

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-504309
(P2005-504309A)

(43) 公表日 平成17年2月10日(2005.2.10)

(51) Int.C1.⁷

GO1N 33/53
C12M 1/00
C12N 15/09
C12Q 1/68
GO1N 27/447

F 1

GO1N 33/53
 GO1N 33/53
 GO1N 33/53
 C12M 1/00
 C12Q 1/68

テーマコード(参考)

D 4B024
 M 4B029
 Y 4B063
 A
 A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-532703 (P2003-532703)
 (86) (22) 出願日 平成14年6月18日 (2002.6.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年3月31日 (2004.3.31)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2002/019346
 (87) 國際公開番号 WO2003/029490
 (87) 國際公開日 平成15年4月10日 (2003.4.10)
 (31) 優先権主張番号 60/326,311
 (32) 優先日 平成13年10月1日 (2001.10.1)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 504128080
 ワン, インジアン
 WANG, Yingjian
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州, ウ
 スター, フランク ストリート 65
 65 Frank Street, Wor
 cester, MA, U. S. A.
 (74) 代理人 100075557
 弁理士 西教 圭一郎
 (74) 代理人 100072235
 弁理士 杉山 肇至
 (74) 代理人 100101638
 弁理士 廣瀬 峰太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】生体分子を検出する方法およびアレイ

(57) 【要約】

1種または2種以上の生体分子を検出するアレイおよび方法であって、この方法は、一般的に、1種または2種以上の試薬を固定化した第1支持体を供給するステップと、1種または2種以上のリガンドを固定化した第2支持体を供給するステップと、第1支持体に固定化された試薬を第2支持体に固定化されたリガンドと接触させることによって、1種または2種以上の試薬が1種または2種以上のリガンドと結合するステップと、第1支持体を第2支持体から分離した後、1種または2種以上の結合された試薬が第2支持体における1種または2種以上のリガンドとの結合を維持するステップとを含む。ある好適な方法においては、タンパク質は、該タンパク質が、別の支持体に固定化されたその他のタンパク質との結合後などの一定条件下で、支持体から解離され得るに足る強度で支持体と結合される。たとえば、本発明に従って形成された抗体アレイは、タンパク質溶解物におけるタンパク質発現を検出するために用いることが可能であり、細胞中のタンパク質の有無および位置を明らかにするために免疫染色において用いることが可能である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

1種または2種以上の生体分子を検出する方法であって、
1種または2種以上の試薬が固定化される第1支持体を供給するステップと、
1種または2種以上のリガンドが固定化される第2支持体を供給するステップと、
第1支持体に固定化された試薬を第2支持体に固定化されたリガンドと接触させることによつて、1種または2種以上の試薬が1種または2種以上のリガンドに結合するステップと、

第1支持体を第2支持体から分離するステップと、

前記第2支持体における1種または2種以上の試薬を検出するステップと、
を含むことを特徴とする方法。 10

【請求項 2】

前記試薬は、前記接触ステップにおいて前記試薬を固定化するとともに、前記分離ステップにおいて前記結合された試薬を前記第1支持体から解離可能にするに足る強度で前記第1支持体に固定化されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記試薬は、1種または2種以上の抗体を含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項 4】

前記試薬は、1種または2種以上のDNAプローブを含むことを特徴とする請求項1記載の方法。 20

【請求項 5】

前記リガンドは、前記第2支持体に固定化される前に相互に分離されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項 6】

前記リガンドは、少なくとも部分的に分子量に基づくゲル電気泳動を用いて相互に分離されることを特徴とする請求項5記載の方法。

【請求項 7】

前記リガンドは、少なくとも部分的に等電点に基づくゲル電気泳動を用いて相互に分離されることを特徴とする請求項5記載の方法。

【請求項 8】

前記リガンドは、少なくとも部分的に1つもしくは2つ以上の分子量および等電点、または分子量および等電点の両方にに基づくゲル電気泳動を用いて相互に分離されることを特徴とする請求項5記載の方法。 30

【請求項 9】

前記リガンドは免疫学的に相互に分離されることを特徴とする請求項5記載の方法。

【請求項 10】

前記リガンドは1種または2種以上の抗体アレイを用いて相互に分離されることを特徴とする請求項9記載の方法。

【請求項 11】

前記試薬は、円形状、細長い形状、および多角形状からなる群から選択される1つまたは2つ以上の形状で前記第1支持体に固定化されることを特徴とする請求項1記載の方法。 40

【請求項 12】

前記試薬は、抗体、組換えタンパク質、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド、炭水化物および小さい化学物質からなる群から選択されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項 13】

1種または2種以上の前記試薬は、前記第1支持体において1つまたは2つ以上の所定位置で固定化されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項 14】

