

(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2004-522935
(P2004-522935A)

(43) 公表日 平成16年7月29日(2004.7.29)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	2 GO 4 5
GO 1 N 33/566	GO 1 N 33/566	
GO 1 N 33/68	GO 1 N 33/68	
GO 1 N 37/00	GO 1 N 37/00	1 O 2
	GO 1 N 37/00	1 O 3
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 113 頁)		

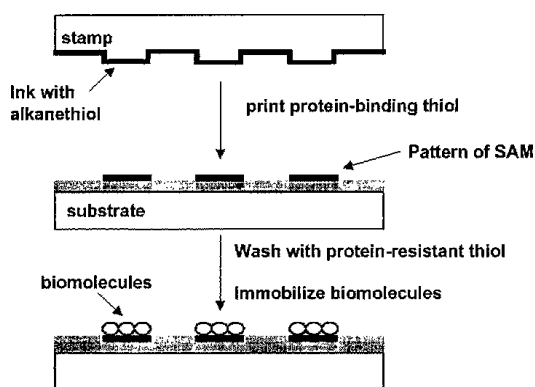
(21) 出願番号	特願2002-519942 (P2002-519942)	(71) 出願人	503061865 サーフェイス ロジックス, インコーポレイティド アメリカ合衆国, マサチューセッツ 02135, ブライトン, ソルジャーズ フィールド プレイス 50
(86) (22) 出願日	平成13年8月14日 (2001.8.14)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月14日 (2003.2.14)	(74) 代理人	100092624 弁理士 鶴田 準一
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/025351	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 国際公開番号	W02002/014864	(74) 代理人	100082898 弁理士 西山 雅也
(87) 国際公開日	平成14年2月21日 (2002.2.21)		
(31) 優先権主張番号	60/225, 363		
(32) 優先日	平成12年8月14日 (2000.8.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体分子アレイ

(57) 【要約】

本発明は、生物学的分子間の多数の相互作用を同時に調べることを容易にするアレイ・システムを提供する。本発明の生体分子アレイは柔軟かつ汎用性のあるツールであり、生物学の研究者が細胞タンパク質の相互作用をハイスループットで調べることを可能にする。本発明のいくつかの実施態様では、生化学経路を分析するため、固定化された生体分子のアレイを形成するステップと、このアレイを溶液中の生体分子に曝露するステップと、固定化された生体分子の修飾を検出するステップ、および/または溶液中の生体分子の修飾を検出するステップ、および/または溶液中の生体分子が固定化された生体分子に結合したことを検出するステップとを含む方法と、そのためのアレイが提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生化学経路を分析するための方法であって、

- a) 固定化された生体分子のアレイを形成するステップと；
- b) 当該アレイを溶液中の生体分子に曝露するステップと；
- c) 固定化された上記生体分子の修飾を検出するステップを含む方法において、固定化された上記生体分子および/または溶液中の上記生体分子が、少なくとも1つの生化学経路の少なくとも2つの要素を含む方法。

【請求項 2】

上記アレイが、少なくとも2つの異なったタイプの固定化された生体分子を含む、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

溶液中の上記生体分子が、少なくとも2つの異なったタイプの生体分子を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

上記修飾に基づき、溶液中の少なくとも1つの生体分子の存在を検出するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

上記修飾に基づき、溶液中の少なくとも1つの生体分子の機能を同定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 6】

上記修飾に基づき、溶液中の少なくとも1つの生体分子の存在量を定量するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

上記修飾に基づき、溶液中の少なくとも1つの生体分子の活性レベルを定性的および/または定量的に明らかにするステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

上記修飾に基づき、固定化された少なくとも1つの生体分子の活性レベルを定性的および/または定量的に明らかにするステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

上記修飾に基づき、固定化された少なくとも1つの生体分子の存在を検出するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 10】

上記修飾に基づき、固定化された少なくとも1つの生体分子の機能を同定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

上記修飾に基づき、固定化された少なくとも1つの生体分子の存在量を定量するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

生化学経路を分析するための方法であって、 40

- a) 固定化された生体分子のアレイを形成するステップと；
- b) 当該アレイを溶液中の生体分子に曝露するステップと；
- c) 溶液中の上記生体分子の修飾を検出するステップを含む方法において、固定化された上記生体分子および/または溶液中の上記生体分子が、少なくとも1つの生化学経路の少なくとも2つの要素を含む方法。

【請求項 13】

上記アレイが、少なくとも2つの異なったタイプの固定化された生体分子を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 14】

溶液中の上記生体分子が、少なくとも2つの異なったタイプの生体分子を含む、請求項 1 50

2に記載の方法。

【請求項15】

上記修飾に基づき、溶液中の少なくとも1つの生体分子の存在を検出するステップをさらに含む、請求項12に記載の方法。

【請求項16】

上記修飾に基づき、溶液中の少なくとも1つの生体分子の機能を同定するステップをさらに含む、請求項12に記載の方法。

【請求項17】

上記修飾に基づき、溶液中の少なくとも1つの生体分子の存在量を定量するステップをさらに含む、請求項12に記載の方法。

10

【請求項18】

上記修飾に基づき、溶液中の少なくとも1つの生体分子の活性レベルを定性的および/または定量的に明らかにするステップをさらに含む、請求項12に記載の方法。

【請求項19】

上記修飾に基づき、固定化された少なくとも1つの生体分子の活性レベルを定性的および/または定量的に明らかにするステップをさらに含む、請求項12に記載の方法。

【請求項20】

上記修飾に基づき、固定化された少なくとも1つの生体分子の存在を検出するステップをさらに含む、請求項12に記載の方法。

【請求項21】

上記修飾に基づき、固定化された少なくとも1つの生体分子の機能を同定するステップをさらに含む、請求項12に記載の方法。

20

【請求項22】

上記修飾に基づき、固定化された少なくとも1つの生体分子の存在量を定量するステップをさらに含む、請求項12に記載の方法。

【請求項23】

生化学経路を分析するための方法であって、

a) 固定化された生体分子のアレイを形成するステップと；

b) 当該アレイを溶液中の生体分子に曝露するステップと；

c) 溶液中の上記生体分子が固定化された上記生体分子に結合したことを検出するステップを含む方法において、

30

固定化された上記生体分子および/または溶液中の上記生体分子が、少なくとも1つの生化学経路の少なくとも2つの要素を含む方法。

【請求項24】

上記アレイが、少なくとも2つの異なったタイプの固定化された生体分子を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

溶液中の上記生体分子が、少なくとも2つの異なったタイプの生体分子を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

上記結合に基づき、溶液中の少なくとも1つの生体分子の存在を検出するステップをさらに含む、請求項23に記載の方法。

40

【請求項27】

上記結合に基づき、溶液中の少なくとも1つの生体分子の、固定化された少なくとも1つの生体分子に対するアフィニティおよび/またはアビディティを同定するステップをさらに含む、請求項23に記載の方法。

【請求項28】

上記結合に基づき、固定化された少なくとも1つの生体分子の、溶液中の少なくとも1つの生体分子に対するアフィニティおよび/またはアビディティを同定するステップをさらに含む、請求項23に記載の方法。

50

【請求項 29】

上記結合に基づき、溶液中の少なくとも1つの生体分子の存在量を定量するステップをさらに含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 30】

上記結合に基づき、固定化された少なくとも1つの生体分子の存在を検出するステップをさらに含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 31】

上記結合に基づき、固定化された少なくとも1つの生体分子の存在量を定量するステップをさらに含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 32】

固定化された生体分子のアレイであって、固定化されたこれら生体分子が、少なくとも1つの生化学経路の少なくとも2つの要素を含むアレイ。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

ほとんどすべての生物活性は、細胞内におけるタンパク質同士の相互作用によって調節されている。タンパク質は、細胞の触媒であり、運動変換器であり、シグナル伝達体である。タンパク質は、細胞分裂、細胞増殖、細胞分化、細胞死を制御し、環境に対する細胞の応答を伝達する。したがって細胞プロセスを理解するためには、タンパク質の活動を観察し、細胞内におけるタンパク質同士の相互作用ネットワークを明らかにする必要がある。

20

【0002】

研究者は、ヒトゲノムから300,000種類以上のタンパク質が翻訳されると考えている。生物学者は、長年にわたってこれらタンパク質同士の相互作用を理解しようと努力してきた。ポストゲノム時代においてこれらタンパク質すべてについての青写真が利用可能になったとき、生物学者は、原則として、より多くのタンパク質とその相互作用を研究できるようにするであろう。

【0003】

かつては、生物学者が利用できるツールを用いた場合、こうした相互作用のうちの1つだけしか一度に研究することができなかった。というのも、タンパク質の多数の相互作用を観察できる分析ツールがなかったからである。タンパク質の相互作用を大量かつ並列に分析することが可能なシステムは非常に大きな価値があり、生物学における発見を加速することであろう。

30

【0004】

細胞のシグナル伝達が分子レベルで理解できると、病気に関する見通しが大いによくなるであろう。このようなことがわかると、より効果的な診断ツールと、医薬品を開発するためのより合理的な方法が得られることになる。生物学を分子レベルで理解するための出発点は、いくつかの生物についてあらゆる遺伝子を同定してその配列を明らかにすることであり、この方法はゲノミクスとして知られている。例えばヒトゲノム計画により、全部で100,000個あるヒトの遺伝子の配列が得られた。こうした配列決定の努力によって得られた大量の分子情報から、機能的ゲノミクスという分野が生まれている。

40

【0005】

機能的ゲノミクスは、細胞の状態の違い（例えば病気の状態と病気でない状態）をメッセンジャーRNA (mRNA) のレベルにおける違いと関連づける。この方法により、多数の遺伝子相互間の機能的関係を明らかにすることができた。機能的ゲノミクスにおけるおそらく最も成功したツールは、相補的DNA (cDNA) アレイであろう。このアレイは、アフィメトリックス社、インサイト・ジェノミクス社、ジーン・ロジック社、ナノジェン社、アジレント社といった会社が市販している。

【0006】

しかし機能的ゲノミクスは、ゲノム配列を利用して生物学を理解するための第一歩にすぎない。機能的ゲノミクスによって興味の対象である遺伝子を同定できるとはいえ、分子レ

50

ベルの情報や、タンパク質が互いにどのように相互作用して細胞の振る舞いや生理を制御しているかは、機能的ゲノミクスからはわからない。例えば転写された mRNA のレベルは、細胞内のタンパク質の量や性質を評価するための信頼できる指標ではない。mRNA のレベルとタンパク質のレベルがこのように関連していないことには多くの原因がある。原因としては、例えば、選択的スプライシングなどによって1つの遺伝子から2つ以上のタンパク質が発現すること、タンパク質が翻訳後に修飾されること（例えばリン酸化、メチル化、アセチル化、脂質化、ファルネシル化、グリコシル化など）が挙げられる。さらに、ゲノミクスによってタンパク質同士の相互作用に関する直接的な情報を得ることはできない。このような直接的な情報の欠如は、翻訳後修飾に大きく支配されるシグナル伝達経路の分野において特に顕著である。

10

【0007】

機能的プロテオミクスは新たに発展中の分野であり、細胞の状態の違いが発現したタンパク質のレベルの違いと直接関係している。プロテオミクス分析で現在利用されている方法（2D電気泳動（2DE）と質量分析）は、ハイスループット用に最適化されていない。また、これらの方法は、膜貫通タンパク質での利用には適しておらず、実施することが技術的に難しく、少量のタンパク質（例えばシグナル伝達経路のタンパク質）を検出する能力が限られているという限界も有する。機能的プロテオミクスを利用する際の1つの制約は、タンパク質とその相互作用を検出できる汎用性と柔軟性のある技術（例えばcDNAアレイ）が現在のところ利用できないことである。

【0008】

タンパク質アレイは、生物学の研究者がハイスループットのアッセイを行なう際に使用する一般的なツールである。タンパク質アレイは、既知の生体分子がパターンニングされたアレイであり、溶液中の複雑なタンパク質混合物の中から特定のタンパク質を分子レベルで認識することができる。タンパク質アレイに関してさまざまなアイデアが提案されている。最も一般的なものはモノクローナル抗体のアレイで構成されており、cDNAアレイがmRNAを捕捉するのと同様の方法でモノクローナル抗体が特定のタンパク質と結合する。これ以外には、タンパク質と結合する化学物質のアレイを用いる方法がある。これらアレイを利用してタンパク質が単離されてきたが、タンパク質同士の相互作用を観察するのに有効なアレイ・システムはまだ存在していない。

20

【0009】

そのため、タンパク質間相互作用を十分にハイスループットで研究するための柔軟で汎用性のあるツールとなるアレイ・システムが必要とされている。

30

【0010】

発明のまとめ

本発明は、生体分子間の多数の相互作用を同時に観察することを容易にするアレイ・システムを提供する。本発明の生体分子アレイは柔軟で汎用性のあるツールであり、生物学の研究者は、このアレイを用いると、細胞内のタンパク質の相互作用をハイスループットで調べることが可能になる。

【0011】

いくつかの実施態様では、これらシステムを、医薬品その他の物質が1つまたは複数の生体分子に与える効果を調べるのに適した形態にする。いくつかの実施態様では、医薬品その他の物質が1つまたは複数の経路の1つまたは複数の生体分子に与える効果を分析する。このような実施態様では、生体分子および/または経路は既知でも未知でもよく、またその特性がわかっているか、わかっていなくてもよい。同様に、医薬品その他の物質は同定されていてもいなくてもよく、その特性がわかっているか、わかっていなくてもよい。

40

【0012】

一実施態様では、これらシステムを、シグナル伝達経路と、酵素を媒介とした翻訳後修飾によって支配されるその他の生体プロセスを明らかにするのに適した形態にする。いくつかの実施態様では、本発明のアレイ・システムを、アレイの性能がハイスループットになるようにする。本発明のアレイ・システムの製造方法と使用方法が提供される。

50

【0013】

この明細書では、“生物学的分子”と“生体分子”という用語は、同じ意味で使用することができる。これらの用語は意味が広く、一般に、生物系によって産生される有機分子またはそれ以外の生物学的分子や、生物系と接触させたときにその生物系に影響を与えたりその生物系を変化させたりすることのできる有機分子や、他の生物学的分子を修飾したり他の生物学的分子と結合したりできる有機分子がこれらの用語に含まれる。同様に、“生物系”も意味を広く考えるべきであり、例えば、有機体、有機系、器官、組織、細胞、インピトロで相互作用する生物学的分子がこの用語に含まれる。“生体分子”という用語には、生物系によって産生される無機分子またはそれ以外の生物学的分子や、生物系と接触させたときにその生物系に影響を与えたりその生物系を変化させたりすることのできる無機分子や、他の生物学的分子を修飾したり他の生物学的分子と結合したりできる無機分子も含まれる。この明細書で用いる“生体分子”には、例えば、無機ビタミン、ミネラル、毒素、医薬品、補因子を含めることができる。

10

【0014】

生体分子の具体例として、オリゴ糖、多糖、オリゴペプチド、ポリペプチド、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドなどが挙げられる。オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドとしては、例えばDNAやRNAが挙げられる。生体分子には、有機化合物、有機金属化合物、有機化合物および有機金属化合物の塩、糖、アミノ酸、ヌクレオチド、脂質、炭水化物、医薬品、毒素、毒液、ステロイド、レクチン、ビタミン、ミネラル、代謝物、補因子、補酵素も含まれる。この明細書で使用する“医薬品”という用語は意味を広く解釈すべきであり、例えば、効果と安全性が確認されている医薬品や、生体分子のライブラリからランダムに取り出された医薬品候補や、両者の中間にある研究段階の医薬品が挙げられる。

20

【0015】

生体分子としてはさらに、上記分子の誘導体が挙げられる。生体分子の誘導体としては、例えば、オリゴペプチド、ポリペプチド、ペプチド、タンパク質の脂質誘導体およびグリコシル化誘導体が挙げられる。生体分子の誘導体に関するさらに別の具体例としては、オリゴ糖および多糖の脂質誘導体（例えばリポ多糖）が挙げられる。

【0016】

生体分子は、同じと見なす基準の違いによってグループまたはクラスに分けて考えることができる。例えばタンパク質と脂質は生体分子の2つの異なるクラスであると考えられることができる。さらに厳密に考えると、酵素と構造タンパク質は、タンパク質の異なる2つのクラスの実例である。さらに厳密に考えると、ペプチダーゼとキナーゼは酵素の異なる2つのクラスの実例である。この明細書では、このようにさまざまにグループ化したものを生体分子のクラスと呼ぶ。この明細書では、生体分子の“タイプ”とは、特定の1つの生体分子のことを指す。例えばプロテインキナーゼAは、生体分子の1つのタイプである。同様に、プロテインキナーゼCは、別のタイプの生体分子である。本発明のアレイは、1つ以上のタイプの生体分子を含むことができ、タイプの異なる生体分子は、同じクラスに属する生体分子からのものでも異なるクラスに属する生体分子からのものでもよい。

30

【0017】

いくつかの実施態様では、本発明のアレイ・システムは、表面に固定化された生体分子を含んでいる。いくつかの実施態様では、生体分子の結合を容易にするために表面を活性化させたり、適合させたり、調整したり、修飾したりすることができる。

40

【0018】

この明細書では、“アレイ”という用語は、一般に、結合アイランドまたは生体分子が所定の空間的配置にされたものを指す。表面に固定化された生体分子を含む本発明のアレイ・システムは、“生体分子アレイ”と呼ぶこともできる。生体分子が表面に結合するのを容易にするために活性化させたり、適合させたり、調節したり、修飾したりした表面を含む本発明のアレイは、“結合アレイ”と呼ぶこともできる。さらに、この明細書で用いる“アレイ”という用語は、表面に配置された複数アレイを指すのに用いることもできる。

50

例えば、1つのアレイをコピーしたものが表面に複数あるような場合である。複数のアレイを有するこのような表面は、“複数アレイ”または“繰り返しアレイ”と呼ぶこともできる。この明細書で用いる“アレイ”という用語には、生体分子アレイ、結合アレイ、複数アレイ、およびこれらの任意の組み合わせが含まれ、意味としてそのどれが適切であるかは、文脈から明らかになる。

【0019】

本発明において有効な表面は、任意の形状およびサイズにすることができる。表面の具体例としては、チップ、連続表面、湾曲した表面、可撓性のある表面、フィルム、プレート、シート、チューブなどが挙げられる。表面は、面積が約 $1\mu\text{m}^2$ ～約 500cm^2 であることが好ましい。本発明による表面の面積、長さ、幅は、実施するアッセイにおける条件に応じて変えることができる。考慮すべき事項として、例えば、取り扱いやすさ、表面を形成する材料の制約、検出システムの条件、堆積システムの条件（例えばアレイ形成装置）などが挙げられる。いくつかの実施態様では、表面の面積が約 106cm^2 である。いくつかの実施態様では、表面の長さおよび幅が、標準的な 96 （または 384 、 1536 、 3456 ）ウエルのプレートと同様になっている。

10

【0020】

本発明において有効な表面は、適切な任意の厚さにすることができる。本発明による表面の厚さは、実施するアッセイにおける条件に応じて変えることができる。考慮すべき事項として、例えば、取り扱いやすさ、表面を形成する材料の制約、検出システムの条件、堆積システムの条件（例えばアレイ形成装置）などが挙げられる。例えば検出にSPRを用いる場合には、表面は一般に 30nm 以下の厚さであることが好ましい。蛍光プレート読み取り装置を用いて読み取る表面はこれよりも厚くすることができ、厚さを例えば約 1cm にする。一般に、表面は厚さを約 $50\mu\text{m}$ ～約 2cm にすることができる。

20

【0021】

いくつかの実施態様では、結合アイランドまたは固定化された生体分子のグループまたはアレイを分離する物理的手段を用いることが望ましい。このような物理的分離により、異なるグループまたはアレイを、興味の対象であるさまざまな溶液に曝露することが容易になる。したがっていくつかの実施態様では、アレイを、 96 、 384 、 1536 、 3456 個のマイクロウェルを有するプレートのウェルの中に配置する。このような実施態様では、ウェルの底部をアレイ形成用の表面として用いるか、あるいはアレイを別の表面に形成した後、ウェルの中に配置することができる。ウェルのない表面を用いるいくつかの実施態様では、表面に結合アイランドを形成するか、あるいは表面に生体分子を固定化し、これらアイランドまたは生体分子に対応する穴を設けたガasketをその表面に配置することができる。このようなガasketは、液体を漏らさないことが好ましい。ガasketは、アレイ形成プロセスの任意のときに表面に配置し、グループまたはアレイを分離する必要がもはやなくなったときに除去することができる。例えば、「ポリマーゲル接触マスク、およびこのマスクを製造するための方法と鑄型」という名称のアメリカ合衆国特許出願番号第 $09/705,187$ 号を参照のこと。

30

【0022】

いくつかの実施態様では、生体分子を別々の領域に固定化する。これら別々の領域は、生体分子が実質的に結合していない領域に囲まれていることが好ましい。別のいくつかの実施態様では、表面を適合させたり、調整したり、修飾したりすることにより、生体分子をこの表面の別々の領域に結合しやすくすることができる。この明細書では、生体分子の結合を容易にするために修飾する領域を“結合アイランド”または“結合領域”と呼ぶことができる。結合領域は、生体分子と結合しない領域または生体分子と結合しにくい領域によって囲まれるか、あるいは互いに分離されていることが好ましい。

40

【0023】

いくつかの実施態様では、固定化された生体分子は、その固定化された生体分子の上に来る溶液からの生体分子と結合する。別の実施態様では、固定化された生体分子は、その固定化された生体分子の上に来る溶液中の生体分子を修飾するか、あるいはその溶液中の生

50

体分子によって修飾される。別の実施態様では、本発明のアレイ・システムは、細胞内で起こるシグナル伝達プロセスを模倣する。さらに別の実施態様では、本発明のアレイ・システムは、シグナル伝達経路に参与する酵素（例えばキナーゼが挙げられるが、それだけに限定されるわけではない）の活性を調べるのに適した形態にする。さらに別の実施態様では、本発明のアレイ・システムは、溶液中の生体分子が、特定のクラスに属する生体分子の多数の要素と相互作用するのを調べるのに適した形態にする。いくつかの実施態様では、本発明のアレイ・システムは、従来のタンパク質チップよりも多くの生化学情報を提供する。

【0024】

本発明のいくつかの実施態様では、生体分子を1つまたは複数の表面に固定化してアレイを形成する。生体分子は、その生体分子と結合することが可能な介在分子を用いて表面に固定化することができる。この明細書では、この介在分子は、“アフィニティ分子”と呼ぶこともできる。このような介在分子を表面に結合させるか、あるいは表面上に層にし、生体分子をこの介在分子に対して固定化する。介在分子を介して表面に固定化された生体分子は、“表面に固定化された生体分子”という表現に含まれる。同様に、表面への生体分子の固定化とは、表面への直接的固定化、あるいは介在分子を用いた固定化のことを意味し、意味としてそのどれが適切であるかは、文脈から明らかになる。

10

【0025】

1つ以上のタイプまたはクラスの生体分子を単一の表面に固定化することができる。いくつかの実施態様では、多数の異なる（例えば1000の）タイプまたはクラスの生体分子を固定化する。別の実施態様では、より少数（例えば100）のタイプまたはクラスの生体分子を固定化する。別の実施態様では、さらに少数（例えば100以下）のタイプまたはクラスの生体分子を固定化する。さらに別の実施態様では、これよりもさらに少数（例えば1～99）のタイプまたはクラスの生体分子を固定化する。本発明の特定のアレイに固定化する生体分子のクラスまたはタイプの数は、実施するアッセイ、生体分子のサイズ、生体分子間の望ましい距離などの因子に基づいて選択することができる。

20

【0026】

本発明のいくつかの実施態様では、生体分子が表面に容易に結合できるように、その表面を修飾したり、適合させたり、調節したりする。このような調節には、他の分子と結合できる分子を表面に固定化したりその表面上に層にしたりする操作が含まれる。この明細書では、他の分子と結合できる分子は、“アフィニティ分子”と呼ぶことができる。アフィニティ分子としては、生体分子と結合できる分子や、生体分子に結合した特定の結合基と結合できる分子が挙げられる。このような結合基は、適切な任意の手段を通じて生体分子に結合させることができる。例えば、生体分子に元々存在している部分を結合基として利用したり、化学的に結合基を結合させたり、組み換えDNA技術を利用してそのような結合基を有する生体分子を製造したり、病気の進行プロセスにおいて結合基を生体分子と結合させたり、環境ストレス、医薬品、毒素などに曝露して結合基を生体分子と結合させたりする。アフィニティ分子は、生体分子全般と結合させること、あるいは1つ以上のクラスの生体分子または結合基に対して特異的になるようにすることが可能である。アフィニティ分子としては、さらに特異的なものも可能である。すなわち、アフィニティ分子は、ほんのいくつかのタイプまたは1つのタイプの生体分子または結合基とだけ結合することができる。

30

40

【0027】

表面を調節して単一の表面に1つ以上のタイプまたはクラスの生体分子が固定化されるようにすることができる。いくつかの実施態様では、表面を調節して、多数の異なる（例えば1000の）タイプまたはクラスの生体分子をその表面に固定化することができる。別の実施態様では、表面を調節して、より少数（例えば100）のタイプまたはクラスの生体分子をその表面に固定化することができる。別の実施態様では、表面を調節して、さらに少数（例えば100以下）のタイプまたはクラスの生体分子をその表面に固定化することができる。さらに別の実施態様では、表面を調節して、これよりもさらに少数（例えば

50

1 ~ 99) のタイプまたはクラスの生体分子をその表面に固定化することができる。本発明の特別なアレイを製造するための生体分子のクラスまたはタイプの数は、実施するアッセイ、生体分子のサイズ、生体分子間の望ましい距離などの因子に基づいて選択することができる。

【0028】

いくつかの実施態様では、生体分子をパターンまたはアレイにして表面に固定化する。別の実施態様では、生体分子がパターンまたはアレイとして固定化されるように表面を修飾したり、適合させたり、調節したりする。

【0029】

いくつかの実施態様では、生体分子の性質ができるだけ変化しないような方法と材料を用いて、あるいは生体分子とその生体分子を固定化する表面の間の相互作用が最小になる方法と材料を用いて、生体分子を固定化する。このようにいくつかの実施態様では、固定化は、表面に1つ以上の自己集合単分子膜(SAM)を形成し、そのSAMのいくつかまたはすべての上に生体分子を固定化することによって実現される。

