

(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2008-546407

(P2008-546407A)

(43) 公表日 平成20年12月25日(2008.12.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12M 1/00 (2006.01)	C12M 1/00 A	4B024
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B029
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 Y	
GO1N 37/00 (2006.01)	GO1N 37/00 102	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-518214 (P2008-518214)	(71) 出願人	503179779
(86) (22) 出願日	平成18年6月13日 (2006.6.13)		ベックマン コールター, インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成20年2月4日 (2008.2.4)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 92834 フラートン ノース ハーパー ブールバード 4300
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/022837	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開番号	W02007/001817		弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開日	平成19年1月4日 (2007.1.4)	(74) 代理人	100096183
(31) 優先権主張番号	60/693,046		弁理士 石井 貞次
(32) 優先日	平成17年6月23日 (2005.6.23)	(74) 代理人	100118773
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 藤田 節
(31) 優先権主張番号	60/716,486	(74) 代理人	100119183
(32) 優先日	平成17年9月14日 (2005.9.14)		弁理士 松任谷 優子
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	11/448,003		
(32) 優先日	平成18年6月7日 (2006.6.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 細胞ベースのマイクロアレイならびにその製造および使用方法

(57) 【要約】

本発明は化学およびバイオテクノロジーの分野におけるものである。本発明は、細胞ベースのマイクロアレイ、そのようなアレイを形成させるための改良された方法、ならびに診断、治療および研究におけるそのようなアレイの使用方法に関する。本発明は特に、支持体に固定化されたオリゴヌクレオチドにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドに結合したリガンド結合性分子を介して標的細胞のリガンドがアレイ支持体に固定化されるマイクロアレイに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(A) 表面リガンドを有する標的細胞；

(B) 1以上の種のバイオコンジュゲート分子；ここで、それぞれのそのような分子は、オリゴヌクレオチド分子部分にコンジュゲートされたりガンド結合性分子部分を含み、それぞれのそのような種は、異なるリガンド結合性部分を含む；および

(C) 1以上の種のオリゴヌクレオチド分子が固定化された支持体；ここでそれぞれのそのような種は、異なるヌクレオチド配列を有する；
を含んでなり、

ここで、バイオコンジュゲート分子のオリゴヌクレオチド部分と、支持体に固定化されたオリゴヌクレオチドとを、互いにハイブリダイズさせ、そのハイブリダイズしたバイオコンジュゲート分子のリガンド結合性分子を該標的細胞の表面リガンドに結合させ、それにより該標的細胞を該支持体に固定化する、細胞ベースのマイクロアレイ。

【請求項2】

該マイクロアレイが、複数の異なる種の標的細胞を含み、それぞれのそのような種を、異なる種のバイオコンジュゲート分子に結合させ、その異なる種のバイオコンジュゲート分子を、該支持体に固定化されたオリゴヌクレオチドの秩序だったアレイにハイブリダイズさせる、請求項1記載の細胞ベースのマイクロアレイ。

【請求項3】

該固体支持体がガラス、紙、光ファイバーまたはプラスチックである、請求項1記載の細胞ベースのマイクロアレイ。

【請求項4】

該標的細胞が哺乳類細胞、爬虫類細胞、鳥類細胞、魚類細胞、真菌細胞、植物細胞、酵母細胞、細菌細胞またはウイルス粒子である、請求項1記載の細胞ベースのマイクロアレイ。

【請求項5】

該表面リガンドが、正常標的細胞の表面上に天然で存在する抗原表面タンパク質、受容体、膜貫通酵素である、請求項1記載の細胞ベースのマイクロアレイ。

【請求項6】

該表面リガンドの存在が病態に関連している、請求項1記載の細胞ベースのマイクロアレイ。

【請求項7】

該リガンド結合性分子が免疫グロブリン、ホルモン、免疫調節物質、サイトカイン、ケモカイン、薬理学的物質、または膜貫通酵素の基質もしくはインヒビターである、請求項1記載の細胞ベースのマイクロアレイ。

【請求項8】

(A) アミノ基を有するオリゴヌクレオチドをヘテロ官能性リンカーと接触させ、ここで、該リンカーは、該アミノ基に対して反応性である第1基、およびチオール基に対して反応性である第2基を有し、該ヘテロ官能性リンカーの第1基が該オリゴヌクレオチドの該アミノ基に結合するのを可能にするのに十分な条件下で該接触を行い、それにより、オリゴヌクレオチド-ヘテロ官能性リンカーコンジュゲートを形成させる工程、および

(B) 該オリゴヌクレオチド-ヘテロ官能性リンカーコンジュゲート(A)を、該ヘテロ官能性リンカーの第2基に対して反応性であるチオール基を有するタンパク質と接触させ、ここで、該タンパク質の該チオール基が該オリゴヌクレオチド-ヘテロ官能性リンカーコンジュゲートのヘテロ官能性リンカーの第2基に結合するのを可能にするのに十分な条件下で該接触を行い、それにより、該バイオコンジュゲート分子の種の分子を形成させる工程

を含む方法により、該バイオコンジュゲート分子の1つの種の分子を形成させる、請求項1記載の細胞ベースのマイクロアレイ。

【請求項9】

10

20

30

40

50

該ヘテロ官能性リンカーの第1基がNHS基であり、該ヘテロ官能性リンカーの第2基がマレイミド基である、請求項8記載の細胞ベースのマイクロアレイ。

【請求項10】

該ヘテロ官能性リンカーが、スルホ-SMCC、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMPB、スルホ-LC-SMPT、SVSB、SIACX、SIA、SIAXXおよびNP1Aよりなる群から選ばれる、請求項8記載の細胞ベースのマイクロアレイ。

【請求項11】

該マイクロアレイが該標的細胞の生存度をアッセイする、請求項1記載の細胞ベースのマイクロアレイ。

【請求項12】

該マイクロアレイが血液型をアッセイする、請求項1記載の細胞ベースのマイクロアレイ。

【請求項13】

該マイクロアレイが細胞型をアッセイする、請求項1記載の細胞ベースのマイクロアレイ。

【請求項14】

該マイクロアレイが該標的細胞の内部成分の存在または発現をアッセイする、請求項1記載の細胞ベースのマイクロアレイ。

【請求項15】

該内部成分の存在または発現がアポトーシス状態または病態に特徴的である、請求項14記載の細胞ベースのマイクロアレイ。

【請求項16】

該マイクロアレイが、該固定化細胞内で産生された核酸分子の存在に関してアッセイする、請求項1記載の細胞ベースのマイクロアレイ。

【請求項17】

細胞集団が、所望の表面リガンドを有する標的細胞を含有するかどうかを判定するための方法であって、

(A) (1) 1以上の種のバイオコンジュゲート分子；ここで、それぞれのそのような種は、オリゴヌクレオチド分子部分にコンジュゲートされたりリガンド結合性分子部分を含み、バイオコンジュゲート分子の該種の少なくとも1つは、所望の表面リガンドに結合するリガンド結合性分子部分を含む；および

(2) 1以上の種のオリゴヌクレオチド分子が固定化された支持体；ここでそれぞれのそのような種は、異なるヌクレオチド配列を有し、少なくとも1つの種は、該バイオコンジュゲート分子のオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列にハイブリダイズしうる；の存在下、該細胞集団をインキュベートし、ここで、

(a) 該バイオコンジュゲートの相補的ヌクレオチド配列と該支持体固定化オリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーション、および

(b) 該バイオコンジュゲート分子のリガンド結合性分子と該標的細胞の所望の表面リガンドとが結合し、それにより該標的細胞を該支持体に固定化することを可能にするのに十分な条件下で該インキュベーションを行い、

(B) 支持体固定化オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしているオリゴヌクレオチド部分を含有するバイオコンジュゲートのリガンド結合性分子への該標的細胞の表面リガンドの結合により達成される該表面への細胞の固定化を検出することにより、該集団のいずれかの細胞が該表面リガンドを有するかどうかを判定する工程を含んでなる方法。

【請求項18】

該マイクロアレイが、複数の異なる種の標的細胞を含み、それぞれのそのような種を、異なる種のバイオコンジュゲート分子に結合させ、その異なる種のバイオコンジュゲート分子を、該支持体に固定化されたオリゴヌクレオチドの秩序だったアレイにハイブリダイズさせる、請求項17記載の方法。

【請求項19】

10

20

30

40

50

該標的細胞が哺乳類細胞、爬虫類細胞、鳥類細胞、魚類細胞、真菌細胞、植物細胞、酵母細胞、細菌細胞またはウイルス粒子である、請求項17記載の方法。

【請求項20】

該表面リガンドが、正常標的細胞の表面上に天然で存在する抗原表面タンパク質、受容体、膜貫通酵素である、請求項17記載の方法。

【請求項21】

該表面リガンドの存在が病態に関連している、請求項17記載の方法。

【請求項22】

該リガンド結合性分子が免疫グロブリン、ホルモン、免疫調節物質、サイトカイン、ケモカイン、薬理学的物質、または膜貫通酵素の基質もしくはインヒビターである、請求項17記載の方法。

10

【請求項23】

該固体支持体がガラス、紙、光ファイバーまたはプラスチックである、請求項17記載の方法。

【請求項24】

該固体支持体が光導波管であり、光ファイバー導波管検出器を使用して、検出可能な標識を測定することにより、該表面への標的細胞の固定化の検出を行う、請求項17記載の方法。

【請求項25】

(A) アミノ基を有するオリゴヌクレオチドをヘテロ官能性リンカーと接触させ、ここで、該リンカーは、該アミノ基に対して反応性である第1基、およびチオール基に対して反応性である第2基を有し、該ヘテロ官能性リンカーの第1基が該オリゴヌクレオチドの該アミノ基に結合するのを可能にするのに十分な条件下で該接触を行い、それにより、オリゴヌクレオチド-ヘテロ官能性リンカー-コンジュゲートを形成させる工程、および

20

(B) 該オリゴヌクレオチド-ヘテロ官能性リンカー-コンジュゲート(A)を、該ヘテロ官能性リンカーの第2基に対して反応性であるチオール基を有するタンパク質と接触させ、ここで、該タンパク質の該チオール基が該オリゴヌクレオチド-ヘテロ官能性リンカー-コンジュゲートのヘテロ官能性リンカーの第2基に結合するのを可能にするのに十分な条件下で該接触を行い、それにより、該バイオコンジュゲート分子の種の分子を形成させる工程

30

を含む方法により、該バイオコンジュゲート分子の1つの種の分子を形成させる、請求項17記載の方法。

【請求項26】

該ヘテロ官能性リンカーの第1基がNHS基であり、該ヘテロ官能性リンカーの第2基がマレイミド基である、請求項25記載の方法。

【請求項27】

該ヘテロ官能性リンカーが、スルホ-SMCC、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMPB、スルホ-LC-SMPT、SVSB、SIACX、SIA、SIAXXおよびNP1Aよりなる群から選ばれる、請求項25記載の方法。

【請求項28】

いずれかの固定化細胞が所望の内部分子を有するかどうかを判定する工程を更に含む、請求項17記載の方法。

40

【請求項29】

該内部成分の存在または発現がアポトーシス状態または病態に特徴的である、請求項28記載の方法。

【請求項30】

細胞の表面リガンドに結合するリガンド結合性分子を特定するための方法であって、

(A) (1) 該細胞の表面リガンドに結合すると疑われる候補リガンド結合性分子；

(2) オリゴヌクレオチド分子部分にコンジュゲートされたりガンド結合性分子部分を含むバイオコンジュゲート分子；および

50

(3) オリゴヌクレオチド分子が固定化された支持体；

ここで、該バイオコンジュゲートオリゴヌクレオチドおよび該支持体固定化オリゴヌクレオチドは互いにハイブリダイズしうる；

の存在下、該表面リガンドを有する細胞の集団をインキュベートし、ここで、

(a) 該バイオコンジュゲートオリゴヌクレオチドおよび該支持体固定化オリゴヌクレオチドが互いにハイブリダイズすること、および

(b) 該バイオコンジュゲートのリガンド結合性分子部分が該細胞の表面リガンドに結合すること

を可能にするのに十分な条件下で該インキュベーションを行い、

(B) 該候補リガンド結合性分子の存在が該固体支持体に対する該細胞の固定化の度合に影響を及ぼすかどうかを判定する工程を含んでなる方法。

10

【請求項 3 1】

(A) 固体支持体に固定化された細胞のマイクロアレイの存在下、候補所望分子をインキュベートし、ここで、該マイクロアレイは、

(1) 該細胞の表面リガンドに結合しうるリガンド結合性分子、

(2) オリゴヌクレオチド分子部分にコンジュゲートされたりリガンド結合性分子部分を含むバイオコンジュゲート分子、および

(3) オリゴヌクレオチド分子が固定化された支持体

の存在下、表面リガンドを有する細胞の集団をインキュベートすることにより形成され、ここで、該支持体には、該バイオコンジュゲートのオリゴヌクレオチド部分にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド分子が固定化されており、該バイオコンジュゲートのリガンド結合性分子部分は該細胞の表面リガンドに結合して該細胞を該固体支持体に固定化し、

20

(B) 該候補所望分子の存在が該固体支持体への該細胞の固定化の度合に影響を及ぼすかどうかを判定すること

を含んでなる、所望の分子に関してスクリーニングするための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対する相互参照：

本出願は、米国仮特許出願第60/693,046号（2005年6月23日付け出願）および第60/716,486号（2005年9月14日付け出願）（それらの両方の出願の全体を参照により本明細書に組み入れることとする）に基づく優先権を主張するものである。

30

【0002】

発明の分野：

本発明は化学およびバイオテクノロジーの分野におけるものである。本発明は、細胞ベースのマイクロアレイ、そのようなアレイを形成させるための改良された方法、ならびに診断、治療および研究におけるそのようなアレイの使用法に関する。本発明は特に、支持体に固定化されたオリゴヌクレオチドにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドに結合したりリガンド結合性分子を介して標的細胞のリガンドがアレイ支持体に固定化されるマイクロアレイに関する。

40

【背景技術】

【0003】

発明の背景：

生物学的流体および組織サンプルにおける生理学的に重要な物質の検出および定量のためのアッセイは科学研究および医療分野における重要な手段である。

【0004】

1. アッセイおよびマイクロアレイ

ヒト血清のような一般的な生物サンプルの比較的高い濃度の成分を検出しうるいくつかの異なるタイプのアッセイが開発されている（Zhang, T.H.ら, “Detection For Anti-Hantavirus IgM In Patient Serum With Silver Enhanced Dot Immunogold Filtration Ass

50

ay,” *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2000 Sep;14(3):266-7)。
 そのようなアッセイには、高分解能ゲル電気泳動（米国特許出願公開番号US2004/0081979
 (Knezevic, V.ら)、および内在性酵素の触媒活性に基づく試験方法 (Bhattacharyya,
 S.P.ら, “Structural Analysis Of DNA Cleaved In Vivo By Bacteriophage T4 Termin
 ase,” *Gene* 1994 Aug 19;146(1):67-72; Gaillot, O.ら, “Molecular Characterizatio
 n And Expression Analysis Of The Superoxide Dismutase Gene From *Streptococcus Ag
 alactiae*,” *Gene* 1997 Dec 19;204(1-2):213-8; Trigueros, S.ら, “Novel Display Of
 Knotted DNA Molecules By Two-Dimensional Gel Electrophoresis,” *Nucleic Acids R
 es.* 2001 Jul 1;29(13):E67-7)が含まれる。これらの方法は一般に、非常に低い濃度で
 存在しうる多数の他の生理学的に重要なサンプル構成成分（例えば、細胞調節に本質的に
 関与している内在性分子（ホルモン、ステロイド、生化学的メッセンジャー）；生物の基
 本構成成分（アミノ酸、タンパク質、多糖）；遺伝物質（DNA、RNA）；ビタミン、薬物お
 よび薬物代謝産物；毒素、病原体、および免疫系により産生される物質）を検出し定量す
 るのに必要な感度を有していない。特に、そのような方法は一般に、ホルモン受容体のよ
 うな細胞表面タンパク質、サイトカイン、免疫調節物質（例えば、インテグリン、セレク
 チンなど）、酵素または他の分子を特徴づけ又はアッセイするには不適當である。

10

【0005】

マイクロアレイは、多数のアナライトの同時かつ協同的なアッセイを可能にするために
 製薬業界およびバイオテクノロジー産業において広く使用されている（米国特許出願公開
 番号US2004/0067539 (Carlsson, R.ら)；Chen, G.Y.ら, “Array-Based Technologies An
 d Their Applications In Proteomics,” *Curr. Top. Med. Chem.* 2003;3(6):705-724; P
 CT公開番号WO01/69247 (Carlsson, R.ら)；Yeo, D.S.ら, “Strategies For Immobiliza
 tion Of Biomolecules In A Microarray,” *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2004
 May;7(3):213-221)。そのようなアッセイは、候補治療物質を特定するためにヒトの疾
 患過程における遺伝子およびタンパク質発現パターンを特徴づけるのに特に有用である。

20

【0006】

オリゴヌクレオチドマイクロアレイは典型的には、オリゴヌクレオチドのマイクロパ
 ターン化 (micropatterned) 蒸着を伴い、相補的オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼー
 ションを検出する（例えば、Chittur, S.V. “DNA Microarrays: Tools For The 21st Cent
 ury,” *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2004 Sep;7(6):531-537; Sarang, S.S.ら
 , “Discovery Of Molecular Mechanisms Of Neuroprotection Using Cell-Based Bioass
 ays And Oligonucleotide Arrays,” *Physiol. Genomics* 2002 Oct 29;11(2):45-52; Eps
 tein, J.R.ら, “High-Density, Microsphere-Based Fiber Optic DNA Microarrays,” *B
 iosens Bioelectron.* 2003 May;18(5-6):541-546; Chen, G.Y.ら, “Array-Based Techno
 logies And Their Applications In Proteomics,” *Curr. Top. Med. Chem.* 2003;3(6):7
 05-724; Wells, J.M. “Genes Expressed In The Developing Endocrine Pancreas And T
 heir Importance For Stem Cell And Diabetes Research,” *Diabetes Metab. Res. Rev.*
 2003 May-Jun;19(3):191-201; Reilly, S.C.ら, “Discovering Genes: The Use Of Mi
 croarrays And Laser Capture Microdissection In Pain Research,” *Brain Res. Brain
 Res. Rev.* 2004 Oct;46(2):225-233; Khetani, S.R.ら, “Exploring Interactions Bet
 ween Rat Hepatocytes And Nonparenchymal Cells Using Gene Expression Profiling,”
Hepatology. 2004 Sep;40(3):545-554; Hardiman, G., “Microarray Platforms - Comp
 arisons And Contrasts,” *Pharmacogenomics* 2004 Jul;5(5):487-502; Meloni, R.ら,
 “DNA Microarrays And Pharmacogenomics,” *Pharmacol. Res.* 2004 Apr;49(4):303-308
 ; Kultima, K.ら, “Valproic Acid Teratogenicity: A Toxicogenomics Approach,” *En
 viron. Health Perspect.* 2004 Aug;112(12):1225-1235を参照されたい)。

30

40

【0007】

抗体およびタンパク質マイクロアレイは、標的細胞のタンパク質補体の包括的分析を行
 うための、ロースルーフトタンパク質相互作用研究（例えば、ELISA）に代わる手段と
 しても記載されている（Panicker, R.C.ら, “Recent Advances In Peptide-Based Micro