前記試薬は、前記第1支持体における所定位置でそれぞれ固定化されることを特徴とする請求項1記載の方法。 50

【請求項 15】

前記試薬は、抗体であることを特徴とする請求項14記載の方法。

【請求項 16】

1種または2種以上の前記抗体は、1種または2種以上の翻訳後修飾されたタンパク質に特異的であることを特徴とする請求項15記載の方法。

【請求項 17】

1種または2種以上の前記抗体は、1種または2種以上のリン酸化タンパク質に特異的であることを特徴とする請求項16記載の方法。

【請求項 18】

5～100,000の異なる種類の試薬が、前記第1支持体において1つまたは2つ以上の所定位置でそれぞれ固定化されることを特徴とする請求項13記載の方法。 10

【請求項 19】

200～10,000の異なる種類の試薬が、前記第1支持体において1つまたは2つ以上の所定位置でそれぞれ固定化されることを特徴とする請求項13記載の方法。

【請求項 20】

50～1,000の異なる種類の試薬が、前記第1支持体において1つまたは2つ以上の所定位置でそれぞれ固定化されることを特徴とする請求項13記載の方法。

【請求項 21】

5～500の異なる種類の試薬が、前記第1支持体において1つまたは2つ以上の所定位置でそれぞれ固定化されることを特徴とする請求項13記載の方法。 20

【請求項 22】

2～50の異なる種類の試薬が、前記第1支持体において1つまたは2つ以上の所定位置でそれぞれ固定化されることを特徴とする請求項13記載の方法。

【請求項 23】

1種または2種以上の試薬が固定化される前記第1支持体を供給する前記ステップが、1種または2種以上の中間物を前記第1支持体に施すステップであって、1種または2種以上の前記中間物はプロテインA、プロテインGおよびこれらの突然変異体からなる群から選択される種種ステップと、種種1種または2種以上の前記試薬が1種または2種以上の前記中間物と相互作用するように、1種または2種以上の前記試薬を前記第1支持体に施すステップとを含むことを特徴とする請求項1記載の方法。 30

【請求項 24】

前記第1支持体は、ニトロセルロース、ナイロン、ポリビニリデンジフルオライド、ガラスまたは合成樹脂と、これらの誘導体とからなる群から選択された材料を含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項 25】

前記第1支持体は、ナイロンおよびナイロンの誘導体からなる群から選択される材料を含むことを特徴とする請求項24記載の方法。

【請求項 26】

細胞中の1種または2種以上の生体分子を検出する方法であって、

(a) 抗体が固定化される位置によって抗体が同定され得るように、前記第1支持体において所定位置で供給される1種または2種以上の抗体を、第1支持体に固定化するステップと、 40

(b) 第2支持体に前記細胞を配置するステップと、

(c) 前記抗体を前記細胞中の対応するいずれの抗原にも結合可能にするために、前記第1支持体における前記抗体を前記第2支持体における前記細胞と接触させるステップと、

(d) 前記第1支持体を前記第2支持体から分離した後、1種または2種以上の前記結合抗体が、対応する生体分子との結合を維持するステップと、

(e) 前記第2支持体における前記細胞中の前記生体分子に結合した前記抗体を検出するステップと、

を含むことを特徴とする方法。 50

【請求項 27】

前記細胞は、前記第2支持体に固定されることを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項 28】

前記細胞は、1または2以上の組織切片であることを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項 29】

1種または2種以上の中間物は、1種または2種以上の前記抗体が1種または2種以上の前記中間物と相互作用するように1種または2種以上の前記抗体を前記第1支持体に施すステップとを含むことを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項 30】

1種または2種以上の前記抗体は、1種または2種以上のリン酸化タンパク質に特異的であることを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項 31】

異なる5~100,000種の試薬が、前記第1支持体において1または2以上の所定位置でそれぞれ固定化されることを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項 32】

異なる200~10,000種の試薬が、前記第1支持体において1または2以上の所定位置でそれぞれ固定化されることを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項 33】

異なる50~1,000種の試薬が、前記第1支持体において1または2以上の所定位置でそれぞれ固定化されることを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項 34】

異なる5~500種の試薬が、前記第1支持体において1または2以上の所定位置でそれぞれ固定化されることを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項 35】

異なる2~50種の試薬が、前記第1支持体において1または2以上の所定位置でそれぞれ固定化されることを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項 36】

前記第1支持体は、ニトロセルロース、ナイロン、ポリビニリデンジフルオライド、ガラス、合成樹脂、およびこれらの誘導体からなる群から選択された材料を含むことを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項 37】

前記第1支持体は、ナイロンおよびナイロンの誘導体からなる群から選択された材料を含むことを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項 38】

前記試薬は、円形状、細長い形状および多角形状からなる群から選択された1つまたは2つ以上の形状で前記第1支持体に固定化されることを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項 39】

