sizes in microfabricated structures³³. These results indicate that well densities of microfabricated protein chips can be readily increased by several orders of magnitude. The protein chip technology reported here is readily scalable.

In conclusion, an inexpensive, disposable protein chip technology was developed for high throughput screening of protein biochemical activity. Utility was demonstrated.

WO 01/83827

PCT/US01/14526

through the analysis of 119 protein kinases from *Saccharomyces cerevisiae* assayed for phosphorylation of 17 different substrates. These protein chips permit the simultaneous measurement of hundreds of protein samples. The use of microfabricated arrays of wells as the basis of the chip technology allows array densities to be readily increased by several orders of magnitude. With the development of appropriate sample handling and measurement techniques, these protein chips can be adapted for the simultaneous assay of several thousand to millions of samples.

E. References

1. Fields, S., Kohara, Y., and Lockhart, D.J. Functional genomics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 8825-26 (1999).
2. Goffeau, A., *et al.* Life with 6000 genes. *Science* **274**, 563-567 (1996).
3. DeRisi, J.L., Iyer, V.R., and Brown, P.O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**, 680-686 (1997).
4. Winzler, E.A., *et al.* Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**, 901-906 (1999).
5. Heyman, J.A., *et al.* Genome-scale cloning and expression of individual open reading frames using topoisomerase I-mediated ligation. *Genome Res.* **9**, 383-392 (1999).
6. Martzen, M.R., *et al.* A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. *Science* **286**, 1153-1155 (1999).
7. Plowman G.D., Sudarsanam S., Bingham J., Whyte D., and Hunter T. The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: A model for signal transduction in multicellular organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 13603-12610 (1999).
8. Hunter, T., & Plowman, G.D. The protein kinases of budding yeast: six score and more. *TIBS* **22**, 18-22 (1997).
9. Hudson, J.R., *et al.* The complete set of predicted genes from *Saccharomyces cerevisiae* in a readily usable form. *Genome Res.* **7**, 1169-1173 (1997).
10. Mitchell, D.A., Marshall, T.K., and Deschenes, R.J. Vector for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion protein in yeast. *Yeast* **9**, 715-23 (1993).
11. Rogers, Y.-H., *et al.* Immobilization of oligonucleotides onto a glass support via disulfide bonds: a method for preparation of DNA microarrays. *Analy. Biochem.* **266**, 23-30 (1999).

WO 01/83827

PCT/US01/14526

12. Stimpson, D.J., *et al.* Real-time detection of DNA hybridization and melting on oligonucleotide arrays by using optical wave guides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 6379-6383 (1995).
13. Hunter, T. & Sefton, B.M. Protein phosphorylation. *Meth. in Enzym.* **200**, 35-83 (1991).
14. Roemer, T.K., *et al.* Selection of axial growth sites in yeast requires Axl2p, a novel plasma membrane glycoprotein. *Genes & Dev.* **10**, 777-793 (1996).
15. Weinert, T.A. & Hartwell, L.H. Cell cycle arrest of *cdc* mutants and specificity of the RAD9 checkpoint. *Genetics* **134**, 63-80 (1993).
16. Jaquenoud, M., Gulli, M.P., Peter, K., and Peter, M. The Cdc42p effector Gic2p is targeted for ubiquitin-dependent degradation by the SCFGrr1 complex. *EMBO J.* **17**, 5360-5373 (1998).
17. Menees, T.M., Ross-MacDonald, P.B., and Roeder, G.S. MEI4, a meiosis-specific yeast gene required for chromosome synapsis. *Mol. Cell Biol.* **12**, 1340-1351 (1992).
18. Bailis, J.M., & Roeder, G.S. Synaptonemal complex morphogenesis and sister-chromatid cohesion require Mek1-dependent phosphorylation of a meiotic chromosomal protein. *Genes & Dev.* **12**, 3551-3563 (1998).
19. Stern, D.F., Zheng, P., Bejler, D.R., and Zerillo, C. Spk1, a new kinase from *Saccharomyces cerevisiae* phosphorylates proteins on serine, threonine, and tyrosine. *Mol. Cell Biol.* **11**, 987-1001 (1991).
20. Kaouass, M., *et al.* The STK2 gene, which encodes a putative Ser/Thr protein kinase, is required for high-affinity spermidine transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **17**, 2994-3004 (1997).
21. Barral, Y., Parra, M., Bidlingmaier, S., and Snyder, M. Nimi1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. *Genes & Dev.* **13**, 176-187 (1999).
22. Madden, K., Shou, Y.-J., Baetz, K., Andrews, B., and Snyder, M. SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science* **275**, 1781-1784 (1997).
23. Sobel, S.G. & Snyder, M. A highly divergent gamma-tubulin gene is essential for cell growth and proper microtubule organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **131**, 1775-1788 (1995).
24. Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H., and Silver, P.A. Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J.* **17**, 5606-5614 (1998).

WO 01/83827

PCT/US01/14526

25. Ho, U., Mason, S., Kobayashi, R., Heekstra, M., and Andrew, B. Role of the casein kinase I isoform, Hrr25, and the cell cycle-regulatory transcription factor, SBF, in the transcriptional response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 581-586 (1997).
- 5 26. Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., and Saito, H. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol. Cell Biol.* **17**, 1289-1297 (1997).
27. Santos, T. & Hollingsworth, N.M. Red1p, a MEK1-dependent phosphoprotein that physically interacts with Hop1p during meiosis in yeast. *J. Biol. Chem.* **274**, 1783-1790 (1999).
- 10 28. Holly, S.P. & Blumer, K.J. PAK-family kinases regulate cell and actin polarization throughout the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **147**, 845-856 (1999).
29. Richman, T.J., Sawyer, M.M., and Johnson, D.I. The Cdc42p GTPase is involved in a G2/M morphogenetic checkpoint regulating the apical-isotropic switch and nuclear division in yeast. *J. Biol. Chem.* **274**, 16861-16870 (1999).
- 15 30. Malathi, K., Xiao, Y., and Mitchell, A.P. Catalytic roles of yeast GSK3 β /shaggy homolog Rim11p in meiotic activation. *Genetics* **153**, 1145-1152 (1999).
31. Owen, D.J., Noble, M.E., Garman, E.F., Papageorgiou, A.C., and Johnson, L.N. Two structures of the catalytic domain of phosphorylase kinase: an active protein kinase complexed with substrate analogue and product. *Structure*, **3**, 467-474 (1995).
- 20 32. Xia, Y. & Whitesides, G.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 550- (1997).
33. Jackman, R.J., Duffy, D.C., Cherniavskaya, O., and Whitesides, G.M. Using elastomeric membranes as dry resists and for dry lift-off. *Langmuir*, **15**, 2973-2984 (1999).
- 25 34. Mylin, L.M., Hofmann, K.J., Schultz, L.D., and Hopper, J.E. Regulated GAL4 expression cassette providing controllable and high-level output from high-copy galactose promoters in yeast. *Methods Enzymol.* **185**, 297-308 (1990).
- 30 35. Higgins, D.G., Thompson, J.D., and Gibson, T.J. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol.* **266**, 383-402 (1996).
36. Gonnet, G.H., Cohen, M.A., and Benner, S.A. Exhaustive matching of the entire protein sequence database. *Science*. **256**, 1443-1445 (1992).
37. Bairoch, A. & Apweiler, R. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL. *Nucleic Acids Res.* **27**, 49-54 (1999).
- 35