10

【0030】

固定化される生体分子は、興味ある任意の供給源に由来するものが可能である。いくつかの実施態様では、固定化される生体分子は、細胞培養物の上清であるか、あるいはその上清に由来するものである。培養物中の細胞は、興味ある任意の供給源に由来するものが可能である。別のいくつかの実施態様では、固定化される生体分子は、細胞ライセートであるか、あるいはその細胞ライセートに由来するものである。細胞ライセートは、興味ある任意の供給源に由来するものが可能である。そのような供給源の具体例としては、培養物中の細胞、不死化した細胞系、生体または死体から直接に採取した細胞、組織、器官などが挙げられる。別の実施態様では、固定化される生体分子は、生体または死体から採取した体液であるか、あるいはその体液に由来するものである。そのような体液の具体例としては、血液、涙、唾液、胃腸液、羊水、骨髄、血漿、リンパ液、細胞外液、体液(sap)、脳脊髄液、尿などが挙げられる。この明細書では、このような体液を“生理的体液”と呼ぶことができる。さらに別の実施態様では、固定化される生体分子は、タンパク質またはペプチドまたはそれ以外のライブラリであるか、あるいはそのライブラリに由来するものである。いくつかの実施態様では、固定化される生体分子として、医薬品または医薬品候補が挙げられる。興味の対象となる生体分子以外の生体分子を含むサンプルは、分画することによって興味の対象ではない生体分子を減らすか除去するかした後、本発明の結合アイランドに付着させる。しかし本発明のいくつかの実施態様では、このような分画化は不要である。というのも、結合アイランドが所定のタイプまたはクラスの生体分子に対して特異性を示すからである。

20

30

【0031】

多くの実施態様では、固定化された生体分子または固定化される生体分子は、タンパク質である。1つ以上のタイプのタンパク質を表面に固定化することができる。いくつかの実施態様では、タンパク質の固定化を、そのタンパク質ができるだけ変性しないような方法と材料を用いて、あるいはそのタンパク質の活性ができるだけ変化しないような方法と材料を用いて、あるいはそのタンパク質とそのタンパク質が固定化される表面の間の相互作用が最小になるような方法と材料を用いて行なう。いくつかの実施態様では、これら生体分子は、シグナル伝達において重要な経路に關与するタンパク質である。

40

【0032】

固定化された生体分子を有する表面は、表面に固定化されたこれら生体分子と結合したり、これら生体分子を修飾したり、これら生体分子によって修飾されたりする生体分子を含む溶液に曝露することができる。このような溶液は、“興味の対象となる溶液”と呼ぶことができる。いくつかの実施態様では、興味の対象である1つ以上のタイプまたはクラスの生体分子を溶液中に分散させる。いくつかの実施態様では、その溶液は、細胞培養物の上清であるか、あるいはその上清に由来するものである。培養物中の細胞は、興味ある任意の供給源に由来するものが可能である。いくつかの実施態様では、溶液は、細胞ライセ

50

ートであるか、あるいはその細胞ライセートに由来するものである。細胞ライセートは、興味ある任意の供給源に由来するものが可能である。そのような供給源の具体例としては、培養物中の細胞、不死化した細胞系、生体または死体から直接に採取した細胞、組織、器官などが挙げられる。別の実施態様では、溶液は、生体または死体から採取した体液であるか、あるいはその体液に由来するものである。そのような体液の具体例としては、血液、涙、唾液、胃腸液、羊水、骨髄、血漿、リンパ液、細胞外液、体液、脳脊髄液、尿などが挙げられる。この明細書では、このような体液を“生理的体液”と呼ぶことができる。さらに別の実施態様では、溶液は、タンパク質またはペプチドまたはそれ以外のライブラリであるか、あるいはそのライブラリに由来するものである。いくつかの実施態様では、本発明のアレイを曝露する溶液は、医薬品または医薬品候補を含んでいる。

10

【0033】

いくつかの実施態様では、固定化された生体分子および/または溶液中の生体分子は、生化学経路の要素である生体分子を含んでいる。生化学経路（この明細書では単に“経路”と呼ぶことができる）は、細胞が刺激を伝達するのに用いる時系列になった一連のプロセスまたは反応を含んでいる。このような刺激としては、例えば細胞の内部に伝達される外部刺激が挙げられる。このような刺激の別の例として、核の内部に伝達される細胞質ゾルへの刺激などが挙げられる。一般に、上記プロセスまたは反応のそれぞれには、2つ以上の生体分子の間で起こる一連の相互作用が含まれる。例えば1つの生体分子が別の生体分子を修飾し、修飾された生体分子が例えば活性化または不活性化される。所定の経路に関する生体分子は、その経路の“要素”と呼ぶことができる。

20

【0034】

この明細書で固定化された生体分子と興味の対象である溶液の間の相互作用に言及する場合には、その相互作用が、溶液中の生体分子と固定化された生体分子の間の相互作用であることに注意されたい。この明細書で生体分子同士の相互作用の検出に言及する場合には、生体分子相互の結合の検出、あるいは相互作用する1つ以上の生体分子に対する修飾の検出であることに注意されたい。この明細書では、生体分子間の“相互作用”という用語は、1つ以上の生体分子を結合させることと、その相互作用の結果として1つ以上の生体分子が修飾されることを簡潔に表現するために用いる。修飾の具体例としては、化学的修飾、構造的修飾、物理的修飾などが挙げられる。さらに、この明細書では、固定化された生体分子を興味の対象である溶液に曝露することと、興味の対象である溶液を固定化された生体分子に曝露することについて言及している。この2つは、固定化された生体分子と興味の対象である溶液を互いに接触させるという1つの概念を単に異なる方法で表わしたものである。ただし、これとは明らかに異なる記載をした場合は別である。

30

【0035】

この明細書では、“溶液”という用語に、媒体のうち、その媒体中で、本発明の表面に固定化された生体分子に対して所定の位置に固定された基質に分子が結合していないすべての媒体が含まれる。そのような溶液の具体例として、液体、乳液、懸濁液、ゲル、泡などが挙げられる。

【0036】

本発明のアレイを用いて研究することのできるタンパク質、他の生体分子、細胞系、細胞、生理的体液、ライブラリは、動物、植物、藻類、菌類、細菌、ウイルス、原生動物、興味の対象となる他の任意の生命形態などが含まれる供給源に由来するものが可能である。本発明のアレイは、化学的合成、酵素による合成、組み換えヌクレオチド技術、これ以外のインビトロ法によって産生されるタンパク質その他の生体分子を研究するのにも有効である。溶液が、体液、培養物の上清、ライブラリ、細胞ライセートであるか、あるいはこれらに由来する実施態様では、溶液として、ライブラリ全体、変質していない細胞ライセート、培養物の上清、体液が可能である。あるいはライブラリ、ライセート、上清、体液に対して他の分離法、分画法、特性決定法を適用し、アレイを曝露する溶液を製造する。

40

【0037】

いくつかの実施態様では、細胞を興味の対象である医薬品または医薬品候補で処理した後

50

、細胞を溶解させて本発明のアレイを細胞ライセートに曝露する。別の実施態様では、本発明のアレイと一体化したミニチュアの微小流体システムの中で細胞を培養する。次に、このようにして培養した細胞から放出された産物および/またはこの細胞のライセートを、細胞培養システムと一体化したアレイで分析する。細胞を培養し、溶解させ、アレイに曝露するとき、細胞を移動させる必要がない。

【0038】

溶液中の生体分子と固定化された生体分子の間の結合、および/または溶液中の生体分子の修飾、および/または固定化された生体分子の修飾を、従来の検出技術を利用して検出する。いくつかの実施態様では、特定の修飾基を有する生体分子と反応するが、修飾されていない生体分子または別の修飾基を有する生体分子とは反応しない抗体を用い、特定の修飾基を検出する。1つ以上の異なる抗体が、対応する特異的標的と結合するのを評価することができる。2つ以上の抗体との結合を単一のアッセイで評価する実施態様では、異なる抗体に別々の標識を付けることができる。しかし抗体は、その抗体が結合する固定化された生体分子の位置に基づいて識別することもできるため、異なる標識は不要である。抗体に標識を付ける方法は、従来技術において周知である。興味の対象である分子と結合する一次抗体と、標識が付けてあって一次抗体と結合する二次抗体を利用することは、本発明を実施する上で有効な検出技術の一例である。具体例を挙げるならば、抗体は、放射性標識すること、あるいは蛍光タグで標識することなどが可能である。別の実施態様では、質量分析を利用して修飾された生体分子と修飾されていない生体分子を区別する。さらに別の実施態様では、表面プラズモン共鳴を利用して修飾された生体分子と修飾されていない生体分子を区別する。他の検出システムも従来技術で知られている。

10

20

【0039】

本発明のアレイ・システムを用いて分子間の相互作用を明らかにすることができる。例えば本発明の方法とアレイを利用して酵素が生体分子に及ぼす効果を明らかにすることができる。また、本発明の方法とアレイを利用して酵素の阻害剤を同定すること、および/または酵素の阻害剤のキャラクタリゼーションを行なうことも可能である。さらに特別な実施例では、溶液中の生体分子とアレイに固定化された生体分子をうまく選択することによってシステムがシグナル伝達経路を再現し、酵素(例えばキナーゼ)、酵素の基質、酵素の阻害剤、これ以外の興味ある分子についてキャラクタリゼーションを容易に行なえるようにすることができる。別の実施例として、本発明の方法とアレイを利用すると、生体分子(例えば医薬品や毒素)が、有機体、器官、組織、細胞、経路、個々の生体分子に及ぼす効果を明らかにすることができる。さらに別の実施例として、本発明の方法とアレイを利用すると、医薬品間相互作用を明らかにすることができる。

30

【0040】

この明細書でさらに詳しく説明することだが、本発明のアレイ・システムは、多数の相互作用を単一のアッセイでテストできるため、ハイスループット用である。同様に、本発明のアレイ・システムにより、異なる経路を同時に研究することが容易になる。本発明のアレイは、互いに関係のある経路や重なり合った経路を同時に研究するのに特に有効である。いくつかの実施態様では、本発明のアレイにより、互いに関係のない経路を同時に研究することが容易になる。一例として、1つの経路からの生体分子を1つの表面に配置し、別の経路からの生体分子を同じ表面の別の部分に配置した後、その表面を例えば細胞ライセートに曝露することができる。このようにすると、2つの異なる経路を表わす生体分子を同時に1つの細胞ライセートに曝露することができる。

40

【0041】

結合アイランドまたは結合領域を含むアレイをキットに含めることができる。このようなキットが本発明の別の実施態様になる。このようなキットは、本発明によるアレイの結合アイランドまたは結合領域に固定化するための生体分子を調製するのに役立つ試薬や、固定化された生体分子に対する修飾を検出するのに役立つ試薬や、固定化された生体分子に興味の対象である溶液からの生体分子が結合したことを検出するのに役立つ試薬なども含むことができる。

50

【0042】

同様に、固定化された生体分子を含むアレイをキットに含めることができる。このようなキットが本発明のさらに別の実施態様になる。このようなキットは、固定化された生体分子の修飾を検出するのに役立つ試薬や、固定化された生体分子に興味の対象である溶液からの生体分子が結合したことを検出するのに役立つ試薬も含むことができる。

【0043】

詳細な説明

本発明のいくつかの実施態様では、生体分子を表面に固定化する。生体分子は、パターンまたはアレイとなるように固定化することが好ましい。好ましい実施態様では、固定化された生体分子をあるパターンに配置するが、そのとき、生体分子の個々の独立したスポットまたはアイランドが、実質的に生体分子が表面に固定化されていない領域に囲まれるようにする。別の実施態様では、生体分子が表面に固定化された個々の独立したアイランドを、異なる生体分子が表面に固定化された領域に直接隣り合うようにすることができる。

10

【0044】

生体分子の固定化を容易にするために修飾したり、適合させたり、調節したりしてあるが、まだ生体分子を固定化していない表面は、本発明の別の実施態様になる。このようにして準備した表面は、固定化された生体分子を有する表面を製造する際の間段階にすることもできる。表面は、生体分子がその上に固定化されてパターンまたはアレイを形成するようにすることが好ましい。好ましい実施態様では、表面は、固定化された生体分子があるパターンに配置されるようにするが、そのとき、生体分子の個々の独立したスポットまたはアイランドが、実質的に生体分子が表面に固定化されていない領域に囲まれるようにする。別の実施態様では、表面は、興味の対象である生体分子をその上に固定化した後に、その表面が、生体分子がその上に固定化された個々の独立したアイランドを含み、そのアイランドが、異なる生体分子が表面に固定化された領域に直接隣り合うようになっているようにする。

20

【0045】

この明細書では、生体分子を結合させることのできるアイランドまたは領域を“結合アイランド”または“結合領域”と呼ぶことができる。結合アイランドまたは結合領域は、生体分子をその上に結合させることが“できる”。言い換えるならば、結合アイランドまたは結合領域は、生体分子に曝露されたときにその生体分子と結合するであろう。あるいは、結合アイランドまたは結合領域を修飾して、生体分子に曝露されたときにその生体分子と結合するようにはできる。“結合アイランド”または“結合領域”という用語は、“できる”という表現なしで使用する場合には、生体分子が結合した領域、あるいは生体分子を結合させることのできる領域、あるいはその両方を意味する。“結合領域”および“結合アイランド”の意味は、文脈から明らかになる。それぞれの結合領域または結合アイランドは、結合特異性が互いに異なっていてよい。したがってアイランドまたは領域は、すべての生体分子と結合できなくとも、結合アイランドまたは結合領域と見なすことができる。例えば所定の結合アイランドは、所定のクラスまたはタイプの生体分子と特異的に結合することができる。

30

【0046】

生体分子は表面に直接結合することができるが、生体分子と結合して表面に固定化される介在分子か、あるいは生体分子と結合して表面上に層を形成する介在分子と結合することが好ましい。このような介在分子は表面に結合するか表面上に層をなし、生体分子はこの介在分子に固定化される。例えば後で説明するように、SAM（自己集合単分子膜）を表面に形成し、このSAMが、生体分子と結合するSAM形成分子（SFM）を含むようにすることができる。生体分子と結合するSAMの領域を“結合アイランド”または“結合領域”と呼ぶことができる。

40

【0047】

介在分子を用いて表面に固定化されている生体分子は、“表面に固定化された生体分子”という表現で表わされる。同様に、表面に生体分子を固定化するとは、表面に直接に固定

50

化すること、あるいは介在分子を用いて固定化することを意味し、意味としてそのどれが適切であるかは、文脈から明らかになる。

【0048】

どの結合アイランドも、1つのタイプの生体分子の単一のコピーまたは多数のコピーがそのアイランド上に固定化されるように製造することができる。多くの実施態様では、結合アイランドは、独立した1つのアイランドの上に1つのタイプまたはクラスの生体分子を結合できるようにし、独立した第2のアイランドの上に異なるタイプまたはクラスの生体分子を結合できるように製造する。さらに別のタイプまたはクラスの生体分子を表面に結合させることのできる追加の独立したアイランドも表面に含めることができる。もちろん、単一のアイランドを用意してその上にさまざまなタイプまたはクラスの生体分子を結合させるようにすることもできる。

10

【0049】

本発明の結合アイランドまたは結合領域の直径は、100ミクロン以下であることが好ましい。より好ましいのは、本発明の結合アイランドまたは結合領域の直径が50ミクロン以下になっていることである。より一層好ましいのは、本発明の結合アイランドまたは結合領域の直径が20ミクロン以下になっていることである。最も好ましいのは、本発明の結合アイランドまたは結合領域の直径が5ミクロン以下になっていることである。本発明のアレイは、結合アイランドと結合アイランドの間にある非結合領域が0~100ミクロンになっていることが好ましい。より好ましいのは、結合アイランドと結合アイランドの間にある非結合領域が30~60ミクロンになっていることである。結合アイランドと非結合領域のサイズは、アイランドの望ましい数、表面の面積、アイランドの望ましい配置、固定化された生体分子同士の望ましい近接度などを考慮して選択することができる。

20

【0050】

上に説明したサイズの分子の複数のアイランドをアレイ状に配置することができる。このようなアレイは、96、384、1536、3456個のウェルを有するマイクロウェル・プレートのウェルの中に配置するか、あるいはサイズと方向が96、384、1536、3456個のウェルを有するマイクロウェル・プレートのウェルと同じである領域に配置することができる。結合アイランドの直径は極めて小さいため、多数の結合アイランドを各マイクロウェルの中に配置することができる。一例として、それぞれの直径が100ミクロンで、約0~60ミクロンの非結合領域によって互いに隔てられた結合アイランドを含むアレイは、96ウェルのプレートの単一のウェル(各ウェルは直径が約5mm)領域に約500の結合アイランドを収容することができる。別の具体例として、それぞれの直径が20ミクロンで、約0~60ミクロンの非結合領域によって互いに隔てられた結合アイランドを含むアレイは、96ウェルのプレートの単一のウェル領域に約14,000の結合アイランドを収容することができる。

30

【0051】

この明細書でさらに詳しく説明することだが、分子をこのようなサイズのアイランドにして堆積させることは、ソフト・リソグラフィ法によって実現することができる。例えば望ましいサイズの開口部を複数有するマスクを用い、分子を望ましいサイズのアイランドにして堆積させることができる。いくつかの実施態様では、別の方法(例えば、洗浄、滴下、スプレー、浸漬などが挙げられる)やアレイ形成装置を利用することと、本発明のアレイを使用することが、製造上有効である。

40

【0052】

1つのタイプの生体分子の単一のコピーまたは複数コピーを任意のアイランドに固定化することができる。多くの実施態様では、独立した1つのアイランドの上に1つのタイプまたはクラスの生体分子を固定化し、独立した第2のアイランドの上に異なるタイプまたはクラスの生体分子を固定化する。追加の独立したアイランドの上にさらに別のタイプまたはクラスの生体分子を固定化することができる。もちろん、独立した2つ以上のアイランドの上に同じタイプまたはクラスの生体分子が固定化されていてもよい。同様に、単一の独立したアイランドの上に異なるタイプまたはクラスの複数の生体分子が固定されていて

50

もよい。

【0053】

生体分子の本発明のアイランドの直径は100ミクロン以下であることが好ましい。さらに好ましいのは、生体分子の本発明のアイランドの直径が50ミクロン以下になっていることである。より一層好ましいのは、生体分子の本発明のアイランドの直径が20ミクロン以下になっていることである。最も好ましいのは、生体分子の本発明のアイランドの直径が5ミクロン以下になっていることである。生体分子をこのようなサイズのアイランドにして堆積させることは、ソフト・リソグラフィ法によって実現することができる。例えば望ましいサイズの開口部を複数有するマスクを用い、生体分子を望ましいサイズのアイランドにして堆積させることができる。上記のようなサイズの生体分子の多数のアイランドをアレイ状に配置することができる。このようなアレイは、適切な任意の構成に配置することができる。結合アイランドと非結合領域の構成は、アイランドの望ましい数、表面の面積、アイランドのサイズ、固定化された生体分子同士の望ましい近接度などを考慮して選択することができる。例えば、このようなアレイは、表面上で、形状とサイズが96、384、1536、3456個のウェルを有するプレートのウェルと似ていてそれよりも大きなパターンに形成することができる。別の具体例として、アレイは、96、384、1536、3456個のウェルを有するマイクロウェル・プレートのウェルの底面に配置することができる。

10

【0054】

生体分子を固定化する表面は、不活性な材料、および/または非特異的な反応による生体分子(例えばタンパク質)の吸着が起こりにくい材料で形成することが好ましい。生体分子を容易に吸着しない材料を使用することが好ましいのは、非特異的な吸着によって分子が2つ以上の部位に吸着され、その結果としてその分子の特性が変化する可能性があるからである。タンパク質の場合には、非特異的吸着によってタンパク質が表面に固定化されて広げられると変性し、したがってその活性が低下、変化、消失する可能性が大きい。生体分子が表面に非特異的に吸着することにより、興味の対象である特定の生体分子を固定化する能力、および/または特定位置の生体分子を固定化する能力が大きく妨げられる可能性もある。生体分子が非常に付着しやすい表面ではなく、生体分子が付着しにくい表面を用いることが好ましい。

20

【0055】

さらに、この明細書でさらに詳しく説明することだが、表面上の不活性であることが望ましい領域に不活性なSAMを形成することにより、不活性ではない表面(生体分子が幾分か付着する表面)のすべてまたは一部を不活性にすることができる。不活性な表面としては、生体分子が実質的に付着しない表面が挙げられる。

30

【0056】

この明細書では、付着が“実質的にない”とは、生体分子の非特異的付着または望ましからぬ付着のレベルが、調べようとしている相互作用の検出を妨げない程度であることを意味する。言い換えるならば、検出しようとする相互作用に関する信号対雑音比が、使用する検出システムを用いて検出可能な値以上に留まっているとき、非特異的結合の発生が“実質的にない”と言える。したがって、“実質的にない”の定義は、アレイの分解能や使用する検出法などの因子によって変化する。所定のシステムに関する“実質的にない”の定義は、定石的な実験によって経験的に決定することができる。例えば、表面を生体分子の溶液とともにインキュベートすることにより、その表面の結合をテストすることができる。結合のレベルを測定することができる。別の具体例として、(例えばSAMの)結合アイランドのための領域と(例えばSAMの)非結合領域のための領域を有する表面を生体分子の溶液とともにインキュベートすることができる。不活性な領域に結合する分子の数に対し、結合アイランドのための領域に結合する分子の数がどうなっているかの比を測定することができる。このような対照実験を異なるタイプの結合分子と異なる検出システムに対して無理なく行なうことができる。例えばM r k s i c h M . らのAnnu . R e v . B i o p h y s . B i o m o l . S t r u c t . 、第25巻、55~78ページ

40

50

ジ、1996年を参照のこと。

【0057】

本発明のアレイを形成するための表面を形成するのに有効な材料の具体例としては、金、銀、白金、パラジウム、銅が挙げられる。本発明のアレイを形成するための表面を形成するのに有効な材料の別の具体例としては、ガラス、ケイ素、セラミック、プラスチックが挙げられる。最も好ましいのは、表面を金で形成するか、あるいは金でコーティングすることである。例えば金でコーティングしたシリコン・ウエハーは、本発明のいくつかの実施態様で表面として有効である。

【0058】

生体分子は、従来技術で知られている適切な任意の方法で表面に固定化することができる。固定化は、生物学的分子にダメージを与えない方法で実施することが好ましい。例えば、UV光と有機溶媒を使用する際に生物学的分子にダメージを与えるのを避けることが好ましい。

【0059】

生体分子を固定化する具体的な方法は、従来技術において公知である。そのような方法としては、アフィニティ捕獲、共有結合誘導体化（例えばEDC + NHSを利用する）、直接カップリング、膜へのアンカー形成、ストレプトアビジン - ビオチンの利用、ニッケル・キレーション捕獲などが挙げられる。

【0060】

本発明のアレイを製造するために生体分子を固定化する表面は、その表面にSAMを形成することによって準備することが好ましい。それよりもはるかに好ましいのは、表面に1つ以上のタイプのSAM形成分子(SFM)をパターンにして形成することである。最も好ましいのは、表面にSAM形成分子(SFM)をソフト・リソグラフィ法によってパターン化された単層として形成することである。この明細書でさらに詳しく説明することだが、本発明のアレイを製造するのに有効なタイプのSFMとして、生物学的分子と結合しないSFMや、特定の生体分子または特定のタイプの生体分子と特異的に結合するSFMなどが挙げられる。

【0061】

本発明のアレイは、少なくとも1つの領域において上に生体分子が固定化された1つまたは複数のSAMを有する表面を含んでいる。本発明のアレイは、上に1つまたは複数のSAMが固定化されている表面のうち、SAMが、そのSAMを形成するSFMの少なくともいくつかが生体分子と結合できる少なくとも1つの領域を含んでいる表面も含んでいる。

【0062】

適切な任意の方法を用い、表面を、あるいは表面に結合した分子または表面に形成された分子を、その表面に固定化する別の分子（例えば生体分子）に曝露することができる。適切な方法の具体例としては、ソフト・リソグラフィ、洗浄、滴下、スプレー、浸漬、微小流体デリバリー、アレイ形成装置を利用した堆積などが挙げられる。これらの方法は、本発明のアレイを製造する途中の多くの段階で有効である。例えばこれらの方法を用いて分子を表面に直接堆積させることが可能であるが、方法がこれだけに限定されるわけではない。堆積させることのできる分子としては、生体分子、生体分子と結合できる分子、生体分子と結合しにくい分子、生体分子と結合しない分子が挙げられる。別の実施例では、これらの方法が、表面上に層になるかその表面に結合している分子（例えばSFMを形成するSAM）を、その表面に結合しているかその表面上に層になった分子に固定化することが望ましい別の分子（例えば生体分子）に曝露するのに有効である。さらに別の実施例では、これらの方法が、固定化された生体分子を興味の対象である溶液に曝露するのに有効である。

【0063】

アレイ形成装置は、ゲノミクスとアレイに関する従来技術としてよく知られている。一般に、この装置は、サンプルを96または384マイクロウエル・プレートから取り出し、

サンプル間の空間的方向と分離状態を維持したまま、そのサンプルを基板または表面に堆積させるか、あるいは別のマイクロウエル・プレートのウエルの中に堆積させる。具体的なアレイ形成装置としては、ベックマン・インスツルメンツ社のバイオメック 2000 と、ジーンマシーズ社のオムニグリッドが挙げられる。アレイ形成装置を用いると、例えばタンパク質ライブラリからのタンパク質を本発明によるアレイの結合アイランドに移動させることができる。(この明細書に記載したような、また従来技術で知られている)アレイ形成装置を利用すると、例えば、異なるタイプの SFC を 96 ウエル・プレートの所定のウエル内の(あるいは基板上でサイズがそのようなウエルと同じ領域内の)500 スポットのそれぞれに移動させ、500 の結合アイランドを形成し、500 のアイランドのアレイ中でそれぞれのタイプの結合アイランドの位置をあらかじめ決めた状態にすることができる。望むのであれば、この手続きを 96 ウエル・プレート内の 96 個のウエル(あるいは基板上でサイズと方向がそのようなウエルと同じ 96 の領域それぞれ)に対して繰り返すことにより、それぞれが所定の空間的方向性を持った異なる 500 のタイプの結合アイランドのアレイを 96 個コピーして作ることができる。同様の方法を用い、384 ウエル・プレートの中または基板上に、14,000 タイプの生体分子のアレイを製造することができる。

10

【0064】

同様に、(この明細書に記載したような、また従来技術で知られている)アレイ形成装置を利用すると、異なるタイプの生体分子を 96 ウエル・プレートの所定のウエル内の(あるいは基板上でサイズがそのようなウエルと同じ領域内の)500 スポットのそれぞれに移動させ、500 の結合アイランドを形成し、500 のアイランドのアレイ中でそれぞれのタイプの生体分子の位置をあらかじめ決めた状態にすることができる。望むのであれば、この手続きを 96 ウエル・プレート内の 96 個のウエル(あるいは基板上でサイズと方向がそのようなウエルと同じ 96 の領域それぞれ)に対して繰り返すことにより、それぞれが所定の空間的方向性を持った異なる 500 のタイプのタンパク質のアレイを 96 個コピーして作ることができる。同様の方法を用い、384 ウエル・プレートの中または基板上に、14,000 タイプの生体分子のアレイを製造することができる。

20

【0065】

ソフト・リソグラフィは、フォトリソグラフィに代わる方法として開発された製造技術であり、マイクロレベルでのパターンニングに特に有効である。ソフト・リソグラフィは、特徴的なサイズが約 1 ミクロン~約 1 mm の生物材料をパターンニングすること、あるいはそのパターンを複製することに用いられている。ソフト・リソグラフィは、生物材料のアレイのパターンニングを行なうのにも理想的であり、そのまま SAM 技術とも相性がよい。ソフト・リソグラフィの生体適合性は、多くの生物材料にとって有害な有機溶媒または UV 光を使用せずに実施できることに由来する。

30

【0066】

ソフト・リソグラフィ法は、従来のマイクロ製造技術と比べると、資本の投下がほとんど必要なく、元々低コストの材料を使用している。さらに、以下に説明するように、ソフト・リソグラフィを利用すると、タンパク質アレイを現在のドラッグ・デリバリー・システムと一体化することが可能である。適切な任意のソフト・リソグラフィ法を利用して本発明の SAM をパターンニングすることができる。

40

【0067】

ソフト・リソグラフィにおける共通要素は、移動または複製すべき特徴的の形状を含むポリマー鑄型である。一実施態様では、このパターン転写用要素は、マスターの表面でポリジメチルシロキサン(PDMS)の液体前駆体を成形し、それを硬化させて固体にし、それをマスターから取り出すことによって製造される。この PDMS 製レプリカは、化学“インク”を移動させるためのスタンプとして、あるいは材料を堆積させるためのステンシル・マスクとして、あるいは立体構造を形成するための鑄型として用いることができる。微小接触印刷(MCP)は、ソフト・リソグラフィ法の一例である。MCP を利用した SAM の形成について、この明細書で説明する。しかし MCP を利用して他の分子を堆積させ

50

てパターンニングすることができるのは明らかであろう。また、別のソフト・リソグラフィ法を利用してSAMや他の分子を堆積させてパターンを形成できるのも明らかであろう。

【0068】

SAMを形成するための微小接触印刷(MCP)では、PDMS表面の凹凸にSAM形成分子(SMF)(例えばアルカンチオール)が“インク”として入り、基板の表面と接触する。“インク”が基板の表面に移動し、PDMSに刻印された表面の凹凸を写し取ったパターンになったSAMが形成される。100nm~1mmの範囲の特徴的形状をMCPによって製造することができる。

【0069】

ソフト・リソグラフィを利用して本発明のレイを多くのタイプの表面に製造することができる。例えば、ソフト・リソグラフィを利用すると、硬い表面、柔らかい表面、平坦な表面、湾曲した表面に分子をパターンニングすることができる。ソフト・リソグラフィを利用すると、小さな表面積(例えば 1mm^2)や大きな表面積(例えば 数cm^2)に高分解能のレイを形成し、さまざまなサイズ(例えば cm 、 mm 、 μm 、 nm)の特徴的形状を作り出すことができる。

【0070】

特性が最もよくわかっているSAMは、金の表面にアルカンチオール(一端にチオールすなわち-SH基を備え、他端に先頭基(X)を備える炭化水素)によって形成されたものである。銀、パラジウム、白金、銅は、アルカンチオールSAMで用いるのに適した表面の別の例である。表面とチオールの間金属-イオウ結合が形成されることによりこれらSAMが形成され、その結果として炭化水素鎖が結晶のように稠密に充填された状態になる。表面の性質は、表面に露出する炭化水素の先頭基(X)が化学的・生化学的性質を変化させる能力から生じる。例えば、先頭基として CF_3 を有するSAMは、テフロン表面のような挙動を示すのに対し、先頭基として COOH を有するSAMは、ガラス表面のような濡れ特性を示す。ソフト・リソグラフィ法は、SAMを使用するソフト・リソグラフィ法も含め、アメリカ合衆国特許第5,512,131号、第5,620,850号、第5,776,748号、第5,976,826号に詳しく記載されている。これら特許の内容はすべて、参考としてこの明細書に組み込まれている。図1と図2も参照のこと。

【0071】

いくつかの好ましい実施態様では、さまざまなタイプのSMFを表面にパターンにして配置し、パターンニングされたSAMを形成する。そのときパターンの各部分は異なる結合特性を有する。特に好ましいいくつかの実施態様では、そのパターンに生体分子と結合できるSMFの領域またはアイランドが含まれる。単一の結合アイランドを含むSMFは、すべてが同じ特異性を持っているために同じ生体分子と結合すること、あるいはそれぞれが異なる特異性を持っているために異なる生体分子と結合することができる。同様に、生体分子と結合するさまざまなSMFは、すべてが同じ特異性を持っているために同じ生体分子と結合すること、あるいはそれぞれが異なる特異性を持っているために異なる生体分子と結合することができる。

【0072】

結合アイランドは、生体分子と結合できないSMFの領域、あるいは生体分子と結合しにくいSMFの領域によって囲まれていることが好ましい。このような領域(“非結合領域”とも呼ばれる)は、生体分子とレイの非特異的な結合を減らすか阻止することができるために有用である。生体分子が表面に非特異的に吸着されると、興味の対象である特定の生体分子を固定化する能力および/または生体分子を特定の位置に固定化する能力が大いに低下する可能性がある。このような非結合領域は、適切な任意の方法を用いて作ることができる。非結合領域は、例えば生体分子が結合しないか、生体分子が非常に低いアフィニティしか持たないSAMを形成するなどの方法によって作り出すことができる。

【0073】

このようなパターンニングは、望むサイズのパターンを製造できる任意のパターンニング法を用いて実現することが可能である。例えば、このようなパターンニングは、ソフト・リソグ

ラフィ、洗浄、あるいはソフト・リソグラフィと洗浄の組み合わせによって実現することができる。洗浄が有効な場合には、別の同様な方法、例えば滴下、スプレー、浸漬などを用いることもできる。ソフト・リソグラフィによるパターンニングの一例では、MCPや従来技術で知られている他のソフト・リソグラフィ法などの適切な方法を用い、第1のX基(X_1)を適切な表面に付着させる。次に、第2のX基(X_2)を有するSFMを、MCPや従来技術で知られている他のソフト・リソグラフィ法などの適切な方法を用い、表面のうちで X_1 を有するSFMで覆われていない領域に付着させる。 X_2 を有するSFMを、表面のうちで X_1 を有するSFMで覆われていない領域に付着させるには、表面を、 X_2 を有するSFMで洗浄するという方法によることも可能である。すると表面のうちで X_1 を有するSFMで覆われていない領域にSAMが形成される。追加のX基を有する追加のSFMをこのような追加の製造プロセスを通じて同様にして付着させることができる。表面へのSFMの付着は、表面をSFMで洗浄することによっても実現できる。

【0074】

有効な実施態様の一例では、SAM技術を利用して96ウエル・プレートの所定のウエル内の(あるいは基板上でサイズがそのようなウエルと同じ領域内の)500スポットのそれぞれにSAMを形成することにより、所定の位置に500の結合アイランドを形成することができる。望むのであれば、この手続きを96ウエル・プレート内の96個のウエル(あるいは基板上でサイズと方向がそのようなウエルと同じ96の領域それぞれ)に対して繰り返すことにより、それぞれが所定の空間的方向性を持った異なる500のタイプの結合アイランドのアレイを96個コピーして作ることができる。同様の方法を用い、384ウエル・プレートの中または基板上に、14,000タイプの結合アイランドのアレイを製造することができる。

【0075】

一実施態様では、SAM結合アイランドはすべて、同じSFMを含んでいる。すなわち、各結合アイランドは、同じタイプまたはクラスの生体分子と結合することができる。このような実施態様は、例えばアレイ形成装置を用いて特定の生体分子を各結合アイランドに移動させる場合に有効である。この場合、各結合アイランドは、移動した生体分子の任意のものまたはすべてと結合できるが、生体分子同士は混合しない。というのも、分離がアレイ形成装置によって維持されており、それぞれのタイプの生体分子が所定の結合アイランドに結合するからである。別の実施態様では、結合アイランドは、異なるタイプまたはクラスの生体分子に対して特異性を有するSFMを含むことができる。このような実施態様は、生体分子の供給源が、あらかじめ分画または区分していない生物サンプルである生体分子を洗浄によって結合アイランドのアレイに付着させる場合に特に有効である。言い換えるならば、このような実施態様は、本発明のアレイが分離機能とともに固定化機能と局在化機能(すなわち生体分子を所定の位置に保持する)を実現することが望ましい用途において特に有効である。

【0076】

洗浄、滴下、スプレー、浸漬、MCPなどの方法を用いて結合アイランドを非結合領域で囲むことができる。次に、ソフト・リソグラフィ、アレイ形成装置、洗浄、滴下、スプレー、浸漬、MCPなどの方法を用いて生体分子を結合アイランドに固定化する。異なるタイプの生体分子を、96ウエル・プレートの所定のウエル内の(あるいは基板上でサイズがそのようなウエルと同じ領域内の)500スポットのそれぞれに固定化し、500アイランドのアレイ中でそれぞれのタイプの生体分子の位置をあらかじめ決めた状態にすることができる。望むのであれば、この手続きを96ウエル・プレート内の96個のウエル(あるいは基板上でサイズと方向がそのようなウエルと同じ96の領域それぞれ)に対して繰り返すことにより、それぞれが所定の空間的方向性を持った異なる500のタイプのタンパク質のアレイを96個コピーして作ることができる。同様の方法を用い、384ウエル・プレートの中または基板上に、14,000タイプの生体分子のアレイを製造することができる。

【0077】

この明細書では、生体分子と結合するX基は“結合X基”と呼ぶことができ、結合X基を有するSFMは“結合SFM”と呼ぶことができる。同様に、この明細書では、生体分子と結合しないX基または生体分子と結合しにくいX基は、“不活性X基”と呼ぶことができ、不活性X基を有するSFMは“不活性SFM”と呼ぶことができる。

【0078】

所定のX基は、SFMを表面に付着させるときに特異性を有する可能性がある。あるいは、X基を有するSFMを付着させると、X基が修飾または誘導体化されてその結合特性が変化する可能性がある。したがって、結合SFMには、不活性なX基を有するSFMや、SAMを形成するときには最終的に望ましい特異性とは異なっているがSFMが一部に含まれるアレイを形成する途中のある時点で結合特性を変えることのできるX基を有するSFMが含まれることが理解できよう。同様に、不活性なSFMには、生体分子と結合するがSFMが一部に含まれるアレイを形成する途中のある時点で不活性にされるX基を有するSFMが含まれる。したがって、“不活性”と“結合”は、SFMが一部を形成するアレイの製造が完了した後のSFMの結合能力を意味する。

10

【0079】

好ましい実施態様では、2～40個の炭素原子の炭化水素鎖を有するアルカンチオールSFMを使用する。生体分子と結合するX基を末端に有するSFMの場合、炭化水素鎖は8～30個の炭素原子を有することが好ましい。より好ましい炭素原子の数は14～18個であり、最も好ましい炭素原子の数は16個である。炭化水素鎖とX基の間に3～6個のエチレングリコール(EG)基を備え、X基がヒドロキシ(-OH)基またはメチル(-CH₃)基であるSFMを用い、生体分子と結合しない表面を形成することができる。生体分子と結合しないSFMは、炭素原子が3～30個の炭化水素鎖を有することが好ましい。より好ましい炭素原子の数は10～14個であり、最も好ましい炭素原子の数は11個である。

20

【0080】

いくつかの実施態様では、結合SFMだけの領域は、単一の生体分子とその生体分子の2つ以上の部位で結合することになる(すなわち非特異的結合)。その結果、生体分子が変性したり、生体分子の活性または特性が変化または消失したりすることがしばしばある。したがって、好ましい実施態様では、単層の生体分子を表面に固定化してこれら生体分子がその生体分子の1ヶ所だけで結合するようにし、非特異的な結合を回避する。

30

【0081】

この目的は、生体分子と結合するX基を有するSFM(“結合SFM”)と、生体分子と結合しないX基を有するSFM(“不活性SFM”)の両方を用い、不活性SFMのごく近傍に結合SFMを有する結合アイランドまたは結合領域を作り出すことによって実現することができる。この配置にすると、生体分子を結合SFMに特異的に結合させる一方で、生体分子の他の部分が他のSFMと非特異的に結合することが避けられる。結合SFMと結合SFMの間のスペースは、結合SFMと不活性SFMを点在させることによって作り出すことができる。このように結合SFMと不活性SFMを点在させることは、例えば、結合SFMと不活性SFMの両方を混合したものを、表面にアイランドのパターンを印刷するとき使用する“インク”として用い、MCPによって実現することができる。しかし不活性SFMに対する結合SFMの割合が重要である。検出はアッセイ・システムと検出システムにも依存するが、この比が大きすぎると非特異的結合の量が大きくなりすぎて興味ある事象を検出できなくなる可能性がある。検出はアッセイ・システムと検出システムにも依存するが、この比が小さすぎると、結合する生体分子の数が少なすぎて興味ある事象を検出できなくなる可能性がある。所定のアッセイ・システムと検出システムに対し、経験的方法によって適切な比を選択することができる。例えば、不活性SFMに対してさまざまな比で結合した結合アイランドが不活性SAMの領域で囲まれたものを表面に形成し；生体分子をそのアイランドに結合させ；表面を、固定化された生体分子に結合させるか、そうでない場合には固定化された生体分子を修飾する生体分子の溶液に曝露し；各アイランドに対する非特異的結合の程度を測定し；修飾が検出可能であるかどうかを各

40

50

アイランドについて明らかにすることができる。一般に、不活性 S F M に対する結合比は、約 0.1% と約 10 ~ 20% の間の値である。いくつかの実施態様では、比が約 1 ~ 2% だと非特異的結合と検出可能な修飾の量が非常に少なくなる（実質的にない）可能性がある。

【0082】

不活性 S F M に対する最適な結合比は、この明細書に記載したガイドラインを用いて実験的に決定することができる。さらに詳細には、比がわかったさまざまな S F M を有するアイランドを印刷し、生体分子を結合させる。次に、表面プラズモン共鳴などの方法を用いるとアイランドを分析することができる。生体分子の完全な単層を備え、生体分子の非特異的な結合はないアイランドが配置された場合には、そのアイランドのためのインクを製造するのに用いた比が、不活性 S F M に対する最適の結合比であることがわかる。最適な比は、生体分子が何であるかによって異なること、また利用する S F M のタイプによっても異なることが理解できよう。さらに、いくつかの応用では、例えば完全な単層よりもまばらになった生体分子層が望ましいことも理解できよう。この場合には、やはり上記の方法を用いることにより、不活性 S F M に対する結合比に関し、望ましい条件を作り出す上で最適な値を明らかにすることができる。

10

【0083】

この明細書では、結合 S F M と不活性 S F M の両方を含んでいて生体分子が結合する領域を形成するアイランドまたは領域を、“結合アイランド”または“結合領域”と呼ぶことができる。

20

【0084】

異なるいくつかのシステムを用いて X 基を有する S F M に生体分子を固定化することができる。一例として、E D S - N H S を用いて生体分子と S F M の間に共有結合を形成することができる。別の例として、ピオチンと結合するアミノ基を末端に有する S F M を製造することができる。このピオチンが、今度はストレプトアビジンと結合する。次に、ピオチニル化された生体分子が S F M のストレプトアビジンに強く結合することになる。さまざまな結合システムを用いると、表面の特定の独立した領域にさまざまな生体分子を固定化するのが容易になる。

【0085】

1 つ以上の生体分子を単一の表面に固定化することができる。いくつかの実施態様では、異なる多数（例えば 1000 種類）の生体分子を固定化する。別の実施態様では、これよりも少数（50 種類以下）の生体分子を固定化する。

30

【0086】

アレイを形成するために表面に固定化される生体分子（“固定化された生体分子”とも呼ばれる）としては、研究しようとする任意の生体分子が可能である。固定化される生体分子としては、炭水化物、核酸、タンパク質、ポリペプチド、脂質などが挙げられる。同様に、固定化された生体分子に対して曝露される生体分子としては、研究しようとする任意の生体分子が可能である。このような生体分子（この明細書では“溶液中の生体分子”とも呼ばれる）としては、炭水化物、核酸、タンパク質、ポリペプチド、脂質などが挙げられる。

40

【0087】

特に好ましい実施態様では、パターンニングされた結合アイランドを含む S A M を生成させる。このとき、アイランドは、不活性 S F M に対する結合比が最適になっており、結合アイランドと結合アイランドの間の領域に不活性 S F M が含まれている。そのため、生体分子が結合アイランドと結合アイランドの間の領域に結合することはない。

【0088】

いくつかの実施態様では、溶液中の単一のタイプの生体分子を、固定化された生体分子に曝露する。別の実施態様では、固定化された生体分子に曝露する溶液は、2 つ以上のタイプの生体分子を含んでいる。いくつかの実施態様では、固定化された生体分子に曝露する溶液は、2 つ以上のクラスの生体分子を含んでいる。本発明の実施態様で有効な生体分子

50

としては、性質がわかっている生体分子と、性質がわかっていない生体分子の両方が挙げられる。本発明の実施態様で有効な生体分子としては、機能または活性がわかっている生体分子と、機能または活性がわかっていない生体分子の両方が挙げられる。この明細書では、機能または活性がわかっていない生体分子を、“キャラクタリゼーションされていない”と呼ぶことができる。

【0089】

溶液中の医薬品、毒素、およびこれ以外の生体分子としては、既知の単一の生体分子、あるいは既知の生体分子の混合物が可能である。すなわち溶液の組成をあらかじめ決定することができる。同様に、生体分子の活性または特性は既知であってもよいし、生体分子はキャラクタリゼーションされていなくてもよい。別の実施態様では、溶液の組成はキャラクタリゼーションされていなくても未知であってもよい。すなわち、溶液中の生体分子は性質がわかっていないなくても、活性または機能がわかっていないなくてもよい。さらに別の実施態様では、固定化された生体分子に曝露する溶液の組成は、一部がキャラクタリゼーションされていてよい。すなわち、組成の一部がわかっているてもよい。例えば、溶液中のいくつかの生体分子が同定され、および/またはキャラクタリゼーションされ、それ以外の生体分子は同定されていない、および/またはキャラクタリゼーションされていない状態が可能である。溶液中のいくつかの生体分子またはすべての生体分子が同定されていない、および/またはキャラクタリゼーションされていない実施態様の具体例としては、溶液が細胞ライセートである実施態様、溶液が細胞ライセートに由来する実施態様、溶液がライブラリ（例えばタンパク質ライブラリ）である実施態様、溶液がライブラリに由来する実施態様などが挙げられる。

10

20

【0090】

溶液中の生体分子と同様、固定化された生体分子は、同定された生体分子と同定されていない生体分子の両方と、キャラクタリゼーションされた生体分子とキャラクタリゼーションされていない生体分子の両方を含むことができる。多くの実施態様では、既知でキャラクタリゼーションされた生体分子が表面に固定化されて本発明のアレイを形成する。

【0091】

いくつかの実施態様では、固定化される生体分子を、興味の対象である特定の第2の生体分子を修飾することがわかっているもの、あるいはその第2の生体分子と結合することがわかっているものの中から選択する。このような実施態様では、固定化された生体分子を用いて溶液中に他の生体分子（例えば細胞培養物の上清、細胞ライセート、生理的体液、タンパク質ライブラリ）が存在しているかどうかをスクリーニングすることができる。

30

【0092】

いくつかの実施態様では、固定化される生体分子と溶液中の生体分子をうまく選択することにより、溶液中の1つ以上の生体分子が、表面に固定化された1つ以上の生体分子に及ぼす効果を明らかにすることができる。同様に、生体分子をうまく選択することにより、表面に固定化された1つ以上の生体分子が溶液中の1つ以上の生体分子に及ぼす効果を明らかにすることができる。さらに、生体分子をうまく選択することにより、生体分子間の相互作用を明らかにすることもできる。このような効果および相互作用としては、ある生体分子が別の生体分子に結合することや、生体分子を別の生体分子で活性化すること、抑制すること、修飾することなどが挙げられる。修飾としては、リン酸化、脱リン酸化、メチル化、アセチル化、脂質化、ファルネシル化グリコシル化、プレニル化、ユビキチン化、ヒドロキシル化、脱ヒドロキシル化、カルボキシル化、脱カルボキシル化、ニトロシル化、酸化、還元、水素化、脱水素化などが挙げられる。修飾に関するこれ以外の具体例としては、アロステリック転移、加水分解、解糖、タンパク質分解、代謝、異化変性が挙げられる。生体分子に対するこれらの修飾ならびにこれ以外の修飾は、本発明の実施態様を利用して調べることができる。

40

【0093】

固定化される生体分子は、興味ある任意の供給源に由来するものが可能である。いくつかの実施態様では、固定化される生体分子は、細胞培養物の上清であるか、あるいはその上

50

清に由来するものである。培養物中の細胞は、興味ある任意の供給源に由来するものが可能である。別のいくつかの実施態様では、固定化される生体分子は、細胞ライセートであるか、あるいはその細胞ライセートに由来するものである。細胞ライセートは、興味ある任意の供給源に由来するものが可能である。そのような供給源の具体例としては、培養物中の細胞、不死化した細胞系、生体または死体から直接に採取した細胞、組織、器官などが挙げられる。別の実施態様では、固定化される生体分子は、生体または死体から採取した体液であるか、あるいはその体液に由来するものである。そのような体液の具体例としては、血液、涙、唾液、胃腸液、羊水、骨髄、血漿、リンパ液、細胞外液、体液、脳脊髄液、尿などが挙げられる。この明細書では、このような体液を“生理的体液”と呼ぶことができる。さらに別の実施態様では、固定化される生体分子は、標的タンパク質またはそれ以外のライブラリであるか、あるいはそのライブラリに由来するものである。いくつかの実施態様では、固定化される生体分子として、医薬品または医薬品候補が挙げられる。興味の対象となる生体分子以外の生体分子を含むサンプルは、分画することによって興味の対象ではない生体分子を減らすか除去するかした後、本発明の結合アイランドに付着させる。しかし本発明のいくつかの実施態様では、このような分画化は不要である。というのも、結合アイランドが結合特異性を示すからである。

10

【0094】

いくつかの実施態様では、これら生体分子は、タンパク質である。1つ以上のタイプのタンパク質を表面に固定化することができる。いくつかの実施態様では、タンパク質の固定化を、そのタンパク質ができるだけ変性しないような方法と材料を用いて、あるいはそのタンパク質の活性ができるだけ変化しないような方法と材料を用いて、あるいはそのタンパク質とそのタンパク質が固定化される表面の間の相互作用が最小になるような方法と材料を用いて行なう。いくつかの実施態様では、これら生体分子は、シグナル伝達において重要な経路に關与するタンパク質である。

20

【0095】

固定化された生体分子を有する表面は、固定化されたこれら生体分子と反応したり、これら生体分子を修飾したり、これら生体分子によって修飾されたりする生体分子を含む溶液に曝露することができる。このような表面は、“興味の対象となる溶液”と呼ぶことができる。いくつかの実施態様では、興味の対象である1つ以上のタイプまたはクラスの生体分子を溶液中に分散させる。いくつかの実施態様では、その溶液は、細胞培養物の上清であるか、あるいはその上清に由来するものである。培養物中の細胞は、興味ある任意の供給源に由来するものが可能である。いくつかの実施態様では、溶液は、細胞ライセートであるか、あるいはその細胞ライセートに由来するものである。細胞ライセートは、興味ある任意の供給源に由来するものが可能である。そのような供給源の具体例としては、培養物中の細胞、不死化した細胞系、生体または死体から直接に採取した細胞、組織、器官などが挙げられる。別の実施態様では、溶液は、生体または死体から採取した体液であるか、あるいはその体液に由来するものである。そのような体液の具体例としては、血液、涙、唾液、胃腸液、羊水、血漿、骨髄、リンパ液、細胞外液、脳脊髄液、尿などが挙げられる。この明細書では、このような体液を“生理的体液”と呼ぶことができる。さらに別の実施態様では、溶液は、標的タンパク質またはそれ以外のライブラリであるか、あるいはそのライブラリに由来するものである。いくつかの実施態様では、本発明のアレイを曝露する溶液は、医薬品または医薬品候補を含んでいる。興味の対象となる生体分子以外の生体分子を含むサンプルは、分画することによって興味の対象ではない生体分子を減らすか除去するかした後、本発明の結合アイランドに付着させる。しかし本発明のいくつかの実施態様では、このような分画化は不要である。というのも、結合アイランドが結合特異性を示すからである。

30

40

【0096】

この明細書では、“溶液”という用語に、媒体のうち、その媒体中で、本発明の表面に固定化された生体分子に対して所定の位置に固定された基質に分子が結合していないすべての媒体が含まれる。