前記第1支持体は、アレイを含むことを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項 40】

前記アレイは、複数の全体的または部分的な毛細管を含むことを特徴とする請求項39記載の方法。

【請求項 41】

前記抗体を固定化する前記ステップは、1種または2種以上の中間物を前記第1支持体に施すステップと、1種または2種以上の前記抗体が1種または2種以上の前記中間物と相互作用するように1種または2種以上の前記抗体を前記第1支持体に施すステップとを含むことを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項 42】

1種または2種以上の前記中間物は、プロテインA、プロテインGおよびこれらの突然変異体からなる群から選択されることを特徴とする請求項41記載の方法。

【請求項 43】

前記検出ステップは、1種または2種以上の前記抗体が一方または両方の支持体に存在す

10

20

30

40

50

るか否かを検出するステップと、前記分離ステップ後、前記抗体の1つまたは2つ以上の位置を同定するステップと、前記抗体の1つまたは2つ以上の数量を決定するステップと、抗体の1つまたは2つ以上のタイプを同定するステップとからなる群から選択する1つまたは2つ以上の検出ステップを含むことを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項44】

1種または2種以上の生体分子を検出する方法であって、
(a) 第1支持体に1種または2種以上の試薬を固定化するステップと、
(b) 1種または2種以上の前記試薬と相互作用するように構成される1種または2種以上のリガンドを第2支持体に固定化するステップと、
(c) 前記試薬の1種または2種以上を1種または2種以上の前記リガンドと結合可能にするために前記試薬を前記リガンドに接触させるステップと、
(d) 前記試薬の1種または2種以上を1種または2種以上の前記リガンドと架橋するステップと、
(e) 1種または2種以上の前記リガンドと結合される1種または2種以上の前記試薬を前記第1支持体から解離可能にするために、前記第1支持体を前記第2支持体から分離するステップと、
(f) 前記試薬またはリガンドの1種または2種以上を検出するステップと、
を含む方法。

【請求項45】

1種または2種以上の前記リガンドおよび試薬は、少なくとも部分的に1種または2種以上のアルデヒドを用いて架橋されることを特徴とする請求項44記載の方法。

【請求項46】

1種または2種以上の前記アルデヒドは、ホルムアルデヒドおよびグルタルデヒドからなる群から選択されることを特徴とする請求項45記載の方法。

【請求項47】

1種または2種以上の生体分子の検出に用いるアレイであって、
1種または2種以上の試薬を固定化するように構成される第1支持体であって、1種または2種以上のリガンドが固定化される第2支持体と接触して配置されるように構成される第1支持体を含み、
1種または2種以上の前記試薬は、1種または2種以上の前記リガンドと結合し、次いで前記第1支持体から解離し、前記第2支持体において前記リガンドとの結合を維持することが可能にされることを特徴とするアレイ。

【請求項48】

前記第1支持体は、ナイロン、ニトロセルロース、ポリビニリデンジフルオライド、ガラス、合成樹脂およびこれらの誘導体からなる群から選択された1種または2種以上の材料を含むことを特徴とする請求項47記載のアレイ。

【請求項49】

前記第1支持体は1つまたは2つ以上の毛細管の全部または一部を含むことを特徴とする請求項47記載のアレイ。

【請求項50】

1種または2種以上の前記試薬は、円形状、細長い形状、および多角形状からなる群から選択された1つまたは2つ以上の形状で固定化されることを特徴とする請求項47記載のアレイ。

【請求項51】

1種または2種以上の前記試薬は、抗体を含むことを特徴とする請求項47記載のアレイ。

【請求項52】

1種または2種以上の前記試薬は、DNAプローブを含むことを特徴とする請求項47記載のアレイ。

【請求項53】

10

20

30

40

50

1種または2種以上の前記試薬は、抗体、組換えタンパク質、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド、炭水化物および小さい化学物質からなる群から選択されることを特徴とする請求項47記載のアレイ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、一般に、複数のタンパク質を検出する新規な方法およびアレイに関し、さらに特に、複数のタンパク質の発現、活性および機能を検出する方法およびアレイに関する。

【0002】

多数の生物試薬、たとえば数十万のクローン化DNA配列や、多数の抗体および組換えタンパク質や、組換え化学合成によって得られた数百万の化合物の利用可能性は、生物研究、臨床診断および医薬開発においてこれらの試薬を利用する技術の発展を促進させた。位置をアドレス可能な、生物試薬の特別なアレイが設計されてきたが、このアレイにおいて、各試薬が位置によって後に同定されることができるよう、各試薬は所定の位置に配置される。たとえば、DNAアレイにおいて、多数のcDNAまたはオリゴを、それぞれ所定の位置で固定化し、該位置によって後に同定することができる。DNAアレイは、遺伝子発現の監視のような用途に関する大規模なハイブリッド形成検定法に用いられる (Sche na et al., 1995, Science 270: 467-470; DeRisi et al., 1996, Nature Genetics 14: 457-460)。発現ベクターにおけるDNAクローンのアレイは、哺乳類の細胞中でコード化されたタンパク質を発現させるために用いられる (Ziauddin and Sabatini, 2001, Nature 411, 107-110)。