WO 01/83827

PCT/US01/14526

38. Barker, W.C., *et al.* The PIR-International Protein Sequence Database. *Nucleic Acids Res.* **27**(1), 39-43 (1999).
39. Benson, D.A., *et al.* GenBank. *Nucleic Acids Res.* **27**, 12-17 (1999).
40. Lipman, D.J. & Pearson, W.R. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science*. **227**, 1435-1441 (1985).
41. Pearson, W.R. & Lipman, D.J. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 2444-2448 (1988).
42. Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M., and Orcutt, B.C. A model of evolutionary change in proteins. In *Atlas of Protein Sequence and Structure*, M.O. Dayhoff, Ed. Washington, DC: National Biomedical Research Foundation. pp 345-352 (1978).
43. Hanks, S.K. & Hunter, T. Protein Kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576-596 (1995).
44. Felsenstein, J. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*. **5**, 164-166 (1989).
45. Fitch, W.M. & Margoliash, E. Construction of phylogenetic trees. *Science*. **155**, 279-284 (1967).

VII. Example II: Analysis of Yeast Protein Kinase Activity Using Protein Chips

A. Introduction

The following example presents three protocols that, for illustration purposes only, provide different methods of using the protein chips of the present invention to assay for protein kinase activity.

1. Assay Methods for Protein Kinase Activity

i. Autophosphorylation Activity

- (1) Protein chips were washed three times with 100% EtOH at room temperature. The chips were then coated with the linker GPTS (1% in 95% EtOH) at room temperature for one hour with shaking. After washing with 100% EtOH three times, the chips were dried at 130°C for 1.5 hours under vacuum.
- (2) GST::yeast protein kinases, one kinase species per well, were bound to the wells of the protein chip by incubation for at least one hour. The chip was further blocked by 1% BSA.

WO 01/83827

PCT/US01/14526

(3) Kinase buffer and a ^{32}P - γ -ATP probe was added to each well, and incubated at 30°C for 30 minutes. The chip was washed extensively after the phosphorylation reaction was completed.

(4) The specific ^{32}P - γ -ATP signal, representing autophosphorylation, was
5 detected and quantified by a phosphorimager.

ii. Kinase Activity - Protocol I

(1) Protein chips were washed three times with 100% EtOH at room temperature. The chips were then coated with the linker GPTS (1% in 95% EtOH) at room
10 temperature for one hour with shaking. After washing with 100% EtOH three times, the chips were dried at 130°C for 1.5 hours under vacuum.

(2) A substrate (for example, GST::yeast protein) was bound to the chips by incubation for one or more hours. The chip was further blocked by 1% BSA, and the chip was washed.

(3) A different protein kinase was added to each well of the protein chip, along with kinase buffer and ^{32}P - γ -ATP, and incubated at 30°C for 30 minutes. The protein chip was washed extensively after the phosphorylation reaction was completed.

(4) The specific ^{32}P - γ -ATP signal, representing phosphorylation of the substrate protein by the protein kinase probe, was detected and quantified by a
20 phosphorimager.

iii. Kinase activity - Protocol II

(1) Protein chips were washed three times with 100% EtOH at room temperature. The chips were then coated with the linker GPTS (1% in 95% EtOH) at room
25 temperature for one hour with shaking. After washing with 100% EtOH three times, the chips were dried at 130°C for 1.5 hours under vacuum.

(2) A substrate (for example, GST::yeast protein) was bound to the chips by incubation for one or more hours. The chip was further blocked by 1% BSA and the chip was washed.

(3) A different protein kinase was added to each well of the protein chip, along with kinase buffer and P - γ -ATP, and incubated at 30°C for 30 minutes. The protein chip was washed extensively after the phosphorylation reaction was completed. The chip was incubated with iodoacetyl-LC-biotin in the dark at room temperature overnight.

(4) After washing, the chip was probed with fluorescent-labeled avidin to
35 detect the phosphorylation signals.

WO 01/83827

PCT/US01/14526

- (5) The chip was then scanned using an Axon GenePix 4000A scanner, which was modified with a lens having an increased depth of focus of about 300-400 microns. The modifications allow scanning of surfaces mounted on a slide (e.g., the PDMS microarrays of the present invention), which would otherwise be out of the plane of focus.
- 5 Using the modified Axon GenePix 4000A scanner, the arrays were scanned to acquire and quantify fluorescent signals.

VIII. Example III: Analysis of Protein-Protein Interactions Using Protein Chips

10

- A protein of interest ("probe protein") is recombinantly expressed in and purified from *E. coli* as a labeled fusion protein using standard protocols. The target proteins are attached to the wells of the chip, with a different target protein in each well. The purified probe protein is introduced into each well of the chip, and incubated for several hours or
- 15 more. The chip is washed and probed with either: a) antibodies to the probe protein, or b) antibodies to the label on the fusion protein. The antibodies are labeled with a fluorescent label, such as Cy3 or Cy5, or are detected using a fluorescently labeled secondary antibody that detects the first antibody.

- The following examples provide, for illustration purposes only, methods of using the protein chips of the present invention to assay for proteases, nucleases, or G-protein receptors. Protein-protein interactions generally can be assayed using the following or a similar method.
- 20

A. Analysis of Protease Activity

25

- Protease activity is assayed in the following way. First, protein probes are prepared consisting of various combinations of amino acids, with a C-terminal or N-terminal mass spectroscopic label attached, with the only proviso being that the molecular weight of the label should be sufficiently large so that all labeled cleavage products of the protein can be
- 30 detected. The protein probe is contacted with proteases attached to a protein chip at 37°C. After incubation at 37°C for an appropriate period of time, and washing with acetonitrile and trifluoroacetic acid, protease activity is measured by detecting the proteolytic products using mass spectrometry. This assay provides information regarding both the proteolytic activity and specificity of the proteases attached to the protein chip.