50

array Technologies,” *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2004 Sep;7(6):547-556; Pavlickova, P.ら, “Advances In Recombinant Antibody Microarrays,” *Clin. Chim. Acta.* 2004 May;343(1-2):17-35; Chen, G.Y.ら, “Array-Based Technologies And Their Applications In Proteomics,” *Curr. Top. Med. Chem.* 2003;3(6):705-724; Nielsen, U.B.ら, “Multiplexed Sandwich Assays In Microarray Format,” *J. Immunol. Methods* 2004 Jul;290(1-2):107-120; Bailey, S.N.ら, “Microarrays Of Small Molecules Embedded In Biodegradable Polymers For Use In Mammalian Cell-Based Screens,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004 Nov 16;101(46):16144-9. Epub 2004 Nov 16; 米国特許出願公開番号US2004/0033546 (Wang, D.), US2003/0153013 (Huang, R.P.); US2003/0108972 (Zweig, S.E.ら); US2003/0108949 (Bao, G.ら); 2002/0164656 (Hoeffler, J.P.ら); PCT 公開番号WO99/40434 (Hoeffler, J.P.ら); PCT 公開番号WO2004/076678 (Green, L.); PCT 公開番号WO2004/005477 (Charych, D.ら); PCT 公開番号WO02/073180 (Huang, R.P.); PCT 公開番号WO02/39120 (George, S.T.ら); PCT 公開番号WO02/12893 (Cardone, M.H.ら); PCT 公開番号WO00/63701 (Brown, P.ら); PCT 公開番号WO03/003014 (Pearce, C.D.J.ら)。PCT 公開番号WO02/083918 (Wang, D.) には、ヒドロゲルベースのマイクロアレイが開示されている。PCT 公開番号WO01/36585 (Anderson, N.L.) には、フェージベースのマイクロアレイが開示されている。相補的オリゴヌクレオチドが互いにアニーリングすることは、オリゴヌクレオチドマイクロアレイをタンパク質アレイに変換するための手段として、オリゴヌクレオチドでタグ付けされたタンパク質の使用につながった(例えば、Reddy, M.P.ら, 米国特許第5,648,213号; Jackson, A.M.ら, “Cell-Free Protein Synthesis For Proteomics,” *Brief Funct. Genomic Proteomic* 2004 Feb;2(4):308-319); Oleinikov, A.V.ら, “Self-Assembling Protein Arrays Using Electronic Semiconductor Microchips And In Vitro Translation,” *J. Proteome Res.* 2003 May-Jun;2(3):313-319; Weng, S.ら, “Generating Addressable Protein Microarrays With Profusion Covalent mRNA-Protein Fusion Technology,” *Proteomics* 2002 Jan;2(1):48-57を参照されたい)。

【 0 0 0 8 】

細胞ベースのマイクロアレイは、条件または標的試薬が生細胞に及ぼす影響の研究を可能にし、受容体ベースの安価なアッセイと組織および動物ベースの高価な研究との間の中間段階として医薬研究において益々頻繁に使用されつつある。そのようなマイクロアレイの細胞は、細胞結合性抗体をマイクロアレイ支持体に共有結合させることにより (Ko, K.ら, “Antibody Microarray For Correlating Cell Phenotype With Surface Marker” *Biomaterials* 26(6)687-696, 2005 (e-pub 2004))、あるいは細胞の小さなアリコートを固体支持体にプリントすることにより (Delehanty, J.B.ら, “A Comparison Of Microscope Slide Substrates For Use In Transfected Cell Microarrays,” *Biosens Bioelectron.* 2004 Nov 1;20(4):773-779; Ziauddin, J.ら, “Microarrays Of Cells Expressing Defined cDNAs,” *Nature* 2001 May 3;411(6833):107-110)、あるいは架橋または他のコーティング試薬により (Chen, G.Y.ら, “Array-Based Technologies And Their Applications In Proteomics,” *Curr. Top. Med. Chem.* 2003;3(6):705-724); Otsuka, H.ら, “Two-Dimensional Multiarray Formation Of Hepatocyte Spheroids On A Microfabricated PEG-Brush Surface,” *Chembiochem.* 2004 Jun 7;5(6):850-855; Honma, K.ら, “A Telocollagen-Based Gene Transfer In Cells Allows High-Throughput Screening Of Gene Functions,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001 Dec 21;289(5):1075-1081; Kato, K.ら, “Transfection Microarray Of Nonadherent Cells On An Oleyl Poly(Ethylene Glycol) Ether-Modified Glass Slide,” *Biotechniques* 2004 Sep;37(3):444-8, 450, 452)、あるいは該支持体への「穴あけ (cratering)」のような物理的手段により (Xu, C.W. “High-Density Cell Microarrays For Parallel Functional Determinations,” *Genome Res.* 2002 Mar;12(3):482-486)、該マイクロアレイ支持体に固定化される。他の用途、例えば光化学レジスト写真製版のための、細胞の均一マイクロパターン化アレイの製造方法は既に記載されている (Mrksich,

M.ら, "Using Self-Assembled Monolayers To Understand The Interactions Of Man-Made Surfaces With Proteins And Cells," *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1996;25:55-78)。2つの異なるタイプのテクスチャーでパターン化された表面を得るために、シリコンウェーハの表面上で反応性イオンエッチングが同様に用いられている (Craighead, H.G.ら, "Textured Thin-Film Si Solar Selective Absorbers Using Reactive Ion Etching," *Appl. Phys. Lett.* 37:653, 1980; Craighead, H.G.ら, "Textured Surfaces - Optical Storage and Other Applications," *J. Vac. Sci. Technol.* 20:316, 1982; Suh, s.Y.ら, "Morphology Dependent Contrast Measurements Of Microscopically Textured Germanium Films," *Proc. SPIE* 382:199, 1983)。細胞ベースのマイクロアレイを得るためにフォトレジストスタンピングが用いられている (Singhvi R.ら, "Engineering Cell Shape And Function," *Science* 264:696-698, 1994)。金表面を特異的タンパク質のパターンでコーティングするために、強力であるが非共有結合性の金属キレーションが用いられている (Sigal, G.B.ら, "A Self-Assembled Monolayer For The Binding And Study Of Histidine-Tagged Proteins By Surface Plasmon Resonance," *Anal. Chem.* 68:490-497, 1996)。米国特許第6,103,479 (Taylor, D.L.) およびPCT公開番号W003/102578 (Van Damme, H.ら) は、細胞ベースのハイスループットマイクロアレイを形成させ使用するための方法を開示している。米国特許出願公開番号US20030157523 (Franz, G.) は、非生細胞の染色可能な切片を与える、個々のウェル内で凍結物質を蒸着させることにより得られる、細胞のアレイを開示している。

10

20

【 0 0 0 9 】

組織ベースのマイクロアレイも記載されている (例えば、Braunschweig, T.ら, "Perspectives In Tissue Microarrays," *Comb. Chem High Throughput Screen.* 2004 Sep;7(6):575-585; Shergill, I.S.ら, "Tissue Microarrays: A Current Medical Research Tool," *Curr. Med. Res. Opin.* 2004 May;20(5):707-712); PCT公開番号W002/48674 (Knezevic, V.ら) を参照されたい)。

【 0 0 1 0 】

II. バイオコンジュゲート

バイオコンジュゲート、例えばタンパク質-オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、多種多様な分子生物学的用途において用いられている (Reddy, M.P.ら, 米国特許第5,648,213号; Farooqui, F.ら, 米国特許出願第10/032,592号; 米国特許出願公開番号20050164292)。例えば、抗体または酵素に結合したオリゴヌクレオチドのようなバイオコンジュゲートがイムノアッセイにおけるハイブリダイゼーションプローブとして使用されている (米国特許第5,648,213 (Reddy, M.P.ら); Ghosh, S.S.ら, "Use Of Maleimide-Thiol Coupling Chemistry For Efficient Syntheses Of Oligonucleotide-Enzyme Conjugate Hybridization Probes," *Bioconjug Chem* 1990 Jan-Feb;1(1):71-6; KellerおよびManak, *DNA Probes*, 2nd Edition (Stockton Press, New York, 1993; Milliganら, "Current Concepts In Antisense Drug Design," *J. Med. Chem.*, 36: 1923-1937 (1993); Drmanacら, *Science*, 260: 1649-1652 (1993); Bains, J., *DNA Sequencing and Mapping*, 4: 143-150 (1993))。それらは、アッセイ感度を改善するために診断アッセイにおいて使用されている (米国特許第6,197,513号 (Coullら))。また、オリゴヌクレオチド-抗体コンジュゲートが、核酸ベースの高感度診断アッセイの開発におけるプローブとして使用されている (Martin R.ら, "A Highly Sensitive, Nonradioactive DNA Labeling And Detection System," *13: Biotechniques* 1990 Dec;9(6):762-8) (Podbielski Aら, "Identification Of Group A Type 1 Streptococcal M Protein Gene By A Non-Radioactive Oligonucleotide Detection Method," *14: Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 1990;179(5):255-62; Carpenter W.R.ら, "A Transcriptionally Amplified DNA Probe Assay With Ligateable Probes And Immunochemical Detection," *9: Clin. Chem.* 1993 Sep;39(9):1934-8))。イソチオシアナート (ITC) コンジュゲートのような他のバイオコンジュゲートは、多用途の化学防御剤としてバイオアッセイにおいて使用される (Chung E.L., "Chemoprevention Of Lung Cancer By Isothiocyanates And Their Conjugates In A/J Mouse," *E*

30

40

50

xp Lung Res 2001 Apr-May;27(3):319-30)。相互に増強された免疫原性を有するタンパク質-多糖コンジュゲートが混合ワクチンの開発において使用されている (Gupta R.K.ら, "Adjuvants For Human Vaccines - Current Status, Problems And Future Prospects," Vaccine 1995 Oct;13(14):1263-76)。

【0011】

バイオコンジュゲートの製造は、タンパク質、オリゴヌクレオチドまたはそれらの両方を適当な連結部分で修飾し精製した後でそれらを合体させお互いと反応させることを要する複数の工程を含む。そのようなコンジュゲートは伝統的には、グルタルアルデヒド架橋、マレイミド-チオールカップリング (Ghosh, S.S.ら, "Use Of Maleimide-Thiol Coupling Chemistry For Efficient Syntheses Of Oligonucleotide-Enzyme Conjugate Hybridization Probes," Bioconjug. Chem. 1990 Jan-Feb;1(1):71-6)、イソチオシアナート-アミンカップリング (Brandtzaeg, "Conjugates Of Immunoglobulin G With Different Fluorochromes. I. Characterization By Anionic-Exchange Chromatography," Scand. J. Immunol. 2: 273-290 1973; Loken, M.R.ら, "Analysis Of Cell Populations With A Fluorescence-Activated Cell Sorter," 1975, Annals N.Y. Acad. Sci. 254: 163-171; 米国特許第5,648,213号 (Reddy, M.P.ら); Keller, G.H.ら, "DNA Probes," MacMillan Publishers Ltd., 1989) およびシッフ塩基形成/還元のような方法により製造されている。しばしば、該修飾反応は、直ちに精製し使用しなければならない不安定な反応性酵素またはオリゴマー中間体を与える。これら及び他の理由により、これらの技術を用いた場合にはコンジュゲートの収率は非常に様々である。さらに、反応時間が非常に長く、精製されたコンジュゲートを得るためにはいくつかの精製工程が一般に必要である。最後に、ほとんどの場合、化学反応の性質、非常に長い反応時間および多数の精製工程のため、酵素活性の一部が失われる。

【0012】

すべてのそのような進歩にもかかわらず、標的細胞のリガンドの発現および配置 (アレイ) を反映する様態で標的細胞を表面に結合させるための組成物および方法が依然として必要とされている。より詳しくは、固体支持体に結合したリガンド結合性分子に標的細胞のリガンドを固定化するのに適した組成物および方法が必要とされている。本発明はそのような必要性に対するものである。

【発明の開示】

【0013】

発明の概要

本発明は化学およびバイオテクノロジーの分野におけるものである。本発明は、細胞ベースのマイクロアレイ、そのようなアレイを形成させるための改良された方法、ならびに診断、治療および研究におけるそのようなアレイの使用方法に関する。本発明は特に、支持体に固定化されたオリゴヌクレオチドにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドに結合したリガンド結合性分子を介して標的細胞のリガンドがアレイ支持体に固定化されるマイクロアレイに関する。

【0014】

詳細には、本発明は、

- (A) 表面リガンドを有する標的細胞;
 - (B) 1以上の種のバイオコンジュゲート分子; ここで、それぞれのそのような分子は、オリゴヌクレオチド分子部分にコンジュゲートされたりガンド結合性分子部分を含み、それぞれのそのような種は、異なるリガンド結合性部分を含む; および
 - (C) 1以上の種のオリゴヌクレオチド分子が固定化された平面性または非平面性支持体 (例えば、ガラス、紙、光ファイバー、プラスチック、ビーズなど); ここでそれぞれのそのような種は、異なるヌクレオチド配列を有する;
- を含んでなり、
- ここで、バイオコンジュゲート分子のオリゴヌクレオチド部分と、支持体に固定化されたオリゴヌクレオチドとを、互いにハイブリダイズさせ、そのハイブリダイズしたバイオコ

10

20

30

40

50

ンジュゲート分子のリガンド結合性分子を該標的細胞の表面リガンドに結合させ、それにより該標的細胞を該支持体に固定化する（該バイオコンジュゲート分子のオリゴヌクレオチド部分と、支持体に固定化されたオリゴヌクレオチドとを、互いにハイブリダイズさせ、該リガンド結合性分子を該標的細胞の表面リガンドに結合させ、それにより該標的細胞を固定化する）、細胞ベースのマイクロアレイを提供する。

【0015】

本発明は、該標的細胞が哺乳類細胞（特にヒト細胞）、爬虫類細胞、鳥類細胞、魚類細胞、真菌細胞、植物細胞、酵母細胞、細菌細胞またはウイルス粒子である、細胞ベースのそのようなマイクロアレイの実施形態に関する。

【0016】

本発明は更に、異なるオリゴヌクレオチド配列を有する2以上のオリゴヌクレオチド分子を該支持体に結合させる、および/または異なる種のバイオコンジュゲート分子が、異なるリガンド結合性分子部分または異なるオリゴヌクレオチド配列を有する、細胞ベースのそのようなマイクロアレイの実施形態に関する。本発明はまた、2以上の異なる種のバイオコンジュゲート分子が、異なるリガンド結合性分子部分および/または異なるオリゴヌクレオチド配列を有する、細胞ベースのそのようなマイクロアレイの実施形態に関する。

【0017】

本発明はまた、マイクロアレイが、複数の異なる種の標的細胞を含み、それぞれのそのような種を、異なる種のバイオコンジュゲート分子に結合させ、その異なる種のバイオコンジュゲート分子を、該支持体に固定化されたオリゴヌクレオチドの秩序だったアレイにハイブリダイズさせる、細胞ベースのそのようなマイクロアレイの実施形態に関する。

【0018】

本発明はまた、表面リガンドが、正常標的細胞または異常標的細胞の表面上に天然で存在する抗原表面タンパク質、受容体、膜貫通酵素である、細胞ベースのそのようなマイクロアレイの実施形態に関する。本発明はまた、該表面リガンドの存在が病態または形態学的状態（例えば、アポトーシス状態）に関連している、細胞ベースのそのようなマイクロアレイの実施形態に関する。

【0019】

本発明はまた、該リガンド結合性分子が免疫グロブリン、ホルモン、免疫調節物質、サイトカイン、ケモカイン、薬理学的物質、または膜貫通酵素の基質もしくはインヒビターである、細胞ベースのそのようなマイクロアレイの実施形態に関する。

【0020】

本発明はまた、

(A) アミノ基を有するオリゴヌクレオチドをヘテロ官能性リンカーと接触させ、ここで、該リンカーは、該アミノ基に対して反応性である第1基、およびチオール基に対して反応性である第2基を有し、該ヘテロ官能性リンカーの第1基が該オリゴヌクレオチドの該アミノ基に結合するのを可能にするのに十分な条件下で該接触を行い、それにより、オリゴヌクレオチド-ヘテロ官能性リンカーコンジュゲートを形成させる工程、および

(B) 該オリゴヌクレオチド-ヘテロ官能性リンカーコンジュゲート(A)を、該ヘテロ官能性リンカーの第2基に対して反応性であるチオール基を有するタンパク質と接触させ、ここで、該タンパク質の該チオール基が該オリゴヌクレオチド-ヘテロ官能性リンカーコンジュゲートのヘテロ官能性リンカーの第2基に結合するのを可能にするのに十分な条件下で該接触を行い、それにより、該バイオコンジュゲート分子の種の分子を形成させる工程

を含む方法により、該バイオコンジュゲート分子の1つの種の分子を形成させる、細胞ベースのそのようなマイクロアレイの実施形態に関する。

【0021】

本発明は更に、該ヘテロ官能性リンカーの第1基がNHS基（特にスルホ-SMCC；スルホ-EMCS；スルホ-GMBS；スルホ-KMUS；スルホ-MBS；スルホ-SIAB；スルホ-SMPB；スルホ-LC-SM

10

20

30

40

50

PT; SVSB; SIACX; SIA, SIAXX; およびNP1A) であり、該ヘテロ官能性リンカーの第2基がマレイミド基である、細胞ベースのマイクロアレイを形成させるためのそのような方法の実施形態に関する。

【0022】

本発明はまた、該アッセイが該標的細胞の生存度をアッセイする、および/または該アッセイが該標的細胞の内部成分(特に細胞シグナリング経路の成分、Gタンパク質共役受容体または炎症の指標)の存在または発現をアッセイする、特に該内部成分の存在または発現が形態学的(例えば、アポトーシス)状態または病態に特徴的である、細胞ベースのそのようなマイクロアレイの実施形態に関する。

【0023】

本発明はまた、細胞集団が、所望の表面リガンドを有する標的細胞を含有するかどうかを判定するための方法であって、

(A) (1) 1以上の種のバイオコンジュゲート分子; ここで、それぞれのそのような種は、オリゴヌクレオチド分子部分にコンジュゲートされたりガンド結合性分子部分を含み、バイオコンジュゲート分子の該種の少なくとも1つは、所望の表面リガンドに結合しうるリガンド結合性分子部分を含む; および

(2) 1以上の種のオリゴヌクレオチド分子が固定化された支持体; ここでそれぞれのそのような種は、異なるヌクレオチド配列を有し、少なくとも1つの種は、該バイオコンジュゲート分子のオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列にハイブリダイズしうる; の存在下、該細胞集団をインキュベートし、ここで、

(a) 該バイオコンジュゲートの相補的ヌクレオチド配列と該支持体固定化オリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーション、および

(b) 該バイオコンジュゲート分子のリガンド結合性分子と該標的細胞の所望の表面リガンドとが結合し、それにより該標的細胞を該支持体に固定化することを可能にするのに十分な条件下で該インキュベーションを行い、

(B) 支持体固定化オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしているオリゴヌクレオチド部分を含むバイオコンジュゲートのリガンド結合性分子への該標的細胞の表面リガンドの結合により達成される該表面への細胞の固定化を検出することにより、該集団のいずれかの細胞が該表面リガンドを有するかどうかを判定する工程を含んでなる方法を提供する。

【0024】

本発明はまた、異なるオリゴヌクレオチド配列を有する2以上のオリゴヌクレオチド分子を該支持体に結合させる、および/または2以上の異なる種のバイオコンジュゲート分子を該支持体に結合させる、および異なる種のバイオコンジュゲートが、異なるリガンド結合性分子部分または異なるオリゴヌクレオチド配列を有する、そのような方法の実施形態に関する。本発明はまた、2以上の異なる種のバイオコンジュゲート分子が、異なるリガンド結合性分子部分を有する、および/または2以上の異なる種のバイオコンジュゲート分子が、異なるオリゴヌクレオチド配列を有する、そのような方法の実施形態に関する。

【0025】

本発明はまた、該マイクロアレイが、複数の異なる種の標的細胞を含み、それぞれのそのような種を、異なる種のバイオコンジュゲート分子に結合させ、それらの異なる種のバイオコンジュゲート分子を、該支持体に固定化されたオリゴヌクレオチドの秩序だったアレイにハイブリダイズさせる、そのような方法の実施形態を提供する。

【0026】

本発明はまた、該標的細胞が哺乳類細胞(特にヒト細胞)、爬虫類細胞、鳥類細胞、魚類細胞、真菌細胞、植物細胞、酵母細胞、細菌細胞またはウイルス粒子である、そのような方法の実施形態を提供する。

【0027】

本発明はまた、該表面リガンドが、正常標的細胞の表面上に天然で存在する抗原表面タ

10

20

30

40

50

ンパク質、受容体、膜貫通酵素である、および/または該表面リガンドが、異常標的細胞の表面上に天然で存在する抗原表面タンパク質、受容体、膜貫通酵素である、および/または該表面リガンドの存在が病態（例えば、癌）に関連している、そのような方法の実施形態を提供する。