50

【0097】

本発明のアレイを用いて研究することのできるタンパク質、医薬品、毒素、他の生体分子、細胞系、細胞、生理的体液、ライブラリは、動物、植物、藻類、菌類、細菌、ウイルス、原生動物、興味の対象となる他の任意の生命形態などが含まれる供給源に由来するものが可能である。本発明のアレイは、化学的合成、酵素による合成、組み換えヌクレオチド技術、これ以外のインピット口法によって産生されるタンパク質その他の生体分子を研究するのも有効である。溶液が、体液、培養物の上清、ライブラリ、細胞ライセートであるか、あるいはこれらに由来する実施態様では、溶液として、ライブラリ全体、変質していない細胞ライセート、培養物の上清、体液が可能である。あるいはライブラリ、ライセート、上清、体液に対して他の分離法、分画法、特性決定法を適用し、アレイを曝露する溶液を製造する。

10

【0098】

いくつかの実施態様では、細胞を興味の対象である医薬品または医薬品候補で処理した後、細胞を溶解させて本発明のアレイを細胞ライセートに曝露する。別の実施態様では、本発明のアレイと一体化したミニチュアの微小流体システムの中で細胞を培養する。次に、このようにして培養した細胞から放出された産物および/またはこの細胞のライセートを、細胞培養システムと一体化したアレイで分析する。細胞を培養し、溶解させ、アレイに曝露するとき、細胞を移動させる必要がない。

【0099】

いくつかの実施態様では、本発明のアレイ・システムを用い、経路（例えばシグナル伝達経路）、フィードバック制御システム、細胞間シグナル伝達経路を調べる。本発明のアレイを用いて調べることができる経路の具体例をこの明細書に記載してあるが、具体例がそれだけに限定されるわけではない。多くのタイプの生体分子を単一のアレイに固定化して他の生体分子を含む溶液に曝露できるため、中間体または最終生成物としての生体分子に関して検出値が変化したことや検出値に変化がないことをもとにして、生体分子間の複雑な相互作用を研究することができる。例えば、溶液中のある特定の生体分子（A）を、固定化された別の生体分子（B）または溶液中の別の生体分子（B）で活性化または不活性化することができる。一実施例では、タンパク質A、B、Cが1つの経路の一部に関与していることがわかっている。さらに詳細には、活性化AがBを活性化し、活性化CがAを活性化することが知られている。本発明のアレイの一例では、不活性化Aと不活性化Bが固定化され（したがって互いに反応することはできない）、活性化Aと、活性化Cと、経路の潜在的な阻害剤とを含む溶液に曝露される。固定化されたAが溶液中のCによって活性化された場合には、この溶液中にCの阻害剤が存在していないことがわかる。固定化されたBが溶液中のAによって活性化された場合には、この溶液中にAの阻害剤が存在していないことがわかる。逆に、固定化されたAが活性化されない場合には、この溶液がCの阻害剤を含んでいることがわかる。固定化されたBが活性化されない場合には、この溶液がAの阻害剤を含んでいることがわかる。活性化のパターン、あるいは活性化されないことを分析すると、経路のうちどこに潜在的な阻害剤（ただし、その阻害剤が、実際に、経路中で調べている部分の阻害剤になっている場合）が作用するかを明らかにすることができる。単一のアレイ上に多数の生体分子を固定化できるため、多数の経路を同時に調べることが容易になる。

20

30

40

【0100】

経路の研究に本発明のアレイ・システムを用いる実施態様では、その経路の一部を構成することがわかっている生体分子、あるいはその経路の一部を構成すると考えられている生体分子を、アレイに固定化する。このようにすると、興味の対象である溶液と、固定化された生体分子のそれぞれとの相互作用を同時に調べることができる。これら実施態様のうちのいくつかでは、特定の経路に関する生体分子の空間配置すなわちアレイを、表面上で2回以上繰り返す。個々のアレイは、物理的な障壁によって他のアレイと分離することが好ましい。すると、興味の対象である2種類以上の溶液と、固定化された生体分子の間の相互作用を同時に調べることができる。

50

【0101】

いくつかの実施態様では、本発明のアレイ・システムを用いて特定のクラスの生体分子を調べる。本発明のアレイを用いて研究できるクラスの生体分子の具体例をこの明細書で説明する。研究するクラスの生体分子は、個々の実施態様において、望みのままに広く定義することも狭く定義することもできる。例えば、多くのタイプのキナーゼを単一のアレイに固定化することができる。多くのタイプの生体分子を単一のアレイに固定化して他の生体分子を含む溶液に曝露することができるため、興味の対象である特定の溶液中の生体分子と、固定化された多くのタイプの生体分子の間の相互作用を同時に調べることができる。

【0102】

いろいろなクラスの生体分子の研究に本発明のアレイ・システムを用いる実施態様では、特定のクラスに属することがわかっている1つ以上のタイプの生体分子、あるいは特定のクラスに属すると考えられる1つ以上のタイプの生体分子を単一のアレイに固定化する。このようにすると、興味の対象である溶液と、固定化された生体分子のそれぞれとの間の相互作用を同時に調べることができる。これら実施態様のうちのいくつかでは、特定の経路に関する生体分子の空間配置すなわちアレイを、表面上で2回以上繰り返す。個々のアレイは、物理的な障壁によって他のアレイと分離することが好ましい。すると、興味の対象である2種類以上の溶液と、固定化された生体分子の間の相互作用を同時に調べることができる。

10

【0103】

一例として、1つのクラスの生体分子の要素を含むアレイを用いて医薬品候補の特異性を調べることができる。例えば、ある生体分子が、標的となるキナーゼに効果を及ぼすことがわかっており、したがってその生体分子がよい医薬品候補である場合、その医薬品候補が他のキナーゼに効果を及ぼすかどうかと、その医薬品候補が他のキナーゼにどのような効果を及ぼすかを知ることが望ましかろう。目的とする標的に対して非常に特異的な医薬品を同定することは有効である。というのも、一般に、その医薬品の投与に伴う副作用は、特異性のより小さい医薬品に伴う副作用と比べて大きく減少するからである。

20

【0104】

興味の対象がタンパク質であるいくつかの実施態様では、生体分子が固定化されたアレイを、これらタンパク質に対して特異的な酵素と、これら酵素に対する潜在的な促進剤または阻害剤とを含む溶液に曝露する。固定化された基質の溶液中の酵素による翻訳後修飾は、その修飾に対して特異的な抗体を用いて検出する。固定化されたタンパク質の変換状態を観察することにより、サンプル中の酵素の活性を明らかにすることができる。このアレイは、(酵素が触媒となって増幅されたシグナルを出すため)低濃度の酵素の存在を検出できるという利点を有する。

30

【0105】

1つのアレイに生体分子を2つだけパターンニングすることにより、1回の実験で2倍の生化学情報を得ることができる。例えば、一連の実験を行わずとも1回の実験で阻害剤の特異性と効率を明らかにすることができる。この考え方は、より多数の基質へも容易に拡張することができる。例えば、MAPKファミリーのいくつか(ERK1~ERK7、p38 MAPK、p57 MAPK)を1つのアレイにパターンニングすることができよう。多くのシグナル伝達経路が入り組んでいるが、研究者は、本発明のアレイ・システムにより、1回の実験でこの入り組んだシグナル伝達経路を調べることができよう。このようにより複雑なアレイを用いると、多数の経路に対する阻害剤をスクリーニングすることができるため、スクリーニングの速度が大いに向上するであろう。1つのアレイ上の数百または数千という標的に対してスクリーニングを行なうというのは、実験を数百回または数千回ではなく、1回だけ行なうことを意味する。

40

【0106】

溶液中の生体分子またはアレイに固定された生体分子の修飾または結合は、従来技術で知られている検出法を利用して検出することができる。そうした方法の具体例としては、免

50

疫法（例えば競合結合アッセイ、サンドイッチ・アッセイ）；共焦点スキャナー、共焦点顕微鏡、CCDをベースとしたシステムなどの装置と、蛍光、蛍光偏光（FP）、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）、全反射蛍光（TIRF）、蛍光相関分光（FCS）などの方法とを用いた蛍光検出法；測光/分光法；表面に吸着される材料の質量変化を測定することのできる表面プラズモン共鳴；放射性同位元素を用いた方法（放射性同位元素結合や、シンチレーション近接アッセイ（SPA））；質量分析法（例えばMALDI、MALDI-TOF）；タンパク質フィルムの厚さを測定する光学的方法である偏光解析法；表面に吸着される材料の質量を測定する非常に感度のよい方法である水晶発振子マイクロバランス（QCM）法；走査プローブ顕微鏡（例えばAFMやSEM）；電気化学法、インピーダンス法、アコースティック法、マイクロ波法、IR/ラマン検出法が挙げられる。例えば、Merelらの『ミニチュア化したFRETアッセイと微小流体学：超ハイスループット・スクリーニングにおいてカギとなる要素』、Drug Discov. Today、第4巻（8）、363～369ページ、1999年と、この論文に引用されている参考文献；Lakowicz Jr.の『蛍光分光の原理』、第2版、プレナム・プレス社、1999年を参照のこと。

【0107】

例えばいくつかの実施態様では、特殊な修飾がなされた生体分子と反応するが、修飾されていない生体分子やそれ以外の修飾がなされた生体分子とは反応しない抗体を用い、特定の修飾を検出する。1つ以上の抗体に対する結合を調べることができる。1つ以上の抗体に対する結合を1回のアッセイで調べる実施態様では、異なる抗体に異なる標識を付けるとよい。抗体への標識法は従来技術において周知である。標識法としては、例えば、抗体に放射性標識したり蛍光タグを付けたりすることができる。別の実施態様では、質量分析を利用して修飾された生体分子と修飾されていない生体分子を区別する。

【0108】

所定の1つのタイプまたは多数のタイプの生体分子の多数のコピーを本発明による特定のアイランドに収容できるため、多くの用途と利点が生まれる。例えば、固定化された2つ以上の生体分子を、互いの間の相互作用がない状態にして、1回のアッセイで使用することができる。別の具体例として、変化を検出する生体分子が固定化される生体分子となる実施態様では、所定の特定の生体分子がアレイ上のどこに位置しているかを正確に知ることができるため、こうした変化の検出が容易になる。例えば、所定の特定の生体分子がアレイ上のどこに位置しているかを正確に知ることができるため、1つの検出システムで2つ以上の効果を検出することができる。例えば、さまざまな生体分子を検出するための抗体や生体分子同士を区別する抗体と結合できる、かなり多いが限られた数の蛍光色素が存在している。したがって、1回のアッセイで限られた数の抗体しか使用しなくても、どの抗体が対応する標的と結合したかを区別する能力を維持することができる。本発明のアレイ・システムでは、固定化された生体分子がタイプごとに空間的に限定された位置に存在している。したがって、所定の1つの蛍光色素を用いて2つ以上の抗体に標識することができる。というのも、同じ色素で標識された特異性が異なる抗体は、アレイ上の位置に基づいて互いに区別できるからである。同様に、質量変化を検出する方法を利用する場合には、（1）1つ以上の特定のタイプの生体分子それぞれの位置と、（2）興味の対象である1つ以上の溶液のうちどれがアレイ上の所定の位置にある所定のタイプの生体分子に曝露されるかがわかると、検出した質量変化が、興味の対象である特定の溶液に曝露された特定のタイプの生体分子によるものであることがわかる。

【0109】

結合アイランドまたは結合領域を含むアレイをキットに含めることができる。このようなキットが本発明の別の実施態様になる。このようなキットは、本発明によるアレイの結合アイランドまたは結合領域に固定化するための生体分子を調製するのに役立つ試薬や、固定化された生体分子に対する修飾を検出するのに役立つ試薬や、固定化された生体分子に興味の対象である溶液からの生体分子が結合したことを検出するのに役立つ試薬なども含むことができる。

【0110】

同様に、固定化された生体分子を含むアレイをキットに含めることができる。このようなキットが本発明のさらに別の実施態様になる。このようなキットは、固定化された生体分子の修飾を検出するのに役立つ試薬や、固定化された生体分子に興味の対象である溶液からの生体分子が結合したことを検出するのに役立つ試薬も含むことができる。

【0111】

本発明を実施する上で有効な実験室の器具やそれ以外の装置も本発明のキットに含めることができる。

【0112】

本発明の方法とアレイにより、多数の異なる分子相互作用を同時に研究することができる。このように同時に研究できることには多くの利点がある。利点として、例えば、ハイスループットになること、自動化が容易になること、同時処理によりサンプル同士の比較がしやすくなることなどが挙げられる。一例として、本発明の方法を用いると、96ウエル・プレートの所定のウエル内の（あるいは基板上でサイズがそのようなウエルと同じ領域内の）500の結合アイランドのそれぞれに異なるタイプの生体分子を固定化し、500アイランドのアレイにおいてそれぞれのタイプの生体分子の位置をあらかじめ決めた状態にすることができる。望むのであれば、この手続きを96ウエル・プレート内の96個のウエル（あるいは基板上でサイズと方向がそのようなウエルと同じ96の領域それぞれ）に対して繰り返すことにより、それぞれが所定の空間的方向性を持った異なる500タイプの生体分子のアレイを96個コピーして作ることができる。このような実施態様では、96の異なる生体分子の溶液のうちの1つを96ウエルのそれぞれに入れる（あるいは基板上でサイズと方向がそのようなウエルと同じ96の領域それぞれに載せる）ことにより、異なる500タイプの生体分子に対して同時に96の異なる処理を行なうことができる。

【0113】

MCPやアレイ形成装置などの方法を用いて表面に結合SAMのパターンを形成することができる。洗浄、滴下、スプレー、浸漬、MCPなどの方法を用いて結合アイランドを非結合領域で囲むことができる。一実施態様では、結合SAMのアイランドのすべてが同じSAMを含んでいる。すなわち、結合アイランドのそれぞれが同じタイプまたはクラスの生体分子と結合することができる。このような実施態様は、例えば、アレイ形成装置を用いて特定の生体分子を各結合アイランドに移動させる場合に有効であろう。この場合、各結合アイランドは移動した任意の生体分子またはすべての生体分子と結合するが、生体分子が混合することはない。その理由は、第1にアレイ形成装置によって分離した状態が維持されていること、第2に、それぞれのタイプの生体分子が所定の結合アイランドと結合することにある。別の実施態様では、結合アイランドごとに、異なるタイプまたはクラスの生体分子に対して特異的なSFMを含むことができる。このような実施態様は、生体分子を洗浄またはそれと同様の方法で結合アイランドのアレイに付着させる場合に特に有効であろう。それは、例えば、生体分子の供給源が、あらかじめ分画または区分していない生物サンプルの場合である。言い換えるならば、このような実施態様は、本発明のアレイが分離機能とともに固定化機能と局在化機能（すなわち所定の位置に生体分子を保持する機能）を実現することが望ましい用途で特に有効である。

【0114】

いくつかの実施態様では、単一のタイプの生体分子と結合しているか、あるいは結合するようにした2つ以上の結合アイランドを含むアレイを製造することが望ましかろう。同様に、いくつかの実施態様では、2つ以上のタイプの生体分子と結合しているか、あるいは結合できるアイランドを製造することが望ましかろう。

【0115】

これら実施態様では、本発明の他のいくつかの実施態様におけるのと同様に、多数の生体分子（約500）を、環境条件が異なっていて他の生体分子の混合物を含む96の異なる溶液に同時に曝露することができる。96ある溶液のそれぞれが500種類の生体分子のそ

れぞれに及ぼす効果は、この明細書に記載した方法で評価することができる。アレイを製造すること、興味の対象である溶液にアレイを曝露すること、溶液と固定化された生体分子が互いの間に及ぼす効果を測定または観察することは、すべて、ハイスループットにすることと自動化することが可能なプロセスである。

【0116】

本発明のアレイ・システムは、ドラッグ・デリバリーに応用される。その応用として、一次スクリーニング、二次スクリーニング、標的の有効性確認が挙げられる。1つのアレイ上でいくつかのタンパク質間相互作用を調べることができるというのは、医薬品候補を単一の伝達経路中のいくつかの潜在的な標的に対してスクリーニングできることを意味する。医薬品間相互作用と、その相互作用が細胞、生体経路、生体分子に及ぼす効果も、本発明の方法とアレイを用いて調べることができる。医薬品の発見において一次スクリーニングからのヒットの特異性をチェックするのに必要なタイプのカウンター・アッセイも、本発明のアレイを用いて行なうことができる。本発明のアレイは多重化されているため、医薬品を発見する際のスクリーニング時間を短縮し、治療法の開発速度を上げることができよう。阻害剤をスクリーニングするためのキナーゼをベースとしたアレイは、例えばガンその他の疾患の診断や、農業分野のバイオテクノロジー (AgBio) で利用される。本発明のアレイは、診断においても役立つ。

10

【0117】

本発明のアレイは、生命科学の研究分野で生体内の経路を研究するツールとしても非常に有用である。本発明の方法とアレイを用いて調べることができる経路の具体例としては、成長/増殖/分化/ガン経路 (例えばsrc経路)、インテグリン・スカフォールド/FAKにより活性化される経路、マイトジェン活性化プロテイン・キナーゼ (MAPK) カスケードなどが挙げられる。MAPKカスケードの具体例としては、Ras/Raf/MEK/ERK経路、PKC/Raf/MEK/ERK経路、MAPKへのシグナル伝達を行なうGタンパク質結合受容体経路、p38 MAPK経路、SAPK/JNK経路が挙げられる。本発明の方法とアレイを用いて調べることができる経路の別の具体例としては、アポトーシス経路 (例えばカスパーゼシグナル伝達経路、p53経路)、抗アポトーシス経路 (例えばPI3K/Akt/BAD経路、Bcl-2経路)、翻訳制御経路 (例えばeIF-2、eIF-4、p70 S6キナーゼを調節する経路)、Wntシグナル伝達経路、PKC経路などが挙げられる。本発明の方法とアレイを用いて調べることができる経路のさらに別の具体例としては、リン脂質 (ジアシルグリセロール/IP3) とCa²⁺によって調節されるシグナル伝達経路 (例えばPKC活性化MAPK、転写因子Nk-kBのPKC活性化、Ca²⁺/カルモジュリン活性化系 (例えばCaMKキナーゼファミリー経路)) ; cAMP媒介経路 (例えばPKAやPKA/CREBによるグリコーゲンの代謝調節) ; cGMP媒介経路などが挙げられる。本発明の方法とアレイを用いて調べることができる経路のさらに別の具体例としては、細胞サイクル/チェックポイント制御経路 (例えばサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 経路、G1/Sチェックポイント経路 (例えばCDK4/6-サイクリンD、CDK2-サイクリンE、Rb)、G2/M DNA損傷チェックポイント経路 (例えばcdc2-サイクリンBキナーゼ)) ; 致死受容体シグナル伝達経路 (例えばFas/TNFR活性化カスパーゼ経路) ; ミトコンドリアによるアポトーシスの制御と関係した経路 ; サイトカイン活性化経路 ; 走化性と関係した経路 ; 増殖因子活性化経路 ; イオンチャネル活性化経路、Gタンパク質結合受容体活性化経路、受容体チロシンキナーゼ (RTK) 活性化経路などが挙げられる。ストレス活性化経路 (例えば環境ストレスと炎症性サイトカインによって活性化されるp38 MAPK経路) ; 環境ストレス、炎症性サイトカイン、増殖因子、GPCRアゴニストによって活性化されるSAPK/JNKシグナル伝達カスケード (例えばRhoファミリー (Rac、Rho、cdc42) によって活性化されるものや、さまざまな因子 (c-jun、ATF2、p53など) の活性化) も、本発明の方法とアレイを用いて調べることができる。本発明の方法とアレイを用いて調べることができる経路のさらに別の具体例としては、Jak/STATシグナル伝達経路 (例えばIL-6受容体ファミリー経路) ; I

20

30

40

50

L-2受容体経路；TGF-スーパーファミリーシグナル伝達経路；細胞骨格経路（例えばRhoサブファミリー（Rho、Rac、cdc42）の調節によるアクチンの再構成）；凝固経路；呼吸経路；合成経路（例えばタンパク質合成経路、炭水化物合成経路、脂肪合成経路、脂質合成経路、ステロイド合成経路）；代謝経路（例えばグルコース合成経路、グリコーゲン産生経路、インスリン依存性経路）；異化経路；電子伝達に關係する経路；補体カスケードに關係する経路；免疫応答経路（例えば炎症経路）；アレルギー誘起経路；発生経路；細胞分化経路などが挙げられる。

【0118】

本発明の方法とアレイを用いて調べることができるタイプの生体分子の具体例として、タンパク質、ポリペプチド、炭水化物、脂質、ポリヌクレオチド、小分子、ステロイドなどと、これらの修飾形または誘導体が挙げられる。本発明の方法とアレイを用いて調べることができるクラスのタンパク質の具体例として、酵素（例えば、キナーゼ、ホスファターゼ、フリパーゼ、エステラーゼ、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、リパーゼグリコシルトランスフェラーゼ、グリコシダーゼ、シンターゼ、ヒドロゲナーゼ、デヒドロゲナーゼ、カルボキシラーゼ、デカルボキシラーゼ、プロテアーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、グリコシダーゼ、ファルネシルトランスフェラーゼ、イソペプチダーゼ）；メチル化、脱メチル化、アセチル化、脱アセチル化、脂質化、脱脂質化、プレニル化、脱プレニル化、ユビキチン化、脱ユビキチン化、ヒドロキシル化、脱ヒドロキシル化、ニトロシル化、脱ニトロシル化、アロステリック転移、加水分解、解糖、電子伝達、呼吸、生体異物処理、代謝、異化変性を行なう酵素；受容体、転写因子、構造タンパク質などと、これらの誘導体（例えば糖タンパク質や糖脂質など）が挙げられる。

【0119】

本発明のアレイ・システムを用いて他の生体プロセス（例えば生体異物の代謝）を調べることができる。例えば、シトクロムP450のイソ酵素のアレイをインビトロでのADME-toxの研究に使用し、インビボでのADME-toxの研究で用いる高価な化合物の数を減らすことができる。本発明のアレイは、ADMEの吸収、分布、代謝、排泄の研究にも用いることができる。

【0120】

この明細書で参照したあらゆる出版物、特許、特許出願は、参考として、それぞれの内容がこの明細書の中に記載されているのかのごとくに組み込まれている。

【0121】

このように本発明をいくつかの好ましい実施態様を参照して説明したからには、当業者であれば、この明細書と実施例を考察することによって他の実施態様も簡単に思いつくであろう。この明細書は、実施例も含め、単なる例示であることに注意されたい。

【0122】

実施例1

（末端にEG3を有するチオールの背景の中に）末端にCOOHを有するチオールをEDC/NHSカップリングと、ピオチン-アミンと、ストレプトアビジンとを用いてあらかじめ微小接触印刷してある表面に、チロシンキナーゼの基質としてピオチニル化されたペプチドのアレイを固定化した。図4を参照のこと。次に、p60^{src}（キナーゼであるsrcファミリーのうちの1つ）とATPを含む溶液をアレイ上に置き、酵素により、リン酸基を基質のチロシン残基に付加した。次に、チロシンリン酸基と特異的に結合する一次抗体をアレイ上でインキュベートした。次に、一次抗体が認識するフルオレセインで標識した二次抗体をアレイ上でインキュベートした。次に、結合した二次抗体からの蛍光を、立方体のフルオレセインを備えた蛍光顕微鏡を用いて検出した（励起480nm；放出530nm）。

【0123】

この実験と3つの対照実験（酵素なし；基質なし；末端にCH₃を有するSAMを微小接触印刷したもの）から、キナーゼという酵素によってリン酸基がアレイ上に付加されるこ

とがわかった。この結果を図5に示してある。

【0124】

実施例2

キナーゼの基質となるように設計した多数のペプチド(10~1000個の範囲)を、適切なロボット式液体供給法を利用して結合SAMアイランドを有する表面の上にアレイ状にする。ペプチド群のいくつかのアレイは、“アレイのアレイ”を生み出す。ペプチドを表面に固定化した後、その表面を洗浄する。次に、1つのキナーゼ、または所定のキナーゼ群を発現している細胞のライセートのいずれかと、ATPと、塩と、緩衝液とを含む溶液を、あらかじめ形成したペプチド・アレイと接触させる。多数の異なる溶液またはライセートをテストする場合には、それぞれの溶液を“アレイのアレイ”内の個々のアレイに供給する。

10

【0125】

固定化されたペプチドをキナーゼでリン酸化させる(一般に37にて30分間)。次に、基板を8mMのドデシル硫酸ナトリウム(SDS)溶液と、0.01%トゥイーン-20(界面活性剤)を含むトリス緩衝生理緩衝液の中で洗浄する。次に、ペプチドがどの程度リン酸化されたかを、抗リン特異抗体と、現像したときに色彩または蛍光が現われる二次抗体を用いて検出する。

【0126】

次に、測光スキャナーまたは蛍光スキャナーを用い、アレイの各要素がどの程度リン酸化されたかを定量する。このデータからリン酸化の“フィンガープリント”が得られ、それを解析することにより、テストしたサンプル(アレイ状になったペプチドのこのサンプルに対する活性はわかっている)中の特定のキナーゼの活性がわかる。したがってこの方法は、個々の経路におけるキナーゼの活性を細胞ライセートから直接明らかにする手段を提供する。キナーゼ阻害剤も研究することができる。図6を参照のこと。

20

【0127】

実施例3

本発明のアレイは、Raf/MEK/MAPK経路を調べるのにも使用できよう。このセリン/トレオニン・リン酸化カスケードがMAPキナーゼ(MAPK)を活性化し、増殖と分化を開始させる。この経路の概略を図3に示してある。この経路の阻害剤を抗ガン剤や抗炎症剤として用いる研究が進められている。このアレイでは、この経路に関係する2つのタンパク質が表面に固定化される。すなわち、不活性なMEKと不活性なMAPKである。タンパク質アレイ上の溶液は、活性なRaf酵素とMEK酵素のほか、この経路の潜在的な阻害剤とATPを含んでいる。このアレイは、溶液に含まれるRafおよび/またはMEKの潜在的な阻害剤に曝露される。アレイ上のアッセイ用溶液をインキュベートした後、MEKとMAPKのリン酸化された残基に対して特異的な抗体をアレイ上でインキュベートする。固定化された酵素がRafまたはMEKによってリン酸化されるのをこの阻害剤が妨げるのであれば、抗体は結合せず、したがって洗浄後に抗体が検出されることはなかろう。阻害剤の特異性と効率に応じ、異なった蛍光スポットが現われることになる。