10

20

30

40

【0003】

タンパク質アレイにおいて、多くのタンパク質を、それぞれ所定の位置で支持体に固定化し、統いてこの独特な位置によって同定することができる。2つのタイプのタンパク質アレイ、抗体アレイと組換えタンパク質アレイとが特に用いられる。これらは、それぞれ複数の抗体および複数の組換えタンパク質を含有する。なぜなら抗体アレイは、細胞タンパク質と結合することができ、これらは *in vivo* 活性でタンパク質を明らかにするのに特に有用である。したがって、この技術は、単一のアッセイにおいて多数の細胞タンパク質の性質研究を可能にする。特に、抗体アレイは、*in vivo* タンパク質・タンパク質相互作用、タンパク質翻訳後修飾およびタンパク質発現パターンを研究するのに用いられた (米国特許第6,197,599号)。

【0004】

加えて、細胞、組織、脂質、ポリマー、医薬およびその他の化学物質は、医療診断、医薬発見、分子生物学、免疫学および毒物学における大規模なスクリーニングアッセイ用に調製される (Kononen et al., Nature Medicine, 4:844-7, 1998)。

【0005】

タンパク質は、細胞の重要な構成要素であり、様々な細胞過程における実際の主役であり、大抵の医薬のターゲットである。ヒトゲノム全体は約40,000種のタンパク質をコード化する。任意の細胞はすべてのタンパク質をコード化するDNAを含有し得るけれども、これら的一部のみを通常発現する。細胞系は約10,000種のタンパク質を通常発現し、さらに多くの数が組織中で発現される。細胞のタンパク質発現パターンは、細胞の形状および機能を決定し、異常なタンパク質発現は疾患を引起す。したがって、プロテオミクスの1つの主要タスクは、任意の発現元で発現されたタンパク質を同定することである。

【0006】

タンパク質(同一の一次アミノ酸を有する。)は、主として翻訳後修飾に起因して細胞中で異なる形態で存在し得る。多くの場合、特別な翻訳後修飾されたタンパク質のみが、活性化されるとともに、細胞過程に直接関係していることから、細胞中でのこれらの活性化されたタンパク質の存在の検出は、細胞過程における価値ある情報の提供を可能にする。

【0007】

リン酸化、グリコシル化、およびユビキチン化のような多くの異なるタンパク質翻訳後修

50

飾が存在する。そして、これらはタンパク質活性を調節するのに重要な役割を果たす。セリン、トレオニンまたはチロシン残基におけるリン酸化は、情報伝達の重要なメカニズムである。異常なタンパク質のリン酸化は多くのヒトの疾患に寄与する。タンパク質のリン酸化を検出する方法の中で、放射性同位元素を有する細胞の代謝標識と、リンタンパク質に対する抗体による免疫検出とが最も広く用いられている。しかしながら、これらの方法は、一度に1種または数種のタンパク質の分析に通常応用できるのみである。P Y 2 0 および4 G 1 0 のようなリン酸化アミノ酸に特異的な抗体は、複数のリン酸化タンパク質を明らかにすることができますけれども、これらのみでは個別のリン酸化タンパク質を同定することができない。複数のリン酸化タンパク質またはその他の修飾されたタンパク質の有無を同時に検出する新規な方法は、情報伝達研究および臨床診断のために相当望ましい。

10

【0008】

タンパク質発現の定量化は、生物医学研究や、疾患診断や、治療用マーカーおよびターゲットの同定を含む様々な分野において、ならびに毒素および医薬に対する細胞応答のプロファイルにおいて応用される。基本的な生物医学研究において、特定の細胞中、または特定の条件下で、どのようなタンパク質が発現されるかを知ることが通常望まれる。そして、異なる細胞のタイプ間のタンパク質発現プロファイルを比較することによって、発現および活性が特定の細胞のタイプを特徴付けるこれらのタンパク質を同定することができる。多くの情報伝達経路において特定のタンパク質が特異的に活性化され、これらの活性タンパク質、たとえばリン酸化タンパク質の検出は、特定の情報伝達経路の活性化における重要な情報を提供することができる。

20

【0009】

多くの疾患は、タンパク質発現を変化させ、多くの場合異常なタンパク質発現はこれらの疾患の原因である。したがって、タンパク質発現プロファイルの決定、および正常生体試料と異常生体試料との発現プロファイルの比較は疾患メカニズムