

(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2004-518138

(P2004-518138A)

(43) 公表日 平成16年6月17日(2004.6.17)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D 4 B O 2 4
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A 4 B O 2 9
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/68	Z 4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68	GO 1 N 37/00	1 O 2
GO 1 N 37/00	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 78 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-559854 (P2002-559854)	(71) 出願人	501418993
(86) (22) 出願日	平成13年10月26日 (2001.10.26)		バイオセプト インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成14年6月26日 (2002.6.26)		アメリカ合衆国 92009 カリフォル
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/051265		ニア州 カールズバッド ラス パルマス
(87) 国際公開番号	W02002/059372		ドライブ 2151 スイート シー.
(87) 国際公開日	平成14年8月1日 (2002.8.1)	(74) 代理人	100077481
(31) 優先権主張番号	60/243, 699		弁理士 谷 義一
(32) 優先日	平成12年10月26日 (2000.10.26)	(74) 代理人	100088915
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 阿部 和夫
		(74) 代理人	100106998
			弁理士 橋本 傳一
		(72) 発明者	ロベルト ファグナニ
			アメリカ合衆国 92037 カリフォル
			ニア州 ラ ホーヤ カミニト フレスコ
			8971

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 3次元型バイオチップ

## (57) 【要約】

アレイの形態で固体基質の上面に付着した複数の光学的に透明なハイドロセルを備えたバイオチップを形成する。セルはそれぞれ、反応性イソシアネート基を有するポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはそれらのコポリマーのハイドロゲルで形成される。非ハイブリダイゼーション結合要素をこれらのセルに結合させ、前記要素は標的蛋白質またはその他の同等の生体分子を選択的に隔離するために有効である。異なる結合要素は、異なるセルに固定され、いくつかの標的蛋白質をアッセイするために使用できるバイオチップを作製する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

光学的に透明なハイドロゲルバイオチップであって、

a) 表面を有する固体基板、

b) 前記基板の前記表面に付着した少なくとも 1 個の光学的に透明なハイドロゲルセルであって、イソシアネート官能性ポリマーから形成されたハイドロゲルセル、および

c) 前記ハイドロゲルセル内部または上部に固定された非ハイブリダイゼーション結合要素であって、標的蛋白質またはその他の同等分子を選択的に隔離するために有効である結合要素

を含むことを特徴とするハイドロセルバイオチップ。

10

## 【請求項 2】

前記ハイドロゲルがウレタン結合を有するポリマーを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載のバイオチップ。

## 【請求項 3】

前記ハイドロゲルがポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはそれらのコポリマーを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載のバイオチップ。

## 【請求項 4】

前記ハイドロゲルセルの厚さが少なくとも 30  $\mu\text{m}$  であることを特徴とする、請求項 1 に記載のバイオチップ。

## 【請求項 5】

前記ハイドロゲルセルの厚さが約 30  $\mu\text{m}$  と約 100  $\mu\text{m}$  との間であることを特徴とする、請求項 4 に記載のバイオチップ。

20

## 【請求項 6】

前記結合要素が、イソシアネート基との反応によって前記ハイドロゲルセルに共有結合し、前記ハイドロゲル内部にあることを特徴とする、請求項 1 に記載のバイオチップ。

## 【請求項 7】

前記セルの前記ポリマー中の約 15% 以下の前記反応性イソシアネートが前記結合要素と反応したことを特徴とする、請求項 5 に記載のバイオチップ。

## 【請求項 8】

前記セルの前記ポリマー中の 10% 以下の前記反応性イソシアネートが前記結合要素と反応したことを特徴とする、請求項 6 に記載のバイオチップ。

30

## 【請求項 9】

前記結合要素がイムノグロブリン、酵素、受容体、酵素阻害剤、酵素基質、またはペプチドを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載のバイオチップ。

## 【請求項 10】

前記結合要素それぞれが媒介剤との相互作用によってハイドロゲル内に固定されていることを特徴とする、請求項 1 に記載のバイオチップ。

## 【請求項 11】

前記結合要素が、前記ハイドロゲル中に固定され、前記媒介剤を構成する金属キレートに結合する蛋白質であることを特徴とする、請求項 9 に記載のバイオチップ。

40

## 【請求項 12】

前記蛋白質がヒスチジン含有ポリペプチドを介して前記蛋白質の一方の末端で前記金属キレートと結合することを特徴とする、請求項 10 に記載のバイオチップ。

## 【請求項 13】

前記結合要素が前記ハイドロゲルに結合した第 1 媒介剤および前記第 1 媒介剤に結合した第 2 媒介剤を介して固定されていることを特徴とする、請求項 10 に記載のバイオチップ。

## 【請求項 14】

前記第 1 媒介剤が抗体であり、前記第 2 媒介剤が蛋白質であることを特徴とする、請求項 13 に記載のバイオチップ。

50

## 【請求項 15】

前記基板が該基板表面に付着した複数のハイドロゲルセルを有し、異なる結合要素が異なるハイドロゲルセルに固定されていることを特徴とする、請求項 1 から 14 のいずれかに一項に記載のバイオチップ。

## 【請求項 16】

前記基板が光学的に透明であることを特徴とする、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載のバイオチップ。

## 【請求項 17】

前記基板が、前記ハイドロゲルが共有結合している上面に反応性分子を有することを特徴とする、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載のバイオチップ。

10

## 【請求項 18】

前記ハイドロゲルセルが前記ポリマーのいくつかの前記イソシアネート基を介して前記基板に共有結合することを特徴とする、請求項 17 に記載のバイオチップ。

## 【請求項 19】

a) 上面を有する固体基板、  
b) 前記基板の前記上面に結合したポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはそれらのコポリマーを含む複数のハイドロゲルセル、  
c) 前記セルの前記ハイドロゲルの内部または上部に固定された媒介剤、および  
d) 少なくとも数個の前記ハイドロゲルセル内の前記媒介剤にそれらの相互作用によって結合した異なる蛋白質結合要素であって、前記蛋白質結合要素が天然の構造をとるような方法で結合した蛋白質結合要素を含むことを特徴とするハイドロゲルバイオチップ。

20

## 【請求項 20】

生化学的アッセイを実施するためにバイオチップを使用する方法であって、  
(a) 少なくとも 2 個のハイドロゲルセルが結合した表面を有する基板を備えた光学的に透明なハイドロゲルバイオチップを提供する工程であって、各セルが少なくとも約 30 μm の厚さであり、主にポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールまたはそれらのコポリマーを含み、前記ハイドロゲルセルそれぞれがその内部または上部に固定された種々の蛋白質結合要素を含む工程、  
(b) 前記ハイドロゲルバイオチップを結合条件下で標的生体分子を含む分析物溶液と接触させる工程、  
(c) 非選択的結合および未結合標的生体分子を除去する条件下で前記ハイドロゲルバイオチップを洗浄する工程、および  
(d) 前記セルの 1 個に結合した前記標的生体分子を検出する工程、  
を含むことを特徴とする方法。

30

## 【請求項 21】

標的生体分子の結合によって前記結合要素の構造変化が生じることを特徴とする、請求項 20 に記載の方法。

## 【請求項 22】

前記構造変化がリン酸化現象であることを特徴とする、請求項 21 に記載の方法。

## 【請求項 23】

前記構造変化が脱リン酸化現象であることを特徴とする、請求項 22 に記載の方法。

40

## 【請求項 24】

前記構造変化を受けた前記結合要素が 1 つまたは複数の媒介剤によってハイドロゲルに結合することを特徴とする、請求項 21 から 23 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 25】

内部または上部に固定された非ハイブリダイゼーション結合要素を有する光学的に透明なイソシアネート官能性ハイドロゲルバイオチップの調製方法であって、前記要素が標的蛋白質または標的生体分子の選択的隔離に有効であり、  
a) イソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーの有機溶媒溶液を提供する工程、  
b) 前記非ハイブリダイゼーション結合要素の溶液を提供する工程、

50

c) 前記要素を、前記反応性イソシアネートの15%以下との反応によって前記イソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーに共有結合させる工程、  
 d) 光学的に透明なハイドロゲルを生成する条件下で、前記イソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーの重合を開始する工程、および  
 e) 前記結合要素を含有する光学的に透明なハイドロゲルポリマーが前記基板に付着するように、前記重合イソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーを固体基板上に小滴形態で分散させる工程、  
 を含むことを特徴とする方法。

【請求項26】

前記要素の前記結合が重合と同時に進行することを特徴とする、請求項25に記載の方法 10

【請求項27】

二酸化炭素の発生を制御して、得られた前記ハイドロゲルの透明度を確実にするために、粘度およびpHを選択することを特徴とする、請求項25または26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

前記基板を処理して、前記重合ハイドロゲルを前記基板に共有結合する上面上に反応性部分を提供することを特徴とする、請求項25から27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項29】

捕捉剤として機能するために選択された、内部または上部に固定された蛋白質を有するイソシアネート官能性ハイドロゲルバイオチップの調製方法であって、 20

a) イソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーの有機溶媒溶液を提供する工程、  
 b) 所望の蛋白質捕捉剤の溶液を提供する工程、  
 c) 前記蛋白質の媒介結合剤を前記イソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーに共有結合させる工程、  
 d) 前記イソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーの重合を開始する工程、  
 e) 前記ポリマーが前記基板に付着するように、前記重合イソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーの小滴を固体基板上に分散させる工程、および  
 f) 個々のハイドロゲル小滴を所望の前記蛋白質溶液の1つに曝露し、前記蛋白質捕捉剤を前記結合剤への結合によってその内部または上部に固定する工程 30  
 を含み、それによって前記小滴が重合して異なる蛋白質捕捉剤を有する複数のセルを備えたバイオチップを作製することを特徴とする方法。

【請求項30】

前記結合剤への前記蛋白質の結合が重合と同時に進行することを特徴とする、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記結合剤への前記蛋白質の前記結合が重合後に行われることを特徴とする、請求項29に記載の方法。

【請求項32】

前記結合剤がキレート剤であることを特徴とする、請求項29から31のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項33】

前記蛋白質がそれぞれヒスチジン含有末端ペプチド配列を含むことを特徴とする、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

二酸化炭素の発生速度を遅くし、得られた前記ハイドロゲルの光学的透明度を確実にするために、前記重合中の反応条件が制御されることを特徴とする、請求項29から33のいずれか一項に記載の方法。

【請求項35】

前記基板を処理して、前記ハイドロゲルを前記基板に共有結合する上面上の反応性部分を 50

提供することを特徴とする、請求項 29 から 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

内部または上部に固定された蛋白質を有する複数のセルを備えたイソシアネート官能性ハイドロゲルバイオチップの調製方法であって、

- a) イソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーの有機溶媒溶液を提供する工程、
- b) 前記イソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーの重合を開始する工程、
- c) 前記小滴が前記基板に付着し、複数のセルを形成するように、前記重合イソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーの小滴を固体基板上に分散させる工程、および
- d) 少なくとも 2 個の前記セルそれぞれの内部または上部に異なる蛋白質を物理的に固定する工程であって、前記蛋白質が特定の生体分子を選択的に隔離する結合剤として機能するために選択されている工程を含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 37】

前記固定が、分子量約 100,000 以上を有する蛋白質を、前記セルに前記蛋白質を拡散させる電流の使用によって物理的に閉じ込めることを含むことを特徴とする、請求項 36 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

固定化した DNA などの核酸から成るマイクロアレイは、ハイスループット分析および生体試料の特徴付けにおいて非常に有用であることが示されている。核酸バイオチップ上で複数の生物学的プローブを組み合わせて使用してこのような試料を分析することによって、試料の核酸成分に関する情報が得られる。このようなバイオチップは、たとえばスライドガラスなどの平坦なプレートを使用して形成してもよいし、凹部またはウェルが形成されたプレートを使用して形成してもよい。一般に、種々の配列の核酸オリゴマー、DNA、すなわち、1本鎖DNA、RNAまたはPNAを試料の相補的な配列とハイブリダイズする形態で固定させる。米国特許第6242246号参照のこと。このようなハイブリダイゼーションの特異性および多数の核酸配列の組み合わせを迅速に確認できる能力ゆえに、得られたデータは遺伝子発現および試料中の配列特性の決定に有用である。このようなデータは、遺伝子ベースの疾患メカニズムの決定や診断および治療の標的となり得るものの同定において重要な要素となる。

20

30

【0002】

核酸マイクロアレイ法は、市販のDNA合成機、PCR法、および開発中の遺伝子標的情報を利用する。生物学的に関心のあるその他の結合要素(binding entities)、たとえば抗体またはその他の蛋白質を固定するためにこのようなマイクロアレイの使用を拡大することについて将来の関心があり、これを用いることで、核酸マイクロアレイを使用しても容易には推論できない新しい生物学的考察を潜在的に提供することができるハイブリダイゼーションに基づかない相互反応を用いたその他のハイスループット分析を可能とすることができるであろう。

【0003】

しかし、核酸バイオチップと比較して、いくつかの種々の結合要素、たとえば蛋白質およびペプチドを適切に固定できるバイオチップを製作するためには困難に直面することが予想される。蛋白質などの物質を固定するために通常使用される固定化化学は、固相支持体表面への付着または直接接触によってこれらの物質の変性を引き起こすことが多い。さらに、蛋白質などの多くの結合要素上に存在する多数の競合的に活性な部分の結果として、核酸では問題にはならない、付着化学の制限もあり得るし、蛋白質などの多くのその他の結合要素の構造がその生物学的活性を保存するために重要であって、分子上の多数の部分によって固定すると容易に破壊され得ることは周知である。

40

【0004】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)などのDNA増幅法が使用できないために標的蛋白質の検出が本来的に非常に困難であるといった場合、このような潜在的な活性損失はより重要

50

である。すなわち、多くの場合、組織試料から単離された蛋白質などの結合要素の使用量は非常に限られており、核酸では実行可能であるがこのような物質を容易かつ便利な方法で大量に再生することが不可能であることがこのような分析を妨げる。

**【0005】**

(発明の背景)

現在、蛋白質リガンド、蛋白質-蛋白質、蛋白質-DNAの相互作用を研究するために使用されている公知の方法がいくつかある。これらの方法はいずれも、操作が煩雑で、高価で、または大量の蛋白質を必要とし、蛋白質相互作用の迅速なハイスループット分析には適さないという点で、厳しい制限がある。

**【0006】**

蛋白質相互作用を研究するために当初行われた方法は、蛋白質親和性カラムである。この方法では、捕捉された蛋白質はアガロースビーズに共有結合で固定され、アフィニティークロマトグラフィを使用して多くの汚染された蛋白質を含む不均一な混合物から標的蛋白質をアフィニティ精製するために使用される。この方法では、アガロースビーズに適切に固定するために比較的大量の捕捉蛋白質が必要で、蛋白質相互作用の迅速なハイスループットスクリーニングには適していない。

10

**【0007】**

蛋白質相互作用を研究するために使用された他の方法は、酵母2-ハイブリッドシステムである。この方法では、標的蛋白質ライブラリが酵母で構築される。このシステムは、関心のあるこれらの蛋白質を発現し、それぞれが転写活性領域と結合するように考案されている。ベイト蛋白質(または他の相互作用蛋白質候補を確かめるための蛋白質)をコードするDNAをDNA結合ドメインと融合させ、さらに同ライブラリーにおいて発現させる。蛍光蛋白質または容易に検出可能な生物学的活性を有する蛋白質などの検出系をコードする対応DNA配列を有するレポーター遺伝子も含まれる。関心のある標的蛋白質をベイト蛋白質に結合することによって、この2種が結果的に相互作用し、レポーター遺伝子の活性化が達成し、シグナルの発生がもたらされる。この方法は比較的頻繁に使用することができるが、時間がかかり、取り扱いが煩雑で、分子生物学的専門知識を熟知していることが必要で、蛋白質-蛋白質相互作用の経済的かつ迅速なハイスループットスクリーニングには向いていない。

20

**【0008】**

当初から蛋白質相互作用の研究に通常使用されてきた他の方法は、捕捉蛋白質および標的蛋白質の双方を免疫沈殿し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を使用して、得られた複合体を分析する方法である。この方法では、捕捉蛋白質をまず不均一な蛋白質混合物とインキュベートし、標的との結合を起こさせる。次に、得られた複合体を、対の蛋白質の一方に対して作製した抗体を使用して免疫沈殿し、この複合体をゲル電気泳動によって分離して分析し、次に検出工程、たとえば色素による染色を行う。この方法は時間がかかり、煩雑で、生化学的専門知識を熟知していることが必要で、これも同様に蛋白質相互作用の迅速なハイスループット分析には向かない。

30

**【0009】**

蛋白質相互作用の研究に使用されるもう1つの方法は、ファージディスプレイである。この方法では、宿主細菌、たとえば*E. coli*の表面に表れるある種の繊維状ファージの鞭毛上に蛋白質ライブラリを発現させ、このように「ディスプレイ」された蛋白質のアフィニティ支持体を提供する。次に、このファージライブラリを多数の標的蛋白質候補に曝露する。ディスプレイされた蛋白質が標的蛋白質と結合することによって、標的の同定が可能となる。この方法には多くの制限があり、たとえば分子量の大きな蛋白質はディスプレイするのが困難であり、このような用途に適したファージ繊維状蛋白質はほんのわずかである。さらに、ディスプレイされた蛋白質の構造的な圧迫により、親和性が減少し、結果として天然のリガンドとの結合能力に影響が及ぶことが知られている。

40

**【0010】**

このような要素、たとえば、蛋白質の結合に適したハイスループットの可能なマイクロア

50

レイまたはバイオチップの製作には一般的に、通常標的と呼ばれる関心のある他の物質または分子、たとえば、蛋白質とその後容易に相互反応させて検出を行うため使用することができるような形式で、蛋白質を表面上に付着させる方法を使用することが必要である。たとえば、蛋白質を2価または3価金属イオン、たとえば $Cu^{2+}$ または $Fe^{3+}$ で処理した表面に直接結合させてもよく、蛋白質はこれらに種々の親和程度で自然に結合する。次いで標的をプローブに結合させる場合、米国特許第5719060号に記載されているように、質量分析を併用してSELDI(商標)(表面強化レーザー脱離/イオン化)により検出および同定を行うことができる。G. MacBeathおよびS. Schreier(Science 289:1760、2000)によって報告された他の方法では、化学結合を用いて蛋白質を基質表面に結合させる一方、標的リガンドを蛍光タグで標識し、したがってプローブと標識標的との間の任意の相互作用を蛍光に基づいたスライドスキャナを使用して検出することができる。

10

#### 【0011】

結合要素を付与する前述の蛋白質固定方法では、一般に蛋白質の基質表面上への直接的な化学結合を用いるので、活性部位における不適切な化学結合または元の構造の欠損のいずれによってもこれらの方法には蛋白質の機能が結果的に損失するという大きな制限が生じる。このようなことが生じる場合、ほんのわずかな固定蛋白質のみが活性を維持しており、結果として検出が困難で、試験の感度が低くなる。さらに、これらの方法は複雑で正確さを欠くため、一般にハイスループット用途のための高密度マイクロアレイの作製に使用するには適さない。

20

#### 【0012】

米国特許第6087102号では、ポリアクリルアミドゲルを利用して電気泳動した蛋白質スポットから成る個々のセルを生成し、次いでゲルにインサイチューで架橋結合させてバイオチップを形成する方法について記載している。この方法の制限には、バイオチップ上に精密な小さなセルを調製することが困難であること、および架橋結合する際に捕捉蛋白質に破壊的な影響が生じる可能性があることが含まれる。米国特許第5847019号は、光反応性フリーラジカル化学物質を用いてパターン化されたネットワーク層を形成してバイオチップを製作するために、光重合可能なポリマーを利用した他のアプローチについて記載している。バイオチップに蛋白質を固定するために用いるこの光活性化によるアプローチは、アクリルアミドポリマーに関連したある種の光活性化化学物質に限定され、さらに、フリーラジカル光化学の使用によりこのような方法で製作したバイオチップに使用した捕捉蛋白質に対してフリーラジカルによる障害が生じ得る。

30

#### 【0013】

蛋白質と直接反応させて発泡ポリウレタン内で蛋白質を固定するためのイソシアネートキャップ液体ポリウレタンプレポリマーの使用は、米国特許第4098645号および第3672955号に記載されており、イソシアネート官能性ハイドロゲル系を使用し、それらのアミノ部位および水酸部位を介して直接蛋白質を結合し、それによって酵素反応物および抗体/抗原をベースにしたアフィニティカラムを形成することが教示されている。記載された方法はこのような目的に適するであろうが、これらの方法では、バイオチップ使用に適した制御された形状の光学的に透明なハイドロゲルが形成されない。さらに、蛋白質側鎖に生じる可能性のある結合を阻害しないでこのような方法を使用すると、蛋白質とポリマーとの望ましくない架橋結合が生じる可能性が非常に高く、多数の架橋結合が蛋白質の天然の構造を傷つけたり、破壊したりすることとなり、したがって蛋白質の生物活性が減少し、このような方法はバイオチップを使用する精度の高い結合アッセイには適さない。

40

#### 【0014】

これらの技術上の困難にもかかわらず、蛋白質-蛋白質および他の適合生体分子相互作用を理解することは重要性をもとに、多数の異なる非ハイブリダイゼーション結合要素を導入するのに適した実用的かつ順応性のある型のバイオチップ、生物科学分野での種々の研究および商用使用のための望ましいツールが達成した。要するに、最大の結合活性を維持

50

し、次いで該結合活性により非核酸/ハイブリダイゼーションをベースとしたマイクロアレイの作製を可能とするような形式で、要素を支持する効率的な結合系または支持系が必要とされている。

【0015】

別の言い方をすれば、標的を自由に隔離する (sequester) ために、蛋白質の天然の構造 (native conformation) および機能の維持を可能にする方法で蛋白質などの結合要素を固定または封入する方法を提供することが求められている。

【0016】

(発明の概要)

現在、望ましい固定化学特性を有する適当なゲルを提供することによって、生体分子相互作用および特徴のハイスループット分析に適した3次元型 (three dimensional format) アレイに多数の異なる非ハイブリダイゼーション結合要素を導入したマイクロアレイまたはバイオチップを提供できることが発見された。 10

【0017】

本発明は、固体基板にアレイした光学的に透明なPEGまたはPPGをベースとした重合体微小滴 (polymeric microdroplets) のアレイ形態のバイオチップを提供し、これは平方センチメートル当たり1000個もの個々の反応セルを形成できる能力を付与する。各セルは通常、一般的に微小滴内部またはその表面上に固定された少なくとも1個の結合要素を含む。アレイのセル内の種々の結合要素を公知の方法で改変することによって、結合相互作用または活性について生物学的試料または化合物の効率的なスクリーニングが実施および定量できる。これらのセルは、それぞれに含有される結合要素の量を最大にし、これにより検出感度を最大にする、3次元形態であることが好ましい。 20

【0018】

このようなバイオチップの各セルを形成する重合体微小滴は、固定した結合要素、たとえば蛋白質またはペプチドの天然の構造の維持に役立つ環境を提供するために選択される。得られたポリマーは、バイオチップの作製および使用に用いられる連続的な洗浄およびその他の液体処理工程を可能とするために、物理的および化学的に安定なハイドロゲルであることが好ましい。イソシアネート官能性反応基を有するポリエチレングリコールをベースとしたプレポリマーの使用が好ましく、重合した場合にウレタン結合によってポリエチレングリコールハイドロゲルネットワークが形成され、伸長し、架橋結合する。重合反応開始後、プレポリマーをバイオチップ基板上にマイクロスポットし、完全に重合させ、3次元反応セルのアレイを形成する。セル用の特定のポリマー化学は、核酸オリゴマーをハイブリダイゼーション捕捉プローブとして使用したバイオチップを開示している米国特許第6174683号、国際特許出願W000/65097に記載されている。現在では、さらなる技術開発の結果、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはそれらのコポリマーを、蛋白質およびペプチドを含む種々の非ハイブリダイゼーション結合要素を含めるのに適した3次元バイオチップの製作に効率的に使用できることが見出された。 30

【0019】

特定の一態様において、本発明は、(a) 表面を有する固体基板、(b) 前記基板の表面に付着した少なくとも1個の光学的に透明なハイドロゲルセルであって、イソシアネート官能性ポリマーから形成されるハイドロゲルセル、および(c) 前記ハイドロゲルセル内部または上部に固定された非ハイブリダイゼーション結合要素であって、標的蛋白質またはその他の同等分子を選択的に隔離するために有効である結合要素を含む、光学的に透明なハイドロゲルバイオチップを提供する。 40