30

【0128】

図3では、固定化されたMEKとMAPKを含む4つのアレイが、MEKおよび/またはRafの潜在的なさまざまな阻害剤を含む4つの溶液(A、B、C、D)のうちの1つに曝露される。観察されるリン酸化パターンに基づくと、溶液AはRafの活性な阻害剤もMEKの活性な阻害剤も含んでいないこと、溶液BはRafの阻害剤を含んでいるがMEKの阻害剤は含んでいないこと、溶液CはMEKの阻害剤を含んでいるがRafの阻害剤は含んでいないこと、溶液DはRafの阻害剤とMEKの阻害剤の両方を含んでいることがわかる。

40

【0129】

実施例4

適切なロボット式液体供給法により、シグナル伝達経路のリン酸化された個々の要素と特

50

異的に結合する多数の抗体（一般に100以上）を表面にアレイ状にする。例えば、抗リンMAPK、抗リンMEK、抗リンMEKKを表面にアレイ状にする。次に、あらかじめシグナル伝達カスケードを活性化した細胞ライセート、あるいはあらかじめ所定の遺伝子をノックアウトした細胞ライセートを、抗体アレイに曝露する。インキュベーションの後、抗体アレイに対する結合度を適切な検出法（例えばSPRやELISA）で読み取る。リンタンパク質が対応する抗体に結合した量は、シグナル伝達カスケードの個々の要素の活性度を表わしている。

【0130】

実施例5

反応性SAMを、特定の酵素に対する基質となるペプチドを含む溶液でコーティングする。インキュベーションすることによってペプチドを固定化した後、表面を洗浄する。次に、1つまたはいくつかの細胞ライセートを、表面、ATP、塩、緩衝液とともにインキュベートする。次にペプチドのリン酸化の程度をリン特異抗体を用いて調べると、細胞ライセート中のキナーゼの活性を定量することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、アルカンチオールの微小接触印刷を利用して金の表面に生体分子アレイを構成する方法の概略図である。アレイのパターンは、印刷に使用するスタンプ面の凹凸構造に応じて異なる。

【図2】

図2は、自己集合単分子膜（SAM）の分子構造に関する概略図である。SAMを形成する分子部分の機能を矢印の右側に示してある。

【図3】

図3には、Raf/MEK/MAPK経路（左）と、この経路の阻害剤を分析するのに使用できる本発明のアレイ（右）の概略図が含まれる。

【図4】

図4は、アレイで使用する表面に、基質となる生体分子としてペプチドを固定化する方法の一例を示した概略図である。

【図5】

図5は、図4に示した固定化されたペプチドのアレイを用いたアッセイにより得られた結果を示している。

【図6】

図6は、固定化されたキナーゼの基質の多重化生体分子アレイの図である。このアレイは、経路の分析に用いることができよう。この図からわかるように、キナーゼとキナーゼ阻害剤の混合物を添加する。リン酸化された基質に対する蛍光標識抗体とともにこのアレイをインキュベートすると、どの基質がリン酸化されたかを検出することができる。

【 図 5 】

FIGURE 5

・ 実験



- μCP 直径 100-μm の区画
- ポリペプチド EGPWLEEEEA*GWMDF (ガストリンのアミノ酸配列に由来) を固定化
- p60^{src} タンパク質-チロシンキナーゼ (src) を添加
- フルオレセイン AB を用いてリンチロシンを検出

□ 対照1



- 実験と同様にしたが、ポリペプチド基質は固定化しない

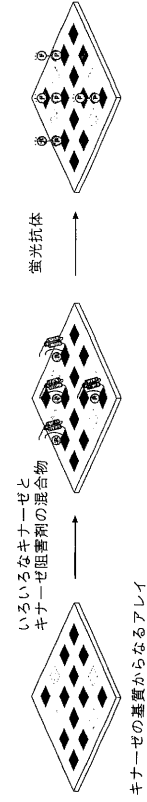
□ 対照2



- 実験と同様にしたが、p60^{src}は添加しない

【 図 6 】

FIGURE 6



キナーゼの基質からなるアレイ

【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
21 February 2002 (21.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/14864 A1

(51) International Patent Classification: G01N 33/53, (74) Agent: KING, Jennifer, L., Kenyon & Kenyon, Suite 700, 33/551, 33/543, 33/68 1500 K Street, N.W., Washington, DC 20005 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/25351

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) International Filing Date: 14 August 2001 (14.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/225,363 14 August 2000 (14.08.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): SURFACE LOGIX, INC. [US/US]; 50 Soldiers Field Place, Brighton, MA 02135 (US).

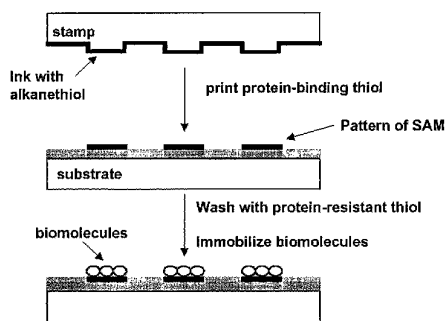
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and Inventors/Applicants (for US only): DUFFY, David [GB/US]; 18 Forest Street #4, Cambridge, MA 02140 (US), CAMPBELL, Stewart [US/US]; 4 Sheehan Circle, Framingham, MA 01701 (US).

Published: with international search report

[Continued on next page]

(54) Title: BIOMOLECULE ARRAYS



(57) Abstract: The present invention provides array systems that facilitate the simultaneous monitoring of many interactions between biological molecules. Biomolecule arrays according to the present invention provide a flexible and general tool and will allow biological researchers to probe cellular protein interactions with high throughput. In certain embodiments, the present invention provides methods and arrays for analyzing biochemical pathways comprising the steps of forming an array of immobilized biomolecules; exposing said array to biomolecules in solution; and detecting modification of the immobilized biomolecules, modification of the biomolecules in solution, and/or binding of biomolecules in solution to immobilized biomolecules.



WO 02/14864 A1

WO 02/14864 A1



— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

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.

BIOMOLECULE ARRAYSBACKGROUND OF THE INVENTION

[1.] Nearly all biological activity is regulated by the interactions of proteins in cells. Proteins are the catalysts, motion transducers, and signal mediators of cells. They control cell division, cell growth, cell differentiation, cell death, and mediate the responses of cells to their environments. To understand cellular processes, we therefore need to monitor the activity of proteins, and to determine the networks of interactions of proteins within cells.

[2.] Researchers believe that upwards of 300,000 proteins are translated from the human genome. For many years biologists have endeavored to understand the interactions between these proteins. In the post-genomic era, when the blue-print for all of these proteins will be available, biologists will, in principle, be able to study many more proteins and their interactions.

[3.] In the past, the tools available to biologists have only allowed these interactions to be studied one at a time because of a lack of analytical tools that would allow large numbers of protein interactions to be monitored. A system that allowed massively parallel analyses of protein interactions would be of immense value and would speed the progress of biological discovery.

[4.] An understanding of cellular signal transduction at a molecular level will provide great insight into disease. This understanding will lead to more effective diagnostic tools and more rational methods of developing drugs. The starting point to understanding biology at the molecular level has been the effort to identify and

WO 02/14864

PCT/US01/25351

sequence all of the genes in several organisms, an approach known as genomics. For example, the human genome project has yielded the sequence of all 100,000 human genes. The enormous amount of molecular information that has been made available from these sequencing efforts has given rise to the field of functional genomics.

[5.] Functional genomics relates differences in the state of cells, e.g., diseased vs. not diseased, to differences in the levels of their messenger RNA (mRNA). This approach has allowed the functional relationships between many genes to be elucidated. Perhaps the most successful tool in functional genomics has been the complementary-DNA (cDNA) array, which has been commercialized by companies such as Affymetrix, Incyte Genomics, Gene Logic, Nanogen, and Agilent.

[6.] Functional genomics is, however, only the first step in using the sequence of genomes to understand biology. Although functional genomics identifies genes of interest, it does not provide molecular level information on how proteins interact to control cell behavior and physiology. For example, the level of transcribed mRNA is not a reliable way to assess the amount or nature of proteins in a cell. This lack of correlation between mRNA and protein levels is due to many factors, including the expression of more than one protein by a single gene, such as via alternative splicing, and post-translational modifications of proteins, such as phosphorylation, methylation, acetylation, lipidation, farnesylation, and glycosylation. Further, genomics does not provide direct information on the interactions between proteins. This lack of direct information is especially prominent in the

WO 02/14864

PCT/US01/25351

area of signal transduction pathways, which are largely governed by post-translational modifications.

[7.] Functional proteomics is a burgeoning field in which differences in the state of a cell are related directly to differences in the levels of expressed proteins. The strategies now being used for proteomic analyses - 2D gel electrophoresis (2DE) and mass spectroscopy - are not optimized for high throughput. These techniques are also limited in that they are not suitable for use with transmembrane proteins, are technically difficult to perform, and have limited ability to detect low abundance proteins, such as those in signal transduction pathways. A limitation to the use of functional proteomics is that a general and flexible technology, akin to cDNA arrays, that can detect proteins and their interactions is not available currently in proteomics.

[8.] Protein arrays provide a general tool that allows biological researchers to perform assays with high throughput. Protein arrays are patterned arrays of known biomolecules that can undergo a molecular recognition with specific proteins amongst a complex mixture of proteins in solution. Various concepts have been proposed for protein arrays. The most common is composed of arrays of monoclonal antibodies that bind to specific proteins in a similar way that arrays of cDNA capture mRNA. Other approaches include the use of arrays of chemicals which bind proteins. Arrays such as these have been used to isolate proteins, but no array system useful for monitoring interactions between proteins yet exists.

WO 02/14864

PCT/US01/25351

[9.] There is therefore a need for an array system that provide a flexible and general tool for studying protein-protein interactions with sufficiently high throughput.

SUMMARY OF THE INVENTION

[10.] The present invention provides array systems that facilitate the simultaneous monitoring of many interactions between biological molecules. Biomolecule arrays according to the present invention provide a flexible and general tool and will allow biological researchers to probe cellular protein interactions with high throughput.

[11.] In certain embodiments, these systems are adapted to be used to investigate the effect of a drug or other substance on a biomolecule or biomolecules. In certain embodiments, the effect(s) of a drug or other substance on a biomolecule or biomolecules of a pathway or pathways is analyzed. In such embodiments, the biomolecules and/ or pathway may be known or unknown and characterized or uncharacterized. Likewise, the drug or other substance may be identified or unidentified and may be characterized or uncharacterized.

[12.] In one embodiment, these systems are adapted to be used to elucidate signal transduction pathways and other biological processes governed by enzyme-mediated, post-translational modifications. In certain embodiments, the array systems of the present invention are adapted to facilitate the performance of assays with high throughput. Methods for preparing and

WO 02/14864

PCT/US01/25351

using array systems according to the present invention are provided.

[13.] As used herein, the terms "biological molecules" and "biomolecules" may be used interchangeably. These terms are meant to be interpreted broadly, and generally encompass organic molecules that are produced by biological systems or other biological molecules, organic molecules that are capable of affecting or altering biological systems when placed in contact therewith, and organic molecules capable of modifying or binding to other biological molecules. "Biological systems" should likewise be interpreted broadly to encompass, for example, organisms, organ systems, organs, tissues, cells, and biological molecules that interact *in vitro*. The term "biomolecules" also includes inorganic molecules that are produced by biological systems or other biological molecules, inorganic molecules that are capable of affecting or altering biological systems when placed in contact therewith, and inorganic molecules capable of modifying or binding to other biological molecules. For example, inorganic vitamins, minerals, toxins, drugs, and cofactors may be encompassed by the term "biomolecules" as used herein.

[14.] As non-limiting examples, biomolecules include oligosaccharides, polysaccharides, oligopeptides, polypeptides, peptides, proteins, oligonucleotides, and polynucleotides. Oligonucleotides and polynucleotides include, for example, DNA and RNA. Biomolecules also include organic compounds, organometallic compounds, salts of organic and organometallic compounds, saccharides, amino acids, and nucleotides, lipids, carbohydrates, drugs, toxins, venoms, steroids, lectins, vitamins,

WO 02/14864

PCT/US01/25351

minerals, metabolites, cofactors, and coenzymes. The term "drugs," as used herein, should be interpreted broadly to include drugs of known efficacy and safety, drug candidates picked randomly from libraries of biomolecules, and drugs at every level of investigation therebetween.

[15.] Biomolecules further include derivatives of the molecules described. For example, derivatives of biomolecules include lipid and glycosylation derivatives of oligopeptides, polypeptides, peptides, and proteins. Further examples of derivatives of biomolecules include lipid derivatives of oligosaccharides and polysaccharides, e.g., lipopolysaccharides.

[16.] Biomolecules may be considered as groups, or classes, of differing degrees of inclusivity. For example, proteins and lipids may be considered to be two different classes of biomolecule. Being more exclusive, enzymes and structural proteins are examples of two classes of protein. More exclusively still, peptidases and kinases are examples of two classes of enzymes. As used herein, any of these degrees of grouping may be referred to as classes of biomolecules. As used herein, a "type" of biomolecule refers to a specific biomolecule. For example, protein kinase A is one type of biomolecule. Likewise, protein kinase C is another type of biomolecule. Arrays according to the present invention may comprise one or more type of biomolecule, and different types of biomolecule may be from the same or different class of biomolecules.

[17.] In certain embodiments, array systems according to the present invention comprise biomolecules immobilized on a surface. In certain embodiments, the

WO 02/14864

PCT/US01/25351

surface may be activated, adapted, prepared, or modified to facilitate the binding of biomolecules.

[18.] The term "array," as used herein, generally refers to a predetermined spatial arrangement of binding islands, biomolecules, or spatial arrangements of binding islands or biomolecules. Array systems according to the present invention that comprise biomolecules immobilized on a surface may also be referred to as "biomolecule arrays." Array systems according to the present invention that comprise surfaces activated, adapted, prepared, or modified to facilitate the binding of biomolecules to the surface may also be referred to as "binding arrays." Further, the term "array" may be used herein to refer to multiple arrays arranged on a surface, such as would be the case where a surface bore multiple copies of an array. Such surfaces bearing multiple arrays may also be referred to as "multiple arrays" or "repeating arrays." The use of the term "array" herein may encompass biomolecule arrays, binding arrays, multiple arrays, and any combination thereof; the appropriate meaning will be apparent from context.

[19.] Surfaces useful according to the present invention may be of any desired shape (form) and size. Non-limiting examples of surfaces include chips, continuous surfaces, curved surfaces, flexible surfaces, films, plates, sheets, tubes, and the like. Surfaces preferably have areas ranging from approximately a square micron to approximately 500 cm². The area, length, and width of surfaces according to the present invention may be varied according to the requirements of the assay to be performed. Considerations may include, for example, ease of handling, limitations of the material(s) of which the

WO 02/14864

PCT/US01/25351

surface is formed, requirements of detection systems, requirements of deposition systems (e.g., arrayers), and the like. In certain embodiments, surfaces are approximately 106 cm². In certain embodiments, surfaces have a length and width similar to the length and width of a standard 96 (or 384, 1536, or 3456) well plate.

[20.] Surfaces useful according to the present invention may be of any suitable thickness. The thickness of surfaces according to the present invention may be varied according to the requirements of the assay to be performed. Considerations may include, for example, ease of handling, limitations of the material(s) of which the surface is formed, requirements of detection systems, requirements of deposition systems (e.g., arrayers), and the like. For example, where SPR will be used for detection, the surface will ordinarily preferably be 30 or fewer nanometers thick. Surfaces to be read with fluorescent plate readers may be thicker, such as approximately 1 cm thick. Typically, the surface may have a thickness of between approximately 50 μ to approximately 2 cm.

[21.] In certain embodiments, it is desirable to employ a physical means for separating groups or arrays of binding islands or immobilized biomolecules: such physical separation facilitates exposure of different groups or arrays to different solutions of interest. Therefore, in certain embodiments, arrays are situated within wells of 96, 384, 1536, or 3456 microwell plates. In such embodiments, the bottoms of the wells may serve as surfaces for the formation of arrays, or arrays may be formed on other surfaces then placed into wells. In certain embodiments, such where a surface without wells is

WO 02/14864

PCT/US01/25351

used, binding islands may be formed or biomolecules may be immobilized on a surface and a gasket having holes spatially arranged so that they correspond to the islands or biomolecules may be placed on the surface. Such a gasket is preferably liquid tight. A gasket may be placed on a surface at any time during the process of making the array and may be removed if separation of groups or arrays is no longer necessary. See, e.g., United States Serial No. 09/705,187, entitled Polymer Gel Contact Masks And Methods And Molds For Making Same.

[22.] In certain embodiments, biomolecules are immobilized in discrete areas. Preferably, such discrete areas are surrounded by areas to which substantially no biomolecules are bound. In certain other embodiments, a surface is adapted, prepared, or modified to facilitate the binding of biomolecules to discrete areas of the surface. Areas which are modified to facilitate the binding of biomolecules may be referred to herein as "binding islands" or "binding areas." Preferably, binding areas are surrounded and separated from each other by regions which do not bind, or which resist binding, biomolecules.

[23.] In some embodiments, immobilized biomolecules bind biomolecules from a solution overlying the immobilized biomolecules. In other embodiments, immobilized biomolecules modify or are modified by biomolecules in a solution overlying the immobilized biomolecules. In other embodiments, array systems of the present invention mimic signal transduction processes that occur in cells. In still other embodiments, array systems of the present invention are adapted for the investigation of the activity of enzymes, (such as, but not limited to,

WO 02/14864

PCT/US01/25351

kinases) that are involved in signal transduction pathways. In yet other embodiments, array systems of the present invention are adapted for the investigation of interactions of biomolecules in solution with numerous members of a particular class of biomolecules. In certain embodiments, array systems of the present invention provide greater biochemical information compared to a conventional protein chip.

[24.] According to certain embodiments of the present invention, biomolecules are immobilized on a surface or surfaces to form an array. Biomolecules may be immobilized on a surface through the use of intermediary molecules that are capable of binding biomolecules. These intermediary molecules may also be referred to herein as "affinity molecules." Such intermediary molecules are bound to or layered over a surface, and biomolecules are immobilized to the intermediary molecules. Biomolecules that are immobilized on a surface through the use of intermediary molecules are encompassed by the term "biomolecules immobilized on a surface." Likewise, references to immobilization of biomolecules on a surface may refer to immobilization directly onto the surface or to immobilization via the use of intermediary molecules, and the appropriate meaning will be evident from context.

[25.] One or more types or classes of biomolecules may be immobilized on a single surface. In certain embodiments, biomolecules of many different types or classes, e.g., 1000's, are immobilized. In other embodiments, biomolecules of fewer types or classes, e.g., 100's, are immobilized. In other embodiments, biomolecules of fewer types or classes, e.g., 100 or fewer, are immobilized. In yet other embodiments, biomolecules of

WO 02/14864

PCT/US01/25351

even fewer types or classes, e.g., from 1 to 99, are immobilized. The number of classes or types of biomolecules immobilized on a particular array according to the present invention may be chosen based on such factors as the assay(s) to be performed, the size of the biomolecules, the desired distance between the biomolecules, and the like.

[26.] According to certain embodiments of the present invention, one or more surfaces are modified, adapted, or prepared to facilitate the binding of biomolecules to the surface. Such preparation may comprise the immobilization or layering onto the surface molecules capable of binding other molecules. Molecules capable of binding other biomolecules may be referred to herein as "affinity molecules." Affinity molecules include molecules capable of binding biomolecules and molecules capable of binding to specific binding groups attached to biomolecules. Such binding groups may be attached to biomolecules through any suitable means: for example, they may be a naturally-occurring part of a biomolecule, they may be attached chemically, biomolecules bearing the groups may be produced using recombinant DNA technology, or they may be attached to biomolecules in disease processes or in response to exposure to environmental stress, drugs, toxins, and the like. Affinity molecules may bind to biomolecules in general, or they may be specific for one or more class of biomolecules or binding groups. Affinity molecules may be still more specific: they may bind to only a few types or a single type of biomolecule or binding group.

[27.] A surface may be prepared so that one or more types or classes of biomolecules may be immobilized

WO 02/14864

PCT/US01/25351

on a single surface. In certain embodiments, a surface may be prepared so that biomolecules of many different types or classes, e.g., 1000's, may be immobilized on that surface. In other embodiments, a surface may be prepared so that biomolecules of fewer types or classes, e.g., 100's, may be immobilized on that surface. In other embodiments, a surface may be prepared so that biomolecules of fewer types or classes, e.g., 100 or fewer, may be immobilized on that surface. In yet other embodiments, a surface may be prepared so that biomolecules of even fewer types or classes, e.g., from 1 to 99, may be immobilized on that surface. The number of classes or types of biomolecules for which a particular array according to the present invention is prepared may be chosen based on such factors as the assay(s) to be performed, the size of the biomolecules, the desired distance between the biomolecules, and the like.

[28.] In some embodiments, biomolecules are immobilized on a surface in patterns, or arrays. In other embodiments, surfaces are modified, adapted, or prepared so that biomolecules may be immobilized thereon in patterns, or arrays.

[29.] In certain embodiments, biomolecules are immobilized using methods and materials that minimize alterations in the nature of the biomolecules, or that minimize interactions between the biomolecules and the surface on which they are immobilized. In certain such embodiments, the immobilization is accomplished by forming one or more self-assembling monolayers (SAMs) on the surface and immobilizing biomolecules on some or all of the SAMs.

WO 02/14864

PCT/US01/25351

[30.] Immobilized biomolecules may be derived from any source of interest. In certain embodiments, biomolecules to be immobilized are or are derived from a supernatant of a cell culture. The cells in culture may be derived from any source of interest. In certain other embodiments, biomolecules to be immobilized are or are derived from a cell lysate. The cell lysate may be derived from any source of interest. Non-limiting examples of such sources include cells in culture, immortalized cell lines, and cells, tissues, or organs taken directly from a living or dead organism. In other embodiments, biomolecules to be immobilized are or are derived from a fluid or fluids taken from a living or dead organism. Non-limiting examples of such fluids include blood, tears, saliva, gastrointestinal fluid, amniotic fluid, bone marrow, plasma, lymph, extracellular fluids, sap, cerebrospinal fluid, and urine. Such fluids may be referred to herein as "physiological fluids." In yet other embodiments, biomolecules to be immobilized are or are derived from a protein or peptide library or other library. In certain embodiments, biomolecules to be immobilized comprise drugs or drug candidates. Samples comprising biomolecules other than biomolecules of interest may be fractionated, thereby reducing or eliminating biomolecules not of interest, before being applied to binding islands of the present invention. However, in certain embodiments of the present invention, such fractionation is unnecessary because the binding islands exhibit binding specificity for certain types or classes of biomolecules.

[31.] In many embodiments, immobilized biomolecules, or biomolecules to be immobilized, are

WO 02/14864

PCT/US01/25351

proteins. One or more types of proteins may be immobilized on a surface. In certain embodiments, the proteins are immobilized using methods and materials that minimize the denaturing of the proteins, that minimize alterations in the activity of the proteins, or that minimize interactions between the protein and the surface on which they are immobilized. In certain embodiments, these biomolecules are proteins involved in pathways that are important in signal transduction.

[32.] Surfaces bearing immobilized biomolecules may be exposed to solutions comprising biomolecules which bind to, modify, or are modified by the biomolecules immobilized on the surface. Such surfaces may be referred to as "solutions of interest." In certain embodiments, one or more type or class of biomolecules of interest is suspended in a solution. In certain embodiments, the solution is or is derived from a supernatant of a cell culture. The cells in culture may be derived from any source of interest. In certain other embodiments, the solution is or is derived from a cell lysate. The cell lysate may be derived from any source of interest. Non-limiting examples of such sources include cells in culture, immortalized cell lines, and cells, tissues, or organs taken directly from a living or dead organism. In other embodiments, the solution is or is derived from a fluid or fluids taken from a living or dead organism. Non-limiting examples of such fluids include blood, tears, saliva, gastrointestinal fluids, amniotic fluid, bone marrow, plasma, lymph, extracellular fluids, sap, cerebrospinal fluid, and urine. Such fluids may be referred to herein as "physiological fluids." In yet other embodiments, the solution is or is derived from a

WO 02/14864

PCT/US01/25351

protein or peptide library or other library. In certain embodiments, the solution to which arrays according to the present invention are exposed comprise drugs or drug candidates.

[33.] In certain embodiments, immobilized biomolecules and/ or biomolecules in solution comprise biomolecules that are members of biochemical pathways. A biochemical pathway, which may be referred to herein as simply a "pathway", comprises sequential collection of processes or reactions a cell uses to transmit stimuli. Such stimuli may be, for example, external stimuli transmitted into the cell into the inside a cell. As another non-limiting example, such stimuli may be cytosolic stimuli transmitted into the nucleus. Each of processes or reactions usually involve a series of interactions between two or more biomolecules. For example, one biomolecule may modify the other, such that the modified biomolecule is, for example, activated or inactivated. Biomolecules involved in a given pathway may be referred to as "members" of that pathway.

[34.] Where reference is made herein to interaction between immobilized biomolecules and a solution of interest, it will be appreciated that the interaction is between biomolecules in the solution and immobilized biomolecules. Where reference is made herein to the detection of an interaction between biomolecules, it will be appreciated that the binding of biomolecules to one another or modifications to one or more of the biomolecules that interact are detected; "interaction" between biomolecules may be used herein as a shorthand for binding together of one or more biomolecules and to modifications to one or more of the interacting

WO 02/14864

PCT/US01/25351

biomolecules as a result of that interaction. Non-limiting examples of modifications include chemical, structural, and physical modifications. Further, reference is made herein to exposure of immobilized biomolecules to solutions of interest and to exposure of solutions of interest to immobilized biomolecules. Unless explicitly stated otherwise, these two references are simply different ways of phrasing one concept - that of putting immobilized biomolecules and solutions of interest in contact with one another.

[35.] As used herein, the term "solution" includes any media in which molecules are not bound to a substrate that is fixed in position in relation to biomolecules immobilized on surfaces according to the present invention. Non-limiting examples of solutions include liquids, emulsions, suspensions, gels, foams, and the like.