- 35 Another rapid assay for protease activity analysis is to attach proteins of known sequence to the chip. The substrate proteins are fluorescently labeled at the end not

WO 01/83827

PCT/US01/14526

attached to the chip. Upon incubation with the protease(s) of interest, the fluorescent label is lost upon proteolysis, such that decreases in fluorescence indicate the presence and extent of protease activity. This same type of assay can be carried out wherein the protein substrates are attached to beads placed in the wells of the chips.

5

B. Analysis of Nuclease Activity

Nuclease activity is assessed in the same manner as described for protease activity, above, except that nucleic acid probes/substrates are substituted for protein probes/substrates. As such, fluorescently tagged nucleic acid fragments that are released by nuclease activity can be detected by fluorescence, or the nucleic acid fragments can be detected directly by mass spectrometry.

10

C. Analysis of G-Protein Coupled Receptors

15

In another type of assay, compounds that bind G-protein coupled receptors are identified. Initially, the G-protein receptor is cloned as a GST fusion protein, with the GST portion attached to the C terminus of the G-protein because the C-terminus is generally not involved with determining probe specificity. The G-protein:GST fusion proteins are attached to the wells, preferably by association with glutathione. The G-protein receptors are then incubated with a mixture of compounds, such as a combinatorial chemical library or a peptide library. After washing, bound probes are eluted, for example by the addition of 25% acetonitrile/0.05% trichloroacetic acid. The eluted material is then be loaded into a MALDI mass spectrometer and the nature of the bound probes identified.

20

IX. Example IV: Analysis of Protein Kinases Inhibition by Specific Inhibitors Using Protein Chips

The following description provides, for exemplary purposes only, methods of using the protein chips of the present invention to examine protein kinases for sensitivity to protein kinase inhibitors. Protein-protein interactions generally can be assayed using the following or similar method.

30

Substrates were bound to the surface of the GPTS-treated microwells on the protein chip at room temperature for one hour, then blocked with 1% BSA and 100 mM Tris pH 7.5, and washed three times with TBS buffer. Kinases and different concentrations of

35

WO 01/83827

PCT/US01/14526

kinase inhibitors were added to the microwells in the presence of $^{32}\text{P}\gamma\text{-ATP}$. The phosphorylation reaction was carried out at 30°C for thirty minutes. After completion of the reaction, the protein chip was washed extensively with TBS buffer at room temperature, and then allowed to dry. Phosphorylation signals were obtained by exposing the protein chip to

5 either X-ray film or a phosphorimager.

A human protein kinase A (PKA), a human map kinase (MAPK), three yeast PKA homologs (TPK1, TPK2 and TPK3), and two other yeast protein kinases (HSL1 and RCK1) were tested against two substrates (*i.e.*, a protein substrate for PKA and a commonly used kinase substrate, MBP) using different concentrations of PKI α (a specific human PKA

10 inhibitor) or SB202190 (a MAPK inhibitor). As shown in Figure 7, PKI α specifically inhibited PKA activities on both peptide and MBP substrates. However, PKI α did not inhibit the three yeast PKA homologs (TPK1, TPK2, TPK3) or the other two yeast protein kinases tested, HSL1 and RCK1). In addition, SB202190 did not inhibit PKA activity.

15 X. Example V: Kinase Assays on a Glass Surface

1. Glass slides (Fisher, USA) were soaked in 28-30% ammonium hydroxide overnight at room temperature ("RT") with shaking.
2. The slides were rinsed with ultra-pure water four times for 5 minutes ("min") each, then rinsed with a large volume of 100% ethanol ("EtOH") to completely remove the
- 20 water. Slides were then rinsed with 95% ethanol three times.
3. The slides were immersed in 1% 3-glycidypropyltrimethoxysilane (GPST) solution in 95% EtOH, 16 mM acetic acid ("HOAc") with shaking for 1 hr at room temperature. The slides were rinsed with 95% ethanol three times at RT.
4. The slides were cured at 135°C for 2 hrs under vacuum. After cooling, the
- 25 slides can be stored in Argon for months before use.
5. Approximately 10 μl of each protein substrate (in 40% glycerol) were arrayed onto a 96-well PCR plate on ice. A manual spotting device (V&P Scientific, USA) was used to spot approximately 3 nl of each of the samples onto the GPST-treated glass slide at RT. In one embodiment, 768 samples are spotted on a single slide. The slides were
- 30 incubated in a covered and clean chamber at RT for one hour.
6. A slide was blocked with 10 ml blocking buffer (100 mM glycine, 100 mM Tris, pH 8.0, 50 mM NaCl) at RT for one hour. The slides were washed with TBS buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl) three times and spun to dryness at 1500 rpm for 5
- 35 min.

WO 01/83827

PCT/US01/14526

7. The substrate surfaces on the slides were covered with the HybriWell Sealing System (Schleicher & Schuell, Germany) and 40 µl of kinase mixture, containing a protein kinase and ³²P-γ-ATP as a labeling reagent, was added to the substrates on ice.

8. The reaction was incubated at 30°C for 30 min in a humidity chamber. The
5 seals were peeled from the slides, and the slides immersed into large volume of PBS buffer containing 50 mM EDTA. The slides were further washed with the same buffer 3 x 15 min at RT. The washed slides were then dried with Kimwipes.

9. To acquire the signals, the slides were exposed to a Phosphorimager screen and the data analyzed using ImageQuant software.

10

XI. References Cited

All references cited herein are incorporated herein by reference in their entirety and
15 for all purposes to the same extent as if each individual publication or patent or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference in its entirety for all purposes.

Many modifications and variations of this invention can be made without departing from its spirit and scope, as will be apparent to those skilled in the art. The specific
20 embodiments described herein are offered by way of example only, and the invention is to be limited only by the terms of the appended claims, along with the full scope of equivalents to which such claims are entitled.

25

30

35

WO 01/83827

PCT/US01/14526

We claim:

1. A positionally addressable array comprising a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being at a different position on the solid support, wherein the plurality of different substances consists of at least 100 different substances per cm².
2. The array of claim 1 wherein the plurality of different substances consists of between 100 and 1,000 different substances per cm².
3. The array of claim 1 wherein the plurality of different substances consists of between 1,000 and 10,000 different substances per cm².
4. The array of claim 1 wherein the plurality of different substances consists of between 10,000 and 100,000 different substances per cm².
5. The array of claim 1 wherein the plurality of different substances consists of between 100,000 and 1,000,000 different substances per cm².
6. The array of claim 1 wherein the plurality of different substances consists of between 1,000,000 and 10,000,000 different substances per cm².
7. The array of claim 1 wherein the plurality of different substances consists of between 10,000,000 and 25,000,000 different substances per cm².
8. The array of claim 1 wherein the plurality of different substances consists of at least 25,000,000 different substances per cm².
9. The array of claim 1 wherein the plurality of different substances consists of at least 10,000,000,000 different substances per cm².
10. The array of claim 1 wherein the plurality of different substances consists of at least 10,000,000,000,000 different substances per cm².
11. The array of claim 1 wherein the solid support is a glass slide.
12. The array of claim 1 wherein each different substance is present in a different well on the surface of the solid support.
13. The array of claim 12 wherein each different substance in a different well is bound to the surface of the solid support.
14. The array of claim 12 wherein each different substance in a different well is not bound to the surface of the solid support.
15. The array of claim 12 wherein each different substance in a different well is in solution.

WO 01/63827

PCT/US01/14526

16. The array of claim 12 wherein each well contains reagents for assaying biological activity of a protein or molecule.
17. A positionally addressable array comprising a plurality of different proteins, or molecules comprising functional domains of said proteins, on a solid support, with each different protein or molecule being at a different position on the solid support, wherein the plurality of proteins or molecules consists of at least 50% of all expressed proteins with the same type of biological activity in the genome of an organism.
18. The array of claim 17 wherein the plurality of proteins or molecules consists of at least 75% of all expressed proteins with the same type of biological activity in the genome of an organism.
19. The array of claim 17 wherein the plurality of proteins or molecules consists of at least 90% of all expressed proteins with the same type of biological activity in the genome of an organism.
20. The array of claim 17 wherein the organism is selected from the group consisting of bacteria, yeast, insects, and mammals.
21. The array of claim 17 wherein the expressed proteins with a biological activity of interest are selected from the group consisting of kinases, phosphatases, proteases, glycosidases, acetylases, other group transferring enzymes, nucleic acid binding proteins, hormone binding proteins, and DNA binding proteins.
22. A positionally addressable array comprising a plurality of different substances selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being at a different position on the solid support, wherein the solid support is selected from the group consisting of ceramics, amorphous silicon carbide, castable oxides, polyimides, polymethylmethacrylates, polystyrenes and silicone elastomers.
23. The array of claim 22 wherein the solid support is silicone elastomer.
24. The array of claim 23 wherein the solid support is polydimethylsiloxane.
25. A positionally addressable array comprising a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being at a different position on the solid support, wherein the plurality of different substances are attached to the solid support via a 3-glycidooxypropyltrimethoxysilane linker.

WO 01/63827

PCT/US01/14526

26. An array comprising a plurality of wells on the surface of a solid support wherein the density of the wells is at least 100 wells/cm².
27. The array of claim 26 wherein the density of the wells is between 100 and 1,000 wells/cm².
- 5 28. The array of claim 26 wherein the density of the wells is between 1,000 and 10,000 wells/cm².
29. The array of claim 26 wherein the density of the wells is between 10,000 and 100,000 wells/cm².
30. The array of claim 26 wherein the density of the wells is between 100,000 and 10 1,000,000 wells/cm².
31. The array of claim 26 wherein the density of the wells is between 1,000,000 and 10,000,000 wells/cm².
32. The array of claim 26 wherein the density of the wells is between 10,000,000 and 25,000,000 wells/cm².
- 15 33. The array of claim 26 wherein the density of the wells is at least 25,000,000 wells/cm².
34. The array of claim 26 wherein the density of the wells is at least 10,000,000,000 wells/cm².
35. The array of claim 26 wherein the density of the wells is at least 10,000,000,000,000 wells/cm².
- 20 36. The array of claim 26 wherein a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, is present in the wells, with each different substance being present in a different well.
- 25 37. The array of claim 36 wherein each different substance in a different well is bound to the surface of the solid support.
38. The array of claim 37 wherein each different substance in a different well is covalently bound to the surface of the solid support.
39. The array of claim 38 wherein each different substance in a different well is covalently bound to the surface of the solid support through a linker.
- 30 40. The array of claim 39 wherein the linker is 3-glycidooxypropyltrimethoxysilane.
41. The array of claim 36 wherein each different substance in a different well is non-covalently bound to the surface of the solid support.
42. The array of claim 36 wherein each different substance in a different well is free of 35 binding to the surface of the solid support.

WO 01/83827

PCT/US01/14526

43. The array of claim 36 wherein each different substance in a different well is in solution.
44. The array of claim 26 wherein each well contains reagents for assaying biological activity of a protein or molecule.
- 5 45. The array of claim 26 wherein volumes of the wells are between 1 pL and 5 μ L.
46. The array of claim 26 wherein volumes of the wells are between 1 nL and 1 μ L.
47. The array of claim 26 wherein volumes of the wells are between 100 nL and 300 nL.
48. The array of claim 26 wherein the bottoms of the wells are square, round, V-shaped or U-shaped.
- 10 49. A method of making a positionally addressable array comprising a plurality of wells on the surface of a solid support comprising the step of:
 - casting an array from a microfabricated mold designed to produce a density of wells on a solid surface of greater than 100 wells/cm².
50. A method of making a positionally addressable array comprising a plurality of wells
 - 15 on the surface of a solid support comprising the steps of:
 - (a) casting a secondary mold from a microfabricated mold designed to produce a density of wells on a solid surface of greater than 100 wells/cm²; and
 - (b) casting at least one array from the secondary mold.
51. The method of claims 49 or 50 wherein the casting of an array further comprises the
 - 20 steps of:
 - (a) covering the mold with a liquid cast material; and
 - (b) curing the cast material until the cast is solid.
52. The method of any of claims 49-51 wherein the density of the wells is between 100 and 1,000 wells/cm².
- 25 53. The method of any of claims 49-51 wherein the density of the wells is between 1,000 and 10,000 wells/cm².
54. The method of any of claims 49-51 wherein the density of the wells is between 10,000 and 100,000 wells/cm².
55. The method of any of claims 49-51 wherein the density of the wells is between
 - 30 100,000 and 1,000,000 wells/cm².
56. The method of any of claims 49-51 wherein the density of the wells is between 1,000,000 and 10,000,000 wells/cm².
57. The method of any of claims 49-51 wherein the density of the wells is between 10,000,000 and 25,000,000 wells/cm².
- 35 58. The method of any of claims 49-51 wherein the density of the wells is greater than 25,000,000 wells/cm².