【0028】

本発明はまた、標的細胞が、検出可能な様態で（特に、検出可能な様態で標識されたりリガンド結合性分子または検出可能な様態で標識された細胞で）標識されている、そのような方法の実施形態を提供する。

【0029】

本発明はまた、該リガンド結合性分子が免疫グロブリン、ホルモン、免疫調節物質、サイトカイン、ケモカイン、薬理学的物質、または膜貫通酵素の基質もしくはインヒビターである、そのような方法の実施形態を提供する。

10

【0030】

本発明はまた、該固体支持体が光導波管であり、光ファイバー導波管検出器を使用して、検出可能な標識を測定することにより、該表面への標的細胞の固定化の検出を行う、そのような方法の実施形態を提供する。

【0031】

本発明はまた、工程（A）において、該標的細胞の表面リガンドを該バイオコンジュゲート分子のリガンド結合性分子部分に結合させた後、該バイオコンジュゲート分子のオリゴヌクレオチド部分を該支持体固定化オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせる、および/または工程（A）において、該標的細胞の表面リガンドを該バイオコンジュゲート分子のリガンド結合性分子部分に結合させ、同時に該バイオコンジュゲート分子のオリゴヌクレオチド部分を該支持体固定化オリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズさせる、および/または工程（A）において、該バイオコンジュゲート分子のオリゴヌクレオチド部分を該支持体固定化オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせた後、該標的細胞の表面リガンドを該バイオコンジュゲート分子のリガンド結合性分子部分に結合させる、そのような方法の実施形態を提供する。

20

【0032】

本発明はまた、検出可能な標識の存在を検出することにより該判定を行う、特に、該検出可能な標識がリガンド結合性分子および/または検出可能な様態で標識された細胞である、そのような方法の実施形態を提供する。

30

【0033】

本発明はまた、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド分子を解離させることなく、および/またはハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド分子を解離させた後で、検出可能な標識の存在を判定する、そのような方法の実施形態を提供する。

【0034】

本発明はまた、イオン化水、尿素含有溶液、ホルムアミド含有溶液およびオリゴヌクレオチドよりなる群から選ばれる切断試薬を使用して、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを解離させる、そのような方法の実施形態を提供する。

【0035】

本発明はまた、
（A）アミノ基を有するオリゴヌクレオチドをヘテロ官能性リンカーと接触させ、ここで、該リンカーは、該アミノ基に対して反応性である第1基、およびチオール基に対して反応性である第2基を有し、該ヘテロ官能性リンカーの第1基が該オリゴヌクレオチドの該アミノ基に結合するのを可能にするのに十分な条件下で該接触を行い、それにより、オリゴヌクレオチド-ヘテロ官能性リンカー-コンジュゲートを形成させる工程、および
（B）該オリゴヌクレオチド-ヘテロ官能性リンカー-コンジュゲート（A）を、該ヘテロ官能性リンカーの第2基に対して反応性であるチオール基を有するタンパク質と接触させ、ここで、該タンパク質の該チオール基が該オリゴヌクレオチド-ヘテロ官能性リンカー-コンジュゲートのヘテロ官能性リンカーの第2基に結合するのを可能にするのに十分な条件

40

50

下で該接触を行い、それにより、該バイオコンジュゲート分子の種の分子を形成させる工程

を含む方法により、該バイオコンジュゲート分子の1つの種の分子を形成させる、そのような方法の実施形態を提供する。

【0036】

本発明はまた、該ヘテロ官能性リンカーの第1基がNHS基（特にスルホ-SMCC；スルホ-EMCS；スルホ-GMBS；スルホ-KMUS；スルホ-MBS；スルホ-SIAB；スルホ-SMPB；スルホ-LC-SMPT；SVSB；SIACX；SIA，SIAXX；およびNP1A）であり、該ヘテロ官能性リンカーの第2基がマレイミド基である、そのような方法の実施形態を提供する。

【0037】

本発明はまた、該アッセイが該標的細胞の生存度をアッセイする、および/または該アッセイが該標的細胞の内部成分（特に細胞シグナリング経路の成分、Gタンパク質共役受容体または炎症の指標）の存在または発現をアッセイする、そのような方法の実施形態を提供する。

【0038】

本発明はまた、該内部成分の存在または発現がアポトーシス状態または病態に特徴的なものである、そのような方法の実施形態を提供する。

【0039】

本発明はまた、細胞の表面リガンドに結合するリガンド結合性分子を特定するための方法であって、

(A) (1) 該細胞の表面リガンドに結合しうると疑われる候補リガンド結合性分子；

(2) オリゴヌクレオチド分子部分にコンジュゲートされたりガンド結合性分子部分を含むバイオコンジュゲート分子；および

(3) オリゴヌクレオチド分子が固定化された支持体；ここで、該バイオコンジュゲートオリゴヌクレオチドおよび該支持体固定化オリゴヌクレオチドは互いにハイブリダイズしう；

の存在下、該表面リガンドを有する細胞の集団をインキュベートし、ここで、

(a) 該バイオコンジュゲートオリゴヌクレオチドおよび該支持体固定化オリゴヌクレオチドが互いにハイブリダイズすること、および

(b) 該バイオコンジュゲートのリガンド結合性分子部分が該細胞の表面リガンドに結合すること

を可能にするのに十分な条件下で該インキュベーションを行い、

(B) 該候補リガンド結合性分子の存在が該固体支持体に対する該細胞の固定化の度合に影響を及ぼすかどうかを判定する工程を含む方法を提供する。

【0040】

本発明はまた、工程(A)において、該標的細胞の表面リガンドを該バイオコンジュゲート分子のリガンド結合性分子部分に結合させた後、該バイオコンジュゲート分子のオリゴヌクレオチド部分を該支持体固定化オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせる、および/または該標的細胞の表面リガンドを該バイオコンジュゲート分子のリガンド結合性分子部分に結合させ、同時に該バイオコンジュゲート分子のオリゴヌクレオチド部分を該支持体固定化オリゴヌクレオチドに同時にハイブリダイズさせる、および/または該バイオコンジュゲート分子のオリゴヌクレオチド部分を該支持体固定化オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせた後、該標的細胞の表面リガンドを該バイオコンジュゲート分子のリガンド結合性分子部分に結合させる、そのような方法の実施形態を提供する。

【0041】

本発明はまた、細胞集団が、所望の内部分子を有する標的細胞を含有するかどうかを判定するための方法であって、

(A) (1) オリゴヌクレオチド分子部分にコンジュゲートされたりガンド結合性分子部分を含むバイオコンジュゲート分子、および

(2) オリゴヌクレオチド分子が固定化された支持体

10

20

30

40

50

の存在下、該細胞集団をインキュベートし、ここで、該バイオコンジュゲートオリゴヌクレオチドおよび該支持体固定化オリゴヌクレオチドは互いにハイブリダイズすることが可能であり、

(a) 該バイオコンジュゲートオリゴヌクレオチドおよび該支持体固定化オリゴヌクレオチドが互いにハイブリダイズすること、および

(b) 該バイオコンジュゲートのリガンド結合性分子部分が該標的細胞の表面リガンドに結合し、それにより細胞を該支持体に固定化すること

を可能にするのに十分な条件下で該インキュベーションを行い、

(B) 固定化標的細胞内の所望のリガンドの存在を検出することにより、該集団の固定化細胞のいずれかが所望の内部リガンドを有するかどうかを判定する工程を含む方法を提供する。

10

【0042】

本発明はまた、該マイクロアレイが、該固定化細胞内で産生された核酸分子の存在に関してアッセイする、および/またはアッセイされた核酸分子を *in vitro* 核酸増幅法により増幅する、そのような方法の実施形態に関する。

【0043】

本発明はまた、

(A) 固体支持体に固定化された細胞のマイクロアレイの存在下、候補所望分子をインキュベートし、ここで、該マイクロアレイは、

(1) 該細胞の表面リガンドに結合しうるリガンド結合性分子、

20

(2) オリゴヌクレオチド分子部分にコンジュゲートされたりリガンド結合性分子部分を含むバイオコンジュゲート分子、および

(3) オリゴヌクレオチド分子が固定化された支持体

の存在下、表面リガンドを有する細胞の集団をインキュベートすることにより形成され、ここで、該支持体には、該バイオコンジュゲートのオリゴヌクレオチド部分にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド分子が固定化されており、該バイオコンジュゲートのリガンド結合性分子部分は該細胞の表面リガンドに結合して該細胞を該固体支持体に固定化し、

(B) 該候補所望分子の存在が該固体支持体への該細胞の固定化の度合に影響を及ぼすかどうかを判定すること

を含む、所望の分子（特に薬理学的物質または化粧品）に関してスクリーニングするための方法を提供する。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0044】

好ましい実施形態の説明：

本発明は化学およびバイオテクノロジーの分野におけるものである。本発明は、細胞ベースのマイクロアレイ、そのようなアレイを形成させるための改良された方法、ならびに診断、治療および研究におけるそのようなアレイの使用に関する。本発明は特に、支持体に固定化されたオリゴヌクレオチドにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドに結合したりリガンド結合性分子を介して標的細胞のリガンドがアレイ支持体に固定化されるマイクロアレイに関する。

40

【0045】

最近、医薬産業において、薬物スクリーニングのために、細胞ベースのアレイが利用されている。これらは、受容体ベースの研究（例えば、イムノアッセイ）と高価な組織および生物研究との間の比較的安価な中間段階として役立つ。Koらは、細胞ベースのアレイが、生細胞を細胞表面マーカーに対する抗体のマイクロアレイと共にインキュベートすることにより得られうることを示している（Ko, K.ら, “Antibody Microarray For Correlating Cell Phenotype With Surface Marker” *Biomaterials* 26(6)687-696, 2005 (e-pub 2004)）。該研究においては、抗体を該表面に直接的に連結することにより得られたマイクロアレイが使用された。

【0046】

50

後記において更に詳しく説明するとおり、本発明のマイクロアレイは、所望の標的細胞を特定または分画（あるいはそうでなければ濃縮または精製）するために使用されうる。それらは、細胞表面分子により又は細胞内酵素の活性のアッセイにより示される異常（特に形態学的状態（例えばアポトーシス状態）または病態（例えば腫瘍形成状態））の存在または非存在を検出するために使用されうる。本発明のマイクロアレイは、細胞型（例えば、CD4+リンパ球など）をアッセイするために使用されうる。それらは、薬理学的物質、ホルモンおよび他の生物学的分子に関するアッセイにおいても使用されうる。

【 0 0 4 7 】

1. 本発明のマイクロアレイの好ましい特徴

本発明のマイクロアレイは、好ましくは、標的細胞を固体支持体に固定化することにより形成される。該標的細胞は、使用者の望みに応じて、生存可能なもの、生存不可能なもの、透過性が亢進しているもの、静止状態のもの、代謝的に活性なもの、誘導されるもの、抑制されるものなどでありうる。生存可能な細胞が望ましい場合には、該マイクロアレイは適当な培地の存在下でインキュベートされうる。そのような培地は、生存性を維持するために、あるいはより好ましい実施形態においては、該マイクロアレイ上で固定化細胞を培養することにより該固定化細胞を増殖させるために使用されうる。そのような好ましい実施形態のサブ実施形態の1つにおいては、該支持体は、新たに生じた細胞が該支持体と該細胞との該細胞の生成中の接触により該支持体に固定化されることを可能にするのに十分な接近可能なリガンド結合性分子を含有する。そのような好ましい実施形態の第2のサブ実施形態においては、新たに生じた細胞が上清中に流入し該支持体に固定化されなくなるよう、未使用のリガンド結合性分子が結合に利用されなくするために該支持体を処理する。そのような好ましい実施形態の第3のサブ実施形態においては、2以上の異なるリガンド結合性分子を使用して該マイクロアレイを形成させて、1つのそのようなリガンド結合性分子に固定化された細胞が、異なるリガンド結合性分子を該細胞が有する場合にのみ該支持体に結合する後代を産生するようにする（すなわち、最初の細胞の結合をもたらすために使用された未使用のリガンド結合性分子は後代細胞による結合には利用されなくされる；該マイクロアレイへのそのような後代細胞の結合は、該支持体の別のリガンド結合性分子に結合しうるリガンド分子の、該細胞のアレイ化（arraying）に左右される）。

【 0 0 4 8 】

該標的細胞は、多種多様な生物学的サンプルのいずれか、特にヒトまたは他の動物由来のもの（例えば、血液、便、喀痰、粘液、血清、尿、唾液、精液、涙、生検サンプル、組織学組織サンプル、PAPスメア、奇胎、疣贅、農産物、廃水、飲料水、ミルク、加工食、空気など）、例えば、細菌またはウイルス調製物に由来するサンプル、および他のサンプル（例えば、農産物、廃水または飲料水、ミルクまたは他の加工食、空気など）に由来しうる。したがって該固定化標的細胞は真核細胞（特に酵母、真菌、植物、鳥類または昆虫細胞）、より好ましくは哺乳類細胞（特にヒト、サル、マウス、ラット、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌなど）、原核細胞（例えば、細菌（病原性細菌、例えばB. anthracis、M. pneumoniae、S. aureus、S. typhus、E. coliなどを含む））、またはウイルスまたはウイルス粒子でありうる。標的細胞は特異的組織型、例えばリンパ球、白血球、肝細胞、幹細胞、上皮細胞、単球、神経細胞、筋細胞、赤血球などを含みうる。また、適切なパイオコンジュゲートの選択により、本発明は、標的細胞が、そのような細胞の亜集団に属するもの（例えば、CD44+単球細胞、61D3+/63D3+単球細胞など）となることを可能にする。あるいは、レーザー微量解剖（Player, A.ら, "Laser Capture Microdissection, Microarrays And The Precise Definition Of A Cancer Cell," Expert Rev Mol Diagn. 2004 Nov;4(6):831-840）のような技術を用いて、純粋な細胞集団を得ることが可能である。

【 0 0 4 9 】

固体支持体は、マイクロウェルプレート、ガラススライド、シルクスクリーニング（silk screened）ガラスプレート（Erie Scientific, New Hampshire）、膜およびファイバー（繊維）を含む（これらに限定されるものではない）種々の形態で使用されうる。さらに、該支持体は種々の部材（例えば、ピペットの先端、試験管など）上にコーティングさ

10

20

30

40

50

れうる。支持体として使用するのに現在好ましいものとしては、ポリプロピレン、ポリビニリデンメタクリレートおよびポリビニリデンフルオリドが挙げられる。該支持体は（該オリゴヌクレオチドが結合する表面を含むよう）二次元のもの、または（結合オリゴヌクレオチドが包埋されるマトリックスを含むよう）三次元のものでありうる。

【0050】

本発明の原理に従い、多種多様な固体支持体のいずれかが使用されうる。そのような支持体はガラス、プラスチック、ゲル（アガロース、アクリルアミドなど）、紙など（例えば、米国特許第5,445,934号（Fodor, S.P.A.ら）；第5,919,523号（Sundberg, S.A.ら）；第5,959,098号（Goldberg, M.ら）；第5,648,213号（Reddy, M.P.ら）；米国特許出願公開番号2002/0182629（Rich, P.M.）；PCT公開番号WO2004/076678（Green, L.）；PCT公開番号WO2004/005477（Charych, D.ら）を参照されたい）でありうる。種々の通常のアッセイ方法における使用には、顆粒状または粉末状固体支持体が特に適している。これらの物質は典型的には約1 μ m～約1インチの範囲の粒径を有する。このタイプの固体支持体の製造のための適当な物質には以下のものが含まれるが、それらに限定されるものではない：ポリビニリデンメタクリレート（例えば、Merck, Darmstadt, GermanyからFractogelとして、およびTosoHaas, Philadelphia, Pa.からToyopearlとして入手可能）；ポリプロピレン；ポリスチレン；ガラスビーズ；セルロース性物質、例えばセルロース濾紙（例えば、Sterogene Bioseparation, Inc., Arcadia, Calif.から商業的に入手可能なActigelおよびBio bind）；およびポリビニリデンフルオリドまたはPVDF（Millipore, San Francisco, Calif.からImmobilonとして商業的に入手可能）。典型的なポリビニリデンメタクリレート製品（例えば、前記のFractogelおよびToyopearl製品）は、バイオプロセッシング（bioprocessing）クロマトグラフィーにおける使用に適していることが当業者によく知られている親水性マクロ細孔性充填剤である。該製品は、ポリビニルアルコールと共重合した、メタクリレートベースの支持体であり、それらのメタクリル酸骨格構造は球状ビーズを強固にする。それらはpH 1～14および100 までの温度で安定であり、化学物質の侵襲に対して抵抗性であり、微生物によって分解されない。該充填剤は、種々の孔サイズ範囲のものが入手可能であり、本発明での使用に特に適しているのはToyopearl HW-75およびFractogel -75Fであり、これらは約45 μ mの粒径を有する["TosoHaas TSK-GEL Toyopearl," TomHaas, Philadelphia, Pa. (March 1989)]. 同等の特性を有する他の適当な物質も勿論、当業者に容易に認識されるであろう。

【0051】

1つの実施形態においては、非平面（例えば、三次元）アレイを得るためにラテックス微粒子または他のマトリックス生成性固体支持体を使用されうる。平面アレイは、平面アレイ上の標識細胞または分子の位置に基づいて結合の特定および特徴づけを可能にし、一方、非平面アレイ、特にビーズベースの非平面アレイは、示差標識された又は検出可能な状態で識別されうる粒子またはビーズを生成することにより、結合の特定および特徴づけを可能にする。例えば、生物学的標識または結合性リガンドがビーズ表面に結合しているビーズを、種々の濃度の色素（例えば、蛍光、発光など）または標識（例えば、放射性同位体、酵素など）に含浸させ、ついで細胞または他の分子と共にインキュベートして、そのような細胞または分子に結合したビーズの示差的検出により標的細胞、リガンドなどの存在が検出される非平面アレイを得る（Venkatasubbarao, S. "Microarrays - Status and Prospects," Trends in Biotechnology Dec. 2004 22(12):630-637; Morgan, E.ら "Cytometric Bead Array: A Multiplexed Assay Platform With Applications In Various Areas Of Biology, Clin. Immunol. (2004) 110:252-266)。あるいは、マイクロもしくはナノ-バーコード（Nicewarner-Pena, S.R.ら, "Submicrometer Metallic Barcodes," Science. 2001 Oct 5;294(5540):137-41; Chan, W.C.W.ら, "Luminescent Quantum Dots For Multiplexed Biological Detection And Imaging," Curr Opin Biotechnol. 2002 Feb;13(1):40-6) または金、銀、ニッケルもしくは白金のような不活性金属から製造される円柱状ナノ粒子（Nanoplex, Mountain View, CA）も使用されうる。もう1つの実施形態においては、粒子の示差的検出が可能となるよう粒子を特定するために、使用され

る粒子は、異なるサイズのもの、および/または異なる濃度の色素で内部が染色されたものでありうる (Edwards, B.S.ら “Flow Cytometry For High-Throughput, High-Content Screening, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004 8:392-398)。Luminex (Austin, TX) は、異なる比の蛍光色素を有する100個までのビーズを含有する、アドレス可能なビーズアレイを販売している。もう1つの実施形態においては、ミクロンサイズの光学的「イメージング」ファイバーをビーズ内にエッチングして、該ビーズが該ファイバー先端においてウェル内に嵌合しうるようにすることが可能である。本発明の原理に従い、種々のオリゴヌクレオチド配列を各ビーズに結合させ、細胞または他の分子に連結することが可能である。数千個のビーズが該ファイバー束上に自己集合しうる。どのビーズがどのウェルを占拠しているかを判定するために、後続の解読処理を行う。結合細胞または分子は、例えば蛍光標識を使用して測定されうる (Gunderson, K.L.ら “Decoding Randomly Ordered DNA Arrays, *Genome Res.* 2004 14:870-877; Oliphant, A.ら, “Beadarray™ Technology: Enabling An Accurate, Cost-Effective Approach To High-Throughput Genotyping,” *Biotechniques* 2002 32:S56-S61;)。また、例えば光電セル、メモリー、計時装置、アンテナなどを含有するマイクロトランスポンダー (microtransponder) または他の集積回路もしくはマイクロサーキット (例えば、250 μm \times 250 μm \times 100 μm の寸法のもの) を導入するために、マイクロ-およびナノ-技術を用いることが可能である。それぞれのそのようなマイクロトランスポンダー、回路またはマイクロサーキットは、特有で特定可能なものでありうる。そのような粒子を示差標識または検出可能な状態で識別するために、そのようなマイクロトランスポンダー、回路またはマイクロサーキット上にオリゴヌクレオチドまたはタンパク質が固定化されうる (Cain, J.T.ら “Energy Harvesting For DNA Gene Sifting And Sorting,” *Intl. J. Parallel Distributed Sys. Networks* 2001 4:140-149)。そのような非平面アレイは、Beckman Coulter, Inc. またはLuminexの検出プラットフォームと共に使用されうる。例えば、非平面アレイの光学的に識別可能なビーズを検出するために、LS™Analyzer (Beckman Coulter, Inc.) を改造することが可能である。種々のサイズのビーズを識別するためには、Multisizer™、N4 Plus™、N5™、RapidVUE™Z1™またはZ2™ (Beckman Coulter, Inc.) が使用されうる。