【0020】

他の特定の態様では、本発明は生化学的アッセイを実施するためのバイオチップの使用方法を提供し、この方法には、(a) 少なくとも2個のハイドロゲルが結合した表面を有する基板を備えた光学的に透明なハイドロゲルバイオチップを提供する工程であって、各セ 50

ルの厚さは少なくとも約30 $\mu$ mで、主にポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールまたはそれらのコポリマーからなり、前記ハイドロゲルはそれぞれその内部または上部に固定した種々の蛋白質結合要素を含む工程、(b)結合条件下で、標的生体分子を含有する分析物溶液とハイドロゲルバイオチップを接触させる工程、(c)ハイドロゲルバイオチップを非選択的結合および未結合標的生体分子を除去する条件下で洗浄する工程、および(d)前記セルの1個に結合した標的生体分子を検出する工程が含まれる。

#### 【0021】

さらに他の特定の態様では、本発明は、内部または上部に固定された非ハイブリダーゼーション結合要素を有する光学的に透明なイソシアネート官能性ハイドロゲルバイオチップの調製方法を提供し、この要素は標的蛋白質または標的生体分子を選択的に隔離するため  
10  
に有効であり、この方法には、(a)イソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーの有機溶媒溶液を提供する工程、(b)前記非ハイブリダーゼーション結合要素の溶液を提供する工程、(c)前記要素を、15%以下のイソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーに前記反応性イソシアネートとの反応を介して共有結合させる工程、(d)光学的に透明なハイドロゲルを生成する条件下で、イソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーの重合を開始する工程、および(e)前記結合要素を含有する光学的に透明なハイドロゲルポリマーが前記基板に付着するように、小滴形態の重合イソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーを固体基板上に分散させる工程が含まれる。

#### 【0022】

さらに他の特定の態様では、本発明は、捕捉剤(capture agent)として機能させるように選択された、内部または上部に固定された蛋白質を有するイソシアネート官能性ハイドロゲルバイオチップの調製方法を提供し、この方法には、(a)イソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーの有機溶媒溶液を提供する工程、(b)所望の蛋白質捕捉剤の溶液を提供する工程、(c)前記蛋白質の媒介結合剤をイソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーに共有結合する工程、(d)前記イソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーの重合を開始する工程、(e)前記ポリマーが前記基板に付着するよ  
20  
うに、重合したイソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーの小滴を固体基板に分散する工程、および(f)個々のハイドロゲル小滴を所望の前記蛋白質溶液の1つに曝露して前記蛋白質捕捉剤を前記結合剤の連結を介して内部または上部に固定し、それによって前記小滴を重合して、異なる蛋白質捕捉剤を備えた複数のセルを有するバイオチップを生成する工程が含まれる。  
30

#### 【0023】

さらに他の態様では、本発明は、(a)上面(top surface)を有する固形基板、(b)前記基板の上面に結合したポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはそれらのコポリマーを含む複数のハイドロゲルセル、(c)前記セルの前記ハイドロゲル内部または上部に固定した媒介剤(intermediate agent)、および(d)前記蛋白質結合要素が天然の構造をとるような様式で相互作用することによって、少なくとも数個の前記ハイドロゲルセルの内部で前記媒介剤と結合した種々の蛋白質結合要素を含むハイドロゲルバイオチップを提供する。

#### 【0024】

さらに特定の態様では、本発明は、内部または上部に蛋白質を固定した複数のセルを有するイソシアネート官能性ハイドロゲルバイオチップを調製する方法を提供し、この方法には、(a)イソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーの有機溶媒溶液を提供する工程、(b)イソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーの重合を開始する工程、(c)重合したイソシアネート官能性ハイドロゲルプレポリマーの小滴を固体基板上に、前記小滴が前記基板に付着し複数のセルを形成するように、分散する工程、および(d)少なくとも2個の前記セルそれぞれの内部または上部に種々の蛋白質を物理的に固定する工程であって、前記蛋白質が選択的に特定の生体分子を隔離する結合剤として機能するように  
40  
選択される工程が含まれる。

#### 【0025】

10

20

30

40

50

(好ましい実施形態の詳細な説明)

ハイドロゲルは、マトリックスの内部および外部において分子を拡散させるために適当な大きさの孔および高い水分含量を有し、ガラスなどの表面に結合する能力を有し、完全に重合した状態で光学的に十分透明で、蛍光タグとの光学的妨害が最小限に留められており、完全に重合すると優れた構造完全性を有し、かつ一般研究用および臨床用に適当な保存性を有するゲルマトリックスを提供できるポリマーの種類である。ハイドロゲルは、脱水状態でガラス状であって水の存在下では膨潤して弾力性のあるゲルを形成する親水性ネットワークポリマーである。イソシアネート官能性ハイドロゲルは、非ハイブリダイゼーション結合要素、たとえば蛋白質の固定に有利に使用できるいくつかの特性を備えている。イソシアネート官能性ハイドロゲルとは、さらなる所望の重合を実施するように機能し、さらに蛋白質などまたは蛋白質を付着する媒介剤を共有結合する、イソシアネート基でキャップされた有機ポリマーを意味する。たとえば、ジイソシアネートとポリエーテルまたはポリエステルポリオールとの反応によって形成することができる当業界で周知であるポリウレタンポリマーは、この目的に適したハイドロゲルを提供することができる。

10

【0026】

これらのイソシアネート官能性ハイドロゲルを使用したバイオチップを形成するための出発物質として、プレポリマーを使用することが好ましく、これらのプレポリマーは、水和したポリウレタン、ポリウレア-ウレタンおよび/またはポリウレアポリマーゲルを付与するために調製されることが好ましい。ハイドロゲルポリマーは、種々のプレポリマーから調製され、その他の種々の用途に広く使用されている。一般に、ハイドロゲルは、濃縮形態でゲル化する3次元ポリマーネットワークを有する軽度に架橋結合したプレポリマーを最初に形成するような条件下で、親水性モノマーを溶液中で重合することによって形成される。ポリウレタンハイドロゲルは、ウレアとウレタンの結合を生じさせることによりイソシアネートで末端をキャップしたプレポリマーの重合によって形成される。

20

【0027】

適当なイソシアネート官能性プレポリマーは、2官能性または官能性イソシアネート化合物と反応する比較的高分子量のポリオキシアルキレンジオールまたはポリオールから調製されることが多い。好ましいプレポリマーは、エチレンオキシド単位のホモポリマーまたはエチレンオキシド単位とプロピレンオキシド単位またはブチレンオキシド単位の混合物を含有するブロックコポリマーまたはランダムコポリマーを含むことができるポリオキシアルキレンジオールまたはポリオールから形成される。ブロックコポリマーまたはランダムコポリマーの場合、単位の少なくとも75%がエチレンオキシド単位であることが好ましい。あるいは、ポリプロピレンオキシドのホモポリマーも用いることができるが、あまり好ましくない。ポリオキシアルキレンジオールまたはポリオールの分子量は、好ましくは2000から30000、より好ましくは5000から30000である。適当なプレポリマーは、本質的に全ての水酸基がポリイソシアネートでキャップされるように、たとえば水酸基に対するイソシアネートの比を約1.2から約2.2として、選択したポリオキシアルキレンジオールまたはポリオールをポリイソシアネートと反応させることによって調製することができる。イソシアネート官能性プレポリマーは、活性イソシアネートを約0.1 meq/gから約1.2 meq/gの量で、好ましくは約0.2 meq/gから約0.8 meq/gの量で含むことが好ましい。一般に、かなり低分子量、たとえば3000 MW未満のプレポリマーでは、イソシアネート含量が比較的高いことが好ましい(約1 meq/g以上)。このようなプレポリマーの重合速度は、重合が速すぎて効果的にマイクロスポットできないようにならないように制御するべきであり、この点において、イソシアネートの含量が比較的低い高分子量プレポリマーが一般的に好まれる。

30

40

【0028】

このような高分子量プレポリマーは、2つの一般的な方法、(1)分子量が少なくとも2000であるポリオール(トリオール以上)をイソホロンジイソシアネートなどのポリイソシアネートと反応させる方法、または(2)分子量が少なくとも2000であるジオールをポリイソシアネートおよび架橋結合剤、たとえばグリセロール、トリメチロールプロ

50

パン、トリメチロールエタン、トリエタノールアミンまたは有機トリアミンと反応させる方法のいずれかで調製されることが多いが、当業界で公知の他の方法も使用できる。

【0029】

芳香族、脂肪族または環状脂肪族ポリイソシアネートを使用することができる。高分子量脂肪族イソシアネートでキャップしたプレポリマーは一般に約20分から90分で水和ポリマーの状態にゲル化するが、芳香族ポリイソシアネートでキャップしたプレポリマーはより迅速にゲル化する。適当な2官能性または多官能性イソシアネートの例は以下の通りである：トルエン-2,4-ジイソシアネート、トルエン-2,6-ジイソシアネート、イソホロンジイソシアネート、エチレンジイソシアネート、エチリレンジイソシアネート、プロピレン-1,2-ジイソシアネート、シクロヘキサレン-1,2-ジイソシアネート、シクロヘキサレン-1,4-ジイソシアネート、-フェニレンジイソシアネート、3,3'-ジフェニル-4,4'-ビフェニレンジイソシアネート、1,6-ヘキサメチレンジイソシアネート、1,4-テトラメチレンジイソシアネート、1,10-デカメチレンジイソシアネート、クメン-2,4-ジイソシアネート、1,5-ナフタレンジイソシアネート、メチレンジシクロヘキシルジイソシアネート、1,4-シクロヘキシルジイソシアネート、p-テトラメチルキシリレンジイソシアネート、p-フェニレンジイソシアネート、4-メトキシ-1,3-フェニレンジイソシアネート、4-クロロ-1,3-フェニレンジイソシアネート、4-プロモ-1,3-フェニレンジイソシアネート、4-エトキシ-1,3-フェニレンジイソシアネート、2,4-ジメチル-1,3-フェニレンジイソシアネート、2,4-ジメチル-1,3-フェニレンジイソシアネート、5,6-ジメチル-1,3-フェニレンジイソシアネート、1,4-ジイソシアナトジフェニルエーテル、4,4'-ジイソシアナトジ-フェニルエーテル、ベンジジンジイソシアネート、4,6-ジメチル-1,3-フェニレンジイソシアネート、9,10-アントラセンジイソシアネート、4,4'-ジイソシアナトジベンジル、3,3'-ジメチル-4,4'-ジイソシアナトジ-フェニルメタン、1,6-ジメチル-4,4'-ジイソシアナトジフェニル、2,4-ジイソシアナトスチベン、3,3'-ジメトキシ-4,4'-ジイソシアナトジフェニル、1,4-アントラセンジイソシアネート、2,5-フルオロネジイソシアネート、1,8-ナフタレンジイソシアネート、2,6-ジイソシアナトベンズルラン、2,4,6-トルエントリイソシアネート、p,p',p''-トリフェニルメタントリイソシアネート、イソホロンジイソシアネートの3官能性3量体(イソシアヌレート)、ヘキサメチレンジイソシアネートの3官能性ピウレット、ヘキサメチレンジイソシアネートの3官能性3量体(イソシアヌレート)、重合4,4'-ジフェニルメタンジイソシアネート、キシレンジイソシアネートおよびm-テトラメチルキシレンジイソシアネート。

10

20

30

【0030】

選択されたジオールまたはポリオールをポリイソシアネートでキャップしてプレポリマーを形成することは、化学量論的量の反応物を使用して実施することができる。水酸基に対するイソシアネートの比は、当業界で知られているように変化することができるが、約1から約3が好ましく、約1.2から約2.2がより好ましい。キャップ反応は適当な条件を用いて実施することができ、たとえば約20から約150、乾燥窒素下で、約2時間から約14日間、好ましくは触媒なしで実施することができる。好ましい温度は、約60から約100で、イソシアネート濃度が理論値に近くなったとき、反応を停止する。

40

【0031】

好ましいプレポリマーには、トルエンジイソシアネートで末端をキャップしたポリエチレングリコール、エチレンオキシドおよびプロピレンオキシド(場合によってはトリメチロールプロパンを有する)およびトルエンジイソシアネートのコポリマー、トルエンジイソシアネート-ポリエチレングリコール-トリメチロールプロパン、メチレンジイソシアネート-メチレンホモポリマー、重合メチレンジイソシアネート-ポリエチレングリコール、エチレンオキシド-プロピレンオキシド-トリメチロールプロパンおよびイソホロンジ

50

イソシアネートのポリマー、およびポリエチレングリコールトリラクテートおよびトルエンジイソシアネートが含まれる。上記種類の適当なプレポリマーは、Hampshire Chemical Corp. (レキシントン、マサチューセッツ) から、HYPOL PreMA (登録商標) G-50、HYPOL (登録商標) 2000、HYPOL (登録商標) 3000、HYPOL (登録商標) 4000 および HYPOL (登録商標) 5000 として市販されており、これらの調製物は一般にポリエチレンオキッドおよび微量のポリプロピレンオキッドのコポリマーを含んでいる。

#### 【0032】

あらゆることを考慮すると、ハイドロゲルポリマーの主鎖には、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールのコポリマーを含むことが好ましい。理論的機構によって制約されるものではないが、ポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールハイドロゲルの非イオン性の親水的な特性によって、ハイドロゲルに対する分析物の非特異的結合の程度が低く、固定した生体分子の天然の構造および生物活性を維持するように生体分子に対する適合性が良好になると信じられている。イソシアネート官能性ハイドロゲルは、大量の液体を迅速に、かつ、ゲル物質の全体てきな基本形状が維持されるような比較的均一な方法で有利に吸収する。さらに、これらの物質によって吸収された水分は、使用する圧力下でも吸着物質内部に保持される。この一般的な種類のポリウレタンをベースとしたイソシアネート官能性ハイドロゲルは、米国特許第3939123号 (Matthews 他)、第4110286号 (Vandegaeer 他) および第4098645号 (Hartdegan 他) に記載されている。このようなポリウレタンをベースにしたハイドロゲルは、表面コーティング剤として、および柔軟性または剛性発泡樹脂製品を形成するために広く使用されており、これらは、酵素反応系用の発泡樹脂製品を形成するためにも使用されている。

#### 【0033】

好ましい実施形態において、バイオチップは、水に活性なジイソシアネートでキャップされ、任意選択で適当な架橋結合剤で軽度に架橋結合することができる、高分子量ポリエチレンオキッド、ポリプロピレンオキッドまたはポリエチレンオキッドおよびポリプロピレンオキッドのコポリマーのジオールまたはトリオールに基づくイソシアネート官能性ハイドロゲルを使用して作製される。プレポリマーに存在する活性イソシアネートの量が予測できることが好ましく、たとえば約0.1 meq/g と約1 meq/g との間が好ましく、約0.8 meq/g 以下がより好ましい。一般に好ましいジイソシアネートには、芳香族をベースとしたジイソシアネート、たとえばトルエンジイソシアネートまたはメチレンジフェニル-イソシアネート、並びに脂肪族ジイソシアネート、たとえばイソホロンジイソシアネートが含まれる。ポリマー中の反応性イソシアネートの約15% から約5% が結合要素を固定する部位をもたらすために使用されることが好ましく、プレポリマー中の反応性イソシアネートの10% 以下が結合要素の固定に使用されることがより好ましい。水混和性有機溶媒中で予備生成することができるバイオチップ作製のプレポリマーの重合は、水の添加のみによって生じるウレタ結合の形成によって起こる。

#### 【0034】

結合要素は、セル物質の重合中または前後に、各セルまたはマイクロスポットに直接的または間接的に固定することができる。直接的固定化には、ハイドロゲルに最初に結合する媒介剤が検討され、おそらく今度はそれに結合する第2の媒介剤の使用が検討される。たとえば、ハイドロゲルマトリックスに封入される第1の媒介剤は、カルモジュリンに対する抗体であることができる。カルモジュリンが抗体に一旦結合すると、カルモジュリンはカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼII などのカルモジュリン結合蛋白質を隔離するために今度は利用される第2の媒介剤として働く。(よく引用される) CaM キナーゼII をハイドロゲルに付着するアプローチは、天然の結合モチーフを介して、すなわちカルモジュリン蛋白質によって結合する穏やかな方法を提供する。CaM キナーゼII は、たとえばCaM キナーゼII の制御現象(リン酸化、脱リン酸化)を調べる目的のため、またはドッキング蛋白質またはその他の細胞内輸送蛋白質となり得るものを検索するた

10

20

30

40

50

めに、分析物溶液を探索することに束縛はない。C a Mキナーゼ I I を結合する他の方法は、機能の損失またはその他の有害な影響を引き起こし得る。

【 0 0 3 5 】

結合要素という用語は、特定の方法で1個または複数の標的分子と相互作用し、ハイブリダイゼーション以外の機構によってそれらを物理的に隔離できる物質を意味するために使用される。これらの非ハイブリダイゼーション結合要素には、限定はしないが、生物学的物質、たとえば受容体を含む蛋白質、ペプチド、酵素、酵素阻害剤、酵素基質、抗体などの免疫グロブリン、抗原、レクチン、修飾蛋白質、修飾ペプチド、2本鎖DNA、生体アミンおよび複合炭化水素が含まれ、この種の特異的な結合活性を有するように設計された合成分子、たとえば薬剤および合成リガンドも含まれる。「修飾」蛋白質またはポリペプチドとは、分子内の1個または複数個のアミノ酸が、新規化学部分の付加、既存の化学部分の除去、または除去および付加両方の組み合わせによって改変された蛋白質またはペプチドを意味する。この改変には、天然および合成の両方の改変を含めることができる。天然の修飾には、限定はしないが、リン酸化、硫酸化、グリコシル化、ヌクレオチド付加、および脂質化が含まれる。合成的修飾には、限定はしないが、ハイドロゲルへの結合を容易にする化学的リンカー、および蛍光色素、微小構造、量子ドットなどのナノ構造、またはその他の合成物質の付加が含まれる。さらに、修飾には既存の官能性部分、たとえば水酸基、スルフヒドリル基またはフェニル基の除去、または天然の側鎖またはポリペプチドアミド主鎖の除去または改変が含まれる。複合炭化水素の例には、限定はしないが、天然および合成の直鎖および枝分かれオリゴ糖、修飾多糖、たとえば、糖脂質、ペプチドグリカン、グリコサミノグリカンまたはアセチル化種、および異種オリゴ糖、たとえば、N - アセチルグルコサミンまたは硫酸化種が含まれる。それらの合成的修飾、たとえば薬物、リガンド、色素またはスクリーニングおよび定量的目的のために有用なその他の薬剤等の分子の付加も含まれる。天然の複合炭化水素の例には、キチン、ヒアルロン酸、硫酸ケラタン、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、セルロース、およびアルブミンやI g Gなどの修飾蛋白質上に認められる炭化水素部分がある。このような要素の2つ以上の組み合わせは、マイクロチップアレイ上のいくつかの箇所に固定することができ、この組み合わせは2つの要素の1混合物として付加してもよいし、順番に付加してもよい。

10

20

【 0 0 3 6 】

隔離または非ハイブリダイゼーション結合するときの固定した要素と標的との間の相互作用の記述においては、特異的かつ選択的な形式で、一般には共有結合または非共有結合によって（たとえば、ファンデルワールス力および/またはイオン相互作用によって）2つ以上の分子が一緒に付着または結合することを意味する。特定の標的は、生物学的物質または合成物質の複合混合物中に存在することができる単純な分子であることができる。隔離または結合は、共有修飾または抗体 - 抗原相互作用などの延長的性質であってもよいし、あるいはリン酸化現象などの際に生じる一時的なものであってもよい。

30

【 0 0 3 7 】

DNA結合要素には、限定はしないが、合成および天然のデオキシリボヌクレオシドの2本鎖ポリマー、合成および天然のポリリボヌクレオチド、アプタマー、および1個または複数の修飾されたまたは非天然の化学要素を有する合成ポリヌクレオチドが含まれる。結合/隔離剤としてのこのようなDNAの使用は、標的DNAがハイブリダイズする1本鎖DNA（オリゴヌクレオチドまたはcDNA）を一般的に使用した従来のヌクレオチドハイブリダイゼーションアレイと対照的である。2本鎖DNAは、生体分子を結合または隔離するために、適当な生体分子、たとえばDNA結合蛋白質、転写因子、たとえばエストロゲン受容体、または合成薬物または合成分子と（ハイブリダイズとは対照的に）相互作用するために使用することができる。例として、TBPまたはSP1などの一般的な転写因子、または核ホルモン受容体などの遺伝子特異的転写因子を、螺旋2本鎖DNAに付着し、該螺旋2本鎖DNAによって隔離することができる。モノクローナル抗体とよく似た機能を示すアプタマーについては、米国特許第5840867に記載されている。

40

【 0 0 3 8 】

50

あるいは、ある実施形態において、ゲルマトリックス内に物理的に共重合された最初の結合要素、たとえば選択された抗体またはアプタマーなどのその他の選択的結合剤を用いることができ、1つまたは複数の異なる抗体がアレイの各セルに固定される。その後、生体物質の複合混合物をこのようなアレイに塗布した際、各セル内で固定されたこれらの抗体による特有の結合寄与が、このような複合混合物を「自己選別 (self-sort)」し、「自己会合 (self-assembly)」した新規アレイを形成し、この新規アレイは最初の結合要素に相補的である。たとえば、特定の抗原に対する抗体を重合中に各ゲルのマイクロスポット内に固定し、その後、特定の蛋白質またはペプチド抗原が、蛋白質またはペプチド抗原の混合物をそのようなアレイに曝露することによって同系の抗体それぞれに結合するために提供される。このような媒介抗体アレイの用途の一例は、各蛋白質をそれぞれ単離する必要なく細胞抽出物から蛋白質の複合混合物を自己選別することである。次いで、このように形成されたアレイを使用して、添加した蛋白質キナーゼまたはその他の蛋白質修飾部分に曝露した各部位にどんな影響が生じるかを評価することができる。この概念は、このような修飾された活性が、薬物またはその他の添加された化学的化合物によって影響を受けるかどうかを確かめるために適用することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0039】

さらに他には、重合後、最初に固定された媒介剤を使用することによって、その他の結合要素をバイオチップアレイのセル内に局在または結合させることができる。たとえば、プロテインAなどの適当な媒介剤を重合中に固定し、その後、溶液中でイムノグロブリンに制御しながら曝露することによって、所望のイムノグロブリン捕捉剤を固定したプロテインAに結合させる。

#### 【0040】

さらに他の実施形態において、その後最初に固定した結合要素を修飾することができる。このような修飾には、(a)生物学的修飾、たとえば、リン酸化、グリコシル化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化、脂質修飾、およびADP-リボシル化、または(b)非生物学的修飾、たとえば、蛍光色素修飾、ビオチン化、アルキル化、および異常残基の導入、並びに他の蛋白質または酵素との結合によってアレイの改変された最終形態を生じること、が含まれる。さらに他の実施形態として、2本鎖核酸オリゴヌクレオチド(またはポリマー)を重合中に固定し、その後、所望の蛋白質をこの核酸に核酸配列特異的蛋白質の相互作用により結合し、自己会合蛋白質-核酸複合体アレイを作製する。

#### 【0041】

まず、プレポリマーと結合要素を非プロトン性溶媒中で反応させることによって結合要素を効率的にプレポリマーに固定するが、この方法はハイドロゲルの調製において多くの利点を有することができる。この方法はその後のプレポリマーの均一な水溶液の生成を助けることができ、重合混合物の粘度を低めることによりCO<sub>2</sub>の気泡がゆっくり発生することが可能となるため重合工程中の二酸化炭素の発生を減速させるのに役立つこともできる。たとえば、ポリウレタンをベースとした重合では、いくらかのガス状の二酸化炭素が水とハイドロゲルプレポリマーのイソシアネート基との反応によって発生する。このような反応を図1および図2に示すが、このようなプレポリマーからバイオチップを調製した場合、二酸化炭素ガスの発生および二酸化炭素ガスのゲルからの逃避を制御するのに有利であることができる。重合が高粘度の混合物中であまりに迅速に起こった場合、発生した二酸化炭素ガスは逃れることができず、ゲル内に閉じこめることができる。この結果、ゲルマトリックスの連続性の問題となり得る離散性発泡マトリックスが生じ、光学的透明性の障害となり得る。バイオチップの設計において、光学的透明度が大きいほど、標的への結合に成功したことを示す蛍光の検出がより正確になる。二酸化炭素の発生を制御する1つの方法は、pHを約8.5以下に維持して反応速度を制御し、したがって重合溶液中における二酸化炭素の拡散を制御する方法である。

#### 【0042】

非プロトン性溶媒中においてハイドロゲルを誘導体化する他の利点は、プレポリマーの沈殿を最小限に抑えることによってハイドロゲルの光学的透明度または透明性が高まること

である。ゲルをゆっくり重合し、したがってCO<sub>2</sub>をゆっくり発生させ、確実に連続的かつ透明なゲルマトリックスにする他の方法は、水に対する非プロトン性溶媒の比を少なくとも約0.25から1、好ましくはより高めに、たとえば0.3~0.35から1に維持することである。ハイドロゲルの誘導体化および重合は、一般にこのような比において約30分間で達成される。セルのプレポリマーに結合した結合要素の量は、単純に反応に添加する結合要素の量を(たとえば、各微小滴当たり蛋白質約10 fmolから約1 pmolまで)変化させて容易に調整され、これによって各ハイドロゲル微小滴内に固定された結合要素の量をほぼ制御できる。

#### 【0043】

ゲルマトリックス内に固定された媒介剤または第1結合要素と相互作用する標的予定分子またはその他の第2結合要素のゲル内への拡散しやすさは、部分的には用いる溶液中のハイドロゲルプレポリマーの割合によって決定される。第683号特許では、ハイドロゲル小滴の調製にはプレポリマーの5%溶液を使用することが記載されているが、5%濃度では、蛋白質などのより大きい分子の重合ハイドロゲルへの拡散は所望するよりも遅い。現在のところ、より低い割合、たとえば3.5%のプレポリマーがより大きな生体分子をハイドロゲルに容易に通過させるためには好ましいことを見出されている。しかし、約3%未満のプレポリマー溶液では、得られるゲルは十分な構造完全性、および/または有用となる十分な重合に欠くであろう。したがって、抗体を視覚化ツールとして使用するなど、多くの適用において、ポリマーの範囲は3%と5%の間が好ましいと考える。IgGなどの一般的な抗体よりも小さいサイズの分子(またはより大きいサイズ、たとえばゲルがマイクロスフェアに封入または結合されている場合)を調べる場合などその他の適用および用途では、より高いまたはより低い溶液中のポリマー割合をそれぞれ使用することができる。

#### 【0044】

重合開始後および終了前に、まずハイドロゲルを蛋白質で誘導体化し、次に固相表面に沈着した場合、任意の好都合な方法で送達を達成することができ、たとえば微小滴のアレイを形成するためにゲルを沈着させる慣用のマイクロスポット機器を用いることができる。このようなゲルは、本来的に、ある基板に非共有的に付着し得るが、一般的にハイドロゲルの添加前に基板表面を誘導体化して、基板に対するゲルの確実な付着を達成する。たとえば、ガラスを基板として使用する好ましい一実施形態において、重合したハイドロゲルを沈着させる前にガラスをアミンで誘導体化する。次いで、蛋白質で誘導体化した重合ハイドロゲルは、誘導体化ガラス基板上に沈着したときに、いくつかの活性イソシアネート基とガラス表面上に局在するアミンとの反応によって、基板と強く結合する。これによって、ハイドロゲルと基板との共有付着がもたらされ、プレポリマーに元々ある活性イソシアネート基の約5%以下がこの機能に使用されることが好ましい。

#### 【0045】

ある実施形態において、結合要素の一部を最初にブロックすることは、結合要素の効率的な固定を最大にするために好ましい。イソシアネートプレポリマーと、特定の結合要素に含まれるある種の化学的部分、たとえば1級アミンとの反応は、結合要素とポリマーとの間の過剰な架橋結合を生じ、これによって結合要素の変性が引き起こされ、または標的化合物に対する結合親和性が低下し得る。重合中にこれらの部分の少なくともいくつかを保護することによって、このようなことを回避または制限することができ、次いで、重合後の脱保護によりアレイ内の結合要素の機能性および有効性を回復する。すなわち、重合後の脱ブロックにより、結合要素が天然の構造を確保することが可能となる。このようなブロック/脱ブロックは、共有または非共有手段のいずれかによって達成することができる。たとえば、結合要素として抗体を使用するとき、ポリマーに架橋結合しやすい抗原認識部位を、プレポリマーと混合する前に非架橋結合ペプチド(またはその他のエピトープ様物質)とインキュベートする。このようなペプチドまたはエピトープ様物質は、重合過程中、抗原認識部位を反応性イソシアネート基との複合体化から保護する。重合後、たとえば酸、pH 3.0に短時間曝露してこのようなペプチドを抗体から放ち、したがって抗体

の抗原認識部位を再度曝露する。同様の機構を使用して結合要素上の選択されたスルフヒドリル部分またはアミンを保護することができる。これらは、重合過程の間、これらの官能基を保護するための周知の可逆的化学誘導体化方法を使用することができる。

#### 【0046】

第683号特許における留意点は、重合中に直鎖の伸長を容易にするためにポリエチレングリコールを増粘剤として添加することができることである。その後、その他の化合物を重合中にハイドロゲルに添加して、蛋白質などの結合要素の安定性および天然の活性を維持できることが発見された。結合要素を安定化するために、場合によっては非結合性添加物をプレポリマー混合物に含めることができる。これらの添加物には、限定はしないが、グリセロール、フィコール、およびエチレングリコール並びにマンニトール、スクロースおよびトレハロースなどの糖類が含まれる。ハイドロゲルの架橋結合の程度を制限することが望ましい場合、ウシ血清アルブミンなどの非特異的（非結合）蛋白質を含むその他のバルク剤を用いて蛋白質などの要素の活性を補助することもできる。

10

#### 【0047】

他の添加物の任意選択による使用は、重合したハイドロゲル内の領域またはドメインを生成する物質を用いることである。重合が完了すると、これらの物質は水溶液に溶けるか拡散し、これらの物質がない場合に存在するものよりも大きな孔、空胞または通路をハイドロゲルポリマー内に残す。このような大きな孔の存在は、ハイドロゲル上部または内部に広い表面積を作りだし、ハイドロゲル中に容易に分散するには大きすぎる生体分子などを結合する能力を増大させる。

20

#### 【0048】

ハイドロゲルポリマーは、限定はしないが、合成分子などの物質、薬物、非ペプチド受容体リガンド、金属ポルフィリンなどの混合された有機/無機種、およびゼオライトなどの無機物質を含むその他の結合要素にも適している。好ましい一実施形態において、これらの要素は、結合要素と分析物種との間の特異的な相互作用をに基づいて化合物を溶液から隔離するために用いられる。他の好ましい実施形態において、これらの結合要素は一時的に溶液中の種と相互作用する。これは、結合要素がリン酸化やメチル化などの反応プロセス、切断またはその他の形態の修飾のための選択的基質として役立つ場合である。さらに他の実施形態において、導入された物質は反応の触媒に関与することができる。このような触媒物質は生体反応において有用であることができる。あるいは、種々の触媒要素のアレイを使用して、最も効率的な触媒要素をスクリーニングすることができる。一般に、このような結合要素を用いて調製されたこれらのハイドロゲルは、限定はしないが、生物学的アッセイ、物質スクリーニング、およびセンサーを含む種々の作業に有用である。

30

#### 【0049】

あるいは、図3Aに図示したように、重合前または重合中のいずれかにおいて非生物学的化合物、たとえばアミン誘導体化 $C_4 \sim C_8$ の適当なリンカーを有する3配位または4配位金属キレート剤、たとえばイミノ二酢酸またはニトリロ三酢酸を媒介結合剤としてハイドロゲルに固定する。図3Bに図示したように、望ましい蛋白質などの結合要素は、たとえば蛋白質の尾部または頭部の末端として、複数のヒスチジン含有配列を有するように合成または修飾されることが好ましく、次いでこのような末端残基と共にキレートし、固定したキレート剤との結合によってハイドロゲル内に蛋白質を物理的に固定するように、 $Cu^{2+}$ または $Fe^{3+}$ などの2価または3価金属イオンと共に曝露することによってパイオチップの各セルに固定することができる。各セルを特定の結合要素、たとえば種々の蛋白質捕捉剤に曝露することによって、分析使用に安定な蛋白質チップが形成される。このようなポリマー微小滴を生成する際に媒介剤を使用する1つの利点は、特に影響を受けやすい蛋白質が変性する可能性が回避され、最終的な結合要素蛋白質の構造および立体配置が変化しないで維持されることである。特定の蛋白質マイクロアレイ中に各微小滴またはセルを生成し、その後それに結合剤を結合するために同キレート剤を使用することにより製作を簡単に行うことができる。

40

#### 【0050】

50

バイオチップ基板は、結合アッセイおよび個々のセルに結合した標的分子のその後の検出の際の自動操作を助ける種々の物質および形式から成ることができる。スライドガラスなどの平坦な固相プレートが適しているが、個々のセルを保持するようにプレート中に形成された凹部またはウェルを有するプレートを使用することができる。ガラスなどの光学的に透明な基板または透明なポリスチレンはセルを通過する透過光の検出ができ、蛍光または光学的吸収を用いた検出様式に好都合である。三次元ハイドロゲルセルは高い結合能を有するので、反射光での方法も可能であり、不透明な基板も使用できる。硬い基板を使用すると、バイオチップを使用した分析検出段階でのアラインメントが正確になるが、適当なアラインメントがセルに導入され検出が容易な場合はこのようなことは必要ではないだろう。たとえば、テープまたはフィラメントなどの柔軟性のある形式は、磁気テープの使用と同様のスキャン形式によって正確に検出することができる。光学的方法および適当な基板は簡便さのため好まれるが、放射活性剤の検出などのその他の生化学的検出法を使用することもできる。一般に、セルは何個でも（たとえば1から1000個）バイオチップ上に付与することができる。自動操作を助けるために、96個の倍数のセルを使用することが多い。たとえば、384個のセルを3インチ（7.6cm）×5インチ（12.7cm）プレート上のアレイに付与することができる。複数のセルを使用することが好ましいが、1個のみのセルを使用したバイオチップもある条件では十分であることができる。

10

#### 【0051】

ある実施形態において、ハイドロゲルセルの重合後に結合要素をハイドロセルに添加することが好ましいだろう。これを達成するには、単純拡散は効果的でない手段であろう。迅速にハイドロゲル内に拡散する小分子は、その後の使用過程において迅速にハイドロゲル外に拡散し、それによってこれらの結合要素の損失が生じる。したがって、このような迅速に拡散する薬剤、たとえば小分子およびペプチドの場合、マトリックスに拡散した後、このような薬剤を重合マトリックスに共有結合する機構を有することが好ましい。これを達成するための好ましい1つの手段には、組成の一部としてポリマー内に含有されるか、またはポリマーに拡散した小分子に結合させて架橋結合を実施するために適当な部分、たとえば光活性化試薬または化学的架橋結合試薬が使用される。

20

#### 【0052】

これに対して、蛋白質および大きなDNAセグメントなどのより大きな結合要素は、受動的拡散によってハイドロゲルマトリックス中に効率的に移動することができない。より大きな種が容易にマトリックス中に拡散するように、蛋白質などの正味の電荷を有する種の移動を制御するような方法で蛋白質の等電点とは異なるpH値を有する溶液内で電界をかける。この方法を「電気泳動」という。ハイドロゲルセルが荷電した種の移動経路内であれば、荷電した種は受動的拡散力に加えて電界をかけることによって与えられる他の力を受け、それによってハイドロゲル内に加速される。この電界によって促進される拡散の利点は、その後のアッセイ工程中にこれらのより大きな結合要素がハイドロゲルマトリックスから簡単には受動的に拡散しないことである。

30

#### 【0053】

ハイドロゲルを重合した後、ハイドロゲルセルによって占有されていない基板表面をその後のアッセイ試薬、標的分子またはその他の物質の非特異的または所望しない付着を減少させる薬剤または物質で処理することができる。アッセイ試薬が表面に非特異的に結合することができるが、したがって溶液中のアッセイ試薬または標的分子の有効濃度が実質的に減少する可能性がある場合に、これは特に有用である。あるいは、このような処理は、表面から観察されるバックグラウンドシグナルの量を減少させ、それによってアッセイの目的に対するハイドロゲルセルの有効性を高めるために使用することができる。

40

#### 【0054】

このような曝露表面領域の処理としては、最初の層として存在するか、あるいは基板表面上にコーティングされた1級アミンと反応する試薬の使用が含まれる。これらの試薬には、限定はしないが、1級アミン、およびスクシニルエステルなどの求核反応性部分で官能化された非重合小分子に共有結合する、イソシアネートなどの反応性部分を含有する少な

50

くとも1つの末端を有する活性化ポリエチレングリコールポリマーが含まれる。あるいは、ガラスのシラン処理、または、分子生物学用途の当業者に周知のバックグラウンドシグナルを減少するために通常使用されるウシ血清アルブミンなどの標準的ブロッック試薬を使用することができる。

【0055】

この系に含まれる全反応、すなわち(1)直接蛋白質プローブによって、または媒介剤によってハイドロゲルプレポリマーを誘導体化する反応、(2)ハイドロゲルの重合および(3)誘導体化したハイドロゲルの基板表面への結合は、強力な尿素またはウレタン(カルバメート)結合が関与する。これらの結合は、微小滴アレイに機械的完全性を与え、バイオチップの半減期を著しく延長させる。

10

【0056】

後述するある好ましい実施形態において、基板上に重合した後のハイドロゲル微小滴の厚さは、好ましくは少なくとも約30 $\mu\text{m}$ 、より好ましくは少なくとも約50 $\mu\text{m}$ 、最も好ましくは約50 $\mu\text{m}$ と100 $\mu\text{m}$ の間である。さらに、微小滴は一般に楕円形で、このような系で以前使用された正方形のゲルセルと対照的である。ゲル微小滴(またはセル)が全体的に大きいことによって、そこに固定される結合要素の量が著しく増加し、それによってバイオチップの検出限界をより低く減少させることができ、使用しやすくなる。ポリマー溶液の粘度を減少させ、バイオチップ基板上にマイクロスポットするために今まで使用されてきた分散機構に適切な修飾を加えることによって、より小さな個々のセルを作製することができ、超高密度バイオチップアレイができる。ウェルを有する基板を使用する場合、微小滴をウェルの底部に沈着させる。

20

【0057】

以下の実施例は蛋白質チップに関連したいくつかの適用を例示している。蛋白質-蛋白質相互作用の研究に適した代表的なバイオチップの例は、カルシニューリンに対するカルモジュリンのカルシウム依存方法による結合である。蛋白質-DNA相互作用に適したバイオチップの例は、DNAに対するラムダリプレッサー蛋白質の結合である。もちろん、これらのバイオチップは抗原-抗体相互作用に適しており、操作実施例では詳細に示していないが、前述したその他のこのような相互作用にも適していることは理解されるだろう。

【0058】

実施例1. 生体活性を増強するための添加物(グリセロール/トレハロース)の使用  
以下の実施例は、不活性な蛋白質、単純な炭化水素および湿潤剤がこれらのバイオチップのハイドロゲル固定抗体活性に保護効果を有し、全体的なシグナルおよびアッセイの性能を高めることを示している。

30

【0059】

パネルA-トレハロース。この実験では、トレハロース保存溶液、50mM ホウ酸ナトリウム緩衝液、pH8.0中の50%w/v D(+ )トレハロース2水和物のアリコートを終末量50 $\mu\text{l}$ のハイドロゲル配合物に添加した。この配合物には、最終濃度3.5重量%のHYPOL PreMA(登録商標)ハイドロゲルプレポリマー(HYPOL、アセトニトリル、N-メチル-2-ピロリジノン)をそれぞれ重量比1:3:3で含有する予備混合した保存溶液)、抗トランスフェリン(リン酸緩衝食塩水1X(PBS)中4mg/ml、2 $\mu\text{l}$ ウシIgG(PBS中50mg/mlおよび1.25%グリセロール)も含まれる。トレハロースの量は、最終w/vパーセント、0.1%、2%、5%および10%トレハロースに対応して、0から10 $\mu\text{l}$ で変化させる。蛋白質を含まないブランクハイドロゲルスポットも含める。これらの試験溶液を試料あたり3ピン、アミンコーティングスライドガラスに1ピンあたり2箇所スポットした。封入された試験蛋白質は抗トランスフェリンで、この系をCy3蛍光色素標識トランスフェリン(Amersham、0.1%トリトン100を含有したPBS(PBST)中、約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、および1%ウシ血清アルブミン(BSA))と45 で振盪しながら指定した時間インキュベートした。インキュベーション後、スライドを2x10分PBSTで洗浄して、次いでScan Array Liteスライドスキャナを使用して画像化した。ブランクハイドロ

40

50

ゲルスポットのシグナルは検出不可能であり、0%トレハロースは弱いシグナルを有していた。1%および2%トレハロースは少し強く、5%は強いシグナルを有し、10%は最も強いシグナルを有する。これらの結果によって、トレハロースの添加はハイドロゲル中の試験抗体の生体活性に正の影響を有することが示される。

#### 【0060】

パネルB - グリセロール。ホウ酸ナトリウム緩衝液 pH 8.0中の20%保存液として溶解したグリセロールを、最終濃度3.5%のHYPOL PreMA (登録商標) G-50、抗トランスフェリン、ウシIgG、および5%トレハロースを含有する前述のハイドロゲル配合物に添加し、最終濃度0%、0.5%および1%、たとえば保存グリセロールを0 $\mu$ l、1.25 $\mu$ lおよび2.5 $\mu$ lとした。前述のアッセイのように、Cy3蛍光色素標識トランスフェリン系をアッセイ用に使用した。パネルBについては、グリセロールを半パーセント増加させる毎に、シグナル強度が増加するので、抗体活性に対して正の効果が証明された。

10

#### 【0061】

実施例2 . 拡散 (%ハイドロゲル3%対5%)

以下の実験は、ハイドロゲルのパーセントがハイドロゲルマトリックス中の結合要素の拡散に影響を及ぼすことを示している。

#### 【0062】

実施例1で説明した方法を使用して、マウスIgGを3%、4%および5%ハイドロゲルそれぞれに固定した。BSAを非特異的結合対照として別のスポットとして含めた。ポリマーの重合に続いて、アレイをローダミン標識ウサギ抗マウス抗体の溶液で1時間インキュベートし、次いで洗浄した。マウスIgG抗体に結合したウサギの抗マウス抗体、および結合の程度をScan Array Liteスライドスキャナを使用して各位置の蛍光によって測定した。同一の結合条件および結合時間では、ハイドロゲルスポットのパーセントが少なければ少ないほど、より強い結合シグナルが示された。このことは、これらの低パーセントにおいて、ローダミン標識ウサギ抗マウスIgGのハイドロゲルマトリックスへの拡散速度が速いことを示している。

20

#### 【0063】

実施例3 . 非特異的結合をブロックするため / スライドのバックグラウンドを低下するためのコーティングの使用

30

N-ヒドロキシスクシニミジル活性エステル (NHS) 活性化ポリエチレングリコール (PEG) ポリマー、mPEG-SPA-NHS 5K (Shearwater Corporation) を0.05M 重炭酸ナトリウム緩衝液、pH 8.25に溶解し、最終PEG濃度を50mg/mlとした。コーティング製アミノシランスライドを、ポリマーの表面グラフトに使用した。Grace-Biolabsハイブリダイゼーションチャンバー (SA500-3LC LR) を反応容器として使用した。表面をコーティングするために、3枚のスライドはPEG溶液で室温 (NSH rt) において振盪機上で3時間処理し、3枚のスライドは3時間45 (NHS 45) で処理し、他のスライドは対照としてDI水中で3時間45 処理した。

#### 【0064】

40

PEG処理後、ハイブリダイゼーションチャンバーを取り除いて、このスライドをPBSで10分間洗浄して、次に蒸留水で10分間洗浄して、その後空気乾燥した。Cy3-標識グリア細胞由来神経栄養因子をPBSTに溶解した。スライドを室温で1時間インキュベートした。次に、PBSで10分間、蒸留水10分間洗浄した。次いでこのスライドをScan Array Liteスライドスキャナを使用してスキャンした。両条件設定で処理した後、バックグラウンド強度シグナルは5~10倍低下し、表面上の蛍光物質の非特異的吸収の減少にPEGコーティングが効果的であることを示している。

#### 【0065】

実施例4 . バイオチップ上の蛋白質 - DNA相互作用

以下の実験においては、図4Aに示したように、1本鎖DNAをまずハイドロゲルに結合

50

させた後、その後の標的蛋白質の隔離に有効なハイブリダイゼーションを行う。

【0066】

5'アミノ就職、1本鎖細菌リプレッサー結合配列 $O_R 2 O_R 1$ (wt)および結合部位に1塩基変異を有するその変異体(mut)(配列は図4Bに示す。結合部位には下線が引いてある)を、3.75%HYPOL(商標)中130 $\mu$ Mでアミノシラン化スライドにプリントした。プリントされたスポットを個々のハイブリダイゼーションチャンバーに封入し、対応する相補配列と3X SSC、0.1%トリトンX-100、MgCl<sub>2</sub> 5mM中1 $\mu$ Mで、45 $^{\circ}$ Cで18時間ハイブリダイズさせた。次に、得られた2本鎖DNAを、結合緩衝液(50mM Tris HCl(pH 7.6)、NaCl 100mM、CaCl<sub>2</sub> 1mM、EDTA 0.1mM、BSA 0.1mg/ml、ポリ(dA-dT) 2.5 $\mu$ g/ml、0.05% Tween 20、DTT 1mM)中で、Cy3-標識バクテリオファージラムダリプレッサー CI 1.5 $\mu$ g/mlと室温で2時間インキュベートした。Cy3-標識 CIを結合反応終了時に除去し、スライドを結合緩衝液、次いで脱イオン化H<sub>2</sub>O(dH<sub>2</sub>O)で簡潔に洗浄し、GSIレーザーキャナで画像化した。別個のスライドにおいて、2本鎖DNAを製造元の方法にしたがってSYBR Gold(Molecular Probe)で染色し、DNA総含量をGSIレーザーキャナによって視覚化した。

【0067】

Cy3標識リプレッサーの天然のオペロンドsDNA配列に対する結合は、対応するスポット中の蛍光シグナルが得られることによって示された。変異体スポット中に強い蛍光がなければ、相互作用が配列特異的であることが示される。SYBR Gold(2本鎖DNA染色)で染色したプリントスライドの蛍光をリプレッサーのCy3蛍光と比較することにより、野生型 $O_R 2 O_R 1$ 配列に関連したCy3シグナルを発生するのは、不均一にプリントしたDNAに対する非特異的蛋白質結合ではなく、配列特異的リプレッサー-オペロンの相互作用であることが確認される。野生型配列への結合間のシグナル強度が変異配列と比較して100倍異なることにより、ハイドロゲルマトリックス内に固定した2本鎖DNAに対する反応の特異性が確認される。

【0068】

実施例5. バイオチップ上の蛋白質-DNA相互作用

この実験では、重合および固定化の前に、2本鎖DNAを予備ハイブリダイズし、次いで標的蛋白質を結合させる。

【0069】

2本鎖(ds)DNAバイオチップは、プリントした5'アミノ修飾予備ハイブリダイズdsDNAによって直接作製することもできる。この方法は、1本鎖DNAをプリントした後に同種のオリゴヌクレオチドをこのプリントしたオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせて結合要素を形成した、今までの実施例とは異なる。

【0070】

この実施例では、53kD蛋白質であるエストロゲン受容体(ER)はホモダイマーとして共通のエストロゲン応答要素(ERE)に結合する。野生型ERE配列は、受容体と結合するために重要であることが知られている領域の4個のヌクレオチドが変異配列と異なっている。野生型配列は、配列5'-tttacggtagaggtcactgtgacctctaccg-3'の32塩基のオリゴマーである。変異配列は4個のオリゴヌクレオチド(下線)が異なっており、配列5'-tttacggtagaggtcactgtatggctctaccg-3'を有する。プリント用のdsDNAを生成するために、関心のあるアミン結合オリゴヌクレオチドおよびその相補的オリゴヌクレオチドそれぞれの650 $\mu$ M保存液の5 $\mu$ lをDNAハイブリダイゼーション緩衝液、pH8(3X SSC、MgCl<sub>2</sub> 5mM)40 $\mu$ lで1:650(最終濃度65 $\mu$ M)に希釈して、最終反応量を50 $\mu$ lとする。反応生成物を95 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートし、次いで氷上で3分間冷却する。この2本鎖DNA 10マイクロリットルを、3.75%ポリマー、0.5%グリセロールおよび50mM ホウ酸ナトリウム緩衝液、pH8.0から成る