[36.] Proteins, other biomolecules, cell lines, cells, physiological fluids, and libraries which may be studied using arrays according to the present invention may be derived from sources that include, but are not limited to animals, plants, algae, fungi, bacteria, viruses, protazoa, and any other life form of interest. Arrays according to the present invention are also useful for studying proteins and other biomolecules produced via chemical synthesis, enzymatic synthesis, recombinant nucleotide technology, and other *in vitro* methods. In embodiments in which the solution is or is derived from a fluid, culture supernatant, library, or cell lysate, the solution may be an entire library or unaltered cell lysate, culture supernatant, or fluid; or the library, lysate, supernatant, or fluid may be subjected to other

WO 02/14864

PCT/US01/25351

methods of separation, fractionation, or characterization, to produce a solution to which an array will be exposed.

[37.] In certain embodiments, cells are treated with drugs or drug candidates of interest, then the cells are lysed and arrays according to the present invention are exposed to the cell lysate. In other embodiments, cells are cultured in miniaturized microfluidic systems that are integrated with arrays according to the present invention. Products released by and/or lysates of cells so cultured may then be analyzed on arrays integrated with the cell culturing system itself. Cells may be cultured, lysed, and exposed to arrays without needing to relocate the cells.

[38.] Binding between biomolecules in solution and immobilized biomolecules and/ or modifications to biomolecules in solution and/ or modifications to immobilized biomolecules are detected using detection techniques known in the art. In certain embodiments, antibodies reactive with a biomolecule having a particular modification, but not reactive with non-modified biomolecules or biomolecules having other modifications, are used to detect particular modifications. Binding of one or more different antibodies to their specific targets may be assessed. In embodiments in which binding to more than one antibody is assessed in a single assay, different antibodies may be differentially labeled. However, differential labeling is not necessary, as the antibodies may also be distinguished on the basis of the position of the immobilized biomolecules to which they bind. Labeling of antibodies is well-known in the art. The use of primary antibodies, which bind molecules of interest, and secondary antibodies, which are labeled and which bind the

WO 02/14864

PCT/US01/25351

primary antibodies is an example of a detection technique useful in the practice of the present invention. As non-limiting examples, antibodies may be radiolabeled or labeled with fluorescent tags. In other embodiments, mass spectroscopy is used to differentiate between modified and non-modified biomolecules. In still other embodiments, surface plasmon resonance is used to differentiate between modified and non-modified biomolecules. Other detection systems are known in the art.

[39.] The array systems of the present invention can be used to elucidate interactions between molecules. For example, methods and arrays according to the present invention may be used to determine the effects of enzymes upon biomolecules, and may also be used to identify and/or characterize inhibitors of enzymes. In an even more specific example, the biomolecules in solution and biomolecules immobilized on an array may be selected so that the system mimics signal transduction pathways, facilitating the characterization of enzymes, such as kinases, enzyme substrates, enzyme inhibitors, and other molecules of interest. As another example, methods and arrays according to the present invention may be used to determine the effects of biomolecules such as drugs and toxins on organisms, organs, tissues, cells, pathways, and individual biomolecules. As yet another example, methods and arrays according to the present invention may be used to elucidate drug-drug interactions.

[40.] As will be further explained herein, the array system according to the present invention provides for high throughput, as many interactions may be tested in a single assay. Likewise, array systems according to the present invention facilitate the simultaneous study of

WO 02/14864

PCT/US01/25351

different pathways. Arrays according to the present invention are especially useful in the simultaneous study of interconnected or overlapping pathways. In certain embodiments, arrays according to the present invention facilitate the simultaneous study of unrelated pathways. As a non-limiting example, biomolecules from one pathway may be arrayed on a surface, biomolecules from another pathway may be arrayed on a different part of the same surface, then the surface may be exposed to, for example, a cell lysate. Thus, in this manner, biomolecules representing two different pathways may be exposed simultaneously to a cell lysate.

[41.] Arrays comprising binding islands or areas may be included in kits, and such kits comprise another embodiment of the present invention. Such kits may also include, as non-limiting examples, reagents useful for preparing biomolecules for immobilization onto binding islands or areas of an array according to the present invention, reagents useful for detecting modifications to immobilized biomolecules, or reagents useful for detecting binding of biomolecules from solutions of interest to immobilized biomolecules.

[42.] Likewise, arrays comprising immobilized biomolecules may be included in kits, and such kits comprise yet another embodiment of the present invention. Such kits may also include, as non-limiting examples, reagents useful for detecting modifications to immobilized biomolecules or for detecting binding of biomolecules from solutions of interest to immobilized biomolecules.

WO 02/14864

PCT/US01/25351

BRIEF DESCRIPTION OF FIGURES

[43.] FIG. 1 is a schematic representation of method for constructing a biomolecule array using microcontact printing of alkanethiols onto a gold surface. The pattern of the array is a function of the relief structure on the stamp used for printing.

[44.] FIG. 2 is a schematic representation of the molecular structure of a Self-Assembled Monolayer (SAM). The functions of portions of the molecules forming the SAM are displayed to the right of the arrows.

[45.] FIG. 3 includes a schematic representation of the Raf/MEK/MAPK pathway (left) and an array according to the present invention (right), which may be used to analyze inhibitors of the pathway.

[46.] FIG. 4 is a schematic showing an example of a method for immobilizing a peptide substrate biomolecule to a surface for use in an array.

[47.] FIG. 5 depicts results obtained from an assay using the array of immobilized peptides depicted in FIG. 4.

[48.] FIG. 6 is a drawing of a multiplexed biomolecule array of immobilized kinase substrates, which would be used for analyzing pathways. As shown in the drawing, a mixture of kinases and kinase inhibitors is added. Which substrates were phosphorylated may be determined after incubation of the array with fluorescently labeled antibodies against phosphorylated substrates.

WO 02/14864

PCT/US01/25351

DETAILED DESCRIPTION

[49.] According to certain embodiments of the present invention, biomolecules are immobilized on surfaces. Preferably, biomolecules are immobilized so that they form patterns, or arrays. In preferred embodiments, immobilized biomolecules are arranged in a pattern comprising discrete spots, or islands, of biomolecules surrounded by areas having substantially no biomolecules immobilized thereon. In alternative embodiments, discrete islands having biomolecules immobilized thereon may be immediately adjacent to areas having different biomolecules immobilized thereon.

[50.] Surfaces that have been modified, adapted, or prepared in order to facilitate immobilization of biomolecules thereon, but which do not yet have biomolecules immobilized thereon, comprise another embodiment of the present invention. Such prepared surfaces may also be an intermediary step in the production of surfaces bearing immobilized biomolecules. Preferably, surfaces are prepared so that biomolecules may be immobilized thereon so that the biomolecules form patterns, or arrays. In preferred embodiments, surfaces are prepared such that biomolecules may be immobilized so that they form a pattern comprising discrete spots, or islands, of biomolecules surrounded by areas having substantially no biomolecules immobilized thereon. In alternative embodiments, surfaces are prepared such that, after biomolecules of interest are immobilized thereon, the surface comprises discrete islands having biomolecules immobilized thereon which are immediately adjacent to areas having different biomolecules immobilized thereon.

WO 02/14864

PCT/US01/25351

[51.] An island or area to which biomolecules may be bound may be referred to herein as a "binding island" or "binding area." It may be said that binding islands or areas are "capable of" binding biomolecules thereon. In other words, binding islands or areas will bind biomolecules if they are exposed thereto or may be modified so that they will bind biomolecules if exposed thereto. When used without the phrase "capable of," the terms "binding island" and "binding area" may refer to areas having biomolecules bound thereto, to areas capable of having biomolecules bound thereto, or to both. The meaning of "binding area" and "binding island" will be apparent in context. Binding areas or islands may have different binding specificities. Therefore, an island or area need not be capable of binding all biomolecules in order to be considered to be a binding island or area. For example, a given binding island may be specific for binding a certain class or type of biomolecule.

[52.] Biomolecules may be bound directly to a surface, but are preferably bound to intermediary molecules which bind biomolecules and which are immobilized on or form a layer on the surface. Such intermediary molecules are bound to or layered over a surface, and biomolecules are immobilized to the intermediary molecules. For example, as will be elaborated herein, a SAM (self assembling monolayer) may be formed on a surface, and the SAM may comprise SAM-forming molecules (SFMs) that bind biomolecules. An area of a SAM that binds biomolecules may be referred to as a "binding island" or a "binding area."

[53.] Biomolecules that are immobilized on a surface through the use of intermediary molecules are

WO 02/14864

PCT/US01/25351

encompassed by the term "biomolecules immobilized on a surface." Likewise, references to immobilization of biomolecules on a surface may refer to immobilization directly onto the surface or to immobilization via the use of intermediary molecules, and the appropriate meaning will be evident from context.

[54.] Any given binding island may be prepared such that a single or multiple copies of one type of biomolecule may be immobilized on that island. In many embodiments, binding islands will be prepared so that a discrete island will be capable of binding thereon one type or class of biomolecule and a second discrete island will be capable of binding thereon a different type or class of biomolecule. Additional discrete islands that are capable of binding thereon yet other different types or classes of biomolecules may also be included on a surface. Of course, a single island may be prepared so that it is capable of binding thereon different types or classes of biomolecules.

[55.] Preferably, the diameter of binding islands or areas according to the present invention is 100 microns or fewer. More preferably, the diameter of binding islands or areas according to the present invention is 50 microns or fewer. Even more preferably, the diameter of binding islands or areas according to the present invention is 20 microns or fewer. Most preferably, the diameter of binding islands or areas according to the present invention is 5 microns or fewer. Preferably, arrays according to the present invention have from 0 to 100 microns of non-binding area between binding islands. More preferably, from 30 to 60 microns of non-binding area lies between binding islands. Sizes of binding islands

WO 02/14864

PCT/US01/25351

and non-binding areas may be chosen according to such considerations as the number of islands desired, the area of the surface, the desired configuration of the islands, and the desired proximity of the immobilized biomolecules.

[56.] Multiple islands of molecules having dimensions as described may be arranged in arrays. Such arrays may be arranged in the wells of 96, 384, 1536, or 3456 well microwell plates or in areas the size and orientation of the wells of a 96, 384, 1536, or 3456 microwell plate. Due to the extremely small diameter of the binding islands, many binding islands may be placed within each microwell. As an example, an array comprising binding islands having a diameter of 100 microns each and separated by non-binding areas of approximately 0 to 60 microns would allow for the placement of approximately 500 binding islands in an area the size of single well of a 96 well plate (each well has a diameter of approximately 5mm). As another example, an array comprising binding islands having a diameter of 20 microns each and separated by non-binding areas of approximately 0 to 60 microns would allow for the placement of approximately 14,000 binding islands in an area the size of a single well of a 96 well plate.

[57.] As is discussed further herein, deposition of molecules in islands of such sizes may be accomplished through the use of soft lithographic techniques. For example, a mask having apertures of the desired sizes may be used to deposit molecules in islands of the desired sizes. In certain embodiments, other techniques, such as, but not limited to washing, dripping, spraying, dipping, and the use of arrayers are useful in the fabrication and use of arrays according to the present invention.

WO 02/14864

PCT/US01/25351

[58.] A single or multiple copies of one type of biomolecule may be immobilized on any given island. In many embodiments, a discrete island will have immobilized thereon one type or class of biomolecule and a second discrete island will have immobilized thereon a different type or class of biomolecule. Additional discrete islands may have immobilized thereon yet other different types or classes of biomolecules. Of course, more than one discrete island may have the same type or class of biomolecule immobilized thereon. Likewise, a single discrete island may have immobilized thereon different types or classes of biomolecules.

[59.] Preferably, the diameter of islands of biomolecules according to the present invention is 100 microns or fewer. More preferably, the diameter of islands of biomolecules according to the present invention is 50 microns or fewer. Even more preferably, the diameter of islands of biomolecules according to the present invention is 20 microns or fewer. Most preferably, the diameter of islands of biomolecules according to the present invention is 5 microns or fewer. Deposition of biomolecules in islands of such sizes may be accomplished through the use of soft lithographic techniques. For example, a mask having apertures of the desired sizes may be used to deposit biomolecules in islands of the desired sizes. Multiple islands of biomolecules having dimensions as described may be arranged in arrays. Such arrays may be arranged in any suitable configuration. Configurations of binding islands and non-binding areas may be chosen according to such considerations as the number of islands desired, the area of the surface, the size of the islands, and the desired

WO 02/14864

PCT/US01/25351

proximity of the immobilized biomolecules. For example, such arrays may be formed on surfaces in a larger pattern similar in shape and size to wells of a 96, 384, 1536, or 3456 well plate. As another example, arrays may be arranged on the bottom surface of wells of 96, 384, 1536, or 3456 well microwell plates.

[60.] Preferably, the surfaces on which biomolecules are immobilized are formed of materials that are inert and/or are capable of resisting the adsorption of biomolecules, such as proteins, by non-specific reactions. The use of materials which do not readily adsorb biomolecules is preferable because non-specific adsorption could cause a molecule to be adsorbed at more than one site, which could alter the characteristics of the molecule. In the case of proteins, non-specific adsorption would likely cause proteins immobilized on the surface to unfold and denature, thus reducing, altering, eliminating their activity. Non-specific adsorption of biomolecules to the surface would also greatly hamper the ability to immobilize specific biomolecules of interest and/or to immobilize biomolecules in specific locations. The use of a surface to which biomolecules are less likely to attach, as opposed to a surface which biomolecules are very likely to attach, is preferred.

[61.] Further, as will be explained further herein, all or portions of non-inert surfaces (surfaces to which biomolecules attach to some degree) may be rendered inert by forming inert SAMs on the areas of the surfaces desired to be inert. Inert surfaces include those surfaces to which substantially no biomolecules attach.

WO 02/14864

PCT/US01/25351

[62.] As used herein, "substantially no" attachment indicates a level of non-specific or undesired attachment of biomolecules which does not prevent detection of interactions sought to be investigated. In other words, "substantially no" non-specific binding occurs when the signal to noise ratio for interactions sought to be detected remains at or above a value detectable by the detection systems being employed. Thus, the definition of "substantially no" varies with such factors as the resolving power of the array and the detection method employed. The definition of "substantially no" for a given system may be determined empirically with routine experimentation. For example, a surface may be tested for binding by incubating it with a solution of biomolecules. The level of binding may be measured. As another example, a surface bearing areas (e.g., of SAMs) intended to be binding islands and areas (e.g., of SAMs) intended to be non-binding areas may be incubated with a solution of biomolecules. The ratio of the number of molecules bound in areas intended to be binding islands compared to the number of molecules bound in areas intended to be inert can be measured. Such control experiments can be performed for different types of binding molecules, and for different detection systems, all without undue experimentation. See, e.g., Mrksich M., et al., *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 25: 55-78 (1996).

[63.] Examples of materials useful in forming surfaces for forming arrays according to the present invention include gold, silver, platinum, palladium, and copper. Other examples of materials useful in forming surfaces for forming arrays according to the present invention include glass, silicon, ceramics, and plastics.

WO 02/14864

PCT/US01/25351

Most preferably, the surfaces are formed of gold or are gold-coated. For example, silicon wafers coated with gold are useful as surfaces in certain embodiments of the present invention.

[64.] Biomolecules may be immobilized on the surfaces by any suitable method known in the art. Preferably, the immobilization is performed using techniques which do not damage biological molecules. For example, the use of UV light and organic solvents in a manner that damages biological molecules is preferably avoided.

[65.] Exemplary methods of immobilizing biomolecules are known in the art. Such methods include affinity capture, covalent derivatization, such as with EDC + NHS, direct coupling, and membrane anchoring, the use of streptavidin-biotin, nickel chelation capture, and the like.

[66.] Preferably, preparing a surface for immobilization of biomolecules thereon in order to produce arrays according to the present invention is accomplished via forming a SAM on the surface. Even more preferably, one or more types of SAM-forming molecules (SFMs) is engineered to form a pattern on the surface. Most preferably, soft lithographic application of SAM-forming molecules (SFMs) is used to form a patterned monolayer on the surface. As is further explained herein, types of SFMs useful for creating arrays in accordance with the present invention include, but are not limited to, SFMs that do not bind to biological molecules and SFMs that bind specifically to a particular biomolecule or type of biomolecule.

WO 02/14864

PCT/US01/25351

[67.] Arrays according to the present invention include surfaces having a SAM or SAMs having biomolecules immobilized thereon in at least one area. Arrays according to the present invention also include surfaces having a SAM or SAMs immobilized thereon, which SAM or SAMs comprise at least one area wherein at least some of the SFMs forming the SAM are capable of binding biomolecules.

[68.] Any suitable method may be used to expose a surface or molecules bound to or formed on a surface, such as a SAM, to other molecules, such as biomolecules, sought to be immobilized on the surface. Non-limiting examples of suitable methods include soft lithography, washing, dripping, spraying, dipping, microfluidic delivery, and deposition with an arrayer. Techniques such as these are useful at many stages in the process of fabrication of arrays according to the present invention. As non-limiting examples, such techniques may be used to deposit molecules directly onto a surface. Molecules which may be deposited include biomolecules, molecules capable of binding biomolecules, and molecules that resist binding to or do not bind to biomolecules. As another example, such techniques are useful for exposing molecules, such as SFMs forming a SAM, layered on or bound to a surface to other molecules, such as biomolecules desired to be immobilized to the molecules bound or layered on the surface. As yet another example, these techniques are useful for exposing immobilized biomolecules to solutions of interest.

[69.] Arrayers are well known in the arts of genomics and arrays. Generally, these machines remove samples from a 96 or 384 micro-well plate then deposit the samples onto a substrate, or surface, or into wells of

WO 02/14864

PCT/US01/25351

another micro-well plate, while maintaining the spatial orientation and separation between samples. Exemplary arrayers include the Biomek 2000 from Beckman Instruments and the Omnigridd from GeneMachines. Arrayers may be used, for example, to transfer proteins from a library of proteins to binding islands of an array according to the present invention. For instance, using arrayer technology (as described herein and as known in the art), it is possible to transfer a different type of SFC to each of 500 spots in a given well of a 96 well plate (or in an area the size of such a well on a substrate) to form 500 binding islands and to predetermine the location of each type of binding island in the array of 500 islands. If desired, this procedure can be repeated for each of the 96 wells in a 96 well plate (or for each of 96 areas the size and spatial orientation of such wells on a substrate), thereby producing 96 duplicate arrays of 500 different types of binding island each in a predetermined spatial orientation. Similar methods may be used to create arrays of 14,000 types of biomolecules in 384 well plates or on substrates.

[70.] Likewise, using arrayer technology (as described herein and as known in the art), it is possible to transfer a different type of biomolecule to each of 500 binding islands in a given well of a 96 well plate (or in an area the size of such a well on a substrate) and to predetermine the location of each type of biomolecule in the array of 500 islands. If desired, this procedure can be repeated for each of the 96 wells in a 96 well plate (or for each of 96 areas the size and spatial orientation of such wells on a substrate), thereby producing 96 duplicate arrays of 500 different types of protein each in

WO 02/14864

PCT/US01/25351

a predetermined spatial orientation. Similar methods may be used to create arrays of 14,000 types of biomolecules in 384 well plates or on substrates.

[71.] Soft lithography is a set of fabrication techniques that have been developed as alternatives to photolithography and which are particularly useful for patterning on a microscopic level. Soft lithography has been used to fabricate or replicate patterns of biological materials with feature sizes that range from approximately 1 micron to approximately 1mm. Soft lithography is also ideally suited to patterning arrays of biological material and is directly compatible with SAM technology. Soft lithography's biocompatibility derives from the fact that the techniques may be performed without the use of organic solvents or UV light, which are harmful to many biological materials.

[72.] Compared to conventional microfabrication techniques, soft lithography techniques require little capital investment and utilize materials which are themselves of low cost. Further, as explained below, soft lithography enables the integration of protein arrays with current drug discovery systems. Any suitable soft lithography technique may be used to pattern SAMs according to the present invention.

[73.] The common element in soft lithography is a polymer template that contains features to be transferred or replicated. In one embodiment, the pattern transfer element is produced by casting a liquid precursor of polydimethylsiloxane (PDMS) on a master, curing it to solid, and removing it from the master. The PDMS replica can be used as a stamp to transfer chemical "ink", as a

WO 02/14864

PCT/US01/25351

stencil mask through which materials are deposited, or as a mold to form topological structures. Micro-contact printing (MCP) is an example of a soft lithographic technique. The use of MCP to form a SAM will be described herein. However, it will be appreciated that MCP may be used to deposit and pattern other molecules. It will also be appreciated that other soft lithographic techniques may be used to deposit and pattern SAMs and other molecules.

[74.] In micro-contact printing (MCP) to form a SAM, the surface relief of PDMS is "inked" with SAM-forming molecules (SFMs), such as alkanethiol, and placed in contact with the surface of a surface, or substrate. The "ink" is transferred to the surface of the substrate and forms a SAM in a pattern that is a projection of the surface relief embossed in the PDMS. Features ranging from 100 nm to 1 mm can be fabricated by MCP.

[75.] Soft lithography can be used to create arrays according to the present invention on many types of surfaces. For example, soft lithography can be used to pattern molecules onto rigid or flexible surfaces and onto flat or curved surfaces. Soft lithography can be used to create arrays with high resolution over small surface areas (e.g., one square millimeter) and over large surface areas (e.g., several cm³) and can create features of a range of sizes (e.g., centimeter, millimeter, micrometer, nanometer).

[76.] The best characterized SAM is that formed by alkanethiols (hydrocarbons with a thiol or -SH group at one end and a functional head group, or X, at the other) on gold. Silver, palladium, platinum, and copper are other examples of surfaces suitable for use with

WO 02/14864

PCT/US01/25351

alkanethiol SAMs. These SAMs form via the formation of metal-sulfur bonds between the surface and the thiol, and the subsequent crystalline close-packing of the hydrocarbon chains. Surface engineering arises from the ability to change the chemical and biochemical nature of the head group (X) on the hydrocarbon, which is exposed at the surface. For example, SAMs having the head group of CF_3 behave like a Teflon surface, while those having the head group of COOH show wetting characteristics of a glass surface. Methods of soft lithography, including soft lithography using SAMs, are discussed in detail in United States patents 5,512,131; 5,620,850; 5,776,748; and 5,976,826, all of which are incorporated herein by reference. See, also, FIGS. 1 and 2.

[77.] In certain preferred embodiments, different types of SFMs are arranged in patterns on the surface to form a patterned SAM wherein different portions of the pattern have different binding characteristics. In certain particularly preferred embodiments, the pattern comprises areas or islands of SFMs capable of binding biomolecules. The SFMs comprising a single binding island may have the same specificity and therefore bind the same biomolecules or may have different specificities, so that they bind different biomolecules. Likewise, different islands of SFMs that bind biomolecules may have the same specificity and therefore bind the same biomolecules or may have different specificities, so that they bind different biomolecules.

[78.] Preferably, binding islands are surrounded by areas of SFMs that are incapable of binding, or that resist the binding of, biomolecules. Such areas, also called "non-binding areas," are useful because they may

WO 02/14864

PCT/US01/25351

reduce or prevent non-specific binding of biomolecules to the array. Non-specific adsorption of biomolecules to the surface can greatly hamper the ability to immobilize specific biomolecules of interest and/or to immobilize biomolecules in specific locations. Such non-binding areas may be created using any suitable method. As a non-limiting example, non-binding areas may be created through the formation of SAMs to which biomolecules do not bind or for which biomolecules have very low affinity.

[79.] Such patterning may be achieved through the use of any patterning technique which will produce patterns of the desired size. For example, such patterning may be achieved through the use of soft lithography, washing, or a combination of soft lithography and washing. Where washing is useful, other, similar techniques, such as dripping, spraying, dipping may also be employed. In an example of patterning through soft lithography, SFMs with a first X group (X_1) are applied to a suitable surface using a suitable method such as MCP or other soft lithographic technique known in the art. SFMs bearing a second X group (X_2) are then applied to the surface in areas not covered by the X_1 SFMs using a suitable technique, such as MCP or other soft lithography technique. X_2 SFMs may also be applied to surface areas not covered by X_1 SFMs by washing the surface with X_2 SFMs, which will form SAMs in the areas of the surface not covered by X_1 SFMs. Additional SFMs with additional X groups may similarly be applied through such additive process fabrication. Application of SFMs to a surface may also be achieved through washing of the surface with SFMs.

[80.] As an example of a useful embodiment, SAM technology may be used to form a SAM at each of 500 spots

WO 02/14864

PCT/US01/25351

in a given well of a 96 well plate (or in an area the size of such a well on a substrate) to form 500 binding islands at predetermined locations. If desired, this procedure can be repeated for each of the 96 wells in a 96 well plate (or for each of 96 areas the size and spatial orientation of such wells on a substrate), thereby producing 96 duplicate arrays of 500 different types of binding island each in a predetermined spatial orientation. Similar methods may be used to create arrays of 14,000 binding islands in 384 well plates or on substrates.

[81.] In one embodiment, all of the islands of binding SAM comprise the same SFM, i.e., each of the binding islands may be capable of binding to the same type or class of biomolecules. Such an embodiment may be useful, for example, where an arrayer will be used to transfer specific biomolecules to each binding island; here, each binding island may bind any or all of the biomolecules transferred, but mixing of the biomolecules will be prevented because separation is maintained first by the arrayer, then because each type of biomolecule is bound to a predetermined binding island. In another embodiment, different binding islands may comprise SFMs that are specific for different types or classes of biomolecules. Such an embodiment may be especially useful when biomolecules are to be applied to an array of binding islands by washing, such as where the source of the biomolecules is a biological sample which has not been pre-fractionated or pre-differentiated. In other words, such embodiments find particular utility in applications for which it is desired that arrays according to the present invention perform a separation function, as well

WO 02/14864

PCT/US01/25351

as an immobilization and localization function (i.e., retaining biomolecules in a predetermined position).

[82.] Techniques such as washing, dripping, spraying, dipping, or MCP may be used to surround binding islands with non-binding areas. Biomolecules may then be immobilized on the binding islands using soft lithography, arrayers, or washing, dripping, spraying, dipping. A different type of biomolecule may be immobilized on each of 500 binding islands in a given well of a 96 well plate (or in an area the size of such a well on a substrate) and to predetermine the location of each type of biomolecule in the array of 500 islands. If desired, this procedure can be repeated for each of the 96 wells in a 96 well plate (or for each of 96 areas the size and spatial orientation of such wells on a substrate), thereby producing 96 duplicate arrays of 500 different types of protein each in a predetermined spatial orientation. Similar methods may be used to create arrays of 14,000 types of biomolecules in 384 well plates or on substrates.