【0052】

もう1つの実施形態においては、本発明の固体支持体は、平面アレイ、例えばA²プラットフォーム (Beckman Coulter) およびIC100プラットフォーム (Beckman Coulter, Inc.) (米国特許第5,648,213号 (Reddy, M.P.)) を与える。本発明のそのような実施形態に従い使用するための典型的なポリビニリデンフルオリド材は前記のImmobilon AV Affinity Membraneである。この製品は、種々のリガンドが共有結合により固定化されうる、化学的に活性化される親水性微小孔性膜である。該固相マトリックスは、生物活性を保有したまま高容量の共有結合性固定化 (>100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) をもたらす。基礎膜材料は、低レベルの非特異的タンパク質吸着 (<1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) をもたらす非相互作用性重合体 (親水性ポリビニリデンジフルオリド) である。アミノ基を含有する材料の共有結合性固定化を可能にするために、該膜の全外部および内部表面を化学的に誘導体化する (“Immobilon AV Affinity Membrane,” Millipore, San Francisco, Calif. (June 1988))。この場合も、他の同等の材料が当業者に明らかであろう。

【0053】

最も好ましくは、本発明の支持体は平面であり、ガラス、プラスチック、セルロース、フィルム、紙などから構成され、(直径10 μm ~ 300 μm またはそれ以上 (最も好ましくは直径10 μm ~ 200 μm) のスポットまたは領域のマイクロアレイを形成するよう) リガンド結合性分子の秩序だったパターンを含有する。平面アレイの具体例は米国特許第5,807,522号および第6,649,404号ならびにBrown, P.O.ら (“Exploring The New World Of The Genome With DNA Microarrays,” *Nat. Genet.* 1999 21(1 Suppl):33-37); Chee, M.R.ら (“Accessing Genetic Information With High-Density DNA Arrays,” *Science* 1996 274:610-614); Sosnowski, R.G.ら (“Rapid Determination Of Single Base Mismatch Mutations In DNA Hybrids By Direct Electric Field Control,” *Proc. Natl. Acad. Sci. US*

10

20

30

40

50

A 1997 94:1119-1123)において見出されうる。そのような表面は(前記組成物などのいずれの場合と同様に)コーティングされても、あるいはコーティングされなくてもよい。それらは強固または柔軟でありうる。非常に好ましい実施形態においては、そのような平面アレイは、プラットフォームおよびIC100プラットフォーム(Beckman Coulter, Inc.) (米国特許第5,648,213号 (Reddy, M.P))を使用する分析に適したものとなるよう、より大きなアレイ内のアレイとして設計されるであろう。

【0054】

さらにもう1つの適当な固体支持体部材は光導波管である。化学的に選択的な固定化試薬を含有する平面導波管および光ファイバーよりなる化学センサーは、迅速で高感度で特異的な分析手段となる能力を有する。これらのセンサーは、異なる屈折率を有する2つの透明な媒体の間の界面の光学特性を利用する。適当な条件下、光は全内部反射により光導波管(例えば、水溶液に浸された水晶棒)内を伝わりうる。この過程の一部として、減衰波(evanescent wave)が波長の一部を水相内に透過させ、該導波管表面の外部の薄い減衰波領域内に位置する分子と光学的に相互作用しうる。特に、ファイバー表面に結合した蛍光分子がこの減衰波領域内に位置することがあり、該減衰波により励起されうる。本発明においては、蛍光標識を含有する免疫化学的コンジュゲートを取り込むために、該導波管に共有結合したオリゴヌクレオチドが使用されうる。この過程の結果として、蛍光標識(これはアナライト濃度を示す)がファイバー表面の減衰波領域内に移され、ファイバー軸に沿って伝わる光により励起される。生じた蛍光発光は該ファイバーにより捕捉され、ファイバーの末端に位置する検出器へと全内部反射により伝えられる。

10

20

【0055】

本発明をファイバー光検出に適用する特有の利点は、光ファイバーが二本鎖核酸複合体の単純な変性により再生されて、それを別のアナライトサンプルの測定に利用可能にすることである。明らかに異なる励起および/または発光波長の、異なる蛍光分子を使用することにより、複数のアナライトの同時測定を行うことが可能である。あるいは、異なるファイバーまたはファイバーの束を異なるオリゴヌクレオチド(それぞれは特異的なアナライトに対応する)でコーティングすることによっても、同時測定を行うことが可能である。均一相からシグナルを集めた後、特定のセットのファイバーを或る時点で活性化し、蛍光を測定して、特定のアナライトの濃度を測定することが可能である。ある形態、例えばA²形態においては、既に結合している抗体の全てを完全に除去することは可能でない又は実用的でないかもしれない。そのような制限はアッセイのバックグラウンド「ノイズ」を増加させるように働くかもしれないが、それらは正確な分析を妨げるものではない。

30

【0056】

好ましい実施形態においては、支持体への標的細胞の固定化は、リガンド結合性分子-オリゴヌクレオチドバイオコンジュゲートおよび支持体固定化オリゴヌクレオチドの使用により達成される。該バイオコンジュゲートのリガンド結合性成分は、標的細胞の表面上に存在するリガンド分子を認識し結合する能力を有する多種多様な分子のいずれかでありうる。適当な細胞リガンドとしては、例えば以下のものが挙げられうる: 抗原表面タンパク質(例えば、血液型決定タンパク質、幹細胞マーカー、癌関連抗原、細胞表面マーカー(例えば、CD13、CD26など)、病原性の診断に有用な抗原など)、受容体(特にホルモン受容体(例えば、インスリン受容体、成長ホルモン受容体、ステロイドホルモン受容体[これらは典型的には表面タンパク質ではない]など)、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、メッセンジャータンパク質受容体、オピエート受容体など)、膜貫通酵素(例えば、チロシンホスファターゼ、グアニル酸シクラーゼ、セリン/トレオニンまたはチロシンキナーゼ、セリンまたはチロシンホスファターゼ、プロスタグランジンH2シンターゼ、スルファターゼ、脂肪酸アミドヒドロラーゼ、モノアミンオキシダーゼなど)(例えば、Bracey, M.H.ら, "Structural Commonalities Among Integral Membrane Proteins," FEBS Lett. 567:159-165 (2004)を参照されたい)。メッセンジャータンパク質(Prochiantz A., Messenger Proteins: Homeoproteins, TAT And Others," Curr. Opin. Cell Biol. 2000 Aug;12(4):400-406)など。該リガンドの存在は健常(すなわち正常)細胞に

40

50

において天然で生じうる。あるいはそれは病態（例えば、癌、糖尿病など）（すなわち異常細胞）の存在または重症度に関連づけられうる。

【 0 0 5 7 】

標的細胞は、該標的細胞の表面上のリガンド分子への選択されたりリガンド結合性分子の結合によりマイクロアレイに結合するため、リガンド結合性分子の選択は、個々の細胞が該マイクロアレイに結合するかどうかの決定要因となる。したがって、標的細胞の所望のリガンドを考慮して、適当なリガンド結合性分子を選択する。適当なリガンド結合性分子には、例えば以下のものが含まれる：免疫グロブリン、ホルモン（特にペプチドホルモン、例えばインスリン、成長ホルモンなど）、免疫調節分子、特にサイトカイン（例えば、インターロイキン（IL）（例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14など））；リンホカインおよびシグナリング分子、例えば赤血球形成刺激タンパク質（例えば、エリスロポエチン（EPO））、腫瘍壊死因子（TNF）、インターフェロンなど、成長因子、例えばトランスフォーミング成長因子、神経成長因子、脳由来成長因子、ニューロトロフィン3、ニューロトロフィン4、肝細胞成長因子、トランスフォーミング成長因子（TGF- 1、TGF- 2、TGF- 3など）、コロニー刺激因子（G-CSF、GM-CSF、M-CSFなど）、上皮成長因子（EGF、LIF、KGF、OSM、PDGF、IGF-1など）、繊維芽細胞成長因子（FGF、FGFなど）およびケモカイン（例えば、Baggioliniら，“Human Chemokines: An Update,” *Ann. Rev. Immunology* 1997 15:675-705; Zlotnikら，“Recent Advances In Chemokines And Chemokine Receptors,” *Critical Rev. Immunology* 1999 19(1):1-4; Wangら，“Chemokines And Their Role In Tumor Growth And Metastasis,” *J. Immunological Methods* 1998 220(1-2):1-17; および Moserら，“Lymphocyte Responses To Chemokines,” *Intl. Rev. Immunology* 1998 16(3-4):323-344を参照されたい）、血液型決定マーカー（例えば、A、B、Rh、M、Nなど）[1つの明らかな例は血液型決定であろう。この場合、赤血球の表面上の種々の血液型決定マーカー（A、B、Rh、M、Nなど）に関するマーカーに特異的な抗体のオリゴヌクレオチドコンジュゲートをマイクロアレイ上に存在させる（例えば、Storry, J.R., “Human Blood Groups: Inheritance And Importance In Transfusion Medicine,” *J. Infus. Nurs.* 2003 26(6):367-372; Oriol, R., “Molecular Genetics of H,” *Vox Sang.* 2000 78 Suppl 2:105-108; Ikemoto, S., “Searching For Genetic Markers--In The Fields Of Forensic Medicine And Human Genetics,” *Nippon Hoigaku Zasshi.* 1995 49(6):419-431; Cartro n, J.P.ら，“Red Cell Membrane Diseases And Blood Group Abnormalities,” *Rev Fr Transfus Immunohematol.* 1983 26(6):599-623; Gohler, W. (1981) “The Importance Of Serogenetics As A Subspecialty Of Human Genetics,” *Z Gesamte Inn Med.* 36(11):342-347を参照されたい]；腫瘍特異的または腫瘍関連マーカー、細胞リガンドに結合する能力を有する薬理学的物質（特に、シグナル伝達に關与する細胞リガンドに結合する薬理学的物質）、膜貫通酵素の基質またはインヒビターなど。

【 0 0 5 8 】

本明細書中で用いる「免疫グロブリン」なる語は、天然の又は人工的な一価または多価抗体ならびにポリクローナルおよびモノクローナル抗体を包含し、また、そのような抗体のフラグメントまたは誘導体である分子、例えばF(ab')₂、Fab'およびFab、キメラ抗体、少なくとも2つの抗原またはエピトープ結合部位を有するハイブリッド抗体、一本鎖ポリペプチド抗体、二重特異性組換え抗体（例えば、クアドローム（quadrome）、トリオーム（triome））、種間ハイブリッド抗体、ならびに化学修飾されておりそのような分子の誘導体とみなされる、抗体製造の公知の通常の方法により又はハイブリドーマ技術もしくは抗体工学を用いるDNA組換えにより又は公知方法で合成的もしくは半合成的に製造されうる分子をも包含する。免疫グロブリンを単離または入手するための方法は当技術分野でよく知られている（Kohler, G.ら，“Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity,” *Nature* 1975 256:495-497; Taggart, R.T.ら，“Stable Antibody-Producing Murine Hybridomas,” *Science* 1983 219:1228-1230; Kozbor, D.ら，“Immunology Today” 1983 4:72-79; Morrisonら，“Chimeric Human Antibody Molecu

10

20

30

40

50

les: Mouse Antigen-Binding Domains With Human Constant Region Domains," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984;81:6851-6855; Takeda, S. 5, "Construction Of Chimaeric Processed Immunoglobulin Genes Containing Mouse Variable And Human Constant Region Sequences," Nature 1985 314:452-454; Biocca, S. 5, "Expression And Targeting Of Intracellular Antibodies In Mammalian Cells," EMBO J. 1990 9:101-108; Bird, R. E. 5, "Single-Chain Antigen-Binding Proteins," Science 1988 242:423-426; Boss, M. A. 5, "Assembly Of Functional Antibodies From Immunoglobulin Heavy And Light Chains Synthesised In E. coli," Nucl. Acids Res. 1984 12:3791-3806; Boulianne, G. L. 5, "Production Of Functional Chimaeric Mouse/Human Antibody," Nature 1984 312:643-446; Bukovsky, J. 5 "Simple And Rapid Purification Of Monoclonal Antibodies From Cell Culture Supernatants And Ascites Fluids By Hydroxylapatite Chromatography On Analytical And Preparative Scales," Hybridoma 1987 6:219-228; Diano, M. 5, "A Method For The Production Of Highly Specific Polyclonal Antibodies," Anal. Biochem. 1987 166:224-229; Huston J. S. 5, "Protein Engineering Of Antibody Binding Sites: Recovery Of Specific Activity In An Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced In Escherichia coli," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988 85:5879-5883; Jones, P. T. 5, "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse," Nature 1986 321:522-525; Langone, J.J. 5 (編), Methods Enzymol. 1987 121, Academic Press, London; Oi, V. T. 5, BioTechniques 1986 4:214-221; Riechmann, L. 5, "Reshaping Human Antibodies For Therapy," Nature 1988 332:323-327; Tramontano, A. 5, "Chemical Reactivity At An Antibody Binding Site Elicited By Mechanistic Design Of A Synthetic Antigen," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986 83:6736-6740; Wood, C. R. 5, "The Synthesis And In Vivo Assembly Of Functional Antibodies In Yeast," Nature 1985 314:446-449; および米国特許第4,946,778号 (Ladner, R. 5))。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 9 】

ポリクローナル抗体は、種々のよく知られた方法のいずれかにより製造されうる。例えば、この目的のために、抗原（例えば、標的生物学分子、または標的生物学分子のエピトープを共有する別の分子）を種々の動物に注射することにより、公知方法で種々の動物を免疫することが可能である。そのような抗原分子は天然由来のもの、DNA組換え若しくは合成法により入手可能なもの、またはそれらの断片でありうる。得られた血清から所望のポリクローナル抗体が得られ、公知方法により精製される。あるいは、標的生物学分子が配置された無傷細胞が使用されうる。免疫化のために選択される動物に応じて、抗原の投与に対する免疫応答を増強するために、種々のアジュバントも使用されうる。これらのアジュバントの具体例には、フロイントアジュバント、無機ゲル、例えば水酸化アルミニウム、界面活性物質、例えばポリアニオン、ペプチド、油エマルション、ヘモシアニン、ジニトロフェノールまたはリゾレシチンが含まれる。

【 0 0 6 0 】

所望により、所望の純度を得るために、本発明のバイオコンジュゲートのリガンド結合性分子を精製することが可能である。そのような精製を行うための方法は当業者によく知られている（例えば、免疫吸収または免疫アフィニティークロマトグラフィー、HPLC（高速液体クロマトグラフィー）またはそれらの組合せ）。適当な抗体フラグメントも公知方法により製造されうる。例えば、F(ab')₂フラグメントは、完全なポリクローナルまたはモノクローナル抗体のペプシン消化により入手可能である。Fab'フラグメントは、結合しているF(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を還元することにより入手可能であり、Fabは、例えば、該抗体分子をパインおよび還元剤で処理することにより入手可能である。

【 0 0 6 1 】

好ましい実施形態においては、該オリゴヌクレオチドリンカー系は、リガンド結合性分子に共有結合している第1オリゴヌクレオチド、および固体支持体に固定化された第2オリ

ゴヌクレオチドを含む。該オリゴヌクレオチドは少なくとも6塩基、好ましくは約10塩基、より好ましくは少なくとも約20塩基、最も好ましくは約30塩基の長さを有することが好ましい。当技術分野で十分に理解されているとおり、形成される二重らせんの強度は、ある程度は、オリゴヌクレオチドのペアの配列組成によって決まる。特に、例えば修飾塩基またはペプチド核酸を使用して、短い（すなわち、6~10塩基の）オリゴマーで、安定な二重らせんが形成されうる。

【0062】

適当なオリゴヌクレオチドは、種々の方法のいずれかにより、例えば合成的に製造することが可能であり（例えば、Herdewijn, P. "Oligonucleotide Synthesis Methods and Applications" Humana Press, Totowa, NJ (2004); Caruthers, M.H. "Chemical Synthesis Of DNA And DNA Analogues," Acc. Chem. Res. 24, 278-284 1991); Beaucate, S. L.ら, "Synthesis Of Oligonucleotides" Tetrahedron, 48:2290-2291 1992; Wright, P.ら "Large Scale Synthesis of Oligonucleotides via Phosphoramidite Nucleosides and a High-Loaded Polystyrene Support," Tetrahedron Letters, 34(21):3373-3376 1993; Wolter, A.ら, "Polymer Support Oligonucleotide Synthesis XX.sup.1 : Synthesis of a Henhctacosa Deoxynucleotide By Use of a Dimeric Phosphoramidite Synthon"; Nucleosides & Nucleosides, 5(1), pp. 65-77 (1986)を参照されたい）、天然に存在する核酸分子から（例えば、1以上の制限エンドヌクレアーゼでのDNAの消化により）得ることが可能であり、あるいは組換え技術（例えば、クローニング、DNA増幅技術（例えば、PCR (Mullis, K.ら, 米国特許第4,683,202号)、ローリングサークル増幅（米国特許第6,740,745号 (Auerbach, J.I.)）など）を用いて製造することが可能である。

10

20

【0063】

第1オリゴヌクレオチドおよび第2オリゴヌクレオチドの配列は、それらが互いにハイブリダイズしうるよう選択される。ホモ重合体分子（すなわち、一方のオリゴヌクレオチドがポリdAであり、他方がポリdTであるもの、あるいは一方のオリゴヌクレオチドがポリdCであり、他方がポリdGであるもの）を使用することは可能であるが、ヘテロ重合体分子（該オリゴヌクレオチドの配列が2、3または4つの異なるヌクレオチド種を含有するもの）が非常に効率的に機能する。

【0064】

ヘテロ重合体分子は、各アナライトの取り込み及び置換のための配列の特異的ペアの使用により、単一のサンプルにおける複数のリガンドの検出を可能にする。適当なオリゴヌクレオチドには、通常のDNAおよびRNA塩基、DNA/RNA塩基類似体（例えば、Frauendorf, A.ら, "Studies in Natural Products Chemistry," 13, 257 (1993); Milligan, J.ら, "Current Concepts In Antisense Drug Design," J. Medicinal Chem. 36, 1923 (1993)を参照されたい）、およびペプチド核酸（PNA）（例えば、Hanvey, J. C.ら, "Antisense And Antigene Properties Of Peptide Nucleic Acids," Science 258, 1481 (1992); Burchardt, O.ら, Trends in Biotechnology 11, 384 (1993)を参照されたい）を含むものが含まれるが、これらに限定されるものではない。一般に、塩基対（例えば、ワトソン・クリック二重らせん又はフーグスティーン三重らせん複合体）を形成しうる任意のオリゴヌクレオチドが本発明における使用に適しているであろう。該オリゴヌクレオチドは一本鎖のもの、または部分的もしくは完全に二本鎖のものでありうるが、好ましくは一本鎖である。それらは、天然に存在するヌクレオチド残基または修飾もしくは合成ヌクレオチド残基を含みうる。