溶液を使用して450 $\mu$ mハイドロゲルスポット内にプリントする。PBST中の1%BSA溶液で1時間ブロックした後、ER濃度1.153 $\mu$ Mの形態の転写因子1 $\mu$ lを適当な緩衝液(10%グリセロール、HEPES 10mM、KCl 30mM、EDTA 0.1mM、DTT 0.25mM、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1mM、pH7.9)で希釈して、dsDNAを1時間室温で結合させ、次いでPBSTによる10分間洗浄を行った。ER-ERE複合体を次に1:100に希釈したウサギ抗ER抗体でRTで1時間インキュベートし、次にPBSTで30分間洗浄した。次に1:1000に希釈したヤギ抗ウサギIgG-Cys複合体でRTで1時間インキュベートし、次にPBSTで30分間洗浄した。実験全体を図5に図式で示す。このスライドをdH<sub>2</sub>Oで洗浄し、ScanArray Liteスキャナで画像化する前に空気乾燥した。シグナル分析は、Array Pro 4.0ソフトウェアを使用して実施した。対照が類似している変異配列シグナルと比較して野生型配列を含有するスポットで観察されたシグナルが増大していることによって、ハイドロゲルマトリックス内でエストロゲン受容体の標的配列に対する結合特異性が保持されていることが示唆される。

10

## 【0071】

## 実施例6. 抗原バイオチップ

この実験は、ハイドロゲル基盤はさらに他の結合要素、たとえば抗原を結合するマトリックスとして使用できることを示す。抗体-抗原相互作用は、通常種々の生物学的アッセイにおいて使用され、(抗体または抗原の)いずれかの成分を結合する能力は支持体として望ましい特性である。この実施例では、抗原をハイドロゲル内に結合させる。

20

## 【0072】

実施例1で説明した方法を使用して、蛋白質抗原、ヒトトランスフェリン(0.2mg/ml)を、5%トレハロースを有する3.3%ハイドロゲル、BSA 2mg/mlで様々に希釈して、直接アミンコーティングしたスライドガラス上に固定した。5%無脂肪ドライミルクでブロックした後、スライドを種々の濃度の抗ヒトトランスフェリンを含有したマウス腹水液で1時間インキュベートした。インキュベート後、スライドをPBSTで10分間3回洗浄した。結合したマウス抗トランスフェリン抗体は、スライドをCy3標識ロバ抗マウスIgGでインキュベートして視覚化し、次にレーザースキャナで画像化した。3オーダーの希釈度、すなわち0.1から0.001にかけて直線的な用量応答が認められた。この用量応答関係は、ハイドロゲル内に結合した抗原の機能、およびアッセイ方法全体の一部として、マトリックス中に段階希釈した抗体を支持するハイドロゲルの透過性を示している。

30

## 【0073】

## 実施例7. 抗体バイオチップ

前実施例で記したように、抗体-抗原反応は通常生物学的アッセイに使用される。この実施例では、実施例6で抗原を結合したのとは逆に、抗体をハイドロゲルマトリックスをハイドロゲル内に結合させる。

## 【0074】

実施1の方法に従って、抗ヒトトランスフェリン、抗BSAおよび抗PSA抗体(0.4~0.8mg/ml)を、アミノシラン化スライドガラス上の5%トレハロース、ウシIgG 2mg/mlおよび0.5%グリセロールを存在させた3.3%ハイドロゲルに固定した。次に、このスライドを、1%BSAを含有したPBST中1mg/mlの濃度のCy3標識した個々の抗原と室温で一晩インキュベートした。結合した蛋白質は、PBSTで何度も洗浄した後、レーザースキャナイメージングによって視覚化した。マイクロアレイ上の対応する抗体部位に標識標的蛋白質が存在することにより、ハイドロゲルマトリックス中で抗体機能が保持されていることが示された。

40

## 【0075】

## 実施例8. 多層ELISAアッセイ

より複雑な結合相互作用を支持する能力は、ハイドロゲルマトリックスに望ましい特性でもあり得る。この実施例では、抗体を第1結合要素として結合したハイドロゲルを使用す

50

る。次いで抗原を特異的に局在化し、続いて視覚化のために他の結合現象を加え、このことは蛋白質による多数の結合現象に関するハイドロゲルの生体適合性、および蛋白質機能維持の確認を示す。

【0076】

実施例1に概略を示した方法によって、ラット抗マウスIL-2モノクローナル捕捉抗体(BD、Pharmingen)を、アミノシラン化スライドガラス上の5%トレハロース、ウシIgG 2mg/mlを有する3.3%ハイドロゲルに直接固定した。このスライドをフィットヘマグルチニン刺激マウスLBRM-33 4A1細胞または未刺激細胞の希釈培養液と、適度に混合しながら室温で1時間インキュベートした。PBST15分洗浄を2回行った後、スライドをビオチン化ラットモノクローナル抗マウスIL-2検出抗体(BD、Pharmingen)と室温で1時間インキュベートした。遊離抗体は、PBST15分洗浄を3回行うことによって除去した。その後、西洋ワサビペルオキシダーゼ複合ストレプトアビジンをこのスライドに添加し、室温でさらに1時間インキュベートした。推奨プロトコールに従ってストレプトアビジン-HRPを徹底的に洗浄した後、TSA試薬系のCy3チラミド基質を、プリントしたスポットが完全に覆われるようにこのスライドに添加する。未反応基質を洗浄後、スライドをレーザースキャニングによって分析する。蛍光シグナルが8倍増加したことによって、ハイドロゲル内に結合された抗体によって結合した抗原の存在が示された。

10

【0077】

実施例9. 多層小分子媒介(CaM/カルシニューリン)

20

複数の蛋白質間の複合した総合作用は、支持体表面上で実施することが困難であることが多い。しかし、以下の実施例は、小分子によって媒介される多数蛋白質相互作用の使用を示しており、図6に図示する。

【0078】

実施例1の方法によって、実施例1の方法と同様にマウス抗ウシ脳カルシニューリンモノクローナル抗体(0.4mg/ml、Sigma)、ヒツジ抗ウシカルモジュリン抗体(0.2mg/ml、Chemicon)および対照ウシIgG(0.4mg/ml)をそれぞれ、アミンコートしたスライドガラス上の5%トレハロース、ウシIgG 2mg/mlを有する3.3%ハイドロゲルに直接固定した。その後、スライドを5%粉乳でブロックした後、20mM HEPES(pH7.6)、KCl 130mM、0.1%トリトンX-100、ポリグルタミン酸 10μg/ml中のウシカルシニューリン0.1mg/mlでインキュベートした。Cy3-標識ニワトリカルモジュリンをPBST、1%BSA中のCaCl<sub>2</sub> 1mMまたはEGTA 5mMの存在下で、室温で1時間カルシニューリン処理スライドに結合させる。結合したカルモジュリンをレーザースキャニングによってCy3励起発光波長で視覚化した。抗カルシニューリン抗体の位置のシグナル強度が、カルシウムの存在下でカルシウム無し(すなわち、EGTA存在下)の6倍に増加したことによって、ハイドロゲルが蛋白質および小分子の両方を含む複合生体分子相互作用を支持する能力を有することが示される。

30

【0079】

実施例10. チロシンリン酸化ペプチドのバイオチップによる特異的検出

40

ハイドロゲルマトリックスは、非常に広範な結合要素およびアッセイ形式に適合する。この実施例では、ペプチド結合要素内のリン酸化アミノ酸の使用を示す。

【0080】

各ペプチドを濃度40μMで、4連ずつ2対でスライド上に並べてプリントした。実施例1の方法によって、0.5%グリセロールを含有した3.5%HYPOL(商標)中にペプチドを固定した。以下の表1に挙げたペプチドをスライドにプリントした。

【0081】

【表1】

表 1

番号	基質	アミノ酸配列
1	インシュリン受容体断片	NH-thr-arg-asn-ile-pTyr-gln-thr-asn-tyr-tyr-arg-lys-OH
2	PTP 基質 II	NH-asp-ala-asp-glu-pTyr-leu-ile-pro-gln-gln-gly-OH
3	PTP 基質 I	NH-glu-asn-asp-pTyr-leu-ile-asn-ala-ser-leu-OH
4	インシュリン受容体断片	NH-thr-arg-asn-ile-tyr-gln-thr-asn-tyr-tyr-arg-lys-OH
5	pp60 c-src (521~533)	NH-thr-ser-thr-gly-pro-gln-tyr-gln-pro-gly-glu-asn-leu-OH
6	pp60 c-src (521~533) (リン酸化)	NH-thr-ser-thr-glu-pro-gln-pTyr-gln-pro-gly-gly-asn-leu-OH
7	PDGF 受容体基質	NH-ser-val-leu-pTyr-thr-ala-val-gln-pro-asn-glu-OH
8	pp60 (v-src) 自動リン酸化部位	NH-arg-arg-leu-ile-glu-asp-asn-glu-pTyr-thr-ala-arg-gly-OH
9	RrreepSEEEAA- OH	NH-arg-arg-arg-glu-glu-glu-pSer-glu-glu-glu-ala-ala-OH
10	アンジオテンシン II 基質	NH-asp-arg-val-pTyr-Ile-his-pro-phe-OH
11	pp60C-src	NH-thr-ser-thr-glu-pro-gln-tyr-gln-pro-gly-glu-asn-leu-OH
12	RR-SRC	NH-arg-arg-leu-ile-glu-asp-ala-glu-tyr-ala-ala-arg-gly-OH
13	SRC キナーゼ 基質	NH-arg-arg-leu-ile-glu-asp-ala-glu-pTyr-ala-ala-arg-gly-OH
14	PDGF 受容体 基質	NH-asn-pTyr-ile-ser-lys-gly-ser-thr-phe-leu-OH
15	抗エストロゲンホスホ ペプチド	NH-cys-asn-val-val-pro-leu-pTyr-asp-leu-leu-leu-glu-OH
16	チロシナーゼ 基質	NH-arg-arg-leu-ile-glu-asp-asn-glu-thr-thr-ala-arg-gly-OH
17	チロシナーゼ 基質	NH-arg-arg-leu-ile-glu-asp-ala-glu-thr-ala-ala-arg-gly-OH
18	レトロウイルスプロテアーゼ 基質	NH-thr-phe-gln-ala-tyr-pro-leu-arg-glu-ala-OH
19	アンジオテンシン II 基質	NH-gly-gly-val-tyr-val-his-pro-val-OH
20	アンジオテンシン I	NH-asp-arg-val-tyr-ile-his-pro-phe-his-leu-OH

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 2 】

慣用の略号、p T r y = ホスホチロシンおよび p S e r = ホスホセリンを使用している。

## 【 0 0 8 3 】

以下のインキュベーション工程全てにおいて、スライドガラスをスライドガラス染色皿中のロッカー上でインキュベートした。ペプチドバイオチップを1% B S A ( 0 . 1 % トリトン X - 1 0 0 を含有する P B S 中) で室温で60分間ブロックして、次に1% B S A を含有する P B S T で 1 : 2 0 0 0 に希釈したビオチン化抗ホスホチロシン抗体と4 時間で一晚インキュベートした。室温で P B S T で 1 0 分間、2 回洗浄し、このスライドを1% B S A を含有する P B S T で 1 : 2 0 0 0 に希釈した C y 3 標識ストレプトアビジンとインキュベートした。その後、スライドを室温で P B S T で 1 5 分間、3 回洗浄した。蒸留水

で軽く洗浄した後、スライドを空気乾燥し、G S I Lumonics スキャナを使用してスキャンした。その結果から、ホスホチロシンを含有する箇所では蛍光シグナルが存在し、ホスホセリンを含有する箇所を含む他の箇所には存在しないことが示され、ハイドロゲルに結合したイソシアネートにもかかわらず、ホスホペプチドは適当な天然の構造を保持し、抗体によって認識されることが示された。

#### 【0084】

実施例11. チロシンホスファターゼを有するバイオチップ上でのチロシンリン酸化ペプチドの脱リン酸化

前記の実施例において、長期に渡る(分または時間)特性の結合相互作用を支持するためのハイドロゲルマトリックスの使用について例証した。以下の実験は、マトリックスが、酵素活性に關与する結合相互作用など一時的な結合相互作用をも支持することを示している。この実施例では、ホスホペプチド基質は、ハイドロゲルマトリックス内に結合されており、次いでリン酸基を除去する酵素の基質として働く。次に、残存するリン酸基を実施例10の方法を使用して検出する。

#### 【0085】

実施例10で説明したのと同じ実験方法を使用して、プリントしたスライドを、供給された反応緩衝液(1X LAR緩衝液: 25mM Tris-HCl、NaCl 50mM、Na<sub>2</sub>EDTA 2mM、ジチオスレイトール 5mM、0.01% Brij-35、pH7.0、25。1X YOB緩衝液: 50mM Hris-HCl、NaCl 100mM、Na<sub>2</sub>EDTA 2mM、ジチオスレイトール 5mM、0.01% Brij-35、pH7.0、25)中の白血球抗原関連(LAR)蛋白質チロシンホスファターゼ6単位またはエルシニアエンテロコリチカ(YOP)蛋白質チロシンホスファターゼ6単位で、430μLのチャンパー内において室温で10分間インキュベートした。その後、チャンパーを取り除き、スライドガラスをスライドガラス染色皿に移した。スライドを室温でPBSTによるペルバナジン酸ナトリウム(汎用チロシンホスファターゼ阻害剤)1mM溶液で2×10分洗浄した。その後、実施例10で説明したように、スライドを1%BSAでブロックして、ピオチン化抗ホスホチロシン抗体でインキュベートして、Cy3-ストレプトアビジンを結合させた。実施例10で早期に観察された蛍光シグナルの損失によって、ホスホリラーゼ酵素がハイドロゲルに入り、生物学的活性を維持し、かつ1つまたは複数の基質、すなわち結合されたホスホペプチドとの一時的な相互作用を維持する能力があることが示された。より詳細には、この結果によって、LAR-PTPアーゼが選択的にリン酸基をペプチド番号1から実質的に完全に除去するが、pTyrを含有する残存ペプチドではより少ない程度除去されることが示される。YOB-PTPアーゼ酵素はペプチド番号1、3、6、8および13からリン酸基を実質的に完全に除去する。この酵素は、ペプチド番号2、7、10、14および15からリン酸基を有意に除去し、すなわちそれらのペプチドについてLAR-PTPアーゼが除去するより大きい程度で除去する。したがって、蛍光が種々のホスホペプチドから得られたことによって、ある種のホスホペプチド配列に対する2種のホスホリラーゼ酵素の一部に対する選択的特異性が示された。

#### 【0086】

実施例12. 金属キレート剤

結合要素の起源は生物である必要はなく、種々の合成分子も使用することができる。この実施例では、蛋白質分子内に存在する多数のヒスチジン分子に結合するために役立つ金属キレート剤をハイドロゲルマトリックス内で金属イオンの結合のために使用する。

#### 【0087】

Ni<sup>++</sup>またはCu<sup>++</sup>NTAハイドロゲルは、種々の量のニトリロ三酢酸とHYPOL(商標)溶液を混合して生成し、スライドガラス上にスポットする。重合したゲルスポットをdH<sub>2</sub>O中の酢酸50mMで洗浄し、Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>またはNi(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 50mMを添加する。次いで、これらをKNO<sub>3</sub> 0.1Mを含有するdH<sub>2</sub>O中の酢酸50mM(pH 4.0)で洗浄して、最後にdH<sub>2</sub>Oで洗浄した。6xHisタグを付

10

20

30

40

50

けた緑色蛍光蛋白質  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  (1% BSA を含有する PBS-T 中) をスライドに添加し、未結合の遊離  $6 \times \text{His} - \text{GFP}$  を除去後、自家製 CCD カメラによって、適当な励起、発光フィルタを使用して PBS 中で画像化した。キレート剤の増加に対応して蛍光シグナルの増加が認められ、ハイドロゲルマトリックスにおいて媒介結合剤として小分子が使用できることを示している。

【0088】

実施例 13 . バイオチップ上の  $\alpha - 2 - \text{マクログロブリン} - \text{トリプシン}$  相互作用 (電界をベースとした添加)

アルファ - 2 - マクログロブリンは、特異的にプロテアーゼに結合して中和を行うために血液中を循環する大きな血漿蛋白質 ( $m_w \quad 800000$ ) であり、この機構によって過剰なプロテアーゼ活性から体が保護され、特に「消化」自体から体が保護される。アルファ - 2 - マクログロブリンやトリプシンなどのプロテアーゼとの関係は非常に強く、アガロースビーズに固定されたアルファ - 2 - マクログロブリンはトリプシンおよびその他のプロテアーゼをアフィニティ精製するために使用されている。

10

【0089】

3 組のハイドロゲル微小滴をアミン誘導体化したガラスにスポットした。このスライドガラスを、1% BSA ( $10 \text{mM}$  リン酸ナトリウム緩衝液および  $\text{NaCl} \quad 150 \text{mM}$  (PBS)、 $\text{pH} 7.4$ ) で室温で 2 時間処理して、非特異的結合部位をブロックした。これが不十分であると、いくらかのフルオレセイン標識蛋白質が非特異的に結合し、したがってシグナル対ノイズの割合の上昇が引き起こされよう。ハイドロゲルは、イソシアネート官能性 HYPOL (商標) を含むプレポリマーから構成される。重合は水性溶液で開始し、重合動力学を  $\text{pH}$  および温度によって制御した。ハイドロゲル微小滴それぞれは、 $\text{CO}_2$  ガス発生による混濁を回避するために制御された速度で重合するようにされ、マイクロアレイの 1 セルを形成する。このようなハイドロゲルセルの第 1 組は、 $5 \text{mg}/\text{mL}$  PBS の濃度の溶液  $50 \mu\text{L}$  を使用して  $\alpha - 2 - \text{マクログロブリン}$  と共に添加される。高分子量の  $\alpha - 2 - \text{マクログロブリン}$  はハイドロゲル小滴中への迅速な拡散を制限し、小さな電極系によって流される弱電流 ( $2.5 \sim 5 \text{mV}$ ) を用いることにより拡散速度は増大する。 $\alpha - 2 - \text{マクログロブリン}$  が一旦ハイドロゲル小滴内に拡散すれば、その後小滴から著しく拡散することが大きな分子量によって回避される。トリプシンに結合しないことが知られている陰性対照蛋白質を形成するためにフェリチンを使用する。フェリチンは、同電極系および同条件下における弱電流を使用してハイドロゲル小滴の第 2 組中に同様に拡散する。第 3 組の小滴は蛋白質では処理せず、他の陰性対照として使用する。次に、3 組の小滴全てを FITC 標識トリプシンで約 15 分間曝露し、1% BSA - PBS、 $\text{pH} 7.4$  で約 5 分間から 20 分間洗浄する。蛍光強度を CCD カメラで測定し、結果を表 2 に示す。

20

30

【0090】

【表 2】

表 2. FITC-トリプシンの  $\alpha - \text{マクログロブリン}$  に対する特異的結合

固定蛋白質	蛍光強度 (au)
$\alpha - 2 - \text{マクログロブリン}$	800
フェリチン	20
蛋白質なし	10

40

【0091】

この結果から、FITC - 標識トリプシンはハイドロゲル小滴内で天然のリガンド、 $\alpha - 2 - \text{マクログロブリン}$  と特異的に結合し、陰性対照蛋白質フェリチンおよびハイドロゲル自体のいずれにも結合活性はほとんど検出されないことが示される。

50

## 【 0 0 9 2 】

本発明は、本発明者等によって現在最良と考えられるモデルを含むいくつかの異なる実施形態に関して説明されているが、添付した特許請求の範囲に記載された本発明の範囲から逸脱することなく変化および改変が可能であることは、当業者には明らかであることが理解されよう。たとえば、特定の蛍光体、たとえばFITCおよびCy3を使用したか、その他の蛍光体またはその他のレポーターを代わりに使用することができる。異なる非ハイブリダイゼーション結合要素を有する複数のセルを含むバイオチップを使用することは有利であるが、場合によっては単一のセルのバイオチップが適している可能性がある。

## 【 0 0 9 3 】

本発明の詳細な特徴は、前述の特許請求の範囲において重視して記載している。

10

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 図 1 】

本発明の種々の特徴を具体的に示した方法の一部として、有機溶媒中におけるヒドロゲルと蛋白質との反応、その後のヒドロゲルの重合を示した図である。

## 【 図 2 】

ヒドロゲル重合の際の水中でのヒドロゲルプレポリマーと蛋白質との別の反応を示した図である。

## 【 図 3 A 】

ヒドロゲルプレポリマーとキレート剤との別の反応、その後の金属のキレート化、およびその後の尾部に複数のヒスチジン基を含んだ蛋白質との結合を示した図である。

20

## 【 図 3 B 】

ヒドロゲルプレポリマーとキレート剤との別の反応、その後の金属のキレート化、およびその後の尾部に複数のヒスチジン基を含んだ蛋白質との結合を示した図である。

## 【 図 4 A 】

実施例 4 で記述した実験を表した図である。

## 【 図 4 B 】

実施例 4 で使用した 2 つの 1 本酸核酸配列を表した図である。

## 【 図 5 】

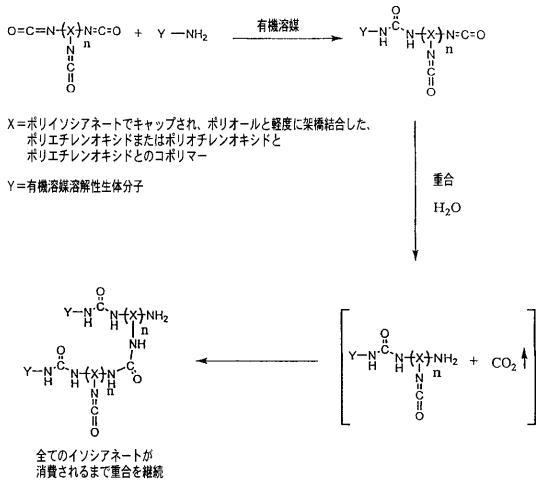
実施例 5 で実施した実験を表した図である。

## 【 図 6 】

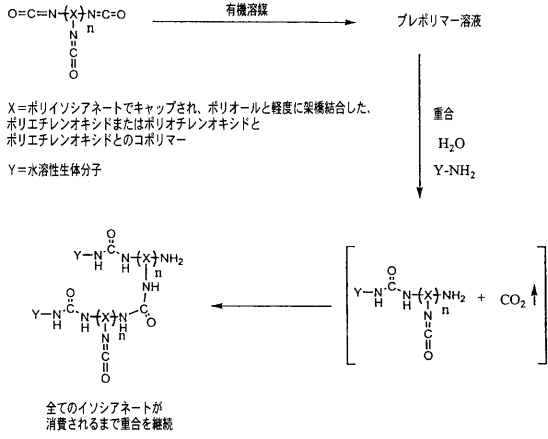
実施例 9 で実施した実験を表した図である。

30

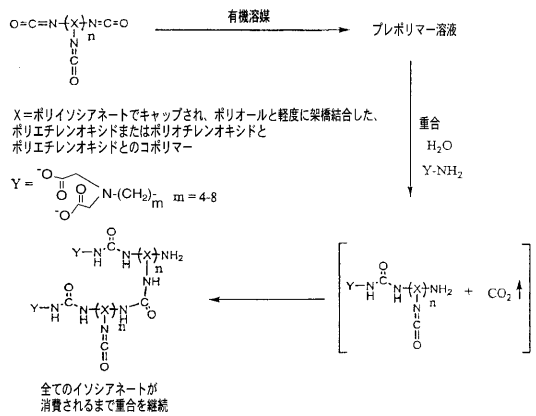
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 A 】

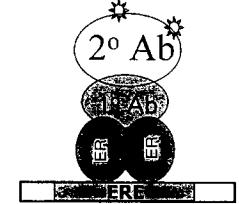


【 図 4 B 】

野生型 tctaacacccgctgcctattgactattttacctctggcggatgataatgg

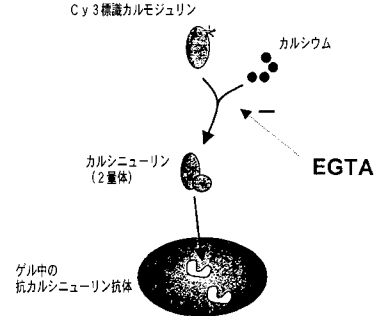
変異型 tctaacacccgctgcctattgactattttacctctggcggatgaaaatgg

【 図 5 】

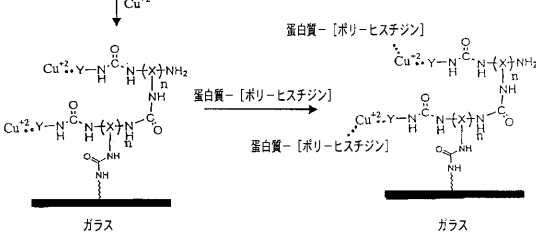


ER: エストロゲン受容体  
 ERE: エストロゲン応答要素

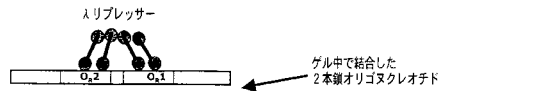
【 図 6 】



【 図 3 B 】



【 図 4 A 】



## 【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  
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/059372 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68 (74) Agents: SAMPLES, Kenneth, H. et al.; Flich, Even, Tabin & Flannery, Suite 1600, 120 South LaSalle Street, Chicago, IL 60603 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/51265
- (22) International Filing Date: 26 October 2001 (26.10.2001) (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/243,699 26 October 2000 (26.10.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BIOCEPT, INC. [US/US]; 2151 Las Palmas Drive, #C, Carlsbad, CA 92009 (US).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

## (72) Inventors; and

- (75) Inventors/Applicants (for US only): FAGNANI, Roberto [US]; 8971 Caminito Fresco, La Jolla, CA 92037 (US). HAHN, Sonnikap [KR/US]; 511 Via Dellina, San Clemente, CA 92672 (US). DONG, Xiaofan [US/US]; 1044 Agate Street, #8, San Diego, CA 92109 (US). PIRCHER, Tony [SE/US]; 8453 Florissant Court, San Diego, CA 92129 (US). MATSUMOTO, Sandra [US/US]; 7655 Palmilla Drive, #4411, San Diego, CA 92122 (US). TSINBERG, Pavel [US/US]; 5370 Teacan Way, H-118, San Diego, CA 92122 (US).

## Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/059372 A2

(54) Title: THREE DIMENSIONAL FORMAT BIOCHIPS

(57) Abstract: A biochip is formed with a plurality of optically clear hydrogel cells attached to the top surface of a solid substrate in the form of an array. Each of the cells is formed of a hydrogel of polyethylene glycol, polypropylene glycol or a copolymer thereof having reactive isocyanate groups. Nonhybridization binding entities are immobilized in these cells, which entities are effective to selectively sequester a target protein or other comparable biomolecule. Different binding entities are immobilized in different cells to create a biochip that can be used to assay for a number of target biomolecules.

**THREE DIMENSIONAL FORMAT BIOCHIPS****Field of the Invention**

Microarrays consisting of immobilized nucleic acids, such as DNA, have demonstrated tremendous utility in the high throughput analysis and characterization of biological samples. Through analysis of such samples using the multiple combinations of biological probes on nucleic acid biochips, information is derived regarding the sample's nucleic acid components. Such biochips may be formed using simple flat plates, e.g. glass slides, or using plates having depressions or wells formed therein. Typically, various sequences of nucleic acid oligomers, DNA, i.e. single strand DNA, RNA or PNA, are immobilized in a form in which they will then hybridize to complementary sequences from the sample, see U.S. Patent No. 6,242,246. Due to the specificity of such hybridization and the ability to rapidly examine many combinations of nucleic acid sequences, the derived data is useful in the determination of gene expression and sequence characteristics from a sample. Such data can be a key element in the determination of the genetic base of disease mechanisms and the identification of potential diagnostic and therapeutic targets.

Nucleic acid microarray methodology takes advantage of available DNA synthesizers, PCR methods, and developing genetic target information. There would be prospective interest in extending the use of such microarrays to immobilize other binding entities of biological interest, e.g. antibodies or other proteins which might then be used to allow other high throughput analysis using nonhybridization based interactions, which could potentially provide a route to new biological insights not readily be deducible from the use of nucleic acid microarrays.

However, one would expect to encounter difficulty in fabricating a biochip that could appropriately anchor a number of different binding entities, such as proteins and peptides, as compared to nucleic acid biochips. Immobilization chemistries normally used to anchor materials such as proteins frequently lead to denaturation of these materials due to adherence or direct contact with the solid support surface. Furthermore, attachment chemistries may also be restrictive as a result of multiple, competitively active moieties that are present on many binding entities such as proteins, which is not an issue with nucleic acids, and it is well known that the conformation of many other

WO 02/059372

PCT/US01/51265

binding entities, such as proteins, is key to preserving their biological activity and can be easily disrupted by immobilization through multiple moieties on the molecule.

Such potential loss of activity would also be even more important in a situation such as this where the detection of target proteins will be inherently more difficult because of the unavailability of DNA amplification methods, such as the polymerase chain reaction (PCR). That is, in many situations, only very limited quantities of binding entities, such as proteins isolated from tissue samples, are available, and the inability to reproduce larger quantities of these materials in an easy and convenient fashion, as can be done with nucleic acids, will deter such analysis.

10 **Background of the Invention**

Presently, there are a number of known methods for use in studying protein-ligand, protein-protein, protein-DNA interactions. These methods all possess significant limitations, in that they are either cumbersome, expensive, require large amounts of proteins or are not suitable for the rapid high throughput analysis of protein interactions.

15 An early method used to study protein interactions is the protein-affinity column. With this method, the capture protein is covalently immobilized to agarose beads and used to affinity-purify a target protein from a heterogeneous mixture containing many contaminating proteins through the use of affinity chromatography. This method requires relatively large amounts of capture proteins for suitable immobilization to agarose beads, and it is not suitable for the rapid high throughput screening of protein interactions.

A further method used to study protein interactions is the yeast 2-hybrid system. With this method, a target protein library is constructed in yeast. This system is designed to express these proteins of interest, with each being linked to a transcription activating region. DNA encoding for a bait protein (or a protein being examined for possible other interacting proteins) is fused to a DNA binding domain and is also expressed in the same library. A reporter gene carrying the corresponding DNA sequence is also included which codes for a detection system, such as a fluorescent protein or a protein with easily detectable biological activities. Upon binding of the target protein of interest to the bait protein, the consequent interaction of the two achieves activation of the reporter gene and results in signal generation. Even though

WO 02/059372

PCT/US01/51265

this method may relatively frequently be used, it is slow and cumbersome, requires significant molecular biology expertise, and does not lend itself to the rapid, high throughput screening of protein-protein interaction in an economical way.

Another early method commonly employed to study protein interactions is immunoprecipitation of both the capture and the target protein, followed by analysis of the resulting complex using polyacrylamide gel electrophoresis. With this method, the capture protein is first incubated with a heterogeneous mixture of proteins allowing it to bind to its target. The resulting complex is then immunoprecipitated using antibodies raised against one protein of the pair, and the complex is separated for analysis by gel electrophoresis and followed by a detection step, e.g. staining by dye. This method is slow and cumbersome, requires significant biochemistry expertise, and likewise does not lend itself to the rapid high throughput analysis of protein interactions.

Another method used to study protein interactions is phage display. With this method, a library of proteins is expressed on the flagella of certain filamentous phage proteins expressed on the surface of a host bacterium, e.g. *E. coli* so as to provide an affinity support for such "displayed" proteins. The phage library is then exposed to a number of potential target proteins. The binding of the displayed protein to the target protein allows target identification. This method has a number of limitations, e.g. large molecular weight proteins are difficult to display, and only very few of a phage's filamentous proteins are appropriate for such use. In addition, conformational constrictions of the displayed protein have been known to decrease its affinity and consequently affect its ability to bind to its natural ligand.

The fabrication of a high-throughput-capable microarray or biochip suitable for binding such entities, e.g. proteins, will generally require the use of a method to attach proteins to the surface in a manner so that they may thereafter be used for detection by readily interacting with other materials or molecules of interest, e.g. proteins, commonly referred to as targets. For example, proteins may be bound directly to a surface treated with divalent or trivalent metal ions, such as  $\text{Cu}^{2+}$  or  $\text{Fe}^{3+}$ , to which proteins will naturally bind with varying degrees of affinity. If targets then bind to the probes, they can be detected and identified by SELDI<sup>TM</sup> (surface-enhanced laser desorption/ionization) in combination with a mass spectrometer, as described in US Patent 5,719,060. In an alternative method described by G. MacBeath and S. Schreiber

WO 02/059372

PCT/US01/51265

(*Science* 289:1760, 2000), chemical binding is also used to attach proteins to a substrate surface, while target ligands are labeled with fluorescence tags; thus, any interaction between probes and labeled targets can be detected using a fluorescence-based slide scanner.

5 Because the above methods of protein immobilization to provide binding entities generally employ direct chemical conjugation of proteins onto the surface of a substrate, these methods embody a major limitation in resultant loss of protein function, due either to inappropriate chemical conjugation at active sites or to loss of original conformation. When such occurs, only a low amount of immobilized protein remains active and results  
10 in detection difficulties and low assay sensitivity. In addition, the complexity and lack of precision of these methods generally render them unsuitable for use in fabrication of high-density microarrays for high throughput use.

U.S. Patent No. 6,087,102 describes a method which utilizes a polyacrylamide gel to create individual cells, composed of the electrophoresed protein spots, which can  
15 be subsequently crosslinked *in situ* into the gel to form a biochip. Limitations of the method include difficulties in preparing precise, small cells on the biochip and in potential destructive effects on the capture protein during crosslinking. U.S. Patent No. 5,847,019 describes another approach which utilizes photopolymerizable polymers to  
20 form a patterned network layer to fabricate a biochip, using light-reactive free-radical chemistry. This photoactivation approach used for the immobilization of proteins to a biochip appears limited to certain photoactivation chemistries involving acrylamide polymers, and moreover, the use of free radical photochemistry may cause potential free radical damage to the capture proteins being used in biochips fabricated in such fashion.

The use of isocyanate-capped liquid polyurethane prepolymers to directly react  
25 with proteins to immobilize proteins within polyurethane foams is described in U.S. Patents Nos. 4,098,645 and 3,672,955 which teach the use of isocyanate-functional hydrogel systems to bind proteins directly through their amino and hydroxyl sites to thereby form enzyme reactors and antibody/antigen based affinity columns. While the described methodology may be suitable for such purposes, these processes do not form  
30 optically clear hydrogels of controlled geometry which would be suitable for biochip use. Additionally, using such methods without inhibiting potential conjugation to protein side chains may very likely cause undesirable crosslinking of the protein to the

WO 02/059372

PCT/US01/51265

polymer, and extensive crosslinking may diminish or destroy the native conformation of the protein and thus reduce the bioactivity of the protein which would render such process unsuitable for high precision binding assays for which biochips are used.

5 Despite these technical hurdles, the importance of understanding protein-protein and other comparable biomolecular interactions has made the achievement of a practical, flexible format biochip, suitable for incorporation of a number of different nonhybridization binding entities, a desired tool for a variety of research and commercial applications in biological science. In short, there exists a need for an efficient anchoring or support system which provides support for entities in such a manner that they retain  
10 maximal binding activity, that would then allow for the construction of non-nucleic acid/hybridization-based microarrays.

Stated another way, it remains desirable to provide methods for enabling binding entities, such as proteins, to be immobilized or encapsulated in a manner which allows them to retain their native conformation and function so that they would be free to  
15 sequester targets.

#### Summary of the Invention

It has now been found that by providing an appropriate gel with desired immobilization chemistries, a microarray or biochip incorporating a multitude of different nonhybridization binding entities in an array in a three-dimensional format  
20 suitable for high-throughput analysis of biomolecular interactions and characteristics can be provided.

The present invention provides a biochip in the form of an array of optically clear PEG or PPG-based polymeric microdroplets arranged on a solid substrate, and it provides the capability of forming as many as 1,000 individual reaction cells per square  
25 centimeter. Each cell would typically contain at least one binding entity immobilized generally within the volume of the microdroplet or upon its surface. By altering the different binding entities in the cells in the array in a known fashion, an efficient screening of biological samples or compounds for binding interactions or activities can be performed and quantitated. These cells are preferably three-dimensional in form  
30 which maximizes the amount of binding entity contained in each and thereby maximizes detection sensitivity.

WO 02/059372

PCT/US01/51265

The polymeric microdroplet that forms each cell of such a biochip is selected to provide an environment conducive to retaining the native conformation of the immobilized binding entity, e.g. a protein or peptide. The resultant polymer is preferably a hydrogel that is physically and chemically stable so as to allow sequential washing and other liquid treatment steps and handlings that would be employed in the fabrication and use of a biochip. Polyethylene glycol-based prepolymers which have isocyanate-functional reactive groups are preferably utilized, and when polymerized, a polyethylene glycol hydrogel network is formed, extended and crosslinked by urethane linkages. After initiating the polymerization reaction, the prepolymer is microspotted onto a biochip substrate and allowed to fully polymerize, forming an array of three-dimensional reaction cells. The particular polymer chemistry for the cell has been described in U.S. Patent No. 6,174,683 and international patent application, WO 00/65097, which disclose biochips that use nucleic acid oligomers as hybridization capture probes. It has now been found that, as a result of further technical developments, polyethylene glycol, polypropylene glycol, or a copolymer thereof can be effectively employed in the fabrication of three-dimensional biochips suitable for containing a variety of nonhybridization binding entities, including proteins and peptides.

In one specific aspect, the invention provides an optically clear hydrogel biochip comprising (a) a solid substrate having a surface; (b) at least one optically clear hydrogel cell attached to the surface of the substrate, which hydrogel cell is formed from an isocyanate-functional polymer; and (c) a nonhybridization binding entity immobilized within or upon said hydrogel cell, which entity is effective to selectively sequester a target protein or other comparable molecule.

In another specific aspect, the invention provides a method of using a biochip to carry out a biochemical assay, which method comprises the steps of (a) providing an optically clear hydrogel biochip having a substrate with a surface to which at least two hydrogel cells are bound, each cell having a thickness of at least about 30  $\mu\text{m}$  and being predominantly comprised of polyethylene glycol, polyethylene glycol or a copolymer thereof, each said hydrogel cell including a different protein binding entity immobilized therewithin or thereupon, (b) contacting the hydrogel biochip with an analyte solution, containing a target biomolecule under binding conditions; (c) washing the hydrogel

WO 02/059372

PCT/US01/51265

biochip under conditions that remove non-selectively bound and unbound target biomolecule; and (d) detecting the target biomolecule bound to one of said cells.

In yet another specific aspect, the invention provides a method of preparing an optically clear isocyanate-functional hydrogel biochip having a nonhybridization binding  
5 entity immobilized therewithin or thereon, which entity is effective to selectively sequester a target protein or target biomolecule, the method comprising the steps of (a) providing an organic solvent solution of an isocyanate-functional hydrogel prepolymer; (b)  
10 providing a solution of said nonhybridization binding entity; (c) covalently binding said entity to the isocyanate-functional hydrogel prepolymer via reaction with not more than 15% of said reactive isocyanates; (d) initiating polymerization of the  
15 isocyanate-functional hydrogel prepolymers under conditions that will produce an optically clear hydrogel; and (e) dispensing the polymerizing isocyanate-functional hydrogel prepolymer in droplet form onto a solid substrate, such that an optically clear hydrogel polymer containing said binding entity is attached to said substrate.

In still another specific aspect, the invention provides a method of preparing an isocyanate-functional hydrogel biochip having proteins immobilized therein or thereupon which are chosen to function as capture agents, the method comprising the steps of (a) providing an organic solvent solution of an isocyanate-functional  
20 hydrogel prepolymer; (b) providing solutions of desired protein capture agents; (c) covalently binding intermediate coupling agents for said proteins to the isocyanate-functional hydrogel prepolymer; (d) initiating polymerization of said isocyanate-functional hydrogel prepolymer; (e) dispensing droplets of the polymerizing isocyanate-functional hydrogel prepolymer onto a solid substrate, such that said polymer becomes  
25 attached to said substrate; and (f) exposing individual hydrogel droplets to one of said desired protein solutions to immobilize said protein capture agents therein or thereupon via connection to said coupling agents, whereby said droplets polymerize to create a biochip having a plurality of cells with different protein captive agents.

In a further specific aspect, the invention provides a hydrogel biochip comprising (a) a solid substrate having a top surface; (b) a plurality of hydrogel cells  
30 comprising polyethylene glycol, polypropylene glycol, or copolymers thereof bound to the top surface of said substrate; (c) intermediate agents immobilized within or upon said hydrogel of said cells; and (d) different protein binding entities bound to said

WO 02/059372

PCT/US01/51265

intermediate agents within at least several of said hydrogel cells by interaction therewith in a manner so that said protein binding entities assume their native conformations.

In a yet further specific aspect, the invention provides a method of preparing an isocyanate-functional hydrogel biochip having a plurality of cells which have proteins  
5 immobilized therein or thereupon, the method comprising the steps of (a) providing an organic solvent solution of an isocyanate-functional hydrogel prepolymer; (b) initiating polymerization of the isocyanate-functional hydrogel prepolymer; (c) dispensing droplets of the polymerizing isocyanate-functional hydrogel prepolymer onto a solid substrate so that said droplets become attached to said substrate and form of a plurality  
10 of cells; and (d) physically immobilizing a different protein in or upon each of at least two of said cells, said proteins being chosen to function as binding agents that will selectively sequester a particular biomolecule.

#### **Brief Description of Figures**

FIG. 1 is a schematic illustrating the reaction of a hydrogel prepolymer with a  
15 protein in an organic solvent followed by polymerization of the hydrogel, as a part of a process embodying various features of the present invention.

FIG. 2 is a schematic illustrating an alternative reaction of a hydrogel prepolymer with a protein in water during polymerization of the hydrogel.

FIGS. 3A and 3B are schematic illustrations of another alternative reaction of a  
20 hydrogel prepolymer with a chelating agent, followed by chelating with a metal and subsequently binding with a protein that contains multiple histidines at its tail.

FIG. 4A is a schematic representation of the experiment described in Example 4.

FIG. 4B is a description of the two single stranded nucleic acid sequences used in  
Example 4.

25 FIG. 5 is a schematic representation of the experiment that is carried out in Example 5.

FIG. 6 is a schematic representation of the experiment that is carried out in Example 9.

WO 02/059372

PCT/US01/51265

**Detailed Description of the Preferred Embodiments**

Hydrogels are a class of polymers that can provide a gel matrix that preferably has adequate pore size and high water content to permit diffusion of molecules in and out of the matrix, an ability to bind to the surface of a glass or the like, sufficient optical transparency in a fully polymerized state to minimize any optical interference with fluorescent tags, good structural integrity when fully polymerized, and adequate shelf life for normal research and clinical use. Hydrogels are hydrophilic network polymers which are glassy in the dehydrated state and swell in the presence of water to form an elastic gel. Isocyanate-functional hydrogels possess a number of characteristics that can be used to advantage for the immobilization of nonhybridization binding entities, e.g. proteins. By isocyanate-functional hydrogels are meant organic polymers that are capped with isocyanate groups that will function to carry out a desired further polymerization and also covalently bind proteins or the like, or intermediates that in turn attach proteins. For example, polyurethane polymers, which are well known in the art and can be formed by reactions between diisocyanates and polyether or polyester polyols, can provide suitable hydrogels for this purpose.

Prepolymers are preferably used as a starting material to form biochips using these isocyanate-functional hydrogels, and preferably these prepolymers are formulated to provide hydrated polyurethane, polyurea-urethane and/or polyurea polymeric gels. Hydrogel polymers have been prepared from various prepolymers and used for a wide variety of other applications. Typically, hydrogels are formed by polymerizing a hydrophilic monomer in an aqueous solution under conditions such that a lightly cross-linked prepolymer is initially formed having a three-dimensional polymeric network which gels in concentrated form. Polyurethane hydrogels are formed by polymerization of isocyanate-end-capped prepolymers by the creation of urea and urethane linkages.

Suitable isocyanate-functional prepolymers are often prepared from relatively high molecular weight polyoxyalkylene diols or polyols which are reacted with bi-functional or multi-functional isocyanate compounds. The preferred prepolymers are made from polyoxyalkylene diols or polyols that may comprise homopolymers of ethylene oxide units or block or random copolymers containing mixtures of ethylene oxide units and propylene oxide or butylene oxide units. In the case of block or random copolymers, at least 75% of the units should preferably be ethylene oxide units. Alternatively, homopolymers of polypropylene oxide may also, but less preferably, be

WO 02/059372

PCT/US01/51265

employed. The polyoxyalkylene diol or polyol molecular weight is preferably from 2,000 to 30,000, and more preferably from 5,000 to 30,000. Suitable prepolymers may be prepared by reacting selected polyoxyalkylene diols or polyols with polyisocyanate, c.g. at an isocyanate-to-hydroxyl ratio of about 1.2 to about 2.2 so that essentially all of the hydroxyl groups are capped with polyisocyanate. The isocyanate-functional prepolymer preferably should contain active isocyanates in an amount of about 0.1 meq/g to about 1.2 meq/g, and preferably about 0.2 meq/g to about 0.8 meq/g. In general, a fairly low molecular weight prepolymer, e.g. less than 3,000 MW, should preferably contain a relatively high isocyanate content (about 1 meq/g or higher). The polymerization rate of such a prepolymer should be controlled so as not to polymerize too rapidly to effectively microspot, and in this respect, high molecular weight prepolymers containing a relatively low isocyanate content are generally preferred.

Such high molecular weight prepolymers are often prepared by either of two general methods, but others as known in the art can also be used: (1) a polyol (triol or higher) having a molecular weight of at least 2000, is reacted with a polyisocyanate such as isophorone diisocyanate, or (2) a diol having a molecular weight of at least 2000 is reacted with a polyisocyanate and a cross-linking agent, such as glycerol, trimethylolpropane, trimethylolethane, triethanolamine or an organic triamine.

Aromatic, aliphatic or cycloaliphatic polyisocyanates may be used. High molecular weight aliphatic isocyanate-capped prepolymers typically gel to a hydrated polymer state in about 20 to 90 minutes, whereas prepolymers capped with aromatic polyisocyanates gel much more rapidly. Examples of suitable bi- and multi-functional isocyanates are as follows: toluene-2,4-diisocyanate, toluene-2,6-diisocyanate, isophorone diisocyanate, ethylene diisocyanate, ethylidene diisocyanate, propylene-1,2-diisocyanate, cyclohexylene-1,2-diisocyanate, cyclohexylene-1,4-diisocyanate, phenylene diisocyanate, 3,3'-diphenyl-4,4'-biphenylene diisocyanate, 1,6-hexamethylene diisocyanate, 1,4-tetramethylene diisocyanate, 1,10-decamethylene diisocyanate, cumene-2,4-diisocyanate, 1,5-naphthalene diisocyanate, methylene dicyclohexyl diisocyanate, 1,4-cyclohexylene diisocyanate, p-tetramethyl xylylene diisocyanate, p-phenylene diisocyanate, 4-methoxy-1,3-phenylene diisocyanate, 4-chloro-1,3-phenylene diisocyanate, 4-bromo-1,3-phenylene diisocyanate, 4-ethoxyl-1,3-phenylene diisocyanate, 2,4-dimethyl-1,3-phenylene diisocyanate, 2,4-dimethyl-1,3-

WO 02/059372

PCT/US01/51265

phenylene diisocyanate, 5,6-dimethyl-1,3-phenylene diisocyanate, 1,4-diiisocyanatodiphenylether, 4,4'-diiisocyanatodi-phenylether, benzidine diisocyanate, 4,6-dimethyl-1,3-phenylene diisocyanate, 9,10-anthracene diisocyanate, 4,4'-diiisocyanatodibenzyl, 3,3'-dimethyl-4,4'-diiisocyanatodiphenylmethane, 1,6-dimethyl-4,4'-  
5 diisocyanatodiphenyl, 2,4-diiisocyanatostibene, 3,3'-dimethoxy-4,4'-diiisocyanatodiphenyl, 1,4-antracenediisocyanate, 2,5-fluoronediiisocyanate, 1,8-naphthalene diisocyanate, 2,6-diiisocyanatobenzluran, 2,4,6-toluene triisocyanate, p,p',p"-triphenylmethane triisocyanate, trifunctional trimer (isocyanurate) of isophorone diisocyanate, trifunctional biuret of hexamethylene diisocyanate, trifunctional trimer  
10 (isocyanurate) of hexamethylene diisocyanate, polymeric 4,4'-diphenylmethane diisocyanate, xylylene diisocyanate and m-tetramethyl xylylene diisocyanate.

Capping of the selected diols or polyols with polyisocyanates to form prepolymers may be effected using stoichiometric amounts of reactants. The isocyanate-to-hydroxyl group ratio may vary as known in this art but should preferably be about 1 to  
15 about 3, and more preferably about 1.2 to about 2.2. The capping reaction may be carried out using any suitable conditions, such as at about 20° to about 150°C, under dry nitrogen, for about 2 hours to about 14 days, and preferably in the absence of a catalyst. The preferred temperature is about 60° to 100°C, and the reaction terminates when the isocyanate concentration approximates theoretical values.