[83.] X groups that bind biomolecules may be referred to herein as "binding X groups," and SFMs having binding X groups may be referred to herein as "binding SFMs." Likewise, X groups that resist the binding of, or do not bind, biomolecules may be referred to herein as "inert X groups," and SFMs having inert X groups may be referred to herein as "inert SFMs."

[84.] A given X group may have a particular specificity when the SFMs are applied to the surface; or SFMs with an X group may be applied, then the X group may be modified or derivatized to alter its binding characteristics. Thus, it will be appreciated that

WO 02/14864

PCT/US01/25351

binding SFMs include those SFMs with X groups that are inert or have a binding specificity different from their final desired specificity at the time that they form a SAM, but the binding specificity of which is capable of being altered at some point during the process of making the array of which the SLM forms a part. Likewise, inert SFMs include those SFMs having X groups which bind biomolecules, but are rendered inert at some point during the process of making the array of which the SLM forms a part. Thus, "inert" and "binding" refer to the binding capacity of a SFM after the completion of the production or manufacture of the array of which it forms a part.

[85.] In a preferred embodiment, alkanethiol SFMs having a hydrocarbon chain of between 2 and 40 hydrocarbons are used. For SFMs ending in an X group that binds biomolecules, the hydrocarbon chain preferably has 8 to 30 carbon atoms, more preferably has 14 to 18 carbon atoms, and most preferably has 16 carbon atoms. Surfaces which do not bind biomolecules can be formed, for example, using SFMs having three or six ethylene glycol (EG) groups between the hydrocarbon chain and the X group and having a hydroxy (-OH) group or a methyl (-CH₃) group as the X group. SFMs which do not bind biomolecules preferably have a hydrocarbon chain of between 3 to 30 carbon atoms, more preferably between 10 to 14 carbon atoms, and most preferably have a hydrocarbon chain of 11 carbon atoms.

[86.] In some embodiments, an area composed entirely of binding SFMs will result in the binding of a single biomolecule at more than one site on the biomolecule (i.e., non-specific binding), which often results in denaturation and alteration or destruction of a biomolecule's activities or characteristics. Hence, in a

WO 02/14864

PCT/US01/25351

preferred embodiment, a monolayer of biomolecules is immobilized on the surface, and those biomolecules are bound by only one location on the biomolecule, i.e., non-specific binding is avoided.

[87.] This objective may be accomplished via the use of both SFMs having X groups which bind to biomolecules ("binding SFMs") and SFMs with X groups that do not bind biomolecules ("inert SFMs") to create a binding island or area comprising binding SFMs that are in close proximity to inert SFMs; this arrangement allows a biomolecule to bind specifically to a binding SFM while preventing non-specific binding of other portions of the biomolecule to other SFMs. Space between binding SFMs may be provided by interspersing binding and inert SFMs. Such interspersing of binding and inert SFMs may be accomplished, e.g., by MCP using a mixture of both binding and inert SFMs as the "ink" to be used in printing the island pattern on the surface. However, the ratio of binding to inert SFMs is important. If the ratio is too high, then the amount of non-specific binding may be too great for detection of the events of interest, depending also on the assay and detection system. If the ratio is too low, then the number of biomolecules bound may be too low for detection of the events of interest, depending also on the assay and detection system. A suitable ratio may be selected for a given assay and detection system using empirical methods. For example, binding islands of varying ratios of binding to inert SFMs, surrounded by areas of inert SAM, may be formed on a surface; biomolecules may be bound to the islands; the surface may be exposed to a solution of biomolecules that bind to or otherwise modify the immobilized biomolecules; the degree

WO 02/14864

PCT/US01/25351

of non-specific binding to each island may be measured; and whether the modification is detectable may be determined for each island. Typically, the ratio of binding to inert SFMs may be between approximately 0.1% and approximately 10-20%. In certain embodiments, a ratio of approximately 1-2% may produce very low (substantially no) non specific binding and detectable amounts of modification.

[88.] The optimum ratio of binding to inert SFMs may be determined experimentally using the guidance provided herein. Specifically, islands with varying known ratios of SFMs are printed, and biomolecules are allowed to bind. Techniques such as surface plasmon resonance can then be used to analyze the islands. When an island having a complete monolayer of biomolecules and without non-specific binding of biomolecules is located, then it is known that the ratio used to produce the ink for that island is an optimum ratio of binding to inert SFMs. It will be appreciated that the optimum ratio will vary from biomolecule to biomolecule and will also vary with the types of SFMs used. It will also be appreciated that, in certain applications, a layer of biomolecules that is, for example, more sparse than a complete monolayer may be desired. In these cases, the above-described method may still be used to determine the ratio of binding to inert SFMs that is optimal for creating the desired conditions.

[89.] Islands or areas comprising both binding and inert SFMs and forming an area to which biomolecules bind may be referred to herein as a "binding island" or "binding area."

WO 02/14864

PCT/US01/25351

[90.] Biomolecules may be immobilized on SFM X groups using several different systems. As one example, EDS-NHS may be used to create a covalent bond between a biomolecule and a SFM. As another example, SFMs may be produced which end in amine groups, which are coupled to biotin, which is in turn coupled to streptavidin. Biotinylated biomolecules will then bind strongly to the streptavidin on the SFMs. The use of different binding systems facilitates the immobilization of different biomolecules on specific and discreet areas of the surface.

[91.] One or more different biomolecules may be immobilized on a single surface. In certain embodiments, many different biomolecules, e.g., 1000's, are immobilized. In other embodiments, fewer different biomolecules, e.g., 50 or fewer, are immobilized.

[92.] The biomolecules immobilized on a surface, also referred to as "immobilized biomolecules," to form an array may be any biomolecule sought to be studied. As non-limiting examples, immobilized biomolecules may comprise carbohydrates, nucleic acids, proteins, polypeptides, and lipids. Likewise, the biomolecules to which the immobilized biomolecules are exposed may comprise any biomolecule sought to be studied. These biomolecules, also referred to herein as "biomolecules in solution," may comprise, as non-limiting examples, carbohydrates, nucleic acids, lipids, and/or proteins.

[93.] In a particularly preferred embodiment, a SAM comprising a pattern of binding islands is created, wherein the islands comprise an optimum ratio of binding to inert SFMs and the regions between the binding islands

WO 02/14864

PCT/US01/25351

comprise inert SFMs, such that biomolecules do not bind to the regions between the binding islands.

[94.] In certain embodiments, a single type of biomolecule in solution is exposed to immobilized biomolecules. In other embodiments, the solution to which immobilized biomolecules are exposed comprises more than one type of biomolecule. In certain embodiments the solution to which immobilized biomolecules are exposed comprises biomolecules of more than one class. Biomolecules useful in embodiments of the present invention include both biomolecules whose identity is known and also include both biomolecules whose identity is unknown. Biomolecules useful in embodiments of the present invention include both biomolecules whose function or activity is known and those biomolecules whose function or activity is unknown. Biomolecules whose function or activity is unknown may be referred to herein as "uncharacterized."

[95.] Drugs, toxins, and other biomolecules in solution may be a single known biomolecule or a mixture of known biomolecules, i.e. the composition of the solution may be predetermined. Similarly, the activities or characteristics of the biomolecules may be known, or the biomolecules may be uncharacterized. In other embodiments, the composition of the solution may be uncharacterized or unknown, i.e., the biomolecules in solution may be of unknown identity or have unknown activities or functions. In still other embodiments, the composition of the solution to be exposed to immobilized biomolecules may be partially characterized or partially known, e.g., some biomolecules in the solution may be identified and/or characterized, and others may be

WO 02/14864

PCT/US01/25351

unidentified and/or uncharacterized. Non-limiting examples of embodiments in which some or all of the biomolecules in a solution may be unidentified and/or uncharacterized include embodiments in which the solution is or is derived from a cell lysate and embodiments in which the solution is or is derived from a library, such as a protein library.

[96.] Similarly to the biomolecules in solution, immobilized biomolecules may comprise both identified and unidentified biomolecules and both characterized and uncharacterized biomolecules. In many embodiments, biomolecules which are both known and characterized are immobilized on a surface to form arrays according to the present invention.

[97.] In certain embodiments, immobilized biomolecules are chosen which are known to modify or bind to a particular second biomolecule of interest. In such embodiments, immobilized biomolecules can be used to screen for the presence of other biomolecules in solutions, such as cell culture supernatants, cell lysates, physiological fluids, and protein libraries.

[98.] In certain embodiments, immobilized biomolecules and biomolecules in solution are selected because the effect of one or more biomolecules in solution on one or more biomolecules immobilized on the surface is sought to be determined. Likewise, biomolecules may be selected to determine the effects of one or more biomolecules immobilized on the surface on one or more biomolecules in solution. Further, the biomolecules may be selected because the interactions between the biomolecules is sought to be elucidated. Such effects and

WO 02/14864

PCT/US01/25351

interactions include, but are not limited to, binding of a biomolecule to another biomolecule and activation of, inhibition of, and modification of a biomolecule by another biomolecule. Modifications include, but are not limited to, phosphorylation, dephosphorylation, methylation, acetylation, lipidation, farnesylation, glycosylation, prenylation, ubiquitination, hydroxylation, dehydroxylation, carboxylation, decarboxylation, nitrosylation, oxidation, reduction, hydrogenation, and dehydrogenation. Other non-limiting examples of modifications include allosteric transitions, hydrolysis, glycolysis, proteolysis, and metabolic and catabolic alterations. These and other modifications to biomolecules may be investigated using embodiments of the present invention.

[99.] Immobilized biomolecules may be derived from any source of interest. In certain embodiments, biomolecules to be immobilized are or are derived from a supernatant of a cell culture. The cells in culture may be derived from any source of interest. In certain other embodiments, biomolecules to be immobilized are or are derived from a cell lysate. The cell lysate may be derived from any source of interest. Non-limiting examples of such sources include cells in culture, immortalized cell lines, and cells, tissues, or organs taken directly from a living or dead organism. In other embodiments, biomolecules to be immobilized are or are derived from a fluid or fluids taken from a living or dead organism. Non-limiting examples of such fluids include blood, tears, saliva, gastrointestinal fluid, amniotic fluid, bone marrow, plasma, lymph, extracellular fluids, sap, cerebrospinal fluid, and urine. Such fluids may be

WO 02/14864

PCT/US01/25351

referred to herein as "physiological fluids." In yet other embodiments, biomolecules to be immobilized are or are derived from a target protein library or other library. In certain embodiments, biomolecules to be immobilized comprise drugs or drug candidates. Samples comprising biomolecules other than biomolecules of interest may be fractionated, thereby reducing or eliminating biomolecules not of interest, before being applied to binding islands of the present invention. However, in certain embodiments of the present invention, such fractionation is unnecessary because the binding islands exhibit binding specificity.

[100.] In certain embodiments, these biomolecules are proteins. One or more types of proteins may be immobilized on a surface. In certain embodiments, the proteins are immobilized using methods and materials that minimize the denaturing of the proteins, that minimize alterations in the activity of the proteins, or that minimize interactions between the protein and the surface on which they are immobilized. In certain embodiments, these biomolecules are proteins involved in pathways that are important in signal transduction.

[101.] Surfaces bearing immobilized biomolecules are exposed to solutions comprising molecules which react with, modify, or are modified by the immobilized biomolecules. Such solutions may be referred to herein as "solutions of interest." In certain embodiments, one or more specific molecules of interest is suspended in a solution. In certain embodiments, the solution is or is derived from a supernatant of a cell culture. The cells in culture may be derived from any source of interest. In certain other embodiments, the solution is or is derived

WO 02/14864

PCT/US01/25351

from a cell lysate. The cell lysate may be derived from any source of interest. Non-limiting examples of such sources include cells in culture, immortalized cell lines, and cells, tissues, or organs taken directly from a living or dead organism. In other embodiments, the solution is or is derived from a fluid or fluids taken from a living or dead organism. Non-limiting examples of such fluids include blood, tears, saliva, gastrointestinal fluids, amniotic fluid, plasma, bone marrow, lymph, extracellular fluids, cerebro-spinal fluid, and urine. Such fluids may be referred to herein as "physiological fluids." In yet other embodiments, the solution comprises or is derived from a target library or other library. In certain embodiments, the solution to which arrays according to the present invention are exposed include drugs or drug candidates. Samples comprising biomolecules other than biomolecules of interest may be fractionated, thereby reducing or eliminating biomolecules not of interest, before being applied to binding islands of the present invention. However, in certain embodiments of the present invention, such fractionation is unnecessary because the binding islands exhibit binding specificity.

[102.] As used herein, the term "solution" includes any media in which molecules are not bound to a substrate that is fixed in position in relation to biomolecules immobilized on surfaces according to the present invention.

[103.] Proteins, drugs, toxins, other biomolecules, cell lines, cells, physiological fluids, and libraries which may be studied using arrays according to the present invention may be derived from sources that include, but are not limited to animals, plants, algae,

WO 02/14864

PCT/US01/25351

fungi, bacteria, viruses, protazoa, and any other life form of interest. Arrays according to the present invention are also useful for studying proteins and other biomolecules produced via chemical synthesis, enzymatic synthesis, recombinant nucleotide technology, and other *in vitro* methods. In embodiments in which the solution is or is derived from a fluid, culture supernatant, library, or cell lysate, the solution may be an entire library or unaltered cell lysate, culture supernatant, or fluid; or the library, lysate, supernatant, or fluid may be subjected to other methods of separation, fractionation, or characterization, to produce a solution to which an array will be exposed.

[104.] In certain embodiments, cells are treated with drugs or drug candidates of interest, then the cells are lysed and arrays according to the present invention are exposed to the cell lysate. In other embodiments, cells are cultured in miniaturized microfluidic systems that are integrated with arrays according to the present invention. Products released by and/or lysates of cells so cultured may then be analyzed on arrays integrated with the cell culturing system itself. Cells may be cultured, lysed, and exposed to arrays without needing to relocate the cells.

[105.] In certain embodiments, array systems of the present invention are used to study pathways, such as signal transduction pathways, feedback control systems, and intercellular signaling pathways. Non-limiting examples of pathways which may be studied using arrays according to the present invention are described herein. Because many types of biomolecules may be immobilized on a single array and exposed to a solution containing other

WO 02/14864

PCT/US01/25351

biomolecules, complex interactions between biomolecules may be studied by detecting changes, or lack thereof, to intermediary or end-point biomolecules. For example, one particular biomolecule (A) in solution may be activated or inactivated by another biomolecule (B) which is immobilized or in solution. In one example, it is known that proteins A, B, and C comprise part of a pathway. Specifically, it is known that active A activates B and that active C activates A. In an exemplary array according to the present invention, inactive A and inactive B are immobilized (and therefore cannot react with one another), and are exposed to a solution containing active A, active C, and a potential inhibitor of the pathway. If immobilized A is activated by C in solution, it can be deduced that no inhibitor of C is present in the solution. If immobilized B is activated by A in solution, it can be deduced that the solution contains no inhibitor of A. Conversely, if immobilized A is not activated, it can be deduced that the solution contains an inhibitor of C. If immobilized B is not activated, then the solution contains an inhibitor of A. By analyzing the pattern of activation, or lack thereof, it can be determined where in the pathway the potential inhibitor act, if it in fact is an inhibitor of the examined portion of the pathway. The ability to immobilize multiple biomolecules on a single array also facilitates the monitoring of multiple pathways at one time.

[106.] In embodiments wherein array systems of the present invention are used to study pathways, one or more biomolecules known or thought to compose part of that pathway are immobilized in an array. In this way, the interactions of a solution of interest with each of the

WO 02/14864

PCT/US01/25351

immobilized biomolecules may be investigated simultaneously. In certain of these embodiments, a spatial arrangement, or array, of biomolecules of a particular pathway is repeated more than time on a surface. Preferably, the each individual array is separated from the others by a physical barrier. The interactions of more than one solution of interest with the immobilized biomolecules can then be investigated simultaneously.

[107.] In certain embodiments, array systems of the present invention are used to study particular classes of biomolecules. Non-limiting examples of classes of biomolecules which may be studied using arrays according to the present invention are described herein. The class of biomolecules to be studied may be defined as broadly or narrowly as desired for each particular embodiment. As a non-limiting example, many types of kinases may be immobilized as a single array. Because many types of biomolecules may be immobilized on a single array and exposed to a solution containing other biomolecules, the interactions between biomolecules in a particular solution of interest and many types of immobilized biomolecules may be investigated simultaneously.

[108.] In embodiments wherein array systems of the present invention are used to study classes of biomolecules, one or more types of biomolecules known or thought to belong to the defined class are plated as a single array. In this way, the interactions of a solution of interest with each of the immobilized biomolecules may be investigated simultaneously. In certain of these embodiments, a spatial arrangement, or array, of biomolecules of a particular pathway is repeated more than

WO 02/14864

PCT/US01/25351

time on a surface. Preferably, the each individual array is separated from the others by a physical barrier. The interactions of more than one solution of interest with the immobilized biomolecules can then be investigated simultaneously.

[109.] As a non-limiting example, arrays comprising members of a class of biomolecules may be used to investigate the specificity of a drug candidate. For example, if a biomolecule is known to affect a target kinase, and therefore be a good drug candidate, it will be desirable to know whether and how the drug candidate affects other kinases. Identification of drugs that are very specific for their intended targets are useful because the side effects associated with their administration are commonly greatly reduced compared to the side effects associated with less specific drugs.

[110.] In certain embodiments wherein the biomolecules of interest are proteins, the array of immobilized biomolecules is exposed to solutions containing enzymes specific to these proteins and potential activators or potential inhibitors of those enzymes. Post-translational modifications of the immobilized substrates by the enzymes in solution are detected by antibodies that are specific to those modifications. By monitoring the turnover of the immobilized proteins, activities of the enzymes in the sample can be determined. These arrays have the advantage that they can detect the presence of enzymes that are present at low concentrations (because the enzymes are catalytic and hence give amplified signals).

WO 02/14864

PCT/US01/25351

[111.] By patterning just two biomolecules on an array, twice as much biochemical information can be gained from one experiment; for example, the specificity and efficacy of an inhibitor can be determined in a single experiment rather than a set of experiments. This concept can easily be extended to larger numbers of substrates, e.g., several of the MAPK family such as ERK1 to ERK7, p38, and p57 MAPKs could be patterned on one array. Many signal transduction pathways are interconnected and the array system of the present invention will allow researchers to probe these interconnections in one experiment. These more complex arrays will allow the screening of inhibitors against large numbers of pathways, which will greatly speed up screening: screening against hundreds or thousands of targets on one array means that only one experiment is done rather than hundreds or thousands.

[112.] Modifications or binding of biomolecules in solution or immobilized on an array may be detected using detection techniques known in the art. Examples of such techniques include immunological techniques such as competitive binding assays and sandwich assays; fluorescence detection using instruments such as confocal scanners, confocal microscopes, or CCD-based systems and techniques such as fluorescence, fluorescence polarization (FP), fluorescence resonant energy transfer (FRET), total internal reflection fluorescence (TIRF), fluorescence correlation spectroscopy (FCS); colorimetric/spectrometric techniques; surface plasmon resonance, by which changes in mass of materials adsorbed at surfaces may be measured; techniques using radioisotopes, including conventional radioisotope binding and scintillation proximity assays

WO 02/14864

PCT/US01/25351

(SPA); mass spectroscopy, such as MALDI and MALDI-TOF; ellipsometry, which is an optical method of measuring thickness of protein films; quartz crystal microbalance (QCM), a very sensitive method for measuring mass of materials adsorbing to surfaces; scanning probe microscopies, such as AFM and SEM; and techniques such as electrochemical, impedance, acoustic, microwave, and IR/Raman detection. See, e.g., Mere L, et al., "Miniaturized FRET assays and microfluidics: key components for ultra-high-throughput screening," *Drug Discov Today* 4(8):363-369 (1999), and references cited therein; Lakowicz JR, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd Edition, Plenum Press (1999).

[113.] For example, in certain embodiments, antibodies reactive with a biomolecule having a specific modification, but not reactive with non-modified biomolecules or biomolecules having other modifications, are used to detect that specific modification. Binding to one or more antibodies may be assayed. In embodiments in which binding to more than one antibody is assessed in a single assay, different antibodies may be differentially labeled. Labeling of antibodies is well-known in the art. As non-limiting examples, antibodies may be radiolabeled or labeled with fluorescent tags. In other embodiments, mass spectrometry is used to differentiate between modified and non-modified biomolecules.

[114.] The ability to confine multiple copies of a single or multiple predetermined types of biomolecules to specific islands provided by the present invention creates many utilities and advantages. For example, more than one immobilized biomolecule may be used in a single assay, without the possibility of interaction between the

WO 02/14864

PCT/US01/25351

immobilized biomolecule. As another example, in embodiments wherein the biomolecules changes in which are to be detected are immobilized biomolecules, the ability to know precisely where a given specific biomolecule is located on an array facilitates detection of those changes. For example, the ability to know precisely where a given specific biomolecule is located on an array allows for one detection system to be used to detect more than one effect. For example, there are a considerable, but limited, number of fluorescent dyes available which may be conjugated to antibodies for detection of different biomolecules and for differentiation between them. Thus, only a limited number of antibodies can be used for a singular assay while retaining the ability to distinguish which antibodies have bound to their targets. The array systems of the present invention spatially confine types of immobilized biomolecules. Therefore, a given fluorescent dye can be used to label more than one antibody because antibodies with different specificities labeled with the same dye may be distinguished from one another based on their position in the array. Likewise, when techniques that detect mass changes are employed, knowledge of (1) the placement of each of one or more particular type of biomolecule and (2) which of one or more solutions of interest was exposed to a given type of biomolecule at a given location on an array allows the investigator to attribute a detected change in mass to a particular type of biomolecule exposed to a particular solution of interest.

[115.] Arrays comprising binding islands or areas may be included in kits, and such kits comprise another embodiment of the present invention. Such kits may also

WO 02/14864

PCT/US01/25351

include, as non-limiting examples, reagents useful for preparing biomolecules for immobilization onto binding islands or areas of an array according to the present invention, reagents useful for detecting modifications to immobilized biomolecules, and reagents useful for detecting binding of biomolecules from solutions of interest to immobilized biomolecules.

[116.] Likewise, arrays comprising immobilized biomolecules may be included in kits, and such kits comprise yet another embodiment of the present invention. Such kits may also include, as non-limiting examples, reagents useful for detecting modifications to immobilized biomolecules or for detecting binding of biomolecules from solutions of interest to immobilized biomolecules.

[117.] Laboratory instruments and other equipment useful in the practice of the present invention may also be included in kits according to the present invention.

[118.] Methods and arrays of the present invention facilitate the simultaneous study of many different molecular interactions. Such simultaneous study confers many advantages, such as, but not limited to, high throughput, ease of automation, and greater comparability between samples due to simultaneous processing. As an example, using methods of the present invention, it is possible to immobilize a different type of biomolecule on each of 500 binding islands in a given well of a 96 well plate (or in an area the size of such a well on a substrate) and to predetermine the location of each type of biomolecule in the array of 500 islands. If desired, this procedure can be repeated for each of the 96 wells in a 96 well plate (or for each of 96 areas the size and

WO 02/14864

PCT/US01/25351

spatial orientation of such wells on a substrate), thereby producing 96 duplicate arrays of 500 different types of biomolecule each in a predetermined spatial orientation. In such an embodiment, 500 different types of biomolecule may simultaneously be exposed to 96 different treatments by placing one of 96 different solutions of biomolecules into each of the 96 wells (or onto each of 96 areas the size and spatial orientation of such wells on a substrate).

[119.] Techniques such as MCP or arrayers may be used to create a pattern of binding SAMs on a surface. Techniques such as washing, dripping, spraying, dipping, or MCP may be used to surround binding islands with non-binding areas. In one embodiment, all of the islands of binding SAM comprise the same SFM, i.e., each of the binding islands may be capable of binding to the same type or class of biomolecules. Such an embodiment may be useful, for example, where an arrayer will be used to transfer specific biomolecules to each binding island; here, each binding island may bind any or all of the biomolecules transferred, but mixing of the biomolecules will be prevented because separation is maintained first by the arrayer, then because each type of biomolecule is bound to a predetermined binding island. In another embodiment, different binding islands may comprise SFMs that are specific for different types or classes of biomolecules. Such an embodiment may be especially useful when biomolecules are to be applied to an array of binding islands by washing or similar techniques, such as where the source of the biomolecules is a biological sample that has not previously been fractionated or differentiated. In other words, such embodiments find particular utility

WO 02/14864

PCT/US01/25351

in applications for which it is desired that arrays according to the present invention perform a separation function, as well as an immobilization and localization function (i.e., retaining biomolecules in a predetermined position).

[120.] It will be appreciated that, in certain embodiments, it may be desirable to produce arrays comprising more than one binding island binding or prepared to bind a single type of biomolecule. Likewise, it will be apparent that, in certain embodiments, it may be desirable to produce islands bound to or capable of binding more than one type of biomolecule.

[121.] In these embodiments, as well as in certain other embodiments of the present invention, a large number of biomolecules (approximately 500) can be simultaneously exposed to 96 different solutions comprising different environmental conditions and mixtures of other biomolecules. The effects of each of the 96 solutions on each of the 500 biomolecules may be evaluated using techniques described herein. The production of arrays, exposure of arrays to solutions of interest, and the measurement or observation of effects of solutions and immobilized biomolecules on one another are all processes which are amenable to high throughput and automation.

[122.] The array systems of the present invention have applications in drug discovery, including primary and secondary screening and target validation. The ability to monitor several protein-protein interactions on one array means that a drug candidate can be screened against several potential targets in a signal transduction pathway. Drug-drug interactions, and their effects on

WO 02/14864

PCT/US01/25351

cells, biological pathways, and biomolecules may also be investigated using methods and arrays according to the present invention. Counter assays, of the type needed in drug discovery to check the specificity of a hit from a primary screen, can also be included on arrays according to the present invention. The multiplexed nature of arrays according to the present invention would, therefore, reduce the screening time during drug discovery and speed the development of therapeutics. A array based on kinases for screening inhibitors has use in diagnostics in cancer and other diseases, for example, and also in agricultural biotechnology (AgBio). Arrays according to the present invention are also useful in diagnostics.