30

40

【0065】

一般に、該オリゴヌクレオチドペアはそれらのそれぞれの配列の少なくとも一部にわたって完全に相補的であることが更に好ましい。該配列のこれらの相補的部分は、少なくとも6塩基、好ましくは少なくとも約10塩基、より好ましくは少なくとも約20塩基、最も好ましくは少なくとも約30塩基を含むべきである。もちろん、当技術分野で十分に理解されているとおり、それらの2つのオリゴヌクレオチドの間に限られた度合のミスマッチが存在する場合であっても、適当な低いストリンジェンシーの条件を用いて、ハイブリダイゼ

50

ーションを達成することが可能である。それでも、簡便のために、完全に相補的な配列の使用が好ましい。一般に、支持体に結合されるオリゴヌクレオチドの量は、本発明のバイオコンジュゲート成分のオリゴヌクレオチドに対して過剰である。

【0066】

II. 本発明のマイクロアレイの作製

A. 支持体への支持体固定化オリゴヌクレオチドの固定化

オリゴヌクレオチドは、種々の技術のいずれかを用いて支持体に固定化されうる（例えば、米国特許第5,648,213号 (Reddy, M.P.ら), Yeo, D.S.ら, “Strategies For Immobilization Of Biomolecules In A Microarray,” *Comb. Chem High Throughput Screen.* 2004 May;7(3):213-221; 米国特許第6,747,143号 (Stryer, L.ら)などを参照されたい)。米国特許第5,648,213号 (Reddy, M.P.ら)に記載の1つのアプローチによれば、オリゴヌクレオチドは、他の目的のためのオリゴヌクレオチドの合成において通常用いられる方法で、支持体上で直接的に合成される。オリゴヌクレオチド合成の基体として、粒子状および膜の両方の支持体が好適に使用されうる。あるいは、反応性官能基（例えば、アミノまたはチオール基）を含有するオリゴヌクレオチドを、それに対して反応性である適当な官能基を含有する支持体上に、オリゴヌクレオチドと支持体との間に共有結合が形成されるよう固定化することが可能である。さらにもう1つのアプローチは、アフィニティー結合による支持体へのオリゴヌクレオチドの結合を含む。例えば、ビオチン化オリゴヌクレオチドを、アビジンまたはストレプトアビジンを含有する支持体上に固定化することが可能である。当業者に明らかとなり、オリゴヌクレオチドを支持体に結合させるために他の技術も同様に用いられうる。

10

20

【0067】

B. リガンド結合性分子-オリゴヌクレオチドバイオコンジュゲートの製造

本発明の好ましい実施形態においては、マイクロアレイはオリゴヌクレオチドとタンパク質リガンド結合性分子とのバイオコンジュゲートを含む。オリゴヌクレオチドとタンパク質リガンド結合性分子とのコンジュゲート（結合）は種々の手段のいずれかにより達成されうる。

【0068】

多種多様なカップリング化学法のいずれかが用いられうる。1つのアプローチにおいては、ホモ二官能性物質（例えば、1,4-フェニレンジイソチオシアナート）が使用される。グルタルアルデヒド架橋、マレイミド-チオールカップリング (Ghosh, S.S.ら, “Use Of Maleimide-Thiol Coupling Chemistry For Efficient Syntheses Of Oligonucleotide-Enzyme Conjugate Hybridization Probes,” *Bioconjug. Chem.* 1990 Jan-Feb;1(1):71-6)、イソチオシアナート-アミンカップリング (Brandtzaeg, P. “Conjugates Of Immunoglobulin G With Different Fluorochromes. I. Characterization By Anionic-Exchange Chromatography,” *Scand. J. Immunol.* 2: 273-290 1973; Loken, M.R.ら, “Analysis Of Cell Populations With A Fluorescence-Activated Cell Sorter,” 1975 *Annals N. Y. Acad. Sci.* 254: 163-171; 米国特許第5,648,213号 (Reddy, M.P.ら); Keller, G.H.ら, “DNA Probes,” MacMillan Publishers Ltd., 1989)、およびシッフ塩基形成/還元によっても、適当なコンジュゲートが製造されうる。

30

40

【0069】

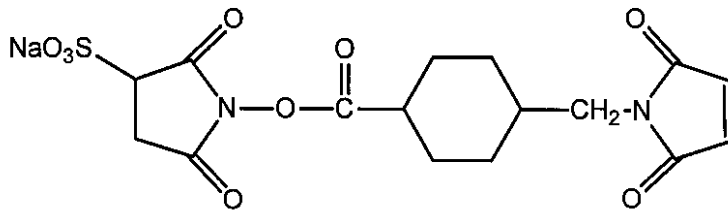
リガンド結合性分子が適当なチオール基を有する場合には、より好ましいコンジュゲート化アプローチは、米国特許第5,648,213号 (Reddy, M.P.ら)に開示されているとおり、ヘテロ二官能性試薬の使用を伴う。適切には、そのような試薬は、オリゴヌクレオチドのアミノ基に特異的な第1反応性基（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド）と、抗体またはそのフラグメントのチオール基に特異的な第2反応性基（例えば、マレイミド）とを含む。そのようなヘテロ二官能性試薬の使用は、実質的に、より高い収率をもたらす。すなわち、ホモ二官能性物質は抗体またはそのフラグメントおよび該オリゴヌクレオチドの複数のアミノ基のいずれとも反応する（そして生成物の混合物を与える）可能性があるが、適当なヘテロ二官能性試薬は特異的に反応して、1対1の抗体/オリゴヌクレオチドコンジ

50

ュゲートを形成する。Fab'フラグメントはチオール基を1個しか有さないため、それは、この方法を用いるオリゴヌクレオチドとのコンジュゲートの形成に特に適している。さらに、Fab'-オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、しばしば、全抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートと比較して、本発明におけるイムノアッセイにおいて、特に競合結合アッセイにおいて、優れた結果を与える。これは、Fab'フラグメントがハプテンまたはアナライトに対する結合領域を1個しか有さないため、競合結合反応において、全抗体（これはハプテンまたはアナライトに対する2つの結合領域を有する）の場合より高い感度をもたらすからだと解釈されうる。抗体/オリゴヌクレオチドコンジュゲートの製造に使用される1つの好ましいヘテロ二官能性物質はN-スルホスクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート（スルホ-SMCC）である。

10

【化1】



スルホ-SMCC

20

【0070】

しかし、当業者に容易に理解されるとおり、アミノおよびスルフヒドリル基により反応がもたらされる種々の架橋剤が、本発明の原理に従い同様に使用されうる。そのような架橋剤は、例えばWong, S. S., "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking," CRC Press, Boca Raton, Fla. (1991), pp. 147-164に記載されている。このタイプの典型的な架橋剤には以下のものが含まれる：N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート；N-スクシンイミジル マレイミドアセタート；N-スクシンイミジル 3-マレイミドプロピオナート；N-スクシンイミジル 4-マレイミドブチラート；N-スクシンイミジル 6-マレイミドカプロアート；N-スクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート；N-スクシンイミジル 4-(p-マレイミドフェニル)ブチラート；N-スルホスクシンイミジル 4-(p-マレイミドフェニル)ブチラート；N-スクシンイミジル o-マレイミドベンゾアート；N-スクシンイミジル m-マレイミドベンゾアート；N-スルホスクシンイミジル m-マレイミドベンゾアート；N-スクシンイミジル p-マレイミドベンゾアート；N-スクシンイミジル 4-マレイミド-3-メトキシベンゾアート；N-スクシンイミジル 5-マレイミド-2-メトキシベンゾアート；N-スクシンイミジル 3-マレイミド-4-メトキシベンゾアート；N-スクシンイミジル 3-マレイミド-4-(N,N-ジメチル)アミノベンゾアート；マレイミドエトキシ[p-(N-スクシンイミジルプロピオナート)フェノキシ]エタン；N-スクシンイミジル4-[(N-ヨードアセチル)アミノ]ベンゾアート；N-スクシンイミジル 3-マレイミド-4-(N,N-ジメチル)アミノベンゾアート；マレイミドエトキシ[p-(N-スクシンイミジルプロピオナート)-フェノキシ]エタン；N-スクシンイミジル4-[(N-ヨードアセチル)アミノ]ベンゾアート；N-スルホスクシンイミジル 4-[(N-ヨードアセチル)アミノ]ベンゾアート；N-スクシンイミジルヨードアセタート；N-スクシンイミジルプロモアセタート；N-スクシンイミジル3-(2-プロモ-3-オキソブタン-1-スルホニル)プロピオナート；N-スクシンイミジル 3-(4-プロモ-3-オキソブタン-1-スルホニル)プロピオナート；N-スクシンイミジル 2,3-ジプロモプロピオナート；N-スクシンイミジル 4-[(N,N-ビス(2-クロロエチル)アミノ)フェニル]ブチラート；p-ニトロフェニル 3-(2-プロモ-3-オキソブタン-1-スルホニル)プロピオナート；p-ニトロフェニル-3-(4-プロモ-3-オキソブタン-1-スルホニル)プロピオナート；p-ニトロフェニル 6-マレイミドカプロアート；(2-ニトロ-4-スルホン酸-フェニル)-6-マレイミドカプロアート；p-ニトロフェニルヨードアセタート；

30

40

50

p-ニトロフェニルプロモアセタート； 2,4-ジニトロフェニル-p-(-ニトロビニル)ベンゾアート； N-3-フルオロ-4,6-ジニトロフェニル)シスタミン； メチル 3-(4-ピリジルジチオ)プロピオンイミダート HCl； エチル ヨードアセトイミダート HCl； エチル プロモアセトイミダート HCl； エチル クロロアセトイミダート HCl； N-(4-アジドカルボニル-3-ヒドロキシフェニル)マレイミド； 4-マレイミドベンゾイルクロリド； 2-クロロ-4-マレイミドベンゾイル クロリド； 2-アセトキシ-4-マレイミドベンゾイルクロリド； 4-クロロアセチルフェニルマレイミド； 2-プロモエチルマレイミド； N-[4-{(2,5-ジヒドロ-2,5-ジオキソ-3-フラニル)メチル}チオフェニル]-2,5-ジヒドロ-2,5-ジオキソ-1H-ピロール-1-ヘキサナムイド； エピクロロヒドリン； 2-(p-ニトロフェニル)アリル-4-ニトロ-3-カルボキシフェニルスルフィド； 2-(p-ニトロフェニル)アリルトリメチルアンモニウム ヨージド；
 , -ビス[{(p-クロロフェニル)スルホニル}メチル]アセトフェノン； , -ビス[{(p-クロロフェニル)スルホニル}メチル]-p-クロロアセトフェノン； , -ビス[{(p-クロロフェニル)スルホニル}メチル]-4-ニトロアセトフェノン； , -ビス[{(p-トリルスルホニル)メチル]-4-ニトロアセトフェノン； , -ビス[{(p-クロロフェニル)スルホニル}メチル]-m-ニトロアセトフェノン； , -ビス[{(p-トリルスルホニル)メチル]-m-ニトロアセトフェノン； 4-[2,2-ビス[{(p-トリルスルホニル)メチル}アセチル]安息香酸； N-[4[2,2-2[{(p-トリルスルホニル)メチル}アセチル]ベンゾイル]-4-ヨードアニリン； , -ビス[{(p-トリルスルホニル)メチル]p-アミノアセトフェノン； N-[5-(ジメチルアミノ)ナフチルスルホニル] , -ビス[{(p-トリルスルホニル)メチル]-p-アミノアセトフェノン； およびN-[4-{2,2-ビス(p-トリルスルホニル)メチル}アセチル]ベンゾイル-1-(p-アミノベンジル)ジエチレントリアミンペンタ酢酸。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 1 】

より好ましくは、その代わりに、該バイオコンジュゲートの形成は、リガンド結合性分子のチオール化アミノ基と該オリゴヌクレオチドのアミノ化基との共有結合カップリングにより達成されうる。そのような実施形態においては、該オリゴヌクレオチド-タンパク質コンジュゲートの合成は以下の4工程で行われる（図1）：

1. アミノ基を有するオリゴヌクレオチドの合成；
2. ヘテロ官能性リンカーによる3'アミノ基の活性化；
3. カップリングすべきタンパク質のアミノ基のチオール化；および
4. 該活性化オリゴヌクレオチドと該チオール化タンパク質とのカップリング。

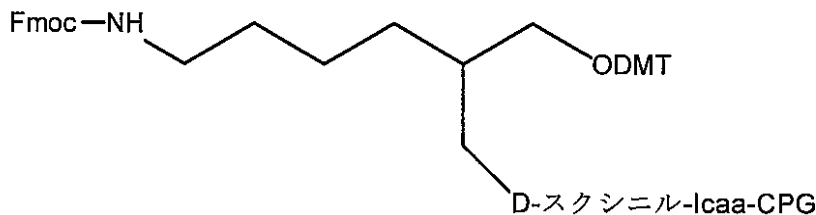
【 0 0 7 2 】

該オリゴヌクレオチドのアミノ基は該オリゴヌクレオチドの3'末端残基、該オリゴヌクレオチドの5'末端残基、または該分子の両末端の間の部位（すなわち、内部部位）に存在しうる。

【 0 0 7 3 】

アミノ基を有するオリゴヌクレオチドの合成は、好ましくは、アミノ修飾試薬、例えば C7 CPG (Glen Research, Sterling Virginia)：

【 化 2 】



を使用して行われる。

【 0 0 7 4 】

該修飾オリゴヌクレオチドを該タンパク質に連結するためには、ヘテロ官能性リンカー

が使用される。好ましくは、そのようなヘテロ官能性リンカーは、3'アミノオリゴヌクレオチドの第一級アミンと反応しうる1つの部分（例えば、NHS-エステル部分）、およびチオール基と反応しうる第2の部分（例えば、マレイミド基）を有する。適当なヘテロ官能性リンカーの具体例には以下のものが含まれる：

スルホ-SMCC スルホスクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート；
 スルホ-EMCS N-(-マレイミドカプロイルオキシ) スルホスクシンイミドエステル；
 スルホ-GMBS (N-(-マレイミドブチリルオキシ) スルホスクシンイミド エステル；
 スルホ-KMUS N-(K-マレイミドウンデカンカノイルオキシ) スルホスクシンイミドエステル；
 スルホ-LC-SPDP スルホスクシンイミジル 6-(3'-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド)ヘキサノアート；
 スルホ-MBS m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミド エステル；
 スルホ-SIAB スルホスクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾアート；
 スルホ-SMPB スルホスクシンイミジル 4-(p-マレイミドフェニル)ブチラート；
 スルホ-LC-SMPT スルホスクシンイミジル-6-(-メチル- -(2-ピリジルジチオ)トルアミド)ヘキサノアート；
 SVSB (N-スクシンイミジル-4-ビニルスルホニル)ベンゾアート；
 SIA N-スクシンイミジル ヨードアセタートまたはヨード酢酸 N-ヒドロキシスクシンイミド エステル；
 SIACX (スクシンイミジル 6-(4-ヨードアセチル)アミノ メチル-シクロヘキサン-1-カルボニル)アミノ ヘキサノアート；
 SIAXX スクシンイミジル 6(6-(((ヨードアセチル)アミノヘキサノイル)アミノヘキサノアート))；
 NP1A p-ニトロフェニル ヨードアセタート。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 5 】

これらの試薬のすべてはPierce, Rockford, ILから購入可能である。スルホ-SMCC（スルホスクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート）は好ましいヘテロ官能性リンカーである。この化合物の使用はSamoszuk, M.K.ら, (“A peroxide-generating immunoconjugate directed to eosinophil peroxidase is cytotoxic to Hodgkin's disease cells in vitro,” Antibody, Immunoconjugates Radiopharmaceuticals 2(1), 37-45 (1989))に記載されている。

【 0 0 7 6 】

好ましくは、該リンカーを該アミノオリゴヌクレオチドと反応させた後、それを該タンパク質と反応させる。室温で約8.0~8.5のpHでの反応は該オリゴヌクレオチドのアミノ基と該リンカーのエステル炭素との間のアミド結合の形成をもたらす（図1）。

【 0 0 7 7 】

該オリゴヌクレオチドにコンジュゲートすべきリガンド結合性分子のアミノ基を、好ましくは、イミノチオラン（Traut試薬）と反応させる。室温での反応は、含まれるアミノ基に対するチオール修飾の生成をもたらす（図1）。該アミノ基はアミノ末端アミノ基でありうる。あるいはそれは内部アミノ基（例えば、リシンまたはアルギニン残基の アミノ基）でありうる。

【 0 0 7 8 】

該活性化オリゴヌクレオチドと該チオール化タンパク質との間のカップリングは、好ましくは、該チオール化タンパク質をスルホ-SMCC-修飾オリゴヌクレオチドと混合することにより達成される。そのような混合は、リン酸緩衝食塩水（PBS）、3M NaCl、2mM EDTA中で行われうる。

【 0 0 7 9 】

本発明の方法においては、遊離第一級アミノ基を含有する任意のタンパク質がコンジュゲートされうる。そのようなタンパク質には、酵素、ホルモン、可溶性受容体タンパク質、ペプチド、免疫グロブリンなどが含まれる。

【 0 0 8 0 】

そのような方法は、オリゴヌクレオチドの5'または3'末端にチオール基を導入し次いでジスルフィド結合コンジュゲート化学法 (Rajur, S.B.ら, Covalent Protein-Oligonucleotide Conjugates For Efficient Delivery Of Antisense Molecules Bioconjugate Chemistry 8:935-940 (1997)) により該チオール化オリゴヌクレオチドをタンパク質と反応させるRajur, S.B.らの方法より簡便であり、より高い収率を与える。同様に、それは、スルホ-SMCCで誘導体化された抗体に5'アミノオリゴヌクレオチド (N-スクシンイミジルチオアセタートで活性化されたもの) をコンジュゲートするHendricksonらの方法 (Hendrickson, R.E.ら, "High Sensitivity Multianalyte Immunoassay Using Covalent DNA-Labeled Antibodies And Polymerase Chain Reaction," Nucl., Acids Res. 23:522-529 (1994)) ならびに米国特許第5,648,213号 (Reddy, M.P.ら) およびKeller, G.H.ら, "DNA Probes," MacMillan Publishers, Ltd. 1989の方法より優れている。

10

【 0 0 8 1 】

C. マイクロアレイの構築

好ましい実施形態においては、該バイオコンジュゲートのオリゴヌクレオチドを支持体固定化オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせ、細胞表面上のリガンドへの結合により該バイオコンジュゲートのリガンド結合性分子に細胞を該支持体へ繋ぎとめさせることにより、マイクロアレイを形成させる (図2)。しかし、該マイクロアレイの成分を合体させる順序は重要でないと理解されるであろう。したがって、例えば、標的細胞を該バイオコンジュゲートと結合させ、ついで該細胞-バイオコンジュゲートをマイクロアレイに固定化することにより、適当なマイクロアレイが製造されうる。

20

【 0 0 8 2 】

本発明において使用する相補的オリゴヌクレオチドの間の二本鎖の形成のための最適な条件の決定は、本質的には常套的な方法で経験的に行われうる。一般に、当技術分野でよく知られているとおり、ハイブリダイゼーションを促進させるためには約0.1M~約3Mの濃度の塩 (例えば、NaCl、KCl、NH₄Cl、第四級アンモニウム塩など) の存在が好ましい。特に、相補的オリゴヌクレオチドのペアに関して50%の二本鎖形成が生じる温度 (融解温度またはT_m) が、任意の与えられたオリゴヌクレオチドペアに関して常套手段により決定されうる。T_mは、配列の長さおよび組成、ならびに該オリゴヌクレオチド中で用いられる個々の塩基の結合アフィニティーを含む多数の要因に左右される。任意の与えられた相補的オリゴヌクレオチドペアに関して、該温度を変化させ特定の波長 (例えば、254nm) における吸光度を測定することにより分光光度的に常法により、T_mを決定することが可能である。オリゴヌクレオチドの任意のペアに関してT_mが決定されたら、50%を上回る結合を得るためにはT_mより低い温度を用いることが一般には好ましい。一般に、二本鎖形成は、複合体形成と同じ範囲内の温度で生じ、二本鎖形成の量を増加させるためには、より低い温度が好ましい。