20 Preferred prepolymers include polyethylene glycol that is end-capped with toluene diisocyanate: a copolymer of ethylene oxide and propylene oxide (optionally with trimethylolpropane) and toluene diisocyanate; toluene diisocyanate-polyethylene glycol-trimethylolpropane, methylene diisocyanate-methylene homopolymer; polymeric  
25 methylene diisocyanate-polyethylene glycol; polymer of ethylene oxide-propylene oxide-trimethylolpropane and isophorone diisocyanate, and polyethylene glycol trilactate and toluene diisocyanate. Suitable prepolymers of the above types are available from Hampshire Chemical Corp. of Lexington, Mass. as HYPOL PreMA® G-50, HYPOL® 2000, HYPOL® 3000, HYPOL® 4000 and HYPOL® 5000, which formulations generally include copolymers of polyethylene oxide and a minor amount of polypropylene oxide.

30 All things considered, the main chain of the hydrogel polymer is preferably comprised of polyethylene glycol, polypropylene glycol, or a copolymer of polyethylene glycol and polypropylene glycol. While not to be constrained by any theoretical

WO 02/059372

PCT/US01/51265

mechanism, it is believed that the non-ionic, hydrophilic properties of polyethylene glycol and polypropylene glycol hydrogels provide for low levels of non-specific binding of analyte to the hydrogel and also for good compatibility with the immobilized biomolecules so as to maintain native conformation and bioreactivity thereof.

5 Isocyanate-functional hydrogels advantageously absorb large quantities of liquid quickly and in a relatively uniform manner such that the basic overall shape of the gel material is maintained. Further, the moisture absorbed by these materials is retained in the absorbent material even under an applied pressure. Polyurethane-based isocyanate-functional hydrogels of this general type are described in U.S. Patent Nos. 3,939,123  
10 (Mathews, et al.), 4,110,286 (Vandegaer, et al.) and 4,098,645 (Hartdegan, et al.). Such polyurethane-based hydrogels have been extensively used as surface coatings and to form flexible or rigid foams; they have also been used to form foams for enzyme reactor systems.

In a preferred embodiment, biochips are made using an isocyanate-functional  
15 hydrogel that is based on a diol or triol of a high molecular weight polyethylene oxide, polypropylene oxide, or a copolymer of polyethylene oxide and polypropylene oxide, capped with water-active diisocyanates, and which may be optionally lightly cross-linked with a suitable cross-linker. It is preferred that the quantity of active isocyanates present in the prepolymer is predictable, for example preferably between about 0.1 and  
20 about 1 meq/g, but more preferably not greater than about 0.8 meq/g. Generally preferred diisocyanates include aromatic-based diisocyanates, such as toluene diisocyanate or methylene diphenyl-isocyanate, as well as aliphatic diisocyanates, such as isophorone diisocyanate. Preferably, about 15% to about 5% of the reactive isocyanates in the polymer are used to provide sites for immobilizing binding entities,  
25 and more preferably 10% or less of the reactive isocyanates in the prepolymer are employed to immobilized binding entities. The polymerization of the prepolymer for biochip creation, which may be preformulated in a water-miscible organic solvent, takes place by the formation of urea linkages which occur upon the simple addition of water.

A binding entity can be directly or indirectly immobilized in each cell or  
30 microspot either prior to, during, or after polymerization of the cell material. Indirect immobilization contemplates the employment of an intermediate agent that is first linked to the hydrogel and possibly a second intermediate agent that is, in turn, linked to it. For

WO 02/059372

PCT/US01/51265

example, a first or primary intermediate agent that is encapsulated into the hydrogel matrix might be an antibody directed against calmodulin. Once calmodulin is bound to the antibody, the calmodulin serves as a second intermediate agent as it is utilized, in turn, to sequester calmodulin-binding-proteins, such as the calcium/calmodulin dependent kinase II. This approach to attaching CaM kinase II (as it is commonly referred to) to the hydrogel provides a gentle way of anchoring the protein via a naturally-occurring binding motif, i.e. through the calmodulin protein. The CaM kinase II is now free to probe analyte solutions, for example for the purpose of examining regulatory events on the CaM kinase II (phosphorylation, dephosphorylation) or for searching for possible docking proteins or other intracellular trafficking proteins. Alternative ways of anchoring the CaM kinase II may lead to its loss of function or to other deleterious effects.

The term binding entity is used to refer to material capable of interacting in a specific fashion with one or more target molecules to physically sequester them by a mechanism other than hybridization. These nonhybridization binding entities include, but are not limited to, biological material, such as proteins including receptors, peptides, enzymes, enzyme inhibitors, enzyme substrates, immunoglobulins, e.g. antibodies, antigens, lectins, modified proteins, modified peptides, double-stranded DNA, biogenic amines and complex carbohydrates; they may also include synthetic molecules, e.g. drugs and synthetic ligands, designed to have specific binding activity of this type. By "modified" proteins or polypeptides is meant those proteins or peptides having one or more amino acids within the molecule altered by the addition of new chemical moieties, the removal of existing chemical moieties or some combination of both removal and addition. This alteration may include both natural and synthetic modifications. Natural modifications include, but are not limited to, phosphorylation, sulfation, glycosylation, nucleotide addition, and lipidation. Synthetic modifications include, but are not limited to, chemical linkers to facilitate binding to the hydrogel, and the addition of fluorescent dyes, microstructures, nanostructures, e.g. quantum dots, or other synthetic materials. In addition, modification may include the removal of existing functional moieties, e.g. hydroxyl, sulfhydryl or phenyl groups, or the removal or alteration of native side chains or the polypeptide amide backbone. Examples of complex carbohydrates include, but are not limited to, natural and synthetic linear and branched oligosaccharides, modified

WO 02/059372

PCT/US01/51265

polysaccharides, e.g. glycolipids, peptidoglycans, glycosaminoglycans or acetylated species, as well as heterologous oligosaccharides, e.g. N-acetylglucosamine or sulfated species. Also included are synthetic modifications thereof, such as the addition of molecules such as drugs, ligands, dyes or other agents useful for the purpose of screening and quantitation. Examples of naturally-occurring complex carbohydrates are chitin, hyaluronic acid, keratan sulfate, chondroitin sulfate, heparin, cellulose and carbohydrate moieties found on modified protein such as albumin and IgG. Combinations of two or more of such entities might be immobilized at some locations on the microchip array, which combinations might be added as one mixture of two entities or may be added serially.

In describing the interaction between the immobilized entity and the target as sequestering or nonhybridization binding, it is meant that two or more molecules adhere or bind together in a specific and selective fashion, typically by covalent or non-covalent bonds (e.g., by van-der-Waals forces and/or ionic interactions). The specific target can be a simple molecule that may be present in a complex mixture of biological or synthetic materials. The sequestering or binding may be of an extended nature, e.g. covalent modification or antibody-antigen interaction, or it may be transient, e.g. as would occur during a phosphorylation event.

DNA binding entities include, but are not limited to, synthetic and natural double-stranded polymers of deoxyribonucleotides, synthetic and natural polyribonucleotides, aptamers, and synthetic polynucleotides having one or more modified or non-naturally occurring chemical entity. This use of DNA as a binding/sequestering agent is in contrast to conventional nucleotide hybridization arrays which typically employ single strands of DNA (oligonucleotides or cDNA) to which target DNA hybridizes. Double-stranded DNA might be employed to interact with (as opposed to hybridizing) a suitable biomolecule, such as a DNA binding protein, a transcription factor, e.g. estrogen receptor, or a synthetic drug or molecule, so as to bind or sequester that biomolecule. As an example, general transcription factors, such as TBP or SP1, or gene specific transcription factors, such as nuclear hormone receptors, can be attracted to and sequestered by helical, double stranded DNA. Aptamers are described in U.S. Patent No. 5,840,867 where they are indicated to function much like monoclonal antibodies.

WO 02/059372

PCT/US01/51265

Alternatively, an embodiment may employ an initial binding entity which is physically co-polymerized within the gel matrix, e.g. select antibodies or other selective binding agents, e.g. aptamers, wherein one or more different antibodies would be immobilized in each cell of an array. Upon subsequent application of a complex mixture of biological materials to such an array, the unique binding attributes of these immobilized antibodies within each cell will "self-sort" such a complex mixture and create a new array which "self-assembles"; the new array will be complementary to the initial binding entities. For example, an antibody against a specific antigen is immobilized within each gel microspot during polymerization; thereafter, specific protein or peptide antigens are provided to bind to each of the cognate antibodies by exposing a mixture of protein or peptide antigens to such an array. One example of the use of such an intermediate antibody array is to self-sort a complex mixture of proteins from cell extracts without requiring individual isolation of each protein. Such an array thus formed might then be employed to assess what the effect would be on each site of exposure to an added protein kinase or other protein-modifying moiety. This concept might be extended to examine whether such modifying activities would be influenced by drugs or other added chemical compounds.

As a further alternative, other binding entities may be located or anchored within a cell of a biochip array after polymerization through the use of intermediate agents that will be initially immobilized. For example, a suitable intermediate, such as Protein A, is immobilized during polymerization; thereafter, a desired immunoglobulin capture agent is bound to the immobilized Protein A by controlled exposure to the immunoglobulin in solution.

In still other embodiments, the initial immobilized binding entities may be subsequently modified. Such modifications may include (a) biological modifications, e.g. phosphorylation, glycosylation, acetylation, methylation, ubiquitination, lipid modification and ADP-ribosylation, or (b) non-biological modifications, e.g. fluorescent dye modification, biotinylation, alkylation and abnormal residue incorporation, as well as by conjugation with another protein or enzyme to yield an altered final form of the array. As yet another embodiment, double-stranded nucleic acid oligonucleotides (or polymers) are immobilized during polymerization; thereafter, the desired proteins are

WO 02/059372

PCT/US01/51265

bound to such nucleic acids by nucleic acid sequence-specific protein interaction, to produce a self-assembled protein-nucleic acid complex array.

By first reacting the prepolymer with the binding entity in an aprotic solvent, the binding entity is effectively immobilized onto the prepolymer, and this procedure may have a number of advantages in the preparation of the hydrogel. It may help to subsequently generate a homogeneous solution of the prepolymer in water, and it may also serve to slow down the generation of carbon dioxide during the polymerization step as lowering the viscosity of the polymerizing mixture allows CO<sub>2</sub> to slowly effervesce. In the polymerization of the polyurethane-based hydrogels, for example, some gaseous carbon dioxide is generated by the reaction of water with the isocyanate groups of the hydrogel prepolymer. Such reaction is illustrated in FIGS. 1 and 2, and it may be advantageous to control the generation of carbon dioxide gas and its escape from the gel when a biochip is prepared from such a prepolymer. If polymerization occurs too quickly in a highly viscous mixture, carbon dioxide gas which is generated is unable to escape and can become trapped within the gel. Such can result in a discrete foam matrix, which may be a problem for continuum of the gel matrix, and it may interfere with the optical transparency. In biochip design, the greater of the optical transparency, the more accurate will be the detection of fluorescence which would be indicative of successful binding to a target. One way of controlling the generation of carbon dioxide is by maintaining the pH at about 8.5 or below to control the reaction rate and thus the diffusion of carbon dioxide in the polymerizing solution.

A further advantage of derivatizing the hydrogel in an aprotic solvent is an enhancement of the optical clarity or transparency of the hydrogel by minimizing any precipitation of the prepolymer. Another way to achieve slow polymerization of the gel and, therefore, slow generation of CO<sub>2</sub>, to assure continuous and transparent gel matrix is to maintain the ratio of aprotic solvent to water at at least about 0.25 to 1 and preferably higher, e.g. 0.3 - 0.35 to 1. Derivatization and polymerization of the hydrogel is generally accomplished in about thirty minutes of such ratios. The quantity of binding entity bound to the prepolymer of any cells is easily adjusted by simply varying the amount of binding entity added to the reaction (for example, from about 10 fmol up to about 1 pmol of protein for each microdroplet), thereby permitting close control over the amount of binding entities immobilized within each hydrogel microdroplet.

WO 02/059372

PCT/US01/51265

Ease of diffusion of a prospective target molecule or other secondary binding entity through the gel to interact with an intermediate or primary binding entity immobilized within the gel matrix will be determined, in some part, by the percentage of hydrogel prepolymer in the solution that is employed. The '683 patent describes the employment of 5% solution of prepolymer for formulating hydrogel droplets; however, at 5% level, diffusion of larger molecules, such as proteins, into the polymerized hydrogel is slower than desired. It has now been found that a lower percentage of prepolymer, e.g. 3.5% is preferred to facilitate passage of larger biomolecules into the hydrogel. However, below about a 3% prepolymer solution, the resultant gel may lack sufficient structural integrity and/or adequate polymerization to be useful. Thus, for many applications, such as those employing antibodies as a visualization tool, the preferred range of polymer is felt to be between 3% and 5%. Other applications and uses, such as those for examining molecules smaller in size than a typical antibody, e.g. IgG (or larger, e.g. when the gel encloses or anchors microspheres), may respectively employ a higher or lower percentage of polymer in the solution.

When the hydrogel is first derivatized with protein and then deposited onto the solid substrate, after initiation and before completion of polymerization thereof, delivery may be accomplished by any convenient method; for example, a conventional microspotting machine which deposits gel to form an array of microdroplets may be used. While such a gel may inherently non-covalently attach to some substrates, a substrate surface is generally derivatized prior to addition of the hydrogel to achieve firm attachment of the gel to the substrate. For example, in one preferred embodiment where glass is used as the substrate, the glass is derivatized with amine prior to deposit of the polymerizing hydrogel. The polymerizing hydrogel, derivatized with protein, then binds strongly to the substrate when it is deposited onto the derivatized glass substrate, via reaction of some of its active isocyanate groups with amines now located on the surface of the glass. This provides covalent attachment of the hydrogel to the substrate, and preferably about 5% or less of the active isocyanate groups originally in the prepolymer are used for this function.

In certain embodiments, partial initial blocking of the binding entity may be preferred to maximize efficient immobilization of the binding entity. The reactivity of the isocyanate prepolymer with certain chemical moieties that a particular binding entity

WO 02/059372

PCT/US01/51265

may include, e.g. primary amines, may result in excess crosslinking between the binding entity and polymer, and such may lead to denaturation of the binding entity or may lower its binding affinity for its target compound. Such might be avoided or limited by protecting at least some of these moieties during polymerization; deprotection after  
5 polymerization would then return the functionality and utility of the binding entity within the array, i.e. de-blocking after polymerization would allow the binding entity to assume its native conformation. Such blocking/de-blocking may be accomplished by either covalent or non-covalent means. For example, when using antibodies as the binding entity, an antigen recognition site susceptible of becoming crosslinked to the  
10 polymer is incubated with an uncross-linkable peptide (or other epitope mimic) prior to mixing with the prepolymer. Such peptide or epitope mimic would protect the antigen recognition site from conjugation with the reactive isocyanate groups during the polymerization process. Following polymerization, such peptide would be released from the antibody, e.g., by brief exposure to acid, pH 3.0, thus re-exposing the antigen  
15 recognition site of the antibody. Similar mechanics can be employed to protect select sulfhydryl moieties or amines on binding entities; these could use well known reversible chemical derivatization to protect these functionalities while polymerization proceeds.

It is noted in the '683 patent that polyethylene glycol might be added as a thickening agent to facilitate a more linear expansion during polymerization. It has since  
20 been discovered that other compounds may be added to the hydrogel during polymerization to maintain the stability and native activity of the binding entities, e.g. proteins. Non-binding additives may be optionally included in the prepolymer mix for stabilization of the binding entities. These additives include, but are not limited to, glycerol, Ficoll, and ethylene glycol as well as saccharides such as mannitol, sucrose and  
25 trehalose. The use of other bulk agents, including non-specific (non-binding) proteins, such as bovine serum albumin, can also be employed to aid in the activity of entities, e.g., proteins, when it is desired to limit the extent of crosslinking to the hydrogel.

Another optional use of additives is to employ materials that create zones or domains within the polymerizing hydrogel. Upon completion of polymerization, these  
30 materials are either dissolved or diffused away in aqueous solution, leaving larger pores, vacuoles or channels within the hydrogel polymer than would otherwise be present in the absence of these materials. The presence of such larger pores creates a larger surface

WO 02/059372

PCT/US01/51265

area on and within the hydrogel cell, providing an increased capacity for binding biomolecules or the like that might be too large to easily diffuse through the hydrogel matrix.

The hydrogel polymer is also suitable for other binding entities, including, but not limited to, materials such as synthetic molecules, drugs, non-peptide receptor ligands, mixed organic/inorganic species, e.g. metal porphyrins, and inorganic materials, e.g. zeolites. In one preferred embodiment, these entities are used to sequester compounds from solutions based upon specific interactions between the binding entity and the analyte species. In another preferred embodiment, these binding entities transiently interact with species in solution. Such is the case when the binding entity serves as a selective substrate for a reactive process, e.g. phosphorylation, methylation, cleavage or other forms of modification. In a yet another embodiment of the invention, the incorporated materials may be involved in the catalysis of reactions. Such catalytic materials may be useful in bioreactors. Alternatively, an array of different catalytic entities may be used to screen for the most efficient catalytic entity. In general, these hydrogels formulated with such binding entities are useful for a variety of tasks, including, but not limited to, bioassays, materials screening and sensors.

Alternatively, a non-biological compound, such as a tridentate or tetradentate metal chelating agent, e.g. iminodiacetic acid or nitrilotriacetic acid, having a proper linker of amine-derivatized C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> is immobilized within the hydrogel as an intermediate binding agent, either prior to or during polymerization as schematically depicted in FIG. 3A. The desired binding entity, e.g. a protein, is preferably synthesized or modified so as to have a multiple histidine-containing sequence, e.g. as a terminus on the tail or head of the protein, and such can then be immobilized to each cell of the biochip by exposure along with a divalent or trivalent metal ion, such as Cu<sup>2+</sup> or Fe<sup>3+</sup>, so as to allow chelation with such a terminal residue to physically immobilize the protein within the hydrogel by linking to the immobilized chelating agent, as schematically depicted in FIG. 3B. By exposing each cell to a particular binding entity, e.g. a different protein capture agent, a protein chip stable for analytical use is formed. One advantage of employing an intermediate agent in creating such a polymer microdroplet is the greater assurance that potential denaturation of a particularly susceptible protein is avoided so that the conformation and configuration of the ultimate binding entity protein remains unaltered.

WO 02/059372

PCT/US01/51265

Also, fabrication may be simplified by the use of the same chelating agent for creating each microdroplet or cell in a particular protein microarray and then subsequently linking the binding agents thereto.

The biochip substrate may consist of a variety of materials and formats which are conducive to automated handling during a binding assay and later detection of target molecules binding to the individual cells. Although solid flat plates, e.g. glass slides, are suitable, plates that have depressions or wells formed therein to hold individual cells may be used. An optically transparent substrate, such as glass or clear polystyrene, will allow for transmission light detection through the cells and is convenient for detection modalities using fluorescence or optical absorption. Due to the high binding capacity of three-dimensional hydrogel cells, reflective optical methods are also possible and allow the use of opaque substrates. The use of rigid substrates would allow for precision of alignment during the detection phase of analysis using a biochip, but such may not be necessary if proper alignment is incorporated into the cells to facilitate detection. For example, a flexible format, such as a tape or filament, could be precisely detected in a scanning fashion similar to the use of magnetic tape. While optical methods and suitable substrates are preferred due to their simplicity, other biochemical detection methods might alternatively be used, e.g. the detection of radioactive agents. Generally, any number of cells can be provided on a biochip, e.g. from 1 to 1000. To assist automated handling, often multiples of 96 cells may be used; for example, 384 cells may be provided in an array on a 3 in (7.6 cm) x 5 in (12.7 cm) plate. Although multiple cells are preferably used, a biochip utilizing only a single cell may be satisfactory in certain situations.

In certain embodiments, it may be preferable to load the binding entity into the hydrogel cell after polymerization of the hydrogel cell. Simple diffusion may be an ineffective tool by which to accomplish this. Small molecules that rapidly diffuse into the hydrogel may, in the course of subsequent use, readily diffuse out of the hydrogel, thereby causing the loss of these binding entities. Therefore, in the case of such readily diffusible agents, e.g. small molecules and peptides, it is preferable to have a mechanism to covalently conjugate such agents to the polymeric matrix after diffusion into the matrix. One preferred means to accomplish this utilizes a moiety suitable for performing crosslinking, e.g. photoactivated or chemical crosslinking reagents, contained either

WO 02/059372

PCT/US01/51265

within the polymer as part of its composition or linked to the small molecule diffusing into the polymer.

In contrast, larger binding entities, e.g. proteins and large segments of DNA, may not efficiently migrate into the hydrogel matrix by passive diffusion. In order to  
5 facilitate the diffusion of larger species into the matrix, an electric field is applied in such a fashion as to cause the controlled migration of species having a net charge, e.g. proteins, within a solution having a pH value different from the isoelectric point of the protein. This process is termed "electrophoresis". If the hydrogel cell is within the  
10 migration path of the charged species, the charged species undergoes an additional force supplied by the applied electric field in addition to passive diffusional forces, thereby accelerating its insertion into the hydrogel cell. An advantage of this electric-field-facilitated diffusion is that these larger binding entities will not readily, passively diffuse out of the hydrogel matrix during subsequent assay steps.

Following polymerization of the hydrogel cell, the substrate surface not occupied  
15 by the hydrogel cells may be treated with agents or materials to reduce subsequent non-specific or non-desired adherence of assay reagents, target molecules or other materials. This is especially useful in those applications where assay reagents may potentially non-specifically bind to the surface, and thus might substantially reduce the effective concentration of the assay reagents or target molecules in solution. Alternatively, such  
20 treatment may be employed to decrease the amount of background signal observed from the surface and thereby increase the effectiveness of the hydrogel cell for assay purposes.

Treatments for such exposed surface regions include the application of reagents that react with primary amines which are present as an initial layer or coating on the substrate surface. These reagents include, but are not limited to, activated polyethylene  
25 glycol polymers having at least one end containing a reactive moiety, e.g. isocyanate, that will covalently bind to a primary amine; and small, non-polymeric molecules functionalized with nucleophile-reactive moieties, such as succinyl esters. The case in the silanization of glass or the use of standard blocking reagents, e.g. bovine serum albumin, customarily employed to reduce background signals as well known to those  
30 skilled in the art of molecular biology applications may alternatively be used.

Advantageously, all reactions involved in this system, namely (1) the derivatization of hydrogel prepolymer either directly with the protein probe or with an

WO 02/059372

PCT/US01/51265

intermediate agent, (2) the polymerization of hydrogel and (3) the binding of derivatized hydrogel to the substrate surface, involve the formation of strong urea or urethane (carbamate) bonds. These bonds endow the microdroplet array with mechanical integrity and significantly increase the half-life of the biochip.

5 In certain preferred embodiments described hereinafter, the hydrogel microdroplets, following polymerization on the substrate, are preferably at least about 30  $\mu\text{m}$  thick, more preferably at least about 50  $\mu\text{m}$  thick and most preferably between about 50  $\mu\text{m}$  and 100  $\mu\text{m}$  thick. Furthermore, the microdroplets are generally elliptical in shape, as opposed to the square gel cells previously used in some systems. The overall  
10 larger size of the gel microdroplets (or cells) permits a significant increase in the quantity of binding entities immobilized therein, thereby reducing the lower detection limit of the biochip and facilitating its use. By decreasing the viscosity of the polymer solution and with appropriate modifications to dispensing mechanisms heretofore used for microspotting onto on to a biochip substrate, smaller individual cells can be produced  
15 enabling very high-density biochip arrays. If substrates having wells are employed, the microdroplets should be deposited upon the bottoms of the wells.

The following examples illustrate several applications relating to protein chips. A representative biochip suitable for study of protein-protein interactions is illustrated by binding calmodulin to calcinerine in a calcium-dependent manner. A biochip suitable  
20 for protein-DNA interactions is illustrated by the binding of lambda repressor protein to DNA. It should of course be appreciated that these biochips are suitable for antigen-antibody interactions and for other such interactions as mentioned hereinbefore that may not be specifically illustrated in the working examples.

#### Example 1. Use of Additives (glycerol/trehalose) to Enhance Bioactivity

25 The following example shows that unreactive proteins, simple carbohydrates and humectants have a protective effect on hydrogel-immobilized antibody activities of these biochips, enhancing overall signal and assay performance.