[123.] Arrays according to the present invention also find great use in the life science research market as a tool for studying biological pathways. Non-limiting examples of pathways which may be investigated using methods and arrays according to the present invention include growth/ proliferation/ differentiation/ oncogenic pathways, such as src pathways, integrin scaffold/FAK activated pathways, and Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) cascades. Examples of MAPK cascades include Ras/Raf/MEK/ERK, PKC/Raf/MEK/ERK, G-Protein Coupled Receptors Signaling to MAPK, p38 MAPK, and SAPK/JNK pathways. Other non-limiting examples of pathways which may be investigated using methods and arrays according to the present invention include apoptotic pathways, such as the caspase signaling pathway and p53 pathways; anti-apoptotic pathways, such as PI3K/Akt/BAD pathways and Bcl-2 pathways; translational control pathways, such as pathways regulating eIF-2, eIF-4, and p70 S6 kinase; Wnt signaling pathways; and PKC pathways. Further non-

WO 02/14864

PCT/US01/25351

limiting examples of pathways which may be investigated using methods and arrays according to the present invention include phospholipid (diacylglycerol/IP3) and Ca²⁺ regulated signaling pathways, such as PKC activated MAPK, PKC activation of transcription factor NF- κ B, and Ca²⁺/calmodulin activated systems such as CaM kinase II family pathways; cAMP mediated pathways, e.g., regulation of glycogen metabolism by PKA, PKA/CREB; and cGMP mediated pathways. Still other non-limiting examples of pathways which may be investigated using methods and arrays according to the present invention include cell cycle/checkpoint control pathways, such as Cyclin Dependent Kinase (CDK) pathways, G1/S Checkpoint pathways (such as CDK4/6-cyclin D, CDK2-cyclin E and Rb), and G2/M DNA Damage Checkpoint pathways (such as cdc2-cyclin B kinase); death receptor signaling pathways, such as Fas/TNFR activated Caspase pathways; pathways associated with mitochondrial control of apoptosis; cytokine activated pathways; pathways associated with chemotaxis; growth factor activated pathways; and ion channel, G-protein coupled receptors, and receptor tyrosine kinases (RTK) activated pathways. Stress activated pathways, such as p38 MAPK pathways activated by environmental stresses and inflammatory cytokines; and SAPK/JNK signaling cascades activated by environmental stresses, inflammatory cytokines, growth factors, and GPCR agonists, including those activated by Rho family (Rac, Rho, Cdc42) and activation of factors such as c-jun, ATF2, and p53, may also be investigated using methods and arrays according to the present invention. Yet other non-limiting examples of pathways which may be investigated using methods and arrays according to the present invention include Jak/STAT signaling pathways, such as IL-6 receptor family pathways;

WO 02/14864

PCT/US01/25351

IL-2 receptor pathways; TGF- β superfamily signaling pathways; cytoskeleton pathways, such as Rho sub family (Rho, Rac, cdc42) regulation of actin reorganization; coagulation pathways; respiratory pathways; synthetic pathways, such as protein synthesis, carbohydrate synthesis, fat synthesis, lipid synthesis, and steroid synthesis pathways; metabolic pathways, such as glucose synthesis pathways, glycogen production pathways, and insulin-dependent pathways; catabolic pathways; pathways associated with electron transport; pathways associated with the complement cascade; immune response pathways, including inflammation pathways; allergy triggering pathways; development pathways; and cell differentiation pathways.

[124.] Non-limiting examples of types of biomolecules which may be investigated using methods and arrays according to the present invention include proteins, polypeptides, carbohydrates, lipids, polynucleotides, small molecules, and steroids, and modified forms or derivatives thereof. Non-limiting examples of classes of proteins which may be investigated using methods and arrays according to the present invention include enzymes, such as kinases, phosphatases, flippases, esterases, oxidoreductases, transferases, hydrolases, lyases, isomerases, ligases, lipases, glycosyl transferases, glycosidases, synthases, hydrogenases, dehydrogenases, carboxylases, decarboxylases, proteases, glycosyl transferases, glycosidases, farnesyl transferases, isopeptidases, and enzymes that perform: methylation, demethylation, acetylation, deacetylation, lipidation, delipidation, prenylation, deprenylation, ubiquitination, deubiquitination, hydroxylation,

WO 02/14864

PCT/US01/25351

dehydroxylation, nitrosylation, denitrosylation, allosteric transitions, hydrolysis, glycolysis, electron transport, respiration, processing of xenobiotics, and metabolic and catabolic alterations; receptors, transcription factors, structural proteins, and derivatives thereof (such as, but not limited to, glycoproteins, glycolipids).

[125.] The array systems of the present invention can also be used to study other biological processes such as metabolism of xenobiotics. For example, an array composed of isozymes of cytochrome P450 can be used for *in vitro* ADME-tox studies and can thereby lead to a reduction in the number of compounds that enter expensive *in vivo* ADME-tox studies. Arrays according to the present invention can also be used in ADME absorption, distribution, metabolism, and excretion studies.

[126.] All publications, patents, and patent applications referenced herein are hereby incorporated by reference to the same extent as if each was individually so incorporated.

[127.] Having thus described the invention with reference to certain preferred embodiments, other embodiments will become apparent to one skilled in the art from consideration of the specification and examples. It is intended that the specification, including the examples, is considered exemplary only.

WO 02/14864

PCT/US01/25351

EXAMPLES**Example 1:**

[128.] An array of biotinylated-peptide tyrosine kinase substrate was immobilized on a surface that had been micro-contact printed with COOH-terminated thiol (in a background of EG3-terminated thiol) using EDC/NHS coupling, biotin-amine, and streptavidin. See, FIG. 4. A solution containing p60c-src (a member of the src family of kinases) and ATP was then placed on the array to enzymatically add a phosphate group to the tyrosine residue of the substrate. A primary antibody that specifically binds to tyrosine phosphate groups was then incubated on the array. A fluorescein-labeled secondary antibody that recognizes the primary antibody was then incubated on the array. The fluorescence from the bound secondary antibody was then detected using a fluorescence microscope with a fluorescein cube (excitation 480 nm; emission 530 nm).

[129.] The experiment and three control experiments (without enzyme; without substrate; with CH₃-terminated microcontact printed SAM) showed that the enzymatic addition of the phosphate group by the kinase could be monitored on the array. The results are shown in FIG. 5.

Example 2:

[130.] A number of peptides (ranging from 10 to 1000s) that are designed to be substrates for kinases are arrayed onto a surface having islands of binding SAM using a suitable robotic liquid delivery method. Several arrays of the set of peptides are created to yield an "array-of-

WO 02/14864

PCT/US01/25351

arrays". After immobilization of the peptides to the surfaces, the surface is washed. Solutions containing a kinase, or a lysate of a cell expressing a certain set of kinases, ATP, salts, and buffer are then placed in contact with the pre-formed peptide arrays. If multiple different solutions or lysates are tested, then each solution is delivered to individual arrays within the "array-of-arrays".

[131.] The phosphorylation of the immobilized peptides by the kinase(s) is allowed to proceed (typically at 37°C for 30 min). The substrate is then washed in a 8 mM solution of sodium dodecyl sulfate (SDS) and tris-buffered saline buffer containing 0.01% Tween-20 surfactant. The degree of phosphorylation of the peptides is then detected using anti-phospho specific antibodies and a secondary antibody that yields a colored or fluorescent product upon development.

[132.] A colorimetric or fluorescent scanner is then used to quantify the degree of phosphorylation within each element of the arrays. These data provide a phosphorylation "fingerprint" that can be deconvoluted to yield the activity of specific kinases within the test sample for which the arrayed peptides have known activity towards. This method therefore provides a way to determine the activity of kinases within individual pathways direct from the cell lysates. Inhibitors of kinases may also be studied. See. FIG. 6.

Example 3:

[133.] An array according to the present invention will be used to monitor the Raf/MEK/MAPK pathway. This

WO 02/14864

PCT/US01/25351

serine/threonine phosphorylation cascade activates MAP-kinase (MAPK) that initiates proliferation and differentiation. The pathway is schematically illustrated in FIG 3. Inhibitors of this pathway are being developed as anti-tumor and anti-inflammatory agents. In this array, two proteins involved in the pathway are immobilized on the surface: inactive MEK and inactive MAPK. The solution above the protein array contains the active Raf and MEK enzymes, as well as potential inhibitors of this pathway and ATP. The array is exposed to potential inhibitors of Raf and/ or MEK in solution. After incubation of the assay solution above the array, antibodies that are specific to phosphorylated residues of MEK and MAPK are incubated on the array. If the inhibitor prevents the phosphorylation of the immobilized enzymes by RAF or MEK then the antibody will not bind and, therefore, will not be detected after washing. Depending on the specificity and efficacy of the inhibitor, different fluorescent spots will light up.

[134.] In FIG. 3, four arrays comprising immobilized MEK and MAPK are each exposed to one of four solutions (A, B, C, and D) comprising different potential inhibitors of MEK and/ or Raf. Based on the phosphorylation pattern observed, it can be determined that solution A comprises active inhibitors of neither Raf nor MEK; solution B comprises an inhibitor of Raf, but no inhibitor of MEK; solution C comprises an inhibitor of MEK, but no inhibitor of Raf; and solution D comprises inhibitors of both Raf and MEK.

WO 02/14864

PCT/US01/25351

Example 4:

[135.] A number of antibodies (typically more than 100) that bind specifically to individual phosphorylated members of a signal transduction pathway are arrayed onto a surface using a suitable robotic liquid delivery method. For example, a set of antibodies including anti-phospho-MAPK, anti-phospho-MEK, and anti-phospho-MEKK, are arrayed onto a surface. A cell lysate, for which a signal transduction cascade had been activated or a certain gene knocked-out, is then exposed to the array of antibodies. After incubation, the degree of binding to the antibody array is then read out by a suitable detection method such as SPR or ELISA. The amount of binding of phosphoproteins to the corresponding antibodies indicates the degree of activity of individual members of a signal transduction cascade.

Example 5:

[136.] A reactive SAM is coated in a solution containing a peptide that is a substrate for a particular enzyme. After an incubation time during which the peptide is immobilized, the surface is washed. One or several cell lysates are then incubated with the surface with ATP, salts, and buffer. The degree of phosphorylation of the peptide is then monitored using a phospho-specific antibody and the activity of kinases in the cell lysate can therefore be quantified.

WO 02/14864

PCT/US01/25351

CLAIMS

We claim:

1. A method for analyzing biochemical pathways, comprising the steps of:
 - a) formation of an array of immobilized biomolecules;
 - b) exposing the array to biomolecules in solution; and
 - c) detecting modification of the immobilized biomolecules;wherein the immobilized biomolecules and/or the biomolecules in solution comprise at least two members of at least one biochemical pathway.
2. The method of claim 1, further wherein said array comprises at least two different types of immobilized biomolecules.
3. The method of claim 1, further wherein said biomolecules in solution comprise at least two different types of biomolecules.
4. The method of claim 1, comprising the additional step of detecting the presence of at least one biomolecule in solution based on said modification.
5. The method of claim 1, comprising the additional step of identifying the function of at least one biomolecule in solution based on said modification.

WO 02/14864

PCT/US01/25351

6. The method of claim 1, comprising the additional step of quantifying the amount present of at least one biomolecule in solution based on said modification.

7. The method of claim 1, comprising the additional step of qualitatively and/ or quantitatively determining the level of activity of at least one biomolecule in solution based on said modification.

8. The method of claim 1, comprising the additional step of qualitatively and/ or quantitatively determining the level of activity of at least one immobilized biomolecule based on said modification.

9. The method of claim 1, comprising the additional step of detecting the presence of at least one immobilized biomolecule based on said modification.

10. The method of claim 1, comprising the additional step of identifying the function of at least one immobilized biomolecule based on said modification.

11. The method of claim 1, comprising the additional step of quantifying the amount present of at least one immobilized biomolecule based on said modification.

12. A method for analyzing biochemical pathways, comprising the steps of:

a) formation of an array of immobilized biomolecules;

WO 02/14864

PCT/US01/25351

b) exposing the array to biomolecules in solution; and
c) detecting modification of the biomolecules in solution;
wherein the immobilized biomolecules and/or the
biomolecules in solution comprise at least two members of
at least one biochemical pathway.

13. The method of claim 12, further wherein said array
comprises at least two different types of immobilized
biomolecules.

14. The method of claim 12, further wherein said
biomolecules in solution comprise at least two different
types of biomolecules.

15. The method of claim 12, comprising the additional
step of detecting the presence of at least one biomolecule
in solution based on said modification.

16. The method of claim 12, comprising the additional
step of identifying the function of at least one
biomolecule in solution based on said modification.

17. The method of claim 12, comprising the additional
step of quantifying the amount present of at least one
biomolecule in solution based on said modification.

18. The method of claim 12, comprising the additional
step of qualitatively and/ or quantitatively determining

WO 02/14864

PCT/US01/25351

the level of activity of at least one biomolecule in solution based on said modification.

19. The method of claim 12, comprising the additional step of qualitatively and/ or quantitatively determining the level of activity of at least one immobilized biomolecule based on said modification.

20. The method of claim 12, comprising the additional step of detecting the presence of at least one immobilized biomolecule based on said modification.

21. The method of claim 12, comprising the additional step of identifying the function of at least one immobilized biomolecule based on said modification.

22. The method of claim 12, comprising the additional step of quantifying the amount present of at least one immobilized biomolecule based on said modification.

23. A method for analyzing biochemical pathways, comprising the steps of:

- a) formation of an array of immobilized biomolecules;
- b) exposing the array to biomolecules in solution; and
- c) detecting binding of the biomolecules in solution to the immobilized biomolecules;

wherein the immobilized biomolecules and/or the biomolecules in solution comprise at least two members of at least one biochemical pathway.

WO 02/14864

PCT/US01/25351

24. The method of claim 23, further wherein said array comprises at least two different types of immobilized biomolecules.

25. The method of claim 23, further wherein said biomolecules in solution comprise at least two different types of biomolecules.

26. The method of claim 23, comprising the additional step of detecting the presence of at least one biomolecule in solution based on said binding.

27. The method of claim 23, comprising the additional step of identifying the affinity and/ or avidity of at least one biomolecule in solution for at least one immobilized biomolecule based on said binding.

28. The method of claim 23, comprising the additional step of identifying the affinity and/ or avidity of at least one immobilized biomolecule for at least biomolecule in solution based on said binding.

29. The method of claim 23, comprising the additional step of quantifying the amount present of at least one biomolecule in solution based on said binding.

WO 02/14864

PCT/US01/25351

30. The method of claim 23, comprising the additional step of detecting the presence of at least one immobilized biomolecule based on said binding.

31. The method of claim 23, comprising the additional step of quantifying the amount present of at least one immobilized biomolecule based on said binding.

32. An array of immobilized biomolecules, wherein the immobilized biomolecules comprise at least two members of at least one biochemical pathway.

FIGURE 1

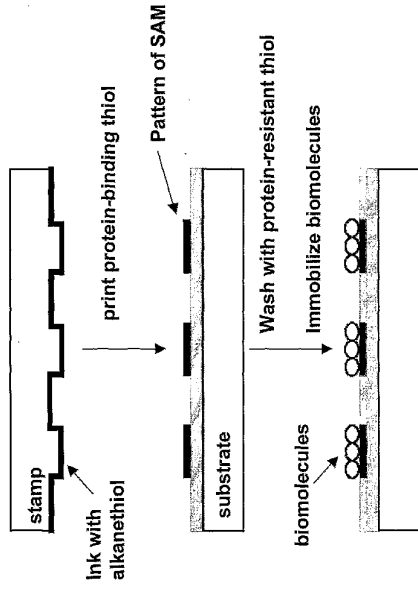
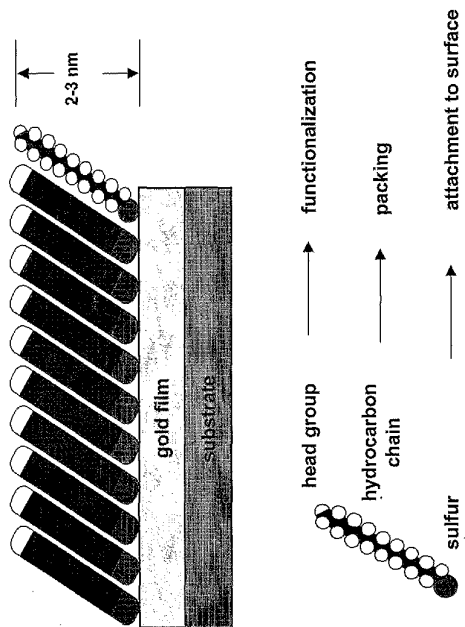


FIGURE 2. Self-Assembled Monolayers



WO 02/14864

PCT/US01/25351

FIGURE 3

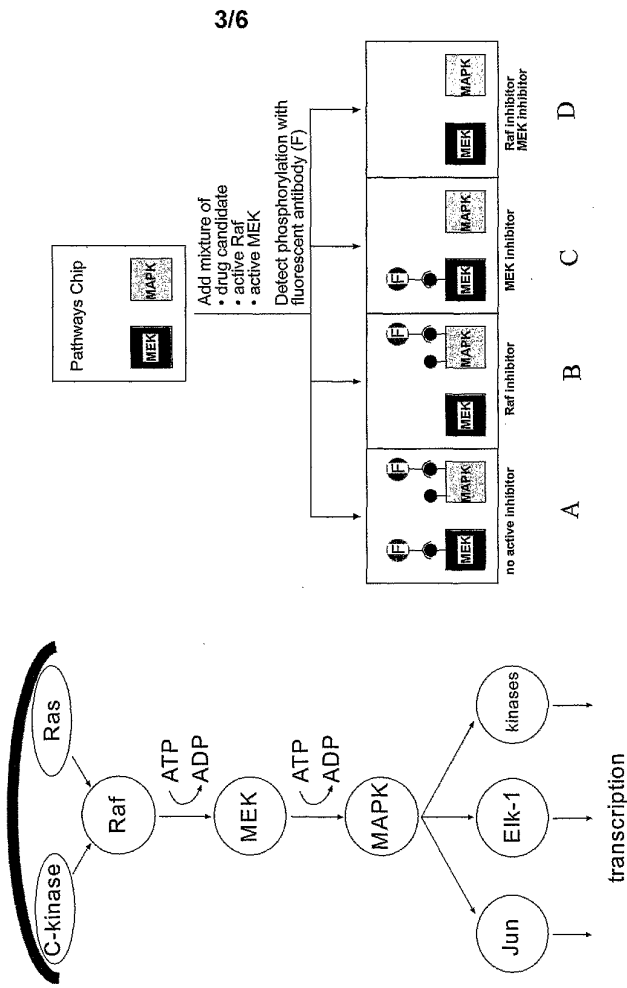
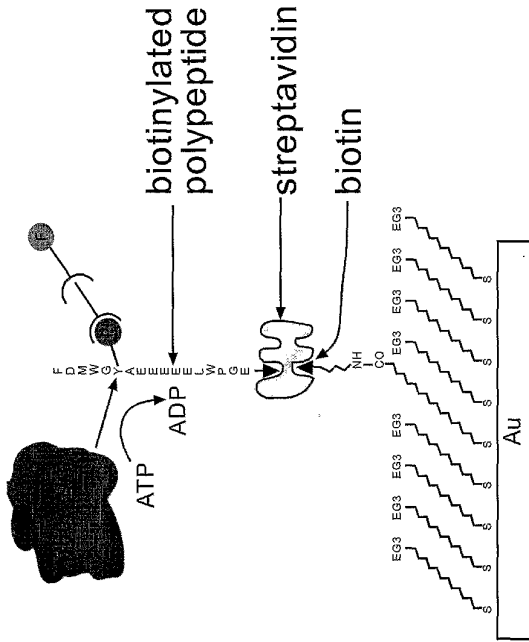


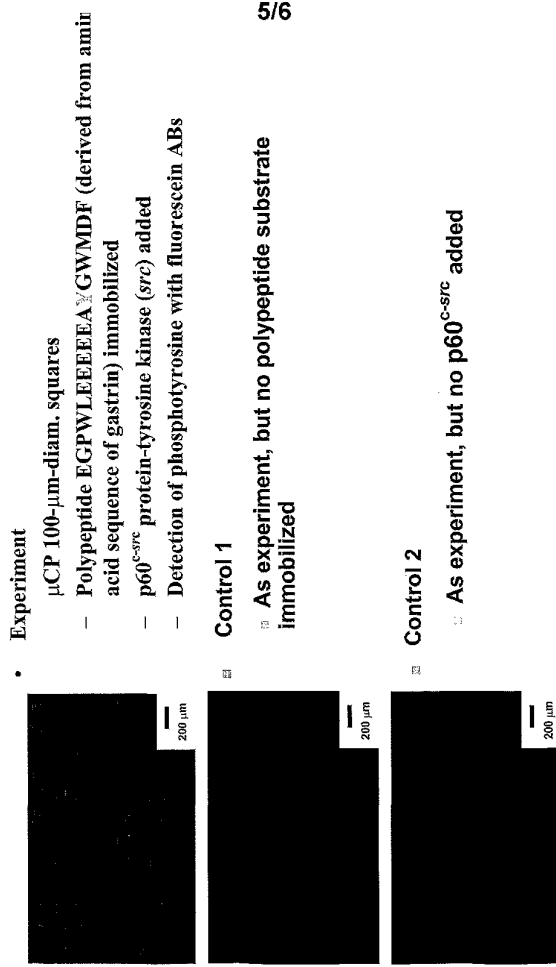
FIGURE 4



WO 02/14864

PCT/US01/25351

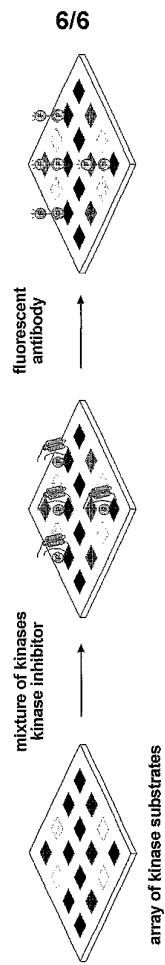
FIGURE 5



WO 02/14864

PCT/US01/25351

FIGURE 6



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/25351
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/53 G01N33/551 G01N33/543 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GE, HUI: "UPA, a universal protein array system for quantitative detection of protein-protein, protein-DNA, protein-RNA and protein-ligand interactions" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 28, no. 2, January 2000 (2000-01), pages E3-e3, XP002183744 the whole document	1-32
Y	---	1-32
X	WO 99 04896 A (RAPIGENE, INC) 4 February 1999 (1999-02-04)	32
A	page 10, line 4 -page 11, line 24; claims 1-29; example 15 --- -/--	1-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 November 2001		Date of mailing of the international search report 22/01/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5616 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 540-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moreno de Vega, C

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/25351

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 569 588 A (THE REAGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 29 October 1996 (1996-10-29) column 8, lines 15-60 column 1, line 66 -column 4, line 67; claim 1; examples 2,3	1-32
A	WO 97 43301 A (NOVARTIS AG) 20 November 1997 (1997-11-20) page 5 -page 11; claims 1,7,19-25	1-32
A	MERE, L. ET AL: "Miniaturized FRET assay and microfluidics: key components for ultra-high-throughput screening" DRUG DISCOV TODAY, vol. 4, no. 8, 1999, pages 363-369, XP001022898 the whole document	1-32
A	HAVLICEK, L. ET AL: "Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds" J. MED. CHEM., no. 40, 1997, pages 408-412, XP002079219 abstract	1-32

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members			International Application No. PCT/US 01/25351	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9904896	A	04-02-1999	AU 735546 B2	12-07-2001
			AU 8582598 A	16-02-1999
			CN 1265049 T	30-08-2000
			EP 0998347 A1	10-05-2000
			HU 0002488 A2	28-11-2000
			JP 2001510727 T	07-08-2001
			WO 9904896 A1	04-02-1999
			US 6150103 A	21-11-2000
US 5569588	A	29-10-1996	AU 724474 B2	21-09-2000
			AU 6720996 A	05-03-1997
			CA 2202154 A1	20-02-1997
			EP 0791078 A1	27-08-1997
			JP 10507647 T	28-07-1998
			WO 9706277 A1	20-02-1997
WO 9743301	A	20-11-1997	AU 2889097 A	05-12-1997
			WO 9743301 A2	20-11-1997

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

テフロン

(74)代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 ダフィー，デイビッド

アメリカ合衆国，マサチューセッツ 02140，ケンブリッジ，フォレスト ストリート 18
，#4

(72)発明者 キャンベル，スチュワート

アメリカ合衆国，マサチューセッツ 01701，フラミンガム，シェーハン サークル 4
Fターム(参考) 2G045 CB01 DA36 FB15

专利名称(译)	生物分子阵列		
公开(公告)号	JP2004522935A	公开(公告)日	2004-07-29
申请号	JP2002519942	申请日	2001-08-14
[标]申请(专利权)人(译)	瑟菲斯洛格斯公司		
申请(专利权)人(译)	表面逻辑, Incorporated的雷开球德		
[标]发明人	ダフィーデイビッド キャンベルスチュワート		
发明人	ダフィー,デイビッド キャンベル,スチュワート		
IPC分类号	G01N33/53 B01J19/00 C07B61/00 C40B30/04 C40B40/10 C40B60/14 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	C40B30/04 B01J19/0046 B01J2219/00382 B01J2219/00497 B01J2219/00527 B01J2219/00585 B01J2219/00596 B01J2219/00605 B01J2219/0061 B01J2219/00612 B01J2219/00621 B01J2219/ /00626 B01J2219/00637 B01J2219/00659 B01J2219/00677 B01J2219/00702 B01J2219/0072 B01J2219/00725 B82Y30/00 B82Y40/00 C07B2200/11 C40B40/10 C40B60/14 G01N33/54306 G01N33/ /6845		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/68 G01N37/00.102 G01N37/00.103		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB15		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
优先权	60/225363 2000-08-14 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

阵列系统, 有助于同时监测生物分子之间的许多相互作用和细胞蛋白质相互作用的分析与高通量。本发明提供了通过形成固定化生物分子阵列来分析生物化学途径的方法和阵列;将阵列暴露在溶液中的生物分子中;检测固定化生物分子的修饰, 溶液中生物分子的修饰, 和/或生物分子在溶液中与固定化生物分子的结合。