30

40

【 0 0 8 3 】

適当な濃度の固定化細胞の生成は僅か数秒で生じることもある。好ましくは、マイクロアレイの形成の完了に要するのは、約6時間未満、最も好ましくは約3時間未満である。また、マイクロアレイの形成は広範な温度で生じうるが、これは、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの変性温度またはリガンド結合性分子-リガンド相互作用の解離温度により、あるいは生細胞が望ましい場合には、使用する標的細胞の生存限界温度により、上限が制限される。そのような温度は一般には約15 ~ 約40の範囲、最も好ましくは (簡便のために) ほぼ室温 ~ 約37 の範囲である。

【 0 0 8 4 】

pHも非常に広範囲で用いられうるが、この場合も、制限要因は細胞の生存可能性、核酸

50

変性、またはリガンド結合性分子-リガンド相互作用の解離である。好ましくは、pHは約4～約10の範囲、最も好ましくは約7である。当技術分野でよく知られているとおり、物質を溶解状態で維持し非特異的相互作用を最小限度にするためには、ウマまたはウシ胎児血清タンパク質のような種々の物質の添加が有用でありうるが、そのような添加剤は決定的なものではない。複合体形成は典型的には、水溶液（これは、所望により、約25%までの適当な非水性成分、例えばアルコール、エーテル、グリコールなどを含有しうる）中で行われる。

【0085】

ついで、支持体およびそれに結合した物質は、未結合物質を含有する溶液から物理的に分離されうる。ついで、支持体に非特異的に結合しているが複合体を形成していない任意の試薬が、例えば、支持体の穏やかな洗浄により容易に除去されうる。形成した二本鎖が、早すぎる時点で解離しないことを保証するためには、該洗浄工程中の適当な条件（例えば、洗浄溶液中の適当な塩濃度）の使用が好適である。

10

【0086】

1つの実施形態においては、該マイクロアレイは唯一の固定化バイオコンジュゲートを含有し（または含有するよう適合化され）、したがって、該バイオコンジュゲートのリガンド結合性分子により認識されるリガンドを有する細胞のみの結合を可能にする。

【0087】

もう1つの実施形態においては、該マイクロアレイは、2以上の異なる固定化バイオコンジュゲート分子を含有する（または含有するよう適合化される）。好ましくは、そのようなアレイは2～10の固定化バイオコンジュゲート分子、より好ましくは10～100、より一層好ましくは100～1000またはそれ以上の固定化バイオコンジュゲート分子を含有する（または含有するよう適合化される）。そのようなマイクロアレイは、異なるバイオコンジュゲートをそれぞれが含有する（または含有するよう適合化される）複数の分離した領域またはゾーンを生成するよう設計されうる。そのようなマイクロアレイの使用は、複数の細胞型または複数のリガンドが同一マイクロアレイに結合することを可能にして、それらが別々にアッセイまたは研究されることを可能にする。1つの実施形態においては、そのような領域またはゾーンは互いに連絡されていて、非固定化細胞または試薬が複数の領域またはゾーンと接触することを可能にする。あるいは、そのようなゾーンは物理的に分離していてもよい（例えば、マイクロタイタープレートのウェル）。

20

30

【0088】

もう1つの実施形態においては、該マイクロアレイは、複数の異なるバイオコンジュゲートを含有しうる（または含有するよう適合化されうる）単一の領域を生成するようランダムまたは偽ランダム（pseudo randomly）に設計された2以上の異なる固定化バイオコンジュゲート分子を含有する（または含有するよう適合化される）。そのようなマイクロアレイの使用は、細胞間コミュニケーションのアッセイまたは研究を行うことを可能にする状態で複数の細胞型または複数のリガンドが同一マイクロアレイに結合することを可能にする。

【0089】

1つの実施形態においては、該マイクロアレイへの標的細胞の固定化の度合は、マイクロアレイ当たり又は領域もしくはゾーン当たりの固定化細胞の数を計数することにより決定されうる。あるいは、そのような度合は、細胞産物の発生または細胞基質の消費を測定することにより間接的に決定されうる。しかし、好ましい実施形態においては、細胞固定化の度合は、検出可能な状態で標識された結合性試薬の使用により決定されうる。1つの実施形態においては、そのような結合性試薬は、固定化細胞のリガンドに対するその結合能に関して選択される（結合リガンドは、該バイオコンジュゲートのリガンド結合性分子により認識されるリガンドと同じ又は異なりうる）。

40

【0090】

該結合性試薬は、標的細胞に結合しうる任意の試薬でありうる。そのような試薬は、例えば、抗体または抗体フラグメント、またはリガンド結合性分子の前記クラスのいずれか

50

ル]ビニル} 1 メチル キノリニウム ヨージド、2 {2 [4 (D グルコピラノシルオキシ) 3 メトキシフェニル]ビニル} 1 プロピル キノリニウム ヨージド、2 {2 [4 (D グルコピラノシルオキシ) 3 メトキシフェニル]ビニル} 3 メチル ベンゾチアゾリウム ヨージド、アンモニウム 5 [4 D グルコピラノシルオキシ) 3 メトキシ フェニルメチレン] 2 チオキソチアゾリン 4 オン 3 エタノアート 水和物、2 メトキシ 4 (2 ニトロビニル) フェニル アセタート、2 メトキシ 4 (2 ニトロビニル) フェニル プロピオナート、5 [4 プロパノイルオキシ) 3,5 ジメトキシ フェニルメチレン] 2 チオキソチアゾリン 4 オン 3 エタノアート、5 [4 ブタノイルオキシ) 3,5 ジメトキシ フェニルメチレン] 2 チオキソチアゾリン 4 オン 3 エタノアート、5 [4 デカノイルオキシ) 3,5 ジメトキシ フェニルメチレン] 2 チオキソチアゾリン 4 オン 3 エタノアート、5 [4 ドデカノイルオキシ) 3,5 ジメトキシ フェニルメチレン] 2 チオキソチアゾリン 4 オン 3 エタノアート、5 [4 テトラデカノイルオキシ) 3,5 ジメトキシ フェニルメチレン] 2 チオキソチアゾリン 4 オン 3 エタノアート、ピリジニウム 4 {2 [4 (ホスホロイルオキシ) 3,5 ジメトキシフェニル]ビニル} 1 プロピル キノリニウム ヨージド、ピリジニウム 5 (4 ホスホロイルオキシ 3,5 ジメトキシ フェニルメチレン) 3 メチル 2 チオキソチアゾリン 4 オンなどが含まれる。適当な蛍光または発蛍光標識には、ローダミン110、ロードール (rhodol)、クマリンまたはフルオレセイン化合物が含まれる。4'または5'保護炭素を有する、ローダミン110、ロードール (rhodol) またはフルオレセイン化合物の誘導体も同様に使用されうる。そのような化合物の好ましい具体例には、4'(5')チオフルオレセイン、4'(5')-アミノフルオレセイン、4'(5')-カルボキシフルオレセイン、4'(5')-クロロフルオレセイン、4'(5')-メチルフルオレセイン、4'(5')-スルホフルオレセイン、4'(5')-アミノロードール、4'(5')-カルボキシロードール、4'(5')-クロロロードール、4'(5')-メチルロードール、4'(5')-スルホロードール; 4'(5')-アミノローダミン110、4'(5')-カルボキシローダミン110、4'(5')-クロロローダミン 110、4'(5')-メチルローダミン 110、4'(5')-スルホローダミン110および4'(5')チオローダミン110が含まれる。「4'(5')」は、4または5'位において、炭素原子上の水素原子が、前に挙げられている特定の有機基で置換されていることを意味する。7-アミノまたはスルホン化クマリン誘導体も同様に使用されうる。種々のシアニン色素 (例えば、米国特許第2,734,900号、第6,002,003号または第6,110,630号に開示されているもの) のいずれかも同様に使用されうる。検出可能な標識としての酵素 (特にアルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼまたはウレアーゼ) の使用 (すなわち、酵素イムノアッセイまたはEIA) が好ましい。

10

20

30

40

50

【0093】

本発明の1つの実施形態においては、リガンドおよびリガンド結合性分子は、標的細胞が実質的に不可逆的に支持体に固定化されるように選択される。あるいは、競合物質 (例えば、薬理的物質、結合インヒビター、ホルモン類似体、模倣体など) への結合によってお互いから解離しうるリガンドおよびリガンド結合性分子が使用される。

【0094】

本発明は、汎用リンカー (universal linker) 技術と組合されたA²プラットフォームおよびIC100プラットフォーム (Beckman Coulter, Inc.) (米国特許第5,648,213号 (Reddy, M.P)) における使用に特に適している。そのような技術は、生理的条件下でDNAマイクロアレイ上の特定の領域に標的物を選択的に固定化するために、注意深くスクリーニングされたオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを用いる。

【0095】

比較的不安定な種 (例えば、抗体) のマイクロアレイを作製するためのオリゴヌクレオチドリンカー技術の使用は、以下の点を含む多数の利点を有する:

1. すべての固定化種に対する単一セットのプリント条件の使用;
2. マイクロアレイの長期安定性 - オリゴヌクレオチドは、タンパク質に比べて非常に安定な分子である;
3. 汎用リンカー (Universal Linker) 技術はこれらのマイクロアレイをアドレス可

能 (addressable) にし、したがって、非常に多種多様な機能性マイクロアレイを作製するために単一タイプのプリント化マイクロアレイが使用されうる；

4. 遭遇する一般的なプリント条件 (例えば、乾燥) に付され得ない不安定な種のマイクロアレイを作製するために、汎用リンカー技術が使用されうる；

5. 種々の異なる分子 (例えば、すべて、細胞表面マーカーと相互作用するモノクローナル抗体、合成ペプチドおよび薬物類似体) を含有するマイクロアレイを作製するために、汎用リンカー技術が使用されうる；

6. 汎用リンカー技術はリガンドと支持体との間にスペーサー基を付与し、これは、所望の基準、例えば長さ、疎水性、電荷などを満たすよう設計されうる；

7. 汎用リンカー技術は、簡便な低毒性の手段 (例えば、遊離相補的オリゴヌクレオチドとの競合) により固定化細胞の選択的溶出をもたらす。

【0096】

A²系 (Beckman Coulter, Inc.) は、本発明の原理に従い使用するのに特に適している、単一のウェル内で複数のタンパク質を測定しうる多重化イムノアッセイ技術である。A²系はA²プレートを使用し、これはアレイ内にアレイを含み、ウェルの表面上にプリントされた異なる配列のオリゴヌクレオチドのセットを使用することによりウェル当たりに複数のアナライトを測定しうる。A²プレートは、本発明のマイクロアレイ支持体として使用可能であり、プリントされたオリゴヌクレオチドは本発明の基体固定化オリゴヌクレオチドとして使用可能である。本発明のバイオコンジュゲート分子は、プリントされたオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド成分を有するよう構築されうる。ついで該バイオコンジュゲート分子は該プレートのウェルに加えられることが可能であり、該プレートの固定化プリント化オリゴヌクレオチドにハイブリダイズして、所望のマイクロアレイを与える。複数のオリゴヌクレオチド種が該プレートにプリントされるため、複数のバイオコンジュゲート種が同一A²プレート上に固定化されうる。

【0097】

この技術は、ワクチン研究のために製薬業界において大きな関心が持たれている、無傷ウイルスのマイクロアレイを作製するためにも使用されうる。

【0098】

本発明のもう1つの用途は、受容体ベースのアッセイと細胞ベースのアッセイとが組合された混合様態 (mixed-mode) マイクロアレイの作製である。汎用リンカーアプローチは、実質的に生理的な条件下で高い忠実度で通常のオリゴヌクレオチドマイクロアレイに対する種々の分子の標的化を可能にする。したがって、生細胞の捕捉およびイムノアッセイのために特別に設計された部位を含有するマイクロアレイを作製するために、in situハイブリダイゼーションを用いることが可能である。

【0099】

D. マイクロアレイ形態

本発明は、使用者が、独立して、所望の標的細胞、リガンドおよびリガンド結合性分子を選択することを可能にする。その結果として、本発明は、非常に広範な種々の方法および形態を提供する。所望のアッセイ形態は、抗体およびタンパク質マイクロアレイに関連した教示を応用することにより得られうる (例えば、Panicker, R.C. ら, "Recent Advances In Peptide-Based Microarray Technologies," *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2004 Sep;7(6):547-556; Pavlickova, P. ら, "Advances In Recombinant Antibody Microarrays," *Clin. Chim. Acta.* 2004 May;343(1-2):17-35); Chen, G.Y. ら, "Array-Based Technologies And Their Applications In Proteomics," *Curr. Top. Med. Chem.* 2003;3(6):705-724; Nielsen, U.B. ら, "Multiplexed Sandwich Assays In Microarray Format," *J. Immunol. Methods* 2004 Jul;290(1-2):107-120; Bailey, S.N. ら, "Microarrays Of Small Molecules Embedded In Biodegradable Polymers For Use In Mammalian Cell-Based Screens," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004 Nov 16;101(46):1614-9. Epub 2004 Nov 16; 米国特許出願公開番号US2004/0033546 (Wang, D.), US2003/0153013 (Huang, R.P.); US2003/0108972 (Zweig, S.E. ら); US2003/0108949 (Bao, G. ら); 2

10

20

30

40

50

002/0164656 (Hoeffler, J.P. 5); PCT公開WO99/40434 (Hoeffler, J.P. 5); PCT公開番号WO2004/076678 (Green, L.); PCT公開番号WO2004/005477 (Charych, D. 5); PCT公開番号WO02/073180 (Huang, R.P.); PCT公開番号WO02/39120 (George, S.T. 5); PCT公開番号WO02/12893 (Cardone, M.H. 5); PCT公開番号WO00/63701 (Brown, P. 5); PCT公開番号WO03/003014 (Pearce, C.D.J. 5); PCT公開番号WO02/083918 (Wang, D.); PCT公開番号WO01/36585 (Anderson, N.L.); 米国特許第5,648,213号 (Reddy, M.P. 5); Jackson, A.M. 5, "Cell-Free Protein Synthesis For Proteomics," Brief Funct. Genomic Proteomic. 2004 Feb;2(4):308-319; Oleinikov, A.V. 5, "Self-Assembling Protein Arrays Using Electronic Semiconductor Microchips And In Vitro Translation," J. Proteome Res. 2003 May-Jun;2(3):313-319; Weng, S. 5, "Generating Addressable Protein Microarrays With Profusion Covalent mRNA-Protein Fusion Technology," Proteomics. 2002 Jan;2(1):48-57; など)。1つの実施形態においては、本発明のマイクロアレイは、マイクロアレイに対する生じうる細胞結合の存在または度合を測定するための直接アッセイにおいて使用されうる。例えば、そのような直接アッセイは、支持体固定化オリゴヌクレオチドとのオリゴヌクレオチド間ハイブリダイゼーションによりリガンド結合性分子-オリゴヌクレオチドバイオコンジュゲートが支持体に固定化されたマイクロアレイを形成させることを含みうるであろう(図2)。該バイオコンジュゲートのリガンド結合性分子は、所望の標的細胞の表面上のリガンドへのその結合能に関して選択される。該マイクロアレイへの細胞結合の存在または度合は視覚的に(例えば、細胞計数など)、より好ましくは、検出可能な様態で標識された試薬標的細胞の使用により測定されうる。該マイクロアレイに固定化されたことが判明した検出可能な標識の存在または度合は、該マイクロアレイに固定化された標的細胞の存在または度合を示すものである。もう1つの実施形態においては、本発明のマイクロアレイは、マイクロアレイへの細胞結合の存在または度合を測定するための間接アッセイにおいて使用されうる。そのような実施形態においては、該バイオコンジュゲートの抗体成分が標的細胞に結合しない限りにおいて、該バイオコンジュゲート分子に特異的に結合しうる検出可能な様態で標識された試薬が使用される。支持体へのそのような試薬の結合の存在または度合は、評価されているサンプルにおける標的細胞の存在または度合に反比例する。血液型決定および細胞型決定は、本発明のマイクロアレイを使用して達成されうる。

10

20

30

40

50

【0100】

本発明の方法および組成物は、細胞の内部成分[特に、存在または発現が形態学的状態(例えば、アポトーシス状態、炎症状態など)または病態(例えば、腫瘍形成状態)に特徴的である内部成分]をアッセイするためにも使用されうる。そのような使用の1つの実施形態においては、細胞膜を透過する能力を有するアッセイ化合物と共に(本発明のマイクロアレイへの固定化の前または後に)所望の標的細胞をインキュベートする。例えば、細胞生存度を示す染料、例えばトリパンブルーの使用により、細胞生存度が評価されうる。内部細胞成分およびそれらの発現は、例えば、(i)分析すべき酵素により切断されるよう選択された脱離基、および(ii)発蛍光指示基[これは、該脱離基と共に存在する場合には非蛍光性の第1状態を有し、該酵素により該指示基から該脱離基が切断されると簡便な波長(例えば、450nmを超える波長)で励起されうる蛍光性の第2状態を有する能力に関して選択されたものである]を有するアッセイ化合物を該細胞に与えることによりアッセイされうる(米国特許第5,698,411号(Lucas 5); 米国特許第5,976,822号(Landrum 5))。典型的なアッセイ化合物は、分析すべき酵素(例えば、システインプロテアーゼ(特にカスパーゼ酵素またはシステインプロテアーゼのグランザイム)、ジペプチルペプチダーゼおよびカルパイン)による切断に関して選択された遮蔽されていない脱離基、および発蛍光指示基[これは、該脱離基と共に存在する場合には非蛍光性の第1状態を有し、該酵素により該指示基から該非遮蔽脱離基が切断されると或る波長で励起されうる蛍光性の第2状態を有する能力に関して選択されたものである]を有する。種々の指示基が開示されている(4'(5')アミノローダミン 110、4'(5')カルボキシローダミン 110、4'(5')クロロローダミン 110、4'(5')メチルローダミン 110、4'(5')スルホローダミン 110、4'

(5')アミノロードール、4'(5')カルボキシロードール、4'(5')クロロロードール、4'(5')メチルロードール、4'(5')スルホロードール、4'(5')アミノフルオレセイン、4'(5')カルボキシフルオレセイン、4'(5')クロロフルオレセイン、4'(5')メチルフルオレセインおよび4'(5')スルホフルオレセイン)。代謝的に活性な細胞内への分子の取り込みの増加を促進する物質(例えば、グリセロール、ジメチルスルホキシド(DMSO)、トレハロース、グルタマート、ベタイン、エチレングリコール、トレイトール、リボース、トリメチルアミンN-オキシドなど)が与えられうる(米国特許出願公開番号20030077569(Clause11ら))。このようにして多種多様な分子がモニターされうる(例えば、5'ヌクレオチダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、酸性ホスファターゼ、酸性エステラーゼ(例えば、酸性エステラーゼI、酸性エステラーゼII、酸性非特異的エステラーゼなど)、アデノシンデアミナーゼ(例えば、アデノシンーリン酸デアミナーゼなど)、アルカリホスファターゼ、アミノペプチダーゼ(例えば、アミノペプチダーゼA、アミノペプチダーゼB、アミノペプチダーゼM、アミノペプチダーゼNなど)、アンジオテンシン変換酵素、カテプシン(例えば、カテプシンB、カテプシンB1、カテプシンC、カテプシンD、カテプシンH、カテプシンIなど)、コリンエステラーゼ、キモトリプシン、コラゲナーゼ、シトシンデアミナーゼ、DPP I、DPP II、DPP IV、エラスターゼ、エンドペプチダーゼ(例えば、エンドペプチダーゼI、エンドペプチダーゼII、膜結合エンドペプチダーゼI、膜結合エンドペプチドダーゼII、中性エンドペプチダーゼなど)、エステルプロテイナーゼ、ガラクトピラノシダーゼ、グルコニダーゼ、グルタチオン、グリコピラノシダーゼ、グアニンデアミナーゼ、HIVプロテアーゼ、インターロイキン1 変換酵素(「ICE」;「カスパーゼ」としても公知である)、リパーゼ、中性エステラーゼ(例えば、中性エステラーゼI、中性エステラーゼII、中性非特異的エステラーゼなど)、ヌクレオシダーゼ、パンクレアチン、ホスホリパーゼ(例えば、ホスホリパーゼA、ホスホリパーゼC、ホスホリパーゼDなど)、プラスミン、ホスファターゼ(例えば、セリンホスファターゼ、酒石酸耐性ホスファターゼ、トレオニンホスファターゼ、チロシンホスファターゼなど)、チミジンデアミナーゼ、トリペプチジルペプチダーゼ、トリプシン、ウロキナーゼ、 α -グルタミルトランスフェラーゼなど)。そのような成分のアッセイはアポトーシス状態の存在または非存在の判定のために利用可能であり、癌(例えば、子宮頸癌)の診断、HIV患者におけるウイルス複製の診断、血液供給におけるHIV感染血の診断、TB感染HIV患者の診断、血液分化の改善の診断、細菌感染症からのウイルス感染症の鑑別診断、慢性関節リウマチからの狼瘡の鑑別診断、骨関節炎からの慢性関節リウマチの鑑別診断、脈管炎の診断、心血管疾患の診断、化学療法効力のモニター、ホジキン病の診断、遺伝子移植の確認、および移植拒絶の診断において役立つ。したがって、本発明の、細胞ベースのマイクロアレイは、例えば炎症の指標を特定することにより炎症をアッセイするために使用されうる。