Panel A - Trehalose. In this experiment, aliquotes of a trehalose stock solution, 50% w/v D(+) trehalose dihydrate in 50 mM sodium borate buffer, pH 8.0, were added  
30 to 50  $\mu\text{l}$  final volume hydrogel formulation. The formulation also included 3.5 weight % final concentration HYPOL PreMA® G-50 hydrogel prepolymer (premixed stock

WO 02/059372

PCT/US01/51265

solution containing HYPOL, acetonitrile, N-methyl-2-pyrrolidinone at a w/w/w ratio of 1:3:3, respectively), anti-transferrin (4 mg/ml phosphate buffered saline 1X (PBS), 2 µl bovine IgG (50/mg/ml in PBS and 1.25% glycerol). The amount of trehalose was varied from 0 to 10 µl, corresponding to a final w/v percentage of 0, 1%, 2%, 5% and 10% trehalose. A blank hydrogel spot which did not contain protein was also included. These test solutions were spotted as three pins per sample with two spots per pin onto an amine-coated glass slide. Test protein encapsulated was anti-transferrin, and the system was incubated with Cy3 fluorescent dye-labeled transferrin (Amersham, approximately 0.1 µg/ml in PBS containing 0.1% Triton X100 (PBST), and 1% bovine serum albumin (BSA)) at 45° with shaking for the indicated times. Following incubation, the slide was washed 2 x 10 minutes in PBST and then imaged using a ScanArray Lite slide scanner. The blank hydrogel spots had no detectable signal, and 0% trehalose had a weak signal. 1% and 2% trehalose were a little more intense, 5% had higher signal yet, and 10% had the strongest signal. These results indicate that the addition of trehalose had a positive effect on the bioactivity of the test antibody in the hydrogel.

Panel B - Glycerol. Glycerol, dissolved as a 20% stock in pH 8.0 sodium borate buffer, was added to the above-mentioned hydrogel formulation containing 3.5% final HYPOL PreMA® G-50, anti-transferrin, bovine IgG, and 5% trehalose, to a final concentration of 0%, 0.5% and 1%, e.g. 0, 1.25 µl and 2.5 µl of stock glycerol. As in the above-mentioned assay, the Cy3 fluorescent dye-labeled transferrin system was used for assay. For Panel B, for each half percent increase in glycerol, there was an increase in signal intensity, evidencing a positive effect upon the antibody activity.

#### Example 2. Diffusion (% hydrogel 3% vs. 5%)

The following experiment shows that the percentage of hydrogel influences the diffusion of binding entities into the hydrogel matrix.

Using the methodology described in Example 1, mouse IgG was immobilized in 3%, 4% and 5% hydrogel, respectively. BSA was included in as a separate spot as a non-specific binding control. Following curing of the polymer, the array was incubated with a solution of rhodamine-labeled rabbit anti-mouse antibody for one hour, then washed. The rabbit anti-mouse antibody bound to mouse IgG antibodies, and the extent of binding was determined by fluorescence at each location using a ScanArray Lite slide

WO 02/059372

PCT/US01/51265

scanner. Under identical binding conditions and binding time, the lower percentage hydrogel spots displayed stronger binding signals; this is indicative of a faster diffusion rate of the rhodamine-rabbit-anti-mouse IgG into the hydrogel matrix at these lower percentages.

5 **Example 3. Use of coating to block non-specific binding/lower background of slide**

N-hydroxysuccinimidyl active ester (NHS) activated polyethylene glycol (PEG) polymer, mPEG-SPA-NHS 5K (Shearwater Corporation) was dissolved in 0.05 M sodium bicarbonate, pH 8.25, buffer to a final PEG concentration of 50 mg/ml. Corning aminosilane slides were used for surface grafting of the polymer. Grace-Biolabs

10 hybridization chambers (SA500-3LCLR) were used as reaction chambers. To coat the surface, three slides were treated with the PEG solution for 3 hours on a shaker at room temperature (NSH rt), three slides were treated for three hours at 45°C (NSH 45), and an additional slide was treated for 3 hours at 45°C in DI water as a control.

After PEG treatment, the hybridization chambers were removed, and the slides  
15 were washed in PBS for 10 minutes, followed by distilled water wash for 10 minutes, followed by air-drying. Cy3-labeled glial-derived neurotrophic factor was dissolved in PBST. Slides were incubated at room temperature for 1 hour. They were then washed in PBS for 10 min, and distilled water for 10 min. The slides were then scanned using a ScanArray Lite slide scanner. A 5-10 fold lower background intensity signal following  
20 treatment under both sets of conditions indicates the effectiveness of the PEG coating in reducing non-specific absorption of fluorescent materials onto the surface.

**Example 4. Protein-DNA Interaction on a Biochip**

In the following experiment, single-stranded DNA is first linked to the hydrogel followed by hybridization to create double-stranded binding entities which then are  
25 effective to sequester target proteins as schematically shown in FIG. 4A.

5' amino-modified, single-stranded bacterial  $\lambda$  repressor binding sequence O<sub>R</sub>2O<sub>R</sub>1 (wt) and its mutant (mut) carrying a single base mutation at the binding site (sequences are shown in FIG. 4B where the binding sites are underlined) are printed on amino-silanated slides at 130  $\mu$ M in 3.75% HYPOL™. The printed spots are enclosed in  
30 individual hybridization chambers and are allowed to hybridize to their corresponding

WO 02/059372

PCT/US01/51265

complementary sequences at 1  $\mu$ M in 3X SSC, 0.1% Triton X-100, 5 mM MgCl<sub>2</sub> at 45°C for 18 hours. The resultant double-stranded DNA are then incubated with 1.5  $\mu$ g/ml Cy3-labeled bacterial phage lambda repressor  $\lambda$ CI in binding buffer (50 mM Tris.HCl (pH 7.6), 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 0.1 mg/ml BSA, 2.5  $\mu$ g/ml poly (dA-dT), 0.05% Tween 20, 1 mM DTT) at room temperature for 2 hours. The Cy3-labeled  $\lambda$ CI is removed at the end of the binding reaction, and the slide is rinsed briefly with binding buffer then deionized H<sub>2</sub>O (dH<sub>2</sub>O) and imaged by a GSI laser scanner. In a separate slide, the double-stranded DNA is stained with SYBR Gold (Molecular Probe) according to manufacturer's protocol and visualized by a GSI laser scanner for its total DNA content.

Binding of the Cy3 labeled  $\lambda$  repressor to its native operon dsDNA sequence was shown by the gain of fluorescent signal in the corresponding spots. The absence of a strong fluorescence in the mutant spots indicated that the interaction is sequence-specific. Comparison of the SYBR Gold (a double-stranded DNA stain) stained fluorescence of the printed slides, with the Cy3 fluorescence from  $\lambda$  repressor, confirms that it is the sequence-specific  $\lambda$  repressor- $\lambda$  operon interaction rather than any non-specific protein linking to unevenly printed DNA that gives rise to the Cy3 signal associated with the wild type O<sub>R</sub>2O<sub>R</sub>1 sequence. A hundred-fold difference in signal intensity between linking to the wild type sequence as compared to the mutant sequence confirms the specificity of the reaction to the double-stranded DNA that was immobilized within the hydrogel matrix.

#### Example 5. Protein-DNA Interaction on a Biochip

In this experiment, double-stranded DNA is pre-hybridized before polymerization and immobilization, which is followed by target protein binding.

Double-stranded (ds) DNA biochips can also be made by directly printing 5' amino-modified prehybridized dsDNA. This procedure contrasts with the previous example where a single-stranded DNA was printed, and the cognate oligonucleotide was subsequently hybridized to this printed oligonucleotide to form the binding entity.

In this example, an estrogen receptor (ER), a 53 kD protein, binds as a homodimer to its consensus estrogen response element (ERE). The wild-type ERE sequence differs from the mutant sequence by four nucleotides in a region known to be critical for binding

WO 02/059372

PCT/US01/51265

by the receptor. The wild-type sequence is a 32-base oligomer with the sequence 5'-ttacgtagaggtcactgtgacctctaccg-3'. The mutant sequence differs by four oligonucleotides (underlined) and has the sequence 5'-ttacgtagaggtcactgtatggtctaccg-3'. To produce dsDNA for printing, 5  $\mu$ l of a 650  $\mu$ M stock of each of the amine-linked oligonucleotide of interest and its complementary oligonucleotide are diluted 1:650 (65  $\mu$ M final concentration) in 40  $\mu$ l DNA hybridization buffer, pH 8 (3xSSC, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) for a final reaction volume of 50  $\mu$ l. The reaction product is incubated at 95°C for 10 min and then chilled on ice for 3 min. Ten microliters of this double-stranded DNA is printed within 450  $\mu$ m hydrogel spots using a solution consisting of 3.75% polymer, 0.5% glycerol and 50 mM sodium borate buffer, pH 8.0. Following 1 hour of blocking with a 1% BSA in PBST solution, 1  $\mu$ l of transcription factor in the form of ER concentration 1.153  $\mu$ M was diluted in appropriate binding buffer (10% glycerol, 10 mM HEPES, 30 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.25 mM DTT, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.9) and allowed to bind to the dsDNA for 1 hour at room temperature; a 10-min wash with PBST then followed. The ER-ERE complex was next incubated with a 1:100 dilution of a rabbit anti-ER $\beta$  antibody for 1 hour at RT, followed by a 30-min wash with PBST. This was followed by incubation with a 1:1000 dilution of goat anti-rabbit IgG-Cy3 conjugate for 1 hour at RT, followed by a 30-min PBST wash. The overall experiment is diagrammatically depicted in FIG. 5. The slide was rinsed with dH<sub>2</sub>O and air dried before imaging with a ScanArray Lite scanner. Signal analysis was performed using ArrayPro 4.0 software. An increased signal observed from spots containing the wild-type sequence as compared to the mutant sequence signal, which resembles the control, indicates the retention of linking specificity by the estrogen receptor for its target sequence in the hydrogel matrix.

#### Example 6. Antigen-Biochip

- 25 This experiment shows that the hydrogel platform can be used as a matrix for anchoring still other binding entities, i.e. antigens. Antibody-antigen interactions are routinely employed in a variety of biological assays, and the ability to anchor either component (antibody or antigen) is a desirable feature in a support. In this example, an antigen is anchored within the hydrogel matrix.
- 30 Using the methodology described in Example 1, the protein antigen, human transferrin (0.2 mg/ml), was directly immobilized at different dilutions in 3.3% hydrogel

WO 02/059372

PCT/US01/51265

with 5% trehalose, 2 mg/ml BSA onto an amine-coated glass slide. After blocking with 5% non-fat dry milk, the slide was incubated for 1 hour with mouse ascites fluid containing anti-human transferrin at the varying concentrations. After incubation, the slide was washed three times for 10 mins with PBST. The bound, mouse, anti-transferrin antibody was visualized by incubating the slide with Cy3-labeled donkey anti-mouse IgG, followed by laser scanner imaging. A linear dose response over three orders of magnitude of dilutions, i.e. 0.1 to 0.001, was observed. This dose-response relationship indicates the functionality of the antigen anchored within the hydrogel matrix and the permeability of the hydrogel matrix supporting sequential diffusion of antibodies into the matrix as part of the overall assay methodology.

#### Example 7. Antibody- Biochip

As noted in the previous example, antibody-antigen reactions are routinely employed in biological assays. In this example, an antibody is anchored within the hydrogel matrix, as opposed to anchoring the antigen in Example 6.

Anti-human transferrin, anti-BSA and anti-PSA antibodies (0.4~ 0.8 mg/ml) were immobilized in 3.3% hydrogel in the presence of 5% trehalose, 2 mg/ml bovine IgG and 0.5% glycerol on amino-silanated glass slides, following the methodology of Example 1. The slides were then incubated at room temperature overnight with Cy3-labeled individual antigens at a concentration of 1 mg/ml in PBST containing 1% BSA. Bound proteins were visualized by laser scanner imaging after an extensive wash with PBST. The presence of labeled target proteins at the sites of the corresponding antibodies on the microarray indicated the retention of functionality of the antibodies in the hydrogel matrix.

#### Example 8. Multiple Layers ELISA Assay

The ability to support more complex binding interactions may also be a desired feature for the hydrogel matrix. In this example, use is made of the hydrogel to anchor an antibody as a first binding entity. Subsequent specific localization of its antigen is followed by additional binding events for the purpose of visualization, and this shows the biocompatibility of the hydrogel with respect to multiple binding events by proteins, as well as confirming maintenance of protein functionality.

WO 02/059372

PCT/US01/51265

Rat anti-mouse IL-2 monoclonal capture antibody (BD, Pharmingen) was directly immobilized in 3.3% hydrogel with 5% trehalose, 2 mg/ml Bovine IgG on an amino-silanated glass slide, as per the methodology outlined in Example 1. The slide was incubated with diluted culture medium from phytohemagglutinin-stimulated mouse LBRM-33 4A1 cells or unstimulated cells, for one hour with proper mixing at room temperature. After two 15-minute wash PBST washes, the slide was incubated with biotinylated rat monoclonal anti-mouse IL-2 detection antibody (BD, Pharmingen) at room temperature for one hour. Free antibody was removed by three PBST washings of 15 minutes each. Horseradish peroxidase-conjugated streptavidin was subsequently added to the slide for another hour of incubation at room temperature. Cy3-tyramide substrate from a TSA reagent system is added to the slide to fully cover all printed spots, after an extensive wash of streptavidine-HRP following recommended protocol. After washing off unreacted substrate, the slide is analyzed by laser scanner imaging. An eight-fold increase in fluorescent signal indicates the presence of bound antigen by the anchoring antibody within the hydrogel.

**Example 9. Multiple Layers Small Molecule Mediated (CaM/calcineurin)**

Complex interactions between multiple proteins are frequently difficult to accomplish on support surfaces; however, the following example demonstrates the use of multiple protein interactions mediated by small molecules and is schematically illustrated in FIG. 6.

Mouse anti-bovine brain calcineurin monoclonal antibody (0.4 mg/ml, Sigma), sheep anti-bovine calmodulin antibody (0.2 mg/ml, Chemicon) and control bovine IgG (0.4 mg/ml) were respectively and directly immobilized in 3.3% hydrogel with 5% trehalose and 2 mg/ml bovine IgG onto an amine-coated glass slide, as per the methodology of Example 1. The slide was subsequently incubated with 0.1 mg/ml bovine calcineurin in 20 mM HEPES (pH 7.6), 130 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 10 µg/ml polyglutamic acid overnight, after 5% dry milk blocking. Cy3-labeled chicken calmodulin is allowed to bind to the calcineurin-treated slide in the presence of 1 mM CaCl<sub>2</sub> or 5 mM EGTA in PBST, 1% BSA at room temperature for one hour. The bound calmodulin was visualized by laser scanner imaging at the Cy3 excitation and emission wavelengths. A six-fold increase in signal intensity shown at the anticalcineurin

WO 02/059372

PCT/US01/51265

antibody location in the presence of calcium as compared to in its absence (i.e. in the presence of EGTA) indicates the ability of the hydrogel matrix to support complex biomolecular interactions involving both proteins and small molecules.

**Example 10. Specific Detection of Tyrosine**

5 **Phosphorylated Peptides on a Biochip**

The hydrogel matrix is compatible with a wide variety of binding entities and assay formats. In this example, the use of a phosphorylated amino acid within a peptide binding entity is shown.

Each peptide was printed onto a slide as two quadruple pairs beside each other at  
10 40  $\mu\text{M}$  concentration; the peptides were immobilized in 3.5% HYPOL™ containing 0.5% glycerol, as per the methodology of Example 1. The peptides listed in Table 1 which follows were printed on the slides.

WO 02/059372

PCT/US01/51265

Table 1

No.	Substrate	Amino Acid Sequence
1	insulin receptor fragment	NH-thr-arg-asn-ile-pTyr-gln-thr-asp-tyr-tyr-arg-lys-OH
2	PTP Substrate II	NH-asp-ala-asp-glu-pTyr-leu-ile-pro-gln-gly-OH
3	PTP Substrate I	NH-glu-asp-asp-pTyr-leu-ile-asp-ala-ser-leu-OH
4	insulin receptor fragment	NH-thr-arg-asn-ile-tyr-gln-thr-asp-tyr-arg-lys-OH
5	pp60 c-src (521-533)	NH-thr-ser-thr-gly-pro-gln-tyr-gln-pro-gly-glu-asp-leu-OH
6	pp60 c-src (521-533) (phosphorylated)	NH-thr-ser-thr-glu-pro-gln-pTyr-gln-pro-gly-gly-asp-leu-OH
7	PDGF receptor substrate	NH-ser-val-leu-pTyr-thr-ala-val-gln-pro-asp-glu-OH
8	pp60(v-src) autophosphorylation site	NH-arg-arg-leu-ile-glu-asp-asp-glu-pTyr-thr-ala-arg-gly-OH
9	RrcpSSEEEA-OH	NH-arg-arg-arg-glu-glu-glu-pSer-glu-glu-ala-ala-OH
10	Angiotensin II substrate	NH-asp-arg-val-pTyr-ile-his-pro-phe-OH
11	pp60C-src	NH-thr-ser-thr-glu-pro-gln-tyr-gln-pro-gly-glu-asp-leu-OH
12	RR-SRC	NH-arg-arg-leu-ile-glu-asp-ala-glu-tyr-ala-arg-gly-OH
13	SRC Kinase Substrate	NH-arg-arg-leu-ile-glu-asp-ala-glu-pTyr-ala-ala-arg-gly-OH
14	PDGF receptor substrate	NH-asp-pTyr-ile-ser-lys-gly-ser-thr-phe-leu-OH
15	Anti-estrogen phospho peptide	NH-cys-asp-val-val-pro-leu-pTyr-asp-leu-leu-glu-OH
16	Tyrosine kinase substrate	NH-arg-arg-leu-ile-glu-asp-asp-glu-thr-thr-ala-arg-gly-OH
17	Tyrosine kinase substrate	NH-arg-arg-leu-ile-glu-asp-ala-glu-thr-ala-ala-arg-gly-OH
18	Retroviral protease substrate	NH-thr-phe-gln-ala-tyr-pro-leu-arg-glu-ala-OH
19	Angiotensin II antipeptide	NH-gly-gly-val-tyr-val-his-pro-val-OH
20	Angiotensin I	NH-asp-arg-val-tyr-ile-his-pro-phe-his-leu-OH

The trivial abbreviations are used with pTyr = phosphotyrosine and pSer = phosphoserine.

- 25 In all following incubation steps, the glass slides were incubated on a rocker in glass slide-staining dishes. The peptide biochip was blocked with 1% BSA in PBS containing 0.1% Triton X-100 for 60 min at room temperature, followed by overnight incubation at 4°C with biotinylated anti-phosphotyrosine antibody at a 1:2000 dilution in PBST containing 1% BSA. After a 2 times 10 mins wash at room temperature with
- 30 PBST, the slide was incubated with Cy3-labeled streptavidin at a 1:2000 dilution in PBST containing 1% BSA. Thereafter, the slide was washed 3 times 15 minutes at room temperature in PBST. After a short rinse with distilled water, the slide was air dried and scanned using a GSI Lumonics scanner. The results showed the presence of fluorescent

WO 02/059372

PCT/US01/51265

signal at those locations containing phosphotyrosine and not at other locations, including those containing phosphoserine, and indicate that the phosphopeptide, despite isocyanate binding to the hydrogel, retained its appropriate native conformation to allow recognition by the antibody.

5                   **Example 11. Dephosphorylation of Tyrosine**

**Phosphorylated Peptides on a Biochip with Tyrosine Phosphatases**

                  The previous examples demonstrated the use of the hydrogel matrix to support binding interactions of extended natures (for minutes or hours). The following experiment shows that the matrix also supports transient binding interactions, such as those involving enzymatic activity, as well. In this example, a phosphopeptide substrate is anchored within the hydrogel matrix, which then serves as a substrate for an enzyme that removes the phosphate group. Residual phosphates are then detected using the methodology of Example 10.

                  Using the same experimental procedure as described in Example 10, printed slides were incubated with either 6 units Leucocyte Antigen Related (LAR) protein tyrosin phosphatase or 6 units Yersinia enterocolitica (YOP) protein tyrosine phosphatase in supplied reaction buffer (1X LAR-buffer: 25 mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 2mM Na<sub>2</sub>EDTA, 5mM dithiothreitol, 0.01% Brij-35, pH 7.0 at 25°C; 1X YOY-buffer: 50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 2mM Na<sub>2</sub>EDTA, 5mM dithiothreitol, 0.01% Brij-35, pH 7.0 at 25°C) in a 430 µL chamber for 10 minutes at room temperature. Thereafter, the chamber was removed, and the glass slides were moved to a glass slide-staining dish. The reaction was stopped by washing the slides 2 x 10 min at room temperature with 1mM sodium pervanadate (universal tyrosine phosphatase inhibitor) in PBST. Thereafter, the slides were blocked with 1% BSA, incubated with biotinylated anti-phosphotyrosine antibody followed by Cy3-streptavidin binding as described in Example 10. Loss of fluorescent signal earlier observed in Example 10 indicated the ability of the phosphorylase enzyme to enter the hydrogel, maintain its biological activity and transiently interact with one or more substrates, i.e. the anchored phosphopeptides. More specifically, the results show that the LAR-PTPase selectively removes the phosphate group substantially completely from Peptide No. 1 and to a lesser degree on the remaining peptides that contain a pTyr residue. The YOY-PTPase enzyme

WO 02/059372

PCT/US01/51265

substantially completely removes the phosphate group from Peptides Nos. 1, 3, 6, 8 and 13; it removes the phosphate group significantly from Peptides Nos. 2, 7, 10, 14 and 15, i.e. to a greater degree than does the LAR-PTase for those peptides. Thus, the fluorescence results with the various phosphopeptides indicated a preferential specificity on the part of the two phosphorylase enzymes towards certain of the phosphopeptide sequences.

#### Example 12. Metal Chelator

Binding entities need not be biological in origin, but a variety of synthetic molecules can be employed as well. In this example, a metal chelator is used to anchor a metal ion within the hydrogel matrix where it serves to bind multiple histidine moieties present within a protein molecule.

$\text{Ni}^{2+}$  or  $\text{Cu}^{2+}$ NTA hydrogel is generated by mixing various amount of nitrilotriacetic acid with HYPOL™ solution and spotted on a glass slide. The polymerized gel spots are washed with 50 mM acetic acid in  $\text{dH}_2\text{O}$ , charged with 50 mM  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  or  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ ; they are then washed with 50 mM acetic acid in  $\text{dH}_2\text{O}$  containing 0.1M  $\text{KNO}_3$  (pH4.0) and finally rinsed with  $\text{dH}_2\text{O}$  6xHis tagged green fluorescent protein at 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBST containing 1% BSA was added to the slide, which was imaged in PBS by a home-built CCD camera under proper excitation and emission filter, after the removal of free unbound 6xHis-GFP. An increased fluorescent signal is observed that corresponds with increased chelator and indicates that the hydrogel matrix supports the use of small molecules as intermediate binding agents.

#### Example 13. Alpha-2-macroglobulin - trypsin Interaction on a Biochip (Electric field based loading)

Alpha-2-macroglobulin is a large plasma protein (mw 800,000) that circulates in the blood specifically to bind to and neutralize proteases, a mechanism which protects the body from excessive protease activity, essentially preventing the body from "digesting" itself. The association between alpha -2-macroglobulin and proteases like trypsin is very strong, and alpha -2-macroglobulin immobilized to agarose beads has been used to affinity-purify trypsin and other proteases.

WO 02/059372

PCT/US01/51265

Three sets of hydrogel microdroplets were spotted onto amine-derivatized glass. The glass slide was first treated with 1% BSA solution in 10 mM sodium phosphate buffer and 150mM NaCl (PBS), pH 7.4, for 2 hours at room temperature to block nonspecific binding sites. Failure to do so would result in some fluorescein-labeled protein binding nonspecifically, thus raising the signal-to-noise ratio. The hydrogel consisted of a prepolymer comprising isocyanate-functional HYPOL™. Polymerization was initiated with an aqueous solution, and the polymerization kinetics were controlled by pH and temperature. Each hydrogel microdroplet was caused to polymerize at a controlled rate to prevent opacity due to CO<sub>2</sub> gas evolution, forming one cell of the microarray. A first set such of hydrogel cells is loaded with  $\alpha$ -2-macroglobulin using a solution of 50 $\mu$ L at a concentration of 5 mg/mL PBS. The high molecular weight of  $\alpha$ -2-macroglobulin limits rapid diffusion into the hydrogel droplet, and the diffusion rate is increased by using a mild electrical current (2.5-5 mV) delivered by a small electrode system. Once  $\alpha$ -2-macroglobulin has diffused inside the hydrogel droplet, its large molecular weight prevents significant subsequent diffusion from the droplet. Ferritin is used to provide a negative control protein as it is known not to bind to trypsin. Ferritin is similarly diffused into a second set of hydrogel droplets using the same electrode system and mild electrical current under the same conditions. A third set of droplets is not treated with any protein and serves as an additional negative control. All three sets of droplets are then exposed to FITC-labeled trypsin for about 15 minutes and washed with 1% BSA-PBS, pH 7.4 for about 5 to 20 minutes. Fluorescence intensities are measured with a CCD camera, and results are shown in Table 2.