WO 01/63827

PCT/US01/14526

59. The method of any of claims 49-51 wherein the density of the wells is greater than 10,000,000,000 wells/cm².
60. The method of any of claims 49-51 wherein the density of the wells is greater than 10,000,000,000,000 wells/cm².
- 5 61. The method of claim 49 or 50 wherein the array is cast from silicone elastomer.
62. The method of claim 49 or 50 wherein the array is cast from polydimethylsiloxane.
63. The method of claim 51 wherein the liquid cast material is a silicone elastomer.
64. The method of claim 51 wherein the liquid cast material is polydimethylsiloxane.
65. A method of using a positionally addressable array comprising a plurality of
10 different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being at a different position on the solid support, wherein the plurality of different substances consists of at least 100 different substances per cm², comprising the steps of:
15 (a) contacting a probe with the array; and
 (b) detecting protein/probe interaction.
66. A method of using a positionally addressable array comprising a plurality of different proteins, or molecules comprising functional domains of said proteins, on a solid support, with each different protein or molecule being at a different position on
20 the solid support, wherein the plurality of proteins or molecules consists of at least 50% of all expressed proteins with the same type of biological activity in the genome of an organism, comprising the steps of:
 (a) contacting a probe with the array; and
 (b) detecting protein/probe interaction.
- 25 67. A method of using a positionally addressable array comprising a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being at a different position on the solid support, wherein the solid support is selected from the
30 group consisting of ceramics, amorphous silicon carbide, castable oxides, polyimides, polymethylmethacrylates, polystyrenes and silicone elastomers, comprising the steps of:
 (a) contacting a probe with the array; and
 (b) detecting protein/probe interaction.
- 35 68. A method of using a positionally addressable array comprising a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules

WO 01/63827

PCT/US01/14526

- comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being at a different position on the solid support, wherein the plurality of different substances are attached to the solid support via a 3-glycidooxypropyltrimethoxysilane linker, comprising the steps of:
- 5 (a) contacting a probe with the array; and
 - (b) detecting protein/probe interaction.
 69. The method of any of claims 65-68 wherein the probe is an enzyme substrate or inhibitor.
 - 10 70. The method of claim 69 wherein the probe is a substrate or inhibitor of an enzyme chosen from the group consisting of kinases, phosphatases, proteases, glycosidases, acetylases, and other group transferring enzymes.
 71. The method of any of claims 65-68 wherein the probe is chosen from the group consisting of proteins, oligonucleotides, polynucleotides, DNA, RNA, small
 - 15 molecule substrates, drug candidates, receptors, antigens, steroids, phospholipids, antibodies, glutathione, immunoglobulin domains, maltose, nickel, dihydrotyrosin, and biotin.
 72. The method of any of claims 65-68 wherein detection of protein/probe interaction is via mass spectrometry.
 - 20 73. The method of any of claims 65-68 wherein detection of protein/probe interaction is via a method chosen from the group consisting of chemiluminescence, fluorescence, radiolabeling, and atomic force microscopy.
 74. A method of using a positionally addressable array comprising the steps of:
 - 25 (a) depositing a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being at a different position on the solid support, wherein the plurality of different substances consists of at least 100 different substances per cm²;
 - 30 (b) contacting a probe with the array; and
 - (c) detecting protein/probe interaction.
 75. The method of claim 74 wherein the solid support is a glass slide.
 76. A method of using a positionally addressable array comprising the steps of:
 - 35 (a) depositing a plurality of different proteins, or molecules comprising functional domains of said proteins, on a solid support, with each different protein or molecule being at a different position on the solid

WO 01/63827

PCT/US01/14526

- support, wherein the plurality of proteins or molecules consists of at least 50% of all expressed proteins with the same type of biological activity in the genome of an organism;
- (b) contacting a probe with the array; and
 - (c) detecting protein/probe interaction.
- 5 77. The method of claim 76 wherein the solid support is a glass slide.
78. A method of making a positionally addressable array comprising the steps of:
- (a) casting an array from a microfabricated mold designed to produce a density of wells on a solid surface of greater than 100 wells/cm²; and
 - 10 (b) depositing in wells a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being in a different well on the solid support.
- 15 79. A method of making a positionally addressable array comprising the steps of:
- (a) casting a secondary mold from a microfabricated mold designed to produce a density of wells on a solid surface of greater than 100 wells/cm²;
 - (b) casting at least one array from the secondary mold; and
 - 20 (c) depositing in wells a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being in a different well on the solid support.
- 25 80. A method of identifying an antigen that activates a lymphocyte comprising the steps of:
- (a) contacting a positionally addressable array with a plurality of lymphocytes, said array comprising a plurality of potential antigens on a solid support, with each different antigen being at a different position on the solid support, wherein the density of different antigens is at least 100 different antigens per cm²; and
 - 30 (b) detecting positions on the solid support where lymphocyte activation occurs.
81. The method of Claim 80 wherein the lymphocytes are derived from a patient.
- 35

WO 01/63827

PCT/US01/14526

82. The method of Claim 80 wherein the antigens are selected from the group consisting of antigens of pathogens, antigens of autologous tissues, tissue-specific antigens, disease-specific antigens, and synthetic antigens.
83. The method of Claim 80 wherein lymphocyte activation is detected by measuring antibody synthesis.
84. The method of Claim 80 wherein lymphocyte activation is detected by measuring the incorporation of ^3H -thymidine by a lymphocyte.
85. The method of Claim 80 wherein lymphocyte activation is detected by determining the expression of cell surface molecules induced or suppressed by lymphocyte activation.
86. The method of Claim 80 wherein lymphocyte activation is detected by determining the expression of secreted molecules induced by lymphocyte activation.
87. The method of Claim 80 wherein lymphocyte activation is detected by measuring the release of ^{51}Cr chromium.
88. A method of determining the specificity of an antibody preparation comprising the steps of:
- (a) contacting a positionally addressable array with an antibody preparation, said array comprising a plurality of potential antigens on a solid support, with each different antigen being at a different position on the solid support, wherein the density of different antigens is at least 100 different antigens per cm^2 ; and
 - (b) detecting positions on the solid support where binding by an antibody in said antibody preparation occurs.
89. The method of Claim 88 wherein the antibody preparation comprises antiserum, a monoclonal antibody, or a polyclonal antibody.
90. The method of Claim 88 wherein the antibody preparation comprises Fab fragments, chimeric, single chain, humanized, or synthetic antibodies.
91. The method of Claim 88 wherein antibody binding is detected by contacting the array with a fluorescently labeled secondary antibody that binds to antibody in said antibody preparation; removing unbound secondary antibody; and detecting bound label on the array.
92. A method of identifying a mitogen comprising the steps of:
- (a) contacting a positionally addressable array with a population of cells; said array comprising a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins, molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-