10

20

30

40

50

【0101】

本発明の、細胞ベースのマイクロアッセイは、Gタンパク質結合受容体(「GPCR」)をアッセイするためにも用いられうる(米国特許第6,770,449号(Barakら)、第5,891,646号(Barakら)、第6,110,693号(Barakら)、第6,528,271号(Bohnら)、PCT出願公開番号W09855635(Barakら)、W00020590(Tangら)を参照されたい)。GPCRは大きなタンパク質スーパーファミリーを含み、これは、A2aアデノシン受容体、A2bアデノシン受容体、1アドレナリン作動性受容体、2アドレナリン作動性受容体、CRF1コルチコトロピン放出因子受容体、D1ドーパミン受容体、D5ドーパミン受容体、FSH濾胞刺激ホルモン受容体、グルカゴン受容体、LH黄体形成ホルモン受容体、PTH1副甲状腺ホルモン受容体、E2プロスタグランジン受容体、E4プロスタグランジン受容体、セクレチン受容体、VIP1血管作動性腸管ペプチド受容体、V2バソプレッシン受容体、2aアドレナリン作動性受容体、2bアドレナリン作動性受容体、2cアドレナリン作動性受容体、A1アデノシン受容体、A3アデノシン受容体、アペリン(Apelin)受容体、C5aアナフィラトキシン受容体、CCR5受容体、CXC R1受容体、CXCR2受容体、CXCR4受容体、D2ドーパミン受容体、D3ドーパミン受容体、D4ドーパミン受容体、Edg1受容体、Edg2受容体、Edg3受容体、Edg5受容体、5HT1Aヒドロキシトリプタミン受容体、オピオイド受容体、 μ オピオイド受容体、MCH1メラニン濃縮ホル

モン受容体、M2Achムスカリン性アセチルコリン受容体、E3プロスタグランジン受容体、テオミル (theormyl) ペプチド受容体、神経ペプチドFF受容体、ha 1b-アドレナリン作動性受容体、AT1AアンジオテンシンII受容体、CCK-Aコレシストキニン受容体、CCK-Bコレシストキニン受容体、サイトメガロウイルスUS28受容体、ETAエンドセリン受容体、GnRH (2型) 性腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体、5HT2Aヒドロキシトリプタミン受容体、5HT2Cヒドロキシトリプタミン受容体、m1AChムスカリン性アセチルコリン受容体、mGluR1代謝調節型グルタミン酸受容体、NK1ニューロキニン受容体、NK3ニューロキニン受容体、NT1ニューロテンシン受容体、オレキシン1受容体、オキシトシン受容体、PAR2プロテイナーゼ活性化受容体、血小板活性化因子受容体、TRHR-1甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体、TRHR-2甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体、およびソマトスタチン受容体を含む。個々のGPCR型は個々のシグナル伝達経路を活性化し、少なくとも10個の異なるシグナル伝達経路がGPCRを介して活性化されることが公知である (2アドレナリン作動性受容体 (AR) は始原型哺乳類GPCRである)。アゴニストの結合に応答して、AR受容体はGタンパク質 (G_s) を活性化し、今度はこれが細胞内のアデニル酸シクラーゼおよび環状アデノシン-リン酸の産生を刺激する。今日使用されている多数の利用可能な薬物がGPCRを標的とする。なぜなら、それらは、血管拡張、心拍、気管支拡張、内分泌分泌および腸蠕動運動を含む非常に重要な生理的応答を媒介するからである (Lefkowitzら, Ann. Rev. Biochem. 52:159 (1983))。例えば、ARに対するリガンドはアナフィラキシー、ショック、高血圧、低血圧、喘息および他の状態の治療に使用される。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 2 】

本発明の、細胞ベースのマイクロアレイは、薬物発見または消費者製品 (例えば、化粧品、石鹸、香水など)、食品、バイオハザード病原体などの試験を促進するために使用されうる。

【 0 1 0 3 】

本発明のマイクロアレイは、マイクロアレイへの細胞結合の存在または度合を測定するためのサンドイッチアッセイにおいて使用されうる (図3、図4A、図4B)。そのようなサンドイッチアッセイは、均一または不均一な性質のものとなるよう設計されうる。それらは競合的または非競合的でありうる。米国特許第5,976,822号、第5,876,935号、第5,851,778号、第5,811,526号、第5,747,352号、第5,698,411号、第5,691,147号、第5,679,525号、第5,633,141号、第5,627,080号、第5,563,036号、第4,016,043号および第3,791,932号は、本発明のマイクロアレイを使用するために適合化されうるいくつかの異なるアッセイ形態および用途を示している。

【 0 1 0 4 】

そのようなアッセイの1つの実施形態においては、標的細胞の固定化は、該標的細胞に結合しうる、検出可能な様態で標識された試薬を使用して判定されうる (図5)。該マイクロアレイに固定化されていることが判明したそのような試薬の検出可能な標識の存在または度合は、評価されているサンプルにおける標的細胞の存在または度合を示すものである。もう1つの実施形態においては、標的細胞の検出を可能にするために、固定化標的細胞のリガンドに結合するリガンドを含有する細胞 (好ましくは、標識された細胞、または検出可能な様態で標識された試薬に結合しうる細胞) が使用されうる (図6)。そのような実施形態においては、該標識細胞は、抗体または他の分子を使用して標識されうる。あるいは、それ自体が標識体でありうる。

【 0 1 0 5 】

もう1つの例においては、本発明は均一免疫クロマトグラフィーアッセイ形態の形成を可能にする。第1の好ましい免疫クロマトグラフィーアッセイ形態においては、該マイクロアレイは、接触しているが空間的に分離している少なくとも2つの領域を含有する。第1のそのような領域は、検出可能な様態で標識された標的細胞に結合したりリガンド結合性分子成分を有する固定化バイオコンジュゲートを含有する (図7)。前記の例と同様に、検出可能な標識は該細胞の直接標識を含みうる。あるいは、それは間接標識 (例えば、標的細胞に結合した又は標的細胞に結合しうる標識されたりリガンド結合性分子の使用) を含み

うる。第2のそのような領域は、標的細胞に結合しうる第2の固定化分子（例えば、抗体、バイオコンジュゲートなど）を含有する。最も好ましくは、第2の領域の固定化分子は、第1の領域において使用するバイオコンジュゲートにより認識されるものとは異なるリガンドを認識する。第2の領域に固定化された標識の検出は、該マイクロアレイの第1の領域において使用するバイオコンジュゲートのリガンド結合性分子への標的細胞の結合と競合しうる物質の存在を示すものである。そのようなマイクロアレイは、薬理学的物質、ホルモン、血液因子などを検出するために使用されうる。

【0106】

第2の好ましい免疫クロマトグラフィーアッセイ形態においては、この場合もまた、該マイクロアレイは、接触しているが空間的に分離している少なくとも2つの領域を含有する。第1のそのような領域は、検出可能な状態で標識された分子（例えば、候補薬理学的物質、ホルモン、可溶性受容体リガンドなど）に結合したリガンド結合性分子成分を有する固定化バイオコンジュゲートを含有する（図8）。第2のそのような領域は、検出可能な状態で標識された分子に結合しうる第2の固定化分子（例えば、抗体、バイオコンジュゲートなど）を含有する。第2の領域に固定化された標識の検出は、該マイクロアレイの第1の領域において使用するバイオコンジュゲートのリガンド結合性分子への検出可能な状態で標識された分子の結合と競合しうるリガンドを有する細胞の存在を示すものである。そのようなマイクロアレイは、生物学的サンプルにおける所望のタイプの標的細胞の存在または度合を検出するために使用されうる。

【0107】

1つの実施形態においては、そのようなマイクロアレイは、例えばプラスチック材などから構成される中空ケースを含み、該ケースにおいて、例えば、装置からアクセス可能（例えば、それからの突出により、または該装置により不完全に覆われることにより）な多層フィルター系を介して、第1の領域が該ケースの内部と間接的に連絡されていて、試験サンプルが該フィルター系に直接的に適用可能であり、そこから第1の領域内へ浸透する（または入り込む）ようになっている。そのような装置においては、標的物質（例えば、標的細胞、生体分子など）を含有する流体の浸透は、第1の領域のバイオコンジュゲートに固定化された検出可能な状態で標識された分子または標的細胞との結合に関する該標的物質の競合を引き起こし、それにより、そのような検出可能な状態で標識された物体を遊離させて、それが該マイクロアレイの第2の領域内へ浸透する（または入り込む）ことを可能にする。

【0108】

したがって、該マイクロアレイの第2の領域における標識された物質の検出は、評価されているサンプル中に標的物質が存在することを示すものである。該アッセイは、該マイクロアレイの第2の領域に結合した標識された物質の量を測定することにより定量的に行われうる。

【0109】

本発明のマイクロアレイは、細胞結合および細胞リガンドのアッセイにおいて使用されるその可能性に関して前記において説明されているが、本発明は、細胞型および細胞亜型の精製を可能にし、したがって、選択された細胞集団または選択された細胞亜集団の単離をも可能にすると理解されるであろう。ついで、そのような単離された細胞は、それらの代謝活性の、細胞ベースのアッセイを行うために使用されうる。例えば、サンプル（これは未精製であっても、部分精製されたものであっても、あるいは十分に精製されたものであってもよい）を、固定化された抗リガンドバイオコンジュゲート分子を含有するマイクロアレイと接触させて配置して、所望の標的細胞を該支持体に固定化させることが可能である。非所望の細胞および他の物質は洗浄または他の方法により除去されうる。本発明のこの態様は、サンプルの所望の標的細胞を容易に採集し従って濃縮することが可能であるという利点をもたらす。また、異なる固定化バイオコンジュゲートを含有するマイクロアレイ領域またはゾーンを使用することにより、所望の標的細胞の亜集団を単離しそれらのそれぞれの活性をお互いから識別することが可能である。

【0110】

ついで、得られたマイクロアレイは、種々の細胞過程のいずれかをアッセイするために使用されうる。実際、本発明のそのような態様の原理に従い、多種多様な酵素、タンパク質などのいずれかが分析されうる。特に、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、グルコシダーゼ、カルボヒドラーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホスファターゼ、スルファターゼ、チオエステラーゼ、ピロホスファターゼ、リパーゼ、エステラーゼ、ヌクレオチダーゼおよびヌクレオシダーゼを含む細胞酵素の活性または存在が分析されうる。本明細書中で用いる「カルボヒドラーゼ」なる語は、炭水化物を加水分解する能力を有する任意の酵素を含む。脱離基を認識しないで切断する酵素、例えばデヒドロゲナーゼおよびキナーゼは、本発明のアッセイには好ましくない。測定すべき酵素は、種々の細胞調製物、細胞質ゾル中に見出される酵素、細胞表面酵素、細胞質酵素および細胞核（核）酵素中に存在するものでありうる。しかし、本発明のこの態様の原理は、生細胞内の細胞内酵素を検出または分析するのに特に有用である。本発明により活性または存在が測定されうる他の酵素には以下のものが含まれる：5'ヌクレオチダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、酸性ホスファターゼ、酸性エステラーゼ、酸性エステラーゼI、酸性エステラーゼII、酸性非特異的エステラーゼ、アデノシンデアミナーゼ、アデノシンーリン酸デアミナーゼ、アルカリホスファターゼ、アミノペプチダーゼA、アミノペプチダーゼB、アミノペプチダーゼM、アミノペプチダーゼN、アンジオテンシン変換酵素、カスパーゼ（カスパーゼ1、3、6、8または9を含む）、カテプシンB、カテプシンB1、カテプシンC、カテプシンD、カテプシンH、カテプシンI、コリンエステラーゼ、コリンエステラーゼ、キモトリプシン、コラゲナーゼ、シトシンデアミナーゼ、DPP I、DPP II、DPP IV、エラスターゼ、エンドペプチダーゼI、エンドペプチダーゼII、エステルプロテイナーゼ、ガラクトピラノシダーゼ、グルコニコダーゼ、グルタチオン、グリコピラノシダーゼ、グアニンデアミナーゼ、HIVプロテアーゼ、リパーゼ、膜結合エンドペプチダーゼI、膜結合エンドペプチダーゼII、中性エンドペプチダーゼ、中性エステラーゼ、中性エステラーゼI、中性エステラーゼII、中性非特異的エステラーゼ、ヌクレオシダーゼ、パンクレアチン、ホスホリパーゼA、ホスホリパーゼC、ホスホリパーゼD、プラスミン、セリンホスファターゼ、酒石酸耐性ホスファターゼ、トレオニンホスファターゼ、チミジンデアミナーゼ、トリペプチジルペプチダーゼ、トリプシン、チロシンホスファターゼ、ウロキナーゼ、v-トロンプシン（thrompsin）および -GT。

【0111】

本発明のマイクロアレイはin situ生化学的アッセイをも促進しうる。1つの実施形態においては、そのようなアッセイはin vitro核酸増幅法、例えばポリメラーゼ連鎖反応（米国特許第4,582,788号（Erlichら）；第4,683,194号（Saikiら）；第4,683,202号（Mullisら））、リガーゼ連鎖反応（第5,427,930号（Birkenmeyerら）；第5,516,663号（Backmanら））、エンド・ラン（End-Run）増幅（第6,180,338号（Adams））、ローリング・サークル（Rolling Circle）増幅（米国特許第5,354,668号（Auerbach）；第5,854,033号（Lizardiら）；第6,740,745号（Auerbach）；第5,876,924号（Zhangら））、鎖置換（Strand Displacement）増幅（第5,270,184号（Walkerら））、NASBA（第5,409,818号（Daveyら））などを含む。1つの実施形態においては、そのような分析は、遺伝子型決定、ハプロタイプ決定、突然変異、対立遺伝子もしくは多型（特に一塩基多型（SNP））の診断および/または検出を促進するために用いられうる。

【0112】

もう1つの実施形態においては、本発明のマイクロアレイは、固定化された細胞（または固定化された細胞のコロニーもしくはクラスター）の「ポロニー（colony）」（ポリメラーゼ-コロニー）分析を促進するために用いられうる。そのような分析においては、マイクロアレイマトリックスが増幅核酸分子の拡散を遅らせ、それにより、増幅産物がそれらのそれぞれの鑄型の付近に局在化したままとなることを可能にする（Mitra, R.D.ら “In Situ Localized Amplification And Contact Replication Of Many Individual DNA Molecules,” Nucleic Acids Res. 1999 27(24):e34; pp.1-6; Mitra, R.D.ら “Digital

10

20

30

40

50

Genotyping and Haplotyping with Polymerase Colonies," Proc Natl Acad Sci USA. 2003 100(10):5926-5931; Merritt, J. 5 "Parallel Competition Analysis Of Saccharomyces Cerevisiae Strains Differing By A Single Base Using Polymerase Colonies," Nucleic Acids Res. 2003 31(15):e84; Mitra, R.D. 5 "Fluorescent in situ Sequencing on Polymerase Colonies," Analyt. Biochem. 2003 320:55-65; Zhu, J. 5 "Single Molecule Profiling of Alternative Pre-mRNA Splicing," Science 2003 301(5634):836-838; Aach, J 5 "Mathematical Models Of Diffusion-Constrained Polymerase Chain Reactions: Basis Of High-Throughput Nucleic Acid Assays And Simple Self-Organizing Systems," J. Theoret. Biol. 2004 228(1):31-46; Constans, A "Beyond Sanger: Toward the \$1000 Genome," The Scientist 2003 17:36; Butz, J. 5 "Characterization Of Mutations And Loss Of Heterozygosity Of p53 and K-ras2 In Pancreatic Cancer Cell Lines By Immobilized Polymerase Chain Reaction," BMC Biotechnol. 2003 3(1):11; Dressman, D. 5 "Transforming Single DNA Molecules Into Fluorescent Magnetic Particles For Detection And Enumeration Of Genetic Variations," Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 100(15):8817-8822; Mikkilineni, V. 5 "Digital Quantitative Measurements Of Gene Expression," Biotechnology and Bioengineering 2004 86(2):117-124; Shendure, J. 5 "Advanced Sequencing Technologies: Methods and Goals," Nature Reviews of Genetics 2004 5(5):335-344; Shendure, J. 5 "Accurate Multiplex Polony Sequencing of an Evolved Bacterial Genome," Science 2005 (epub)。

【0113】

したがって、本発明は、所望の標的核酸分子を有する固定化細胞から *in situ* 核酸増幅が検出されることを可能にする。そのような、細胞ベースの「ポロニー (polony)」法はラテックスビーズまたはポリプロピレン支持体の使用によって特に促進される。

【0114】

本発明は、赤血球の表面上の血液型決定マーカー (A、B、Rh、M、N など) の存在、性質または非存在を決定しうるアレイの構築および使用にも特に適している。そのような実施形態のために、例えば、血液型決定マーカーを免疫学的に認識しそれに結合しうる抗体にコンジュゲートされた相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチドを使用して、アレイを形成させることが可能である。該アレイを血液サンプルと共にインキュベートし、ついで未結合物質を洗い落とすことにより、希有形態を含む血液型を1回の試験で迅速かつ詳細に特定することが可能となろう。同様に、本発明のマイクロアレイは細胞型決定 (例えば、CD4⁺リンパ球とCD4⁻リンパ球との識別など) も可能にする。

【0115】

本発明は、Lucasら (米国特許第5,698,411号) および Landrumら (米国特許第5,976,822) の原理ならびにより好ましくは Clause II 1 (WO 03034025) の原理に従いそのようなアッセイを行うのに適しており、この場合、アナライトおよび/または基質の取り込みの増進をもたらす1以上の物質をアッセイに加える。適当な検出方法および試薬は Clause II 1 (WO 03034025) に開示されている。本発明の物質の作用のメカニズムを何ら限定するものではないが、そのような物質には、高浸透圧ショックを誘導する、ならびにタンパク質を安定化または折り畳むのを補助し及び/又は浸透圧ショックを経験する生物もしくは浸透圧ショックから自分自身を安定化する必要のある生物を助けうる一般的特性を有する物質が含まれる。そのような物質には、グリセロール、ジメチルスルホキシド (DMSO)、トレハロース、グルタマート、ベタイン、エチレングリコール、トレイトール、リボース、トリメチルアミンN-オキシドなどが含まれる。そのような物質の使用は、基質およびアナライトの取り込みおよび/または輸送の増進をもたらすことが判明している。取り込みおよび/輸送のそのような増進は基質またはアナライトの検出の感度を増加させ、アッセイの改善をもたらす。本発明は更に、該取り込み促進物質が、グリセロール (特に、この場合、グリセロール濃度は約5% ~ 約60% (v/v) または約20% ~ 約60% (v/v) または約25% ~ 約40% (v/v) である)、ジメチルスルホキシド (DMSO) (特に、この場合、DMSO濃