**Table 2. Specific binding of FITC-trypsin to  $\alpha$ -2-macroglobulin**

Immobilized Protein	Flourescence Intensity (au)
$\alpha$ -2-macroglobulin	800
Ferritin	20
No protein	10

The results indicate that FITC-labeled trypsin specifically binds to  $\alpha$ -2-macroglobulin, its natural ligand, within the hydrogel droplets, and that there is little

WO 02/059372

PCT/US01/51265

detectable binding activity to either the negative control protein ferritin or to the hydrogel itself.

Although the invention has been described with respect to a number of different embodiments which include the best modes presently contemplated by the inventors, it  
5 should be understood that changes and modifications as would be obvious to one skilled in this art may be made without departing from the scope of the invention which is set forth in the claims appended hereto. For example, although particular fluorophores, such as FITC and Cy3, were used, other fluorophores or other reporters can alternatively be used. Although there are advantages in the use of biochips having a plurality of cells  
10 carrying different nonhybridization binding entities, in certain situations single-cell biochips may be suitable.

Particular features of the invention are emphasized in the claims which follow.

WO 02/059372

PCT/US01/51265

## CLAIMS:

1. An optically clear hydrogel biochip comprising:
  - a) a solid substrate having a surface;
  - b) at least one optically clear hydrogel cell attached to the surface of the substrate, which hydrogel cell is formed from an isocyanate-functional polymer; and
  - c) a nonhybridization binding entity immobilized within or upon said hydrogel cell, which entity is effective to selectively sequester a target protein or other comparable molecule.
2. The biochip of claim 1 wherein the hydrogel comprises a polymer with urethane linkages.
3. The biochip of claim 1 wherein the hydrogel comprises polyethylene glycol, polypropylene glycol, or copolymers thereof.
4. The biochip of claim 1 wherein the hydrogel cell is at least 30  $\mu\text{m}$  thick.
5. The biochip according to claim 4, wherein the hydrogel cell is between about 30 $\mu\text{m}$  and about 100  $\mu\text{m}$  thick.
6. The biochip according to claim 1, wherein said binding entity is covalently bound to and within the hydrogel cell through reaction with isocyanate groups.
7. The biochip of claim 5 wherein about 15% or less of the reactive isocyanates in said polymer of said cell have reacted with said binding entities.
8. The biochip of claim 6 wherein 10% or less of the reactive isocyanates in said polymer of said cell have reacted with said binding entities.
9. The biochip of claim 1 wherein said binding entity comprises an immunoglobulin, an enzyme, a receptor, an enzyme inhibitor, an enzyme substrate, or a peptide.
10. The biochip of claim 1 wherein each said binding entity is immobilized within the hydrogel through an interaction with an intermediate agent
11. The biochip of claim 9 wherein said binding entity is a protein which is bound to a metal chelate that is immobilized in the hydrogel and constitutes said intermediate agent.
12. The biochip of claim 10 wherein said protein is bound to said metal chelate through a histidine-containing polypeptide at one terminal of said protein.

WO 02/059372

PCT/US01/51265

13. The biochip of claim 10 wherein said binding entity is immobilized through a first intermediate agent linked to the hydrogel and a second intermediate agent linked to said first intermediate agent.

14. The biochip of claim 13 wherein said first intermediate agent is an antibody and the second intermediate agent is a protein.

15. The biochip of any one of claims 1-14 wherein the substrate has a plurality of hydrogel cells attached to its surface and wherein different binding entities are immobilized in different hydrogel cells.

16. The biochip of any one of claims 1-15, wherein the substrate is optically transparent.

17. The biochip of any one of claims 1-16, wherein the substrate has reactive molecules on its top surface to which the hydrogel is covalently bound.

18. The biochip according to claim 17, wherein said hydrogel cells are covalently bound to the substrate through some of said isocyanate groups of the polymer.

19. A hydrogel biochip comprising:

- a) a solid substrate having a top surface;
- b) a plurality of hydrogel cells comprising polyethylene glycol, polypropylene glycol, or copolymers thereof bound to the top surface of said substrate;
- c) intermediate agents immobilized within or upon said hydrogel of said cells; and
- d) different protein binding entities bound to said intermediate agents within at least several of said hydrogel cells by interaction therewith in a manner so that said protein binding entities assume their native conformations.

20. A method of using a biochip to carry out a biochemical assay, which method comprises the steps of:

- (a) providing an optically clear hydrogel biochip having a substrate with a surface to which at least two hydrogel cells are bound, each cell having a thickness of at least about 30  $\mu\text{m}$  and being predominantly comprised of polyethylene glycol, polyethylene glycol or a copolymer thereof, each said hydrogel cell including a different protein binding entity immobilized therewithin or thereupon,

WO 02/059372

PCT/US01/51265

- (b) contacting the hydrogel biochip with an analyte solution, containing a target biomolecule under binding conditions;
  - (c) washing the hydrogel biochip under conditions that remove non-selectively bound and unbound target biomolecule; and
  - (d) detecting the target biomolecule bound to one of said cells.
21. The method of claim 20 wherein binding of target biomolecule results in a compositional change of the binding entity.
22. The method of claim 21 wherein said compositional change is a phosphorylation event.
23. The method of claim 22 wherein said compositional change is a dephosphorylation event.
24. The method of any of claims 21-23 wherein said binding entity which undergoes said compositional change is bound to the hydrogel by one or more intermediate agents.
25. A method of preparing an optically clear isocyanate-functional hydrogel biochip having a nonhybridization binding entity immobilized therewithin or thereon, which entity is effective to selectively sequester a target protein or target biomolecule, the method comprising the steps of:
- a) providing an organic solvent solution of an isocyanate-functional hydrogel prepolymer;
  - b) providing a solution of said nonhybridization binding entity;
  - c) covalently binding said entity to the isocyanate-functional hydrogel prepolymer via reaction with not more than 15% of said reactive isocyanates;
  - d) initiating polymerization of the isocyanate-functional hydrogel prepolymers under conditions that will produce an optically clear hydrogel; and
  - e) dispensing the polymerizing isocyanate-functional hydrogel prepolymer in droplet form onto a solid substrate, such that an optically clear hydrogel polymer containing said binding entity is attached to said substrate.
26. The method of claim 25 wherein the binding of said entity is performed simultaneously with polymerization.
27. The method of either claim 25 or 26, wherein viscosity and pH are selected to control carbon dioxide evolution to assure clarity of the resulting hydrogel.

WO 02/059372

PCT/US01/51265

28. The method of any one of claims 25-27, wherein said substrate is treated to provide reactive moieties on its top surface which will covalently bind the polymerizing hydrogel to said substrate.

29. A method of preparing an isocyanate-functional hydrogel biochip having proteins immobilized therein or thereupon which are chosen to function as capture agents, the method comprising the steps of:

a) providing an organic solvent solution of an isocyanate-functional hydrogel prepolymer;

b) providing solutions of desired protein capture agents;

c) covalently binding intermediate coupling agents for said proteins to the isocyanate-functional hydrogel prepolymer;

d) initiating polymerization of said isocyanate-functional hydrogel prepolymer;

e) dispensing droplets of the polymerizing isocyanate-functional hydrogel prepolymer onto a solid substrate, such that said polymer becomes attached to said substrate; and

f) exposing individual hydrogel droplets to one of said desired protein solutions to immobilize said protein capture agents therein or thereupon via connection to said coupling agents,

whereby said droplets polymerize to create a biochip having a plurality of cells with different protein capture agents.

30. The method of claim 29 wherein said connection of said proteins to said coupling agent is performed simultaneously with polymerization.

31. The method of claim 29 wherein said connection of said proteins to said coupling agent is performed subsequent to polymerization.

32. The method of any one of claims 29 to 31 wherein said coupling agent is a chelating agent.

33. The method of claim 32 wherein the proteins each include a histidine-containing terminal peptide sequence.

34. The method of any one of claims 29-33 wherein reaction conditions during said polymerizing are controlled to slow the rate of carbon dioxide evolution and assure optical transparency of the resulting hydrogel.

WO 02/059372

PCT/US01/51265

35. The method of any one of claims 29-34 wherein said substrate is treated to provide reactive moieties on its top surface that will covalently bind said hydrogel to said substrate.

36. A method of preparing an isocyanate-functional hydrogel biochip having a plurality of cells which have proteins immobilized therein or thereupon, the method comprising the steps of:

- a) providing an organic solvent solution of an isocyanate-functional hydrogel prepolymer;
- b) initiating polymerization of the isocyanate-functional hydrogel prepolymer;
- c) dispensing droplets of the polymerizing isocyanate-functional hydrogel prepolymer onto a solid substrate so that said droplets become attached to said substrate and form of a plurality of cells; and
- d) physically immobilizing a different protein in or upon each of at least two of said cells, said proteins being chosen to function as binding agents that will selectively sequester a particular biomolecule.

37. The method of claim 36 wherein said immobilizing comprises physical entrapment of the proteins having a molecular weight of about 100,000 or greater via the use of electrical current to cause the proteins to diffuse into said cells.

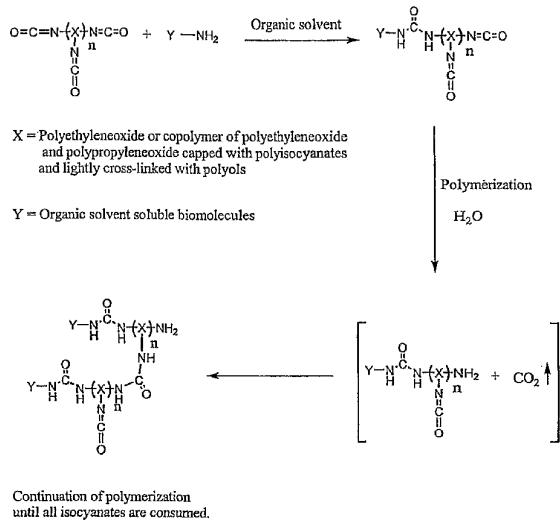


FIG. 1

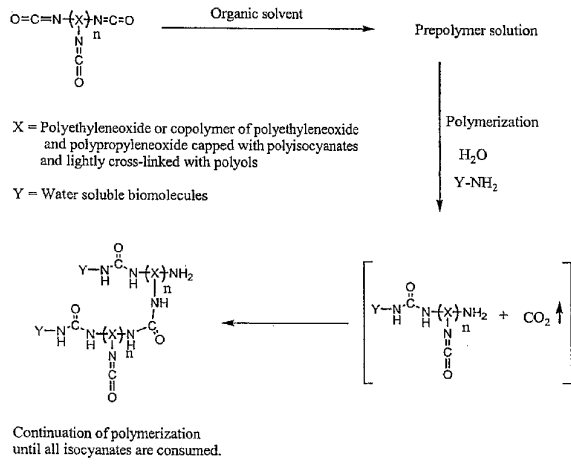
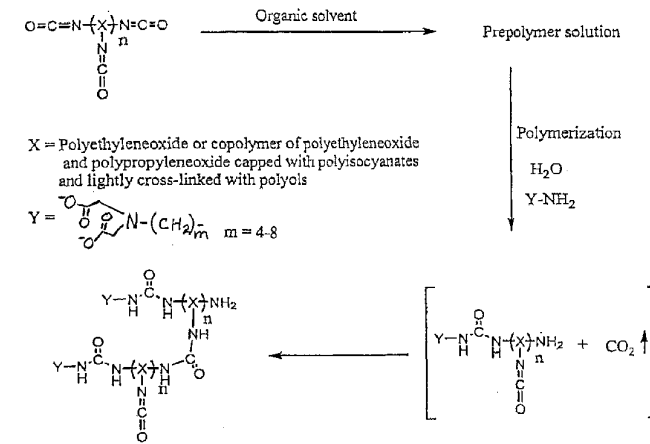
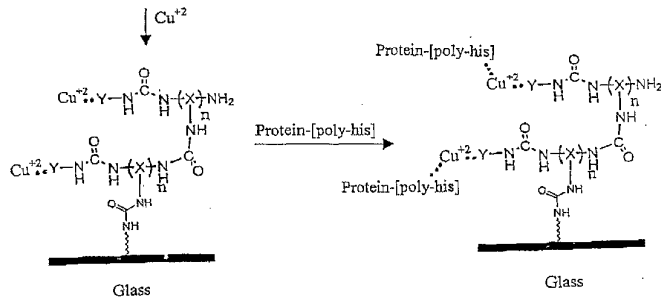


FIG. 2



Continuation of polymerization until all isocyanates are consumed. **FIG. 3A**



**FIG. 3B**

4/5

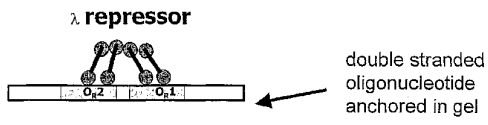
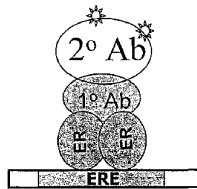


FIG. 4A

wt tctaacaccgtgcgtgtgactatttacctctggcggtgataatgg

mutant tctaacaccgtgcgtgtgactatttacctctggcggtgaaaatgg

FIG. 4B



ER: estrogen receptor  
ERE: estrogen response element

FIG. 5

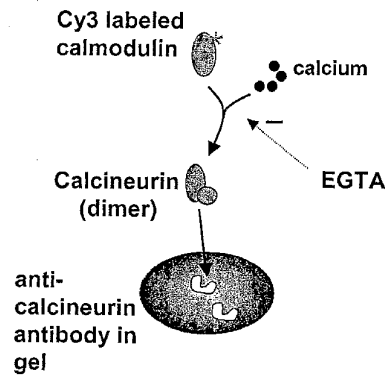


FIG. 6

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/059372 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/543, C12Q 1/00
- (21) International Application Number: PCT/US01/51265
- (22) International Filing Date: 26 October 2001 (26.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/243,699 26 October 2000 (26.10.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BIO-CEPT, INC. [US/US]; 2151 Las Palmas Drive, #C, Carlsbad, CA 92009 (US).
- (72) Inventors; and  
Inventors/Applicants (for US only): FAGNANI, Roberto [—/US]; 8977 Caminito Pinesse, La Jolla, CA 92037 (US). HAHN, Soonkoo [KR/US]; 511 Via Delfin, San Clemente, CA 92672 (US). DONG, Xiaofan [US/US]; 1044 Agate Street, #8, San Diego, CA 92109 (US). PIRCHER, Tony [SI/US]; 8453 Florissant Court, San Diego, CA 92129 (US). MATSUMOTO, Sandra [US/US]; 7655 Palmilla Drive, #4411, San Diego, CA 92122 (US). TSINBERG, Pavel [US/US]; 5370 Toscan Way, II-118, San Diego, CA 92122 (US).
- (74) Agents: SAMPLES, Kenneth, H. et al.; Fitch, Even, Tabin & Flannery, Suite 1600, 120 South LaSalle Street, Chicago, IL 60603 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, 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, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NI, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 19 September 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/059372 A3

(54) Title: THREE DIMENSIONAL BIOCHIP

(57) Abstract: A biochip is formed with a plurality of optically clear hydrogel cells attached to the top surface of a solid substrate in the form of an array. Each of the cells is formed of a hydrogel of polyethylene glycol, polypropylene glycol or a copolymer thereof having reactive isocyanate groups. Nonhybridization binding entities are immobilized in these cells, which entities are effective to selectively sequester a target protein or other comparable biomolecule. Different binding entities are immobilized in different cells to create a biochip that can be used to assay for a number of target biomolecules.

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(L)60202242495



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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/059372 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/543, C12Q 1/00
- (21) International Application Number: PCT/US01/51265
- (22) International Filing Date: 26 October 2001 (26.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/243,699 26 October 2000 (26.10.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BIO-CHEPT, INC. [US/US]; 2151 Las Palmas Drive, #C, Carlsbad, CA 92009 (US).
- (72) Inventor; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): FAGNANT, Roberto [US]; 3971 Caminito Picoaso, La Jolla, CA 92037 (US); HAHN, Soungkap [KR/US]; 511 Via Dell'In, San Clemente, CA 92672 (US); DONG, Xiaofan [US/US]; 1044 Agate Street, #E, San Diego, CA 92109 (US); PITCHER, Tony [SE/US]; 8453 Florissant Court, San Diego, CA 92129 (US); MATSUMOTO, Sandra [US/US]; 7655 Palmilla Drive, #4411, San Diego, CA 92122 (US); TSINBERG, Eavej [US/US]; 5370 Toscan Way, H-118, San Diego, CA 92122 (US).
- (74) Agents: SAMPLES, Kooaeth, H. et al.; Pritch, Liven, Tabin & Flannery, Suite 1600, 120 South LaSalle Street, Chicago, IL 60603 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, 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, GR, HT, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KP, KR, KZ, LC, LR, LS, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (BI, GM, KE, LS, MW, MZ, SI, 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, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Published: with international search report before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments.

(88) Date of publication of the international search report: 19 September 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/059372 A3



(54) Title: THREE-DIMENSIONAL BIOCHIP

(57) Abstract: A biochip is formed with a plurality of optically clear hydrogel cells attached to the top surface of a solid substrate in the form of an array. Each of the cells is formed of a hydrogel of polyethylene glycol, polypropylene glycol or a copolymer thereof having reactive isocyanate groups. Nonhydrogelization binding entities are immobilized in these cells, which entities are effective to selectively sequester a target protein or other comparable biomolecule. Different binding entities are immobilized in different cells to create a biochip that can be used to assay for a number of target biomolecules.

【國際調查報告】

(L)60202230312  
[Barcode]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor: Application No  
PCT/US 01/51265

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 601N33/543 C12Q1/00

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 601N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)  
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 00 65097 A (BIOCEPT INC ;FAGNANI ROBERTO (US); HAHN SOONKAP (US); TSINBERG PAV) 2 November 2000 (2000-11-02) the whole document	1-37
P,X	WO 01 01143 A (BRUSH CHARLES KIMBALL ;LAJOS ROBERT EMIL (US); BEUHLER ALLYSON (US) 4 January 2001 (2001-01-04) page 6 -page 15	19-24
X	WO 00 31148 A (BEUHLER ALLYSON J ;MCGOWEN JOHN A (US); MOTOROLA INC (US)) 2 June 2000 (2000-06-02) page 3-7	19-24
Y	the whole document	1-18, 25-37

Further documents are listed in the continuation of box C.  Patent family members are listed in annex.

**\* Special categories of cited documents:**

*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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
*E* earlier document but published on or after the international filing date	*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
*L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*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
*O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search: 10 July 2002  
Date of mailing of the international search report: 18/07/2002

Name and mailing address of the ISA: European Patent Office, P.O. Box 5918 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 3461-2000, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 3461-2010  
Authorized officer: Diez Schlereth, D



3

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

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern. Application No. PCT/US 01/51265
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 26725 A (MINNESOTA MINING & MFG) 11 May 2000 (2000-05-11) page 4 -page 7	19-24
Y	the whole document.	1-18, 25-37
X	WO 96 33971 A (US NAVY) 31 October 1996 (1996-10-31) page 7 -page 11	19-24
Y	US 4 098 645 A (HARTDEGEN FRANK JOSEPH ET AL) 4 July 1978 (1978-07-04) column 5, line 40 -column 7, line 6	1-37
Y	EP 0 420 053 A (GRACE W R & CO) 3 April 1991 (1991-04-03)	1-37
X	page 4, line 3 -page 5, line 29	1-3, 6, 9, 10, 13, 14
A	US 4 644 033 A (GNANOU YVES ET AL) 17 February 1987 (1987-02-17) abstract	1-37
A	US 4 071 409 A (MESSING RALPH A ET AL) 31 January 1978 (1978-01-31) abstract	1-37

3

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

31

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 01/51265

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0065097	A	02-11-2000	US 6174683 B1 16-01-2001
			AU 4669000 A 10-11-2000
			EP 1173620 A1 23-01-2002
			WO 0065097 A1 02-11-2000
WO 0101143	A	04-01-2001	US 6372813 B1 16-04-2002
			AU 5636200 A 31-01-2001
			EP 1190254 A2 27-03-2002
			WO 0101143 A2 04-01-2001
WO 0031148	A	02-06-2000	US 2002035167 A1 21-03-2002
			AU 2028500 A 13-06-2000
			WO 0031148 A2 02-06-2000
WO 0026725	A	11-05-2000	US 6156478 A 05-12-2000
			AU 2902199 A 22-05-2000
			CN 1325606 T 05-12-2001
			EP 1127293 A1 29-08-2001
			WO 0026725 A1 11-05-2000
			US 6372407 B1 16-04-2002
WO 9633971	A	31-10-1996	US 5736257 A 07-04-1998
			WO 9633971 A1 31-10-1996
			US 5847019 A 08-12-1998
US 4098645	A	04-07-1978	AT 347028 B 11-12-1978
			AT 280376 A 15-04-1978
			CA 1076027 A1 22-04-1980
			CH 639673 A5 30-11-1983
			DE 2612138 A1 30-12-1976
			FR 2314194 A1 07-01-1977
			GB 1541100 A 21-02-1979
			JP 1243714 C 14-12-1984
			JP 51150600 A 24-12-1976
			JP 59017733 B 23-04-1984
			MX 4074 E 02-12-1981
			NL 7603951 A 14-12-1976
			EP 0420053
AU 6261390 A 11-04-1991			
CA 2003942 A1 26-03-1991			
EP 0420053 A1 03-04-1991			
JP 3120467 A 22-05-1991			
NZ 235432 A 23-12-1991			
US 4644033	A	17-02-1987	FR 2539135 A1 13-07-1984
			CA 1250685 A1 28-02-1989
			DE 3461717 D1 29-01-1987
			EP 0117768 A1 05-09-1984
			JP 60006718 A 14-01-1985
US 4071409	A	31-01-1978	NONE

Form PCT/ISA/210 (patent family member) (July 1992)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 N 15/00

F

(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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 スーンカップ ハーン

アメリカ合衆国 9 2 6 7 2 カリフォルニア州 サン クレメント ビア デルフィン 5 1 1

(72) 発明者 シャオフアン ドン

アメリカ合衆国 9 2 1 0 9 カリフォルニア州 サン ディエゴ ナンバー 8 アガト ストリート 1 0 4 4

(72) 発明者 トニー ピルシェル

アメリカ合衆国 9 2 1 2 9 カリフォルニア州 サン ディエゴ フロリッサント コート 8 4 5 3

(72) 発明者 サンドラ マツモト

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州 サン ディエゴ ナンバー 4 4 1 1 パルミラ ドライブ 7 6 5 5

(72) 発明者 パベル ツィンバーグ

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州 サン ディエゴ エイチ - 1 1 8 トスカーナ ウェイ 5 3 7 0

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA19 AA20 CA01 CA11 HA11 HA20

4B029 AA07 AA21 BB15 BB20 CC01 CC02 CC05 FA12 FA15

4B063 QA01 QA05 QQ42 QQ49 QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR38 QR48

QR56 QR82 QS32 QS36 QX02

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004518138A5</a>	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2002559854	申请日	2001-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	生物概念股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物概念公司		
[标]发明人	ロベルトファグナニ スーンカップハーン シャオファン ドン トニーピルシエル サンドラ マツモト パベル ツインバーグ		
发明人	ロベルト ファグナニ スーンカップ ハーン シャオファン ドン トニー ピルシエル サンドラ マツモト パベル ツインバーグ		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/68 C40B40/10 C40B60/14 G01N33/543 G01N33/544 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/544 B01J2219/00351 B01J2219/00497 B01J2219/00585 B01J2219/00587 B01J2219/00596 B01J2219/00605 B01J2219/00612 B01J2219/00617 B01J2219/00621 B01J2219/00626 B01J2219 /0063 B01J2219/00637 B01J2219/00644 B01J2219/00659 B01J2219/00725 C40B40/10 C40B60/14 G01N33/5436		
FI分类号	G01N33/53.D C12M1/00.A C12Q1/68.Z G01N37/00.102 C12N15/00.A C12N15/00.F		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/HA11 4B024/HA20 4B029 /AA07 4B029/AA21 4B029/BB15 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/CC05 4B029/FA12 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ42 4B063/QQ49 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063 /QR32 4B063/QR35 4B063/QR38 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR82 4B063/QS32 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	谷义 安倍晋三和夫		
优先权	60/243699 2000-10-26 US		
其他公开文献	JP2004518138A		

#### 摘要(译)

形成具有多个光学透明的水凝胶的细胞附着于固体基材的上表面上以阵列形式的生物芯片。具有反应性的异氰酸酯基团每个小区，聚乙二醇，由聚丙二醇或它们的共聚物的水凝胶的形成。非杂交结合成员结合到这些细胞中，该元件是有效地选择性螯合靶蛋白或其它等效的生物分子。不同的结合元件被固定到不同的细胞中，以产生可用于测定几个靶生物分子的生物芯片。