WO 01/63827

PCT/US01/14526

- containing cellular material, on a solid support, with each different substance being at a different position on the solid support, wherein the density of different substances is at least 100 different substances per cm^2 ; and
- 5 (b) detecting positions on the solid support where mitogenic activity is induced in a cell.
93. A kit comprising:
- (a) one or more arrays comprising a plurality of wells on the surface of a solid support wherein the density of the wells is at least 100 wells/ cm^2 ; and
- 10 (b) in one or more containers, one or more probes, reagents, or other molecules.
94. The kit according to Claim 93 wherein said one or more containers comprise a reagent useful for assaying biological activity of a protein.
- 15 95. The kit according to Claim 93 wherein said one or more containers comprise a reagent useful for assaying interactions between a probe and a protein.
96. The kit according to Claim 94 or 95 wherein the reagent is in solution.
97. The kit according to Claim 94 or 95 wherein the reagent is in solid form.
98. The kit according to Claim 94 or 95 wherein the reagent is contained in each well of
- 20 the array.
99. The kit according to Claim 94 or 95 wherein the reagent is contained in selected wells of the array.
100. The kit according to Claim 93 wherein said one or more containers contain a solution reaction mixture for assaying biological activity of a protein or molecule.
- 25 101. The kit according to Claim 100 wherein said one or more containers contain one or more substrates to assay said biological activity.
102. A kit comprising:
- (a) one or more positionally addressable arrays comprising a plurality of different substances, selected from the group consisting of proteins,
- 30 molecules comprising functional domains of said proteins, whole cells, and protein-containing cellular material, on a solid support, with each different substance being at a different position on the solid support, wherein the plurality of different substances consists of at least 100 different substances per cm^2 ; and
- 35 (b) in one or more containers, one or more probes, reagents, or other molecules.

WO 01/63827

PCT/US01/14526

103. The kit according to Claim 102 wherein the substances are attached to the surface of wells on the solid support.
104. The kit according to Claim 103 wherein the substances are proteins, and the proteins are at least 50% of all expressed proteins with the same type of biological activity in an organism.
- 5 105. The kit according to Claim 104 wherein the substances are proteins or molecules comprising functional domains of said proteins, and the proteins or molecules are selected from the group consisting of kinases, phosphatases, proteases, glycosidases, acetylases, nucleic acid binding proteins, and hormone binding proteins.