度は約5%～約60%(v/v)または約20%～約60%(v/v)である)、トレハロース(特に、この場合、トレハロース濃度は約0.1M～約1.5Mである)、グルタマート(特に、この場合、グルタマート濃度は約0.25M～約2.0Mまたは約1M～約2Mである)、ベタイン(特に、この場合、ベタイン濃度は約0.3Mまたはそれ以上である)、エチレングリコール(特に、この場合、エチレングリコール濃度は約2M～約7Mである)、トレイトール(特に、この場合、トレイトール濃度は約1M～約5Mである)、リボース(特に、この場合、リボース濃度は約0.4M～約4Mである)およびトリメチルアミンN-オキシド(特に、この場合、トリメチルアミンN-オキシド濃度は約0.4M～約4Mである)よりなる群から選ばれる、そのような方法の実施形態に関する。アナライトおよび/または基質の取り込みの促進をもたらす物質の使用は、DNA二重らせんの二重らせん安定性を不安定化することによりアレイ感度の低下を招きうる。そのような不安定化が、許容できない割合で生じる場合には、アレイ温度を低下させ、または塩濃度を増加させ、または二重らせん安定性に対してそれほど破壊的でない物質(例えば、グリセロールなど)を使用することにより、安定性の改善が達成されうる(Bonner, G.ら(2000) Biotech Bioeng. 68(3): 339-344)。

10

【0116】

本明細書中に挙げられている全ての刊行物および特許出願を、それぞれの刊行物または特許出願が参照により本明細書に組み入れられると具体的かつ個別に示されている場合と同等に、参照により本明細書に組み入れることとする。本明細書中の本発明の背景の考察は、本発明の背景的状况を説明するために記載されている。そのような説明は、言及されている事物のいずれかが前記の態様のいずれかの優先日までに世界中のどこかで公開されていた又は公知であった又は先行技術もしくはありふれた一般知識の一部であったことを自認するものではない。

20

【0117】

本発明はその特定の実施形態に関して記載されているが、それは更に修飾されることが可能であり、本出願は、本発明の関連技術分野における公知または通常のプラクティスに沿った及び前記の本質的特徴に適用されうる本開示からのそのような逸脱を含む、本発明の原理に概ね従う本発明の任意の変更、使用または適合化を包含すると意図されると理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0118】

【図1】図1はオリゴヌクレオチド-抗体コンジュゲートの合成を示す。該製造は、ヘテロ二官能性リンカーであるスルホSMCCで活性化された3'-アミノオリゴヌクレオチドの合成から開始する。ついで、トラウト(Traut's)の試薬(イミノチオラート)を使用して抗体をチオール化する。ついで、抗体へのオリゴヌクレオチドのカップリングを促すために、該活性化オリゴヌクレオチドおよびチオール化抗体を混合する。

30

【図2】図2は、本発明の、細胞ベースの直接的なマイクロアレイを示す。ここで、細胞表面マーカーと相互作用する分子(この場合は抗体(2))をオリゴヌクレオチド(1)に結合させる。得られたバイオコンジュゲート(3)をオリゴヌクレオチドマイクロアレイ(4)と共にインキュベートし、相補的配列(5)を含有する特異的部位にハイブリダイズさせてマイクロアレイ(6)を形成させる。複数のコンジュゲートの使用は種々の分子種のマイクロアレイを与える。細胞(7, 8)を該マイクロアレイに加えると、抗体(2)により認識される特異的表面マーカーを有する細胞(7)が該マイクロアレイ上の対応部位において固定化される。他の細胞は固定化されない。

40

【図3】図3は、本発明の、細胞ベースの間接的なマイクロアレイを示す。ここで、細胞表面マーカーと相互作用する分子(この場合は、細胞(27)の表面分子に結合しうる抗体(22))をオリゴヌクレオチド(21)に結合させてバイオコンジュゲート(23)を形成させる。バイオコンジュゲート(23)を、オリゴヌクレオチド(21)にハイブリダイズしうる特異的オリゴヌクレオチド種(25)を有するオリゴヌクレオチドアレイ(24)と共にインキュベートしてマイクロアレイ(26)を形成させる。細胞(27)および(28)をマイクロアレイ(26)の存在下でインキュベートする。標識抗体(29)がマイクロアレイ固定化

50

細胞(27)に結合して、その検出および定量を可能にする。

【図4】図4Aおよび図4Bは、マイクロアレイ(46, 47)を作製するためのオリゴヌクレオチドリンカー技術の使用を示す。マイクロアレイ(46)は、細胞(39)の細胞表面受容体(41)と相互作用する固定化薬物(40)(例えばオリゴヌクレオチド-薬物コンジュゲートを介して固定化されている)を伴う部位を含有する。マイクロアレイ(47)は、サンプル内の細胞により産生された可溶性タンパク質(43)に対する抗体(42)を含有する。細胞表面受容体(41)および可溶性タンパク質(43)に対する標識抗体(44, 45)ならびにサンプルの存在下でのインキュベーションの後、両方の種を別々に又は同時に検出および/または定量することが可能である。図4Aおよび図4Bに示すサンドイッチマイクロアレイは、お互いと連絡されたアレイ、または同じマイクロアレイの領域もしくは範囲(ゾーン)を含みうる。図4Aおよび図4Bに示すマイクロアレイは、本発明の、細胞ベースのサンドイッチマイクロアレイの2つの実施形態を択一的に示している。

【図5】図5は、本発明のマイクロアレイにおける標的細胞の固定化を検出するための、検出可能な状態で標識された試薬の使用を示す。オリゴヌクレオチド(51)を抗体(52)に結合させる。得られたバイオコンジュゲート(53)をオリゴヌクレオチドマイクロアレイ(54)と共にインキュベートし、相補的配列(55)を含有する特異的部位にハイブリダイズさせて、固定化抗体(56)を有するマイクロアレイを形成させる。複数のコンジュゲートの使用は種々の分子種のマイクロアレイを与える。細胞(57, 58, 59)を該マイクロアレイに加えると、抗体(52)により認識される特異的表面マーカーを有する細胞(57, 58)が該マイクロアレイ上の対応部位において固定化される。他の細胞(59)は固定化されない。該固定化細胞の、異なる細胞表面分子に特異的な、検出可能な状態で標識された異なる試薬を使用して、固定化細胞の垂集団を検出し、区別し、または定量することが可能である。

【図6】図6は、本発明のマイクロアレイにおける標的細胞の固定化を検出するための、標的細胞(77)に結合する能力を有する細胞(78)の使用を示す。オリゴヌクレオチド(71)を抗体(72)に結合させる。得られたバイオコンジュゲート(73)をオリゴヌクレオチドマイクロアレイ(74)と共にインキュベートし、相補的配列(75)を含有する特異的部位にハイブリダイズさせて、固定化抗体を有するマイクロアレイ(76)を形成させる。複数のコンジュゲートの使用は種々の分子種のマイクロアレイを与える。細胞(77, 78)を該マイクロアレイに加えると、抗体(72)により認識される特異的表面マーカーを有する細胞(77)が該マイクロアレイ上の対応部位において固定化される。該固定化標的細胞に結合しうる細胞(78)を使用して、結合の検出が達成される。したがって、固定化細胞(78)の検出は標的細胞(77)の結合を示す。

【図7】図7は、分離しているが連結または隣接している2つのマイクロアレイ領域(86, 88)を有するマイクロアレイ支持体への標的細胞の結合を妨げる物質に関してアッセイしうる免疫クロマトグラフィーマイクロアレイ形態を示す。過剰のリガンド結合性分子(85)が固定化されたマイクロアレイ領域(86)の存在下、表面リガンド分子(82, 83, 84)を有する標的細胞(81)をインキュベートする。リガンド結合性分子(85)と細胞リガンド(83)との結合は標的細胞(81)をマイクロアレイ(86)に固定化する。候補物質(89)を導入する。候補物質(89)は、固定化されたりガンド結合性分子(85)への結合に関して細胞リガンド(83)と競合して、標的細胞の固定化を妨げる。検出可能な状態で標識された抗体(90)がリガンド(82)に結合する。ついで、非固定化細胞が固定化細胞から分離されマイクロアレイ領域(88)と遭遇するのを可能にするのに十分な条件(例えば、洗浄、流体流動など)下(したがって該イムノアッセイのクロマトグラフィー態様)、マイクロアレイ領域(86)をインキュベートする。非固定化細胞がマイクロアレイ(88)と接触すると、リガンド(84)を有する標的細胞が、マイクロアレイ(88)の固定化抗体(87)へのそれらのリガンド(84)の結合により、マイクロアレイ(88)に固定化される。マイクロアレイ領域(88)における固定化細胞の検出は、候補物質(89)がリガンド(83)とリガンド結合性分子(85)との結合を妨げることが可能であったことを示すものである。

10

20

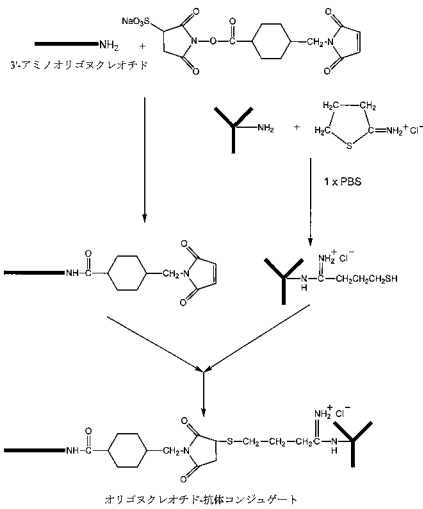
30

40

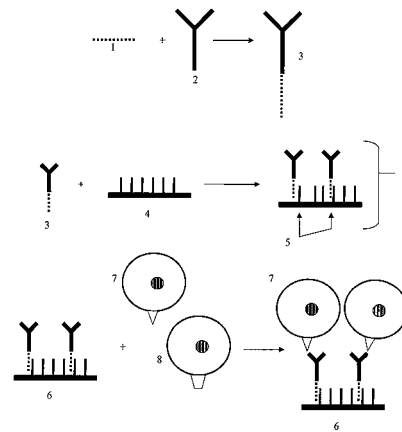
50

【図8】図8は、分離されているが連結または隣接している2つのマイクロアレイ領域（98，99）を有するマイクロアレイ支持体への、検出可能な様態で標識された分子（例えば、候補薬理学的物質、ホルモン、可溶性受容体リガンドなど）の結合を妨げうる標的細胞に関してアッセイする免疫クロマトグラフィーマイクロアレイ形態を示す。検出可能な標識（96）を有する分子（94）を、過剰のリガンド結合性分子（95）が固定化されたマイクロアレイ領域（98）の存在下でインキュベートする。検出可能な標識（96）は直接標識（例えば、放射能、蛍光、酵素などの標識）または間接標識（例えば、抗体など）でありうる。リガンド結合性分子（95）と分子（94）との結合は分子（94）をマイクロアレイ（98）に固定化する。表面リガンド（92，93）を有する標的細胞（91）を導入する。標的細胞（91）は、固定化リガンド結合性分子（95）に関して分子（94）と競合して、分子（94）の固定化を妨げる。ついで、非固定化分子（94）が固定化細胞から分離されマイクロアレイ領域（99）と遭遇するのを可能にするのに十分な条件（例えば、洗浄、流体流動など）下（したがって該イムノアッセイのクロマトグラフィー態様）、マイクロアレイ領域（98）をインキュベートする。非固定化分子がマイクロアレイ（99）と接触すると、分子（94）が抗体（97）に結合し、マイクロアレイ領域（99）に固定化される。マイクロアレイ領域（99）における固定化分子（94）の検出は、標的細胞（91）が分子（94）とリガンド結合性分子（95）との結合を妨げることが可能であったことを示すものである。

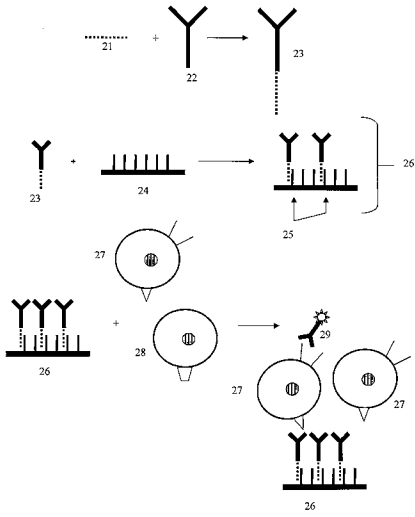
【図1】



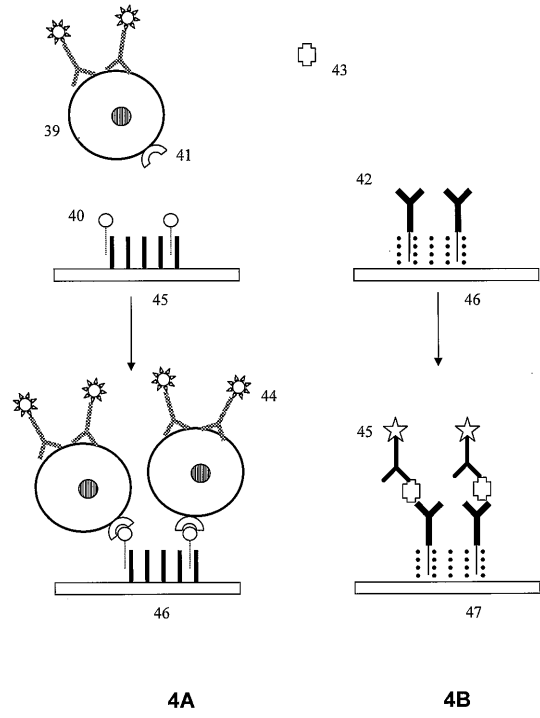
【図2】



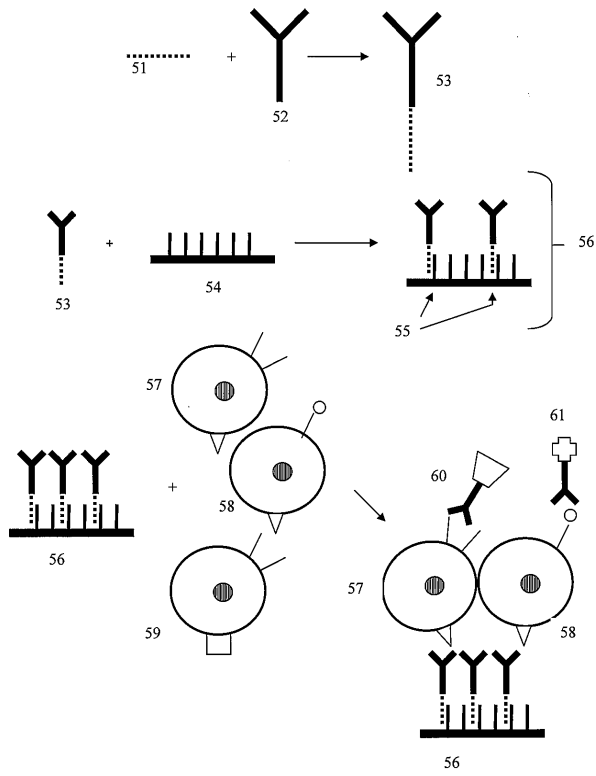
【 図 3 】



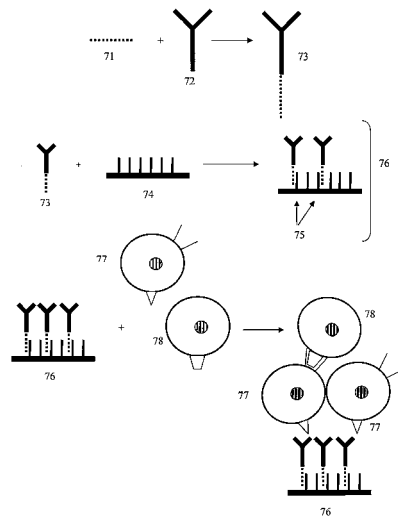
【 図 4 】



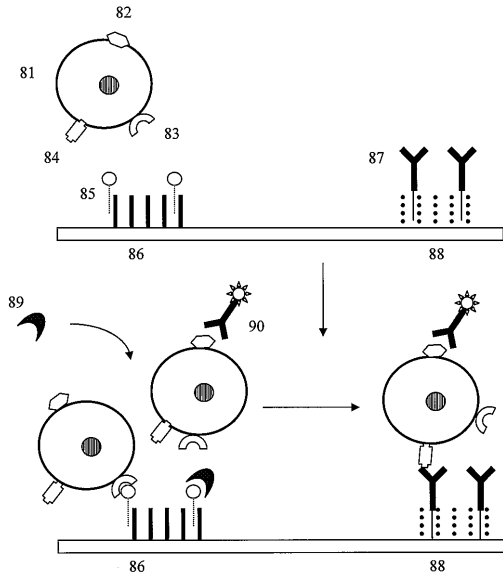
【 図 5 】



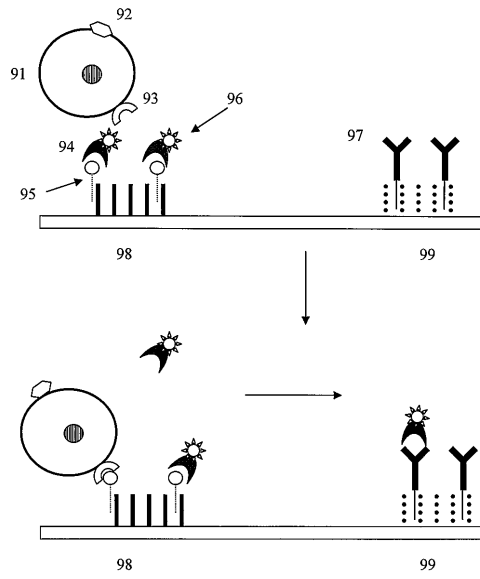
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US06/22837
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C12M 3/00(2006.01);C12N 5/00(2006.01);C12Q 1/68(2006.01);G01N 33/53(2006.01);C07K 16/00(2006.01) USPC: 435/287.2,325,6,7.1;530/387.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/287.2, 325, 6, 7.1; 530/387.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched EAST: US-PG PUBS, US PAT, DERWENT, JPO, EPO Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN: MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, CAPLUS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2005/0106721 A1 (NEGAMUNE et al) 19 May 2005 (19.05.2005), see entire document.	1-16
A	PALMER et al. Cell-based Microarrays: Current Progress, Future Prospects. Pharmacogenomics. July 2005, Vol. 6, No. 5, pages 527-534, see entire document.	1-31
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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 application or patent 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 doubts 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 referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" 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 02 October 2006 (02.10.2006)		Date of mailing of the international search report 02 NOV 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer: <i>Walter Schlaepkohl</i> Walter Schlaepkohl Telephone No. (571) 272-1600

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	K
	G 0 1 N 33/543	5 9 5
	C 1 2 N 15/00	A

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

(72) 発明者 レディ, エム., パラメスワラ
 アメリカ合衆国 9 2 8 2 1 カリフォルニア州, ブレア, ヴァルヴェルデ アヴェニュー 2 1 9

(72) 発明者 ブリルハルト, カート
 アメリカ合衆国 9 2 6 9 1 カリフォルニア州, ミッション ビエッホ, ヴィア アルカラ 2 6 8 4 1

(72) 発明者 キース, ダニエル
 アメリカ合衆国 9 2 6 0 4 カリフォルニア州, アーバイン, クレストハーヴェン 8

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 HA14
 4B029 AA07 BB01 CC03 CC08 FA01
 4B063 QA01 QQ08 QR32 QS32

专利名称(译)	基于细胞的微阵列及其生产和使用方法		
公开(公告)号	JP2008546407A	公开(公告)日	2008-12-25
申请号	JP2008518214	申请日	2006-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	ベックマンコールターインコーポレーテッド		
申请(专利权)人(译)	贝克曼库尔特有限公司		
[标]发明人	レディエムパラメスワラ ブリルハルトカート キースダニエル		
发明人	レディ,エム.,パラメスワラ ブリルハルト,カート キース,ダニエル		
IPC分类号	C12M1/00 C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/53 G01N37/00 G01N33/543 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6837		
FI分类号	C12M1/00.A C12Q1/68.A C12Q1/02 G01N33/53.Y G01N37/00.102 G01N33/53.M G01N33/53.K G01N33/543.595 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/BB01 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA01 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QR32 4B063/QS32		
代理人(译)	松任谷裕子		
优先权	60/693046 2005-06-23 US 60/716486 2005-09-14 US 11/448003 2006-06-07 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明属于化学和生物技术领域。本发明涉及基于细胞的微阵列，用于形成这种阵列的改进方法，以及在诊断，治疗和研究中使用这种阵列的方法。本发明特别涉及一种通过连接到该杂交载体上的固定化的寡核苷酸固定在阵列支持的寡核苷酸配体结合分子的靶细胞的微阵列配体。