10

15

20

25

30

35

WO 01/83827

PCT/US01/14526

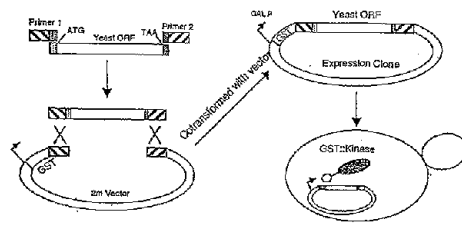


FIG. 1A

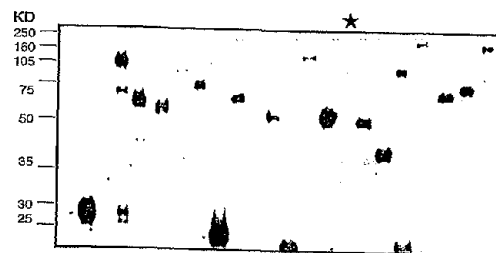


FIG. 1B

WO 01/83827

PCT/US01/14526

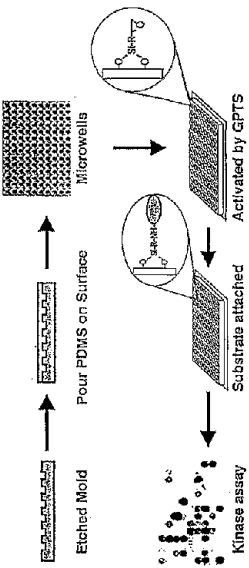


FIG. 2A

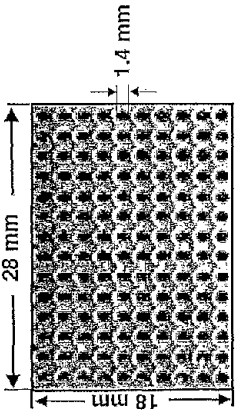


FIG. 2B

WO 01/83827

PCT/US01/14526

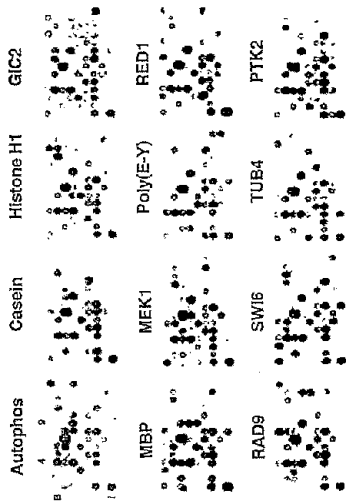


FIG. 3

WO 01/83827

PCT/US01/14526

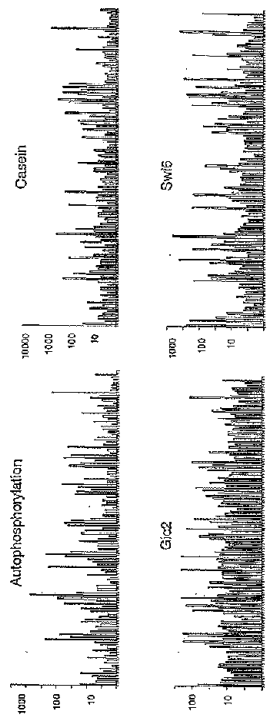


FIG.4A

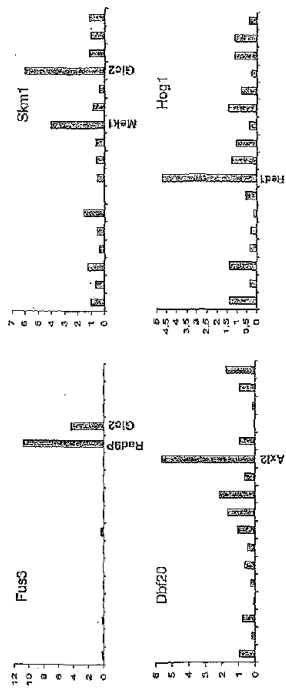
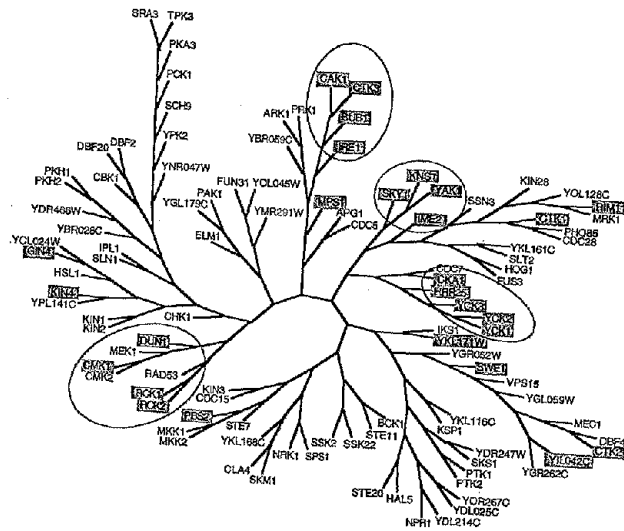
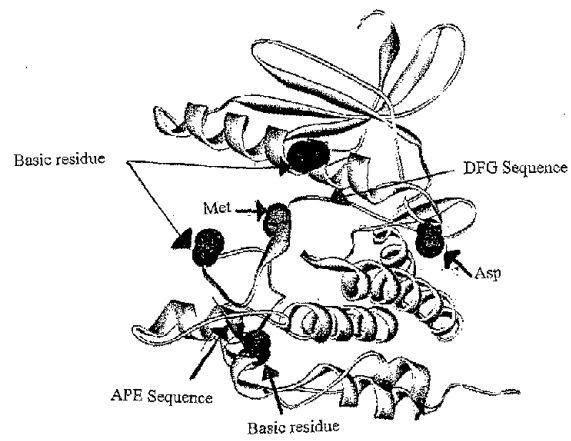


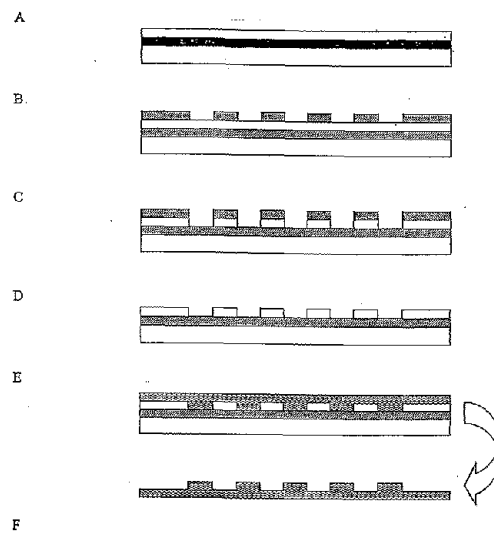
FIG. 4B



**FIG.5B**

WO 01/83827

PCT/US01/14526



WO 01/83827

PCT/US01/14526

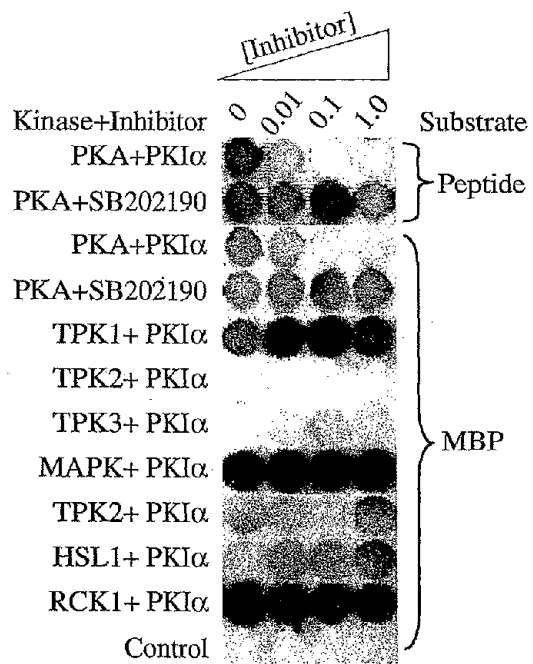


FIG. 7

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/14525									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68 US CL : 435/7.1, D1G 22 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. : 435/5, 6, 7.1, 7.9, 422/50, 68.1, 76 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) USPTO, DERWENT: array, address, encode, spatially, positionally, microarray, wells, high density, cast, mold, microfabricate											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>XB—BY</td> <td>WO 00/06770 A1 (SOLEXA LTD.) 10 February 2000 (10.02.2000), pages 2, 3, 5, 11, 13, 14, 18, and the claims</td> <td>1-9, 11-20, 26-34, 36-39, 42-48, 65, 66, 69, 71, 73-77, 93-104B B10, 21-25, 35, 40, 41, 67, 68, 70, 72, 80-92, 105</td> </tr> <tr> <td>XB—BY</td> <td>US 5,583,639 A (DORSEL et al.) 17 December 1996 (17.12.1996), columns 1 and 5.</td> <td>1-5, 65, 71, 73, 74, 76B--- B5-48, 66-70, 72, 75, 77-105</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	XB—BY	WO 00/06770 A1 (SOLEXA LTD.) 10 February 2000 (10.02.2000), pages 2, 3, 5, 11, 13, 14, 18, and the claims	1-9, 11-20, 26-34, 36-39, 42-48, 65, 66, 69, 71, 73-77, 93-104B B10, 21-25, 35, 40, 41, 67, 68, 70, 72, 80-92, 105	XB—BY	US 5,583,639 A (DORSEL et al.) 17 December 1996 (17.12.1996), columns 1 and 5.	1-5, 65, 71, 73, 74, 76B--- B5-48, 66-70, 72, 75, 77-105
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
XB—BY	WO 00/06770 A1 (SOLEXA LTD.) 10 February 2000 (10.02.2000), pages 2, 3, 5, 11, 13, 14, 18, and the claims	1-9, 11-20, 26-34, 36-39, 42-48, 65, 66, 69, 71, 73-77, 93-104B B10, 21-25, 35, 40, 41, 67, 68, 70, 72, 80-92, 105									
XB—BY	US 5,583,639 A (DORSEL et al.) 17 December 1996 (17.12.1996), columns 1 and 5.	1-5, 65, 71, 73, 74, 76B--- B5-48, 66-70, 72, 75, 77-105									
☒ 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 "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "C" 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 "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understate the principles 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 16 June 2001		Date of mailing of the international search report 15 AUG 2001									
Name and mailing address of the ISA/US Counsellor of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Thomas A. Reschler Telephone No. (703) 608-4548									

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/14526
G (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
XB--BY	US 5,653,939 A (HOLLIS et al.) 5 August 1997 (03.08.1997), see entire document.	1-6, 12-22, 26-33, 36-39, 41-48, 65-67, 69-71, 73, 74, 76, 78, 79, 88-103B ----- 08-11, 23 25, 34, 35, 40, 68, 72, 73, 77, 80-87
Y	US 5,776,748 A (SINGHVI et al.) 7 July 1998 (07.07.1998), columns 4-6.	49-64
XB--BY	US 6,051,280 A (SOSNOWSKI et al.) 18 April 2000 (18.04.2000), columns 3, 8, 9, and 23	1, 2, 12-23, 35, 37, 38, 39, 41-44, 48, 65-103B ----- 03-11, 24, 25, 28-35, 40, 45-47

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;"> International application No. PCT/US01/14526 </td> </tr> </table>	International application No. PCT/US01/14526	
International application No. PCT/US01/14526			
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)			
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:			
1.	☐ Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:		
2.	☐ Claim 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.	☐ Claim 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: Please See Continuation Sheet			
1.	☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.		
2.	☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.		
3.	☐ 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.:		
4.	☐ 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	<table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 5%; text-align: center; vertical-align: top;"> ☐ ☒ </td> <td style="padding-left: 10px;"> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. No protest accompanied the payment of additional search fees. </td> </tr> </table>	☐ ☒	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. No protest accompanied the payment of additional search fees.
☐ ☒	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. No protest accompanied the payment of additional search fees.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US91/14526

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING: This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-25 and 102-105, drawn to a positionally addressable array comprising at least 100 different substances per square centimeter.

Group II, claim(s) 26-48 and 93-101, drawn to an array comprising at least 100 wells per square centimeter.

Group III, claim(s) 49-64, 78, and 79, drawn to methods of making a positionally addressable array.

Group IV, claim(s) 65-77 and 80-92, drawn to methods of using a positionally addressable array.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature common to Groups I-IV is an array (either positionally addressable or not) with a well density or a sample density of more than 100 wells or samples per square centimeter. High density positionally addressable arrays of with densities greater than 100 samples or wells per square centimeter are shown by US Patent No. 6,051,389 (SOSNOWSKI et al.) 18 April 2000 to lack novelty and are therefore not a contribution over the prior art (see figures 2 and 3 and "summary of the invention").

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 21/78	C 1 2 N 11/14	
G O 1 N 27/62	G O 1 N 21/78	C
G O 1 N 33/543	G O 1 N 27/62	V
G O 1 N 33/566	G O 1 N 33/543	5 7 5
G O 1 N 33/577	G O 1 N 33/566	
G O 1 N 37/00	G O 1 N 33/577	Z
	G O 1 N 37/00	1 0 2

(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,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,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,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

バブルジェット

(72)発明者 リード, マーク

アメリカ合衆国 0 6 4 6 8 コネティカット州, モンロー, ギニア ロード 1 2 9

(72)発明者 ズー, ヘング

アメリカ合衆国 0 6 5 1 1 コネティカット州, ニュー ヘブン, パール ストリート 4 8

(72)発明者 クレミック, ジェームズ, フランク

アメリカ合衆国 0 6 5 1 1 コネティカット州, ニュー ヘブン, ウィロウ ストリート 2 6
0

Fターム(参考) 2G054 AA06 CA21 CE02 EA03 EA10 GA04

4B033 NA02 NA11 NA22 NB25 NB27 NB35

4H045 AA10 AA30 EA50 EA55 FA80

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004511753A5	公开(公告)日	2008-06-19
申请号	JP2001580434	申请日	2001-05-04
[标]申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
[标]发明人	スナイダーマイケル リードマーク ズーヘング クレミックジェームズフランク		
发明人	スナイダー, マイケル リード, マーク ズー, ヘング クレミック, ジェームズ, フランク		
IPC分类号	G01N33/53 C07K17/08 C07K17/12 C12N11/08 C12N11/14 G01N21/78 G01N27/62 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/577 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/485 B01J19/0046 B01J2219/00274 B01J2219/00313 B01J2219/00317 B01J2219/00382 B01J2219/00497 B01J2219/00527 B01J2219/00585 B01J2219/00596 B01J2219/00605 B01J2219/ /0061 B01J2219/00612 B01J2219/00621 B01J2219/00626 B01J2219/0063 B01J2219/00637 B01J2219/ /00659 B01J2219/00677 B01J2219/00702 B01J2219/00722 B01J2219/00725 B01L3/5085 B82Y15/00 B82Y30/00 C40B40/06 C40B40/10 C40B60/14 G01N33/5008 G01N33/5041 G01N33/543 G01N33/ /54313 G01N2500/00		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.N C07K17/08 C07K17/12 C12N11/08 C12N11/14 G01N21/78.C G01N27/62. V G01N33/543.575 G01N33/566 G01N33/577.Z G01N37/00.102		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/CA21 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/EA10 2G054/GA04 4B033/NA02 4B033/ /NA11 4B033/NA22 4B033/NB25 4B033/NB27 4B033/NB35 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/EA50 4H045/EA55 4H045/FA80		
优先权	60/201921 2000-05-04 US 60/221034 2000-07-27 US		
其他公开文献	JP2004511753A		

摘要(译)

本发明涉及用于蛋白质功能的大规模研究的蛋白质芯片，其中芯片含有致密堆积的反应孔。本发明还涉及使用蛋白质芯片同时测定蛋白质样品或一种蛋白质芯片中存在的蛋白质的存在，量和/或功能，或测定每种探针的存在，相对特异性和结合亲和力的方法。在芯片上每种蛋白质的探针混合物中。本发明还涉及使用蛋白质芯片进行高密度和小体积化学反应的方法。此外，本发明涉及可用作蛋白质芯片基质的聚合物和制备蛋白质芯片的方法。本发明还涉及可用于衍生化蛋白质芯片基质的化合物。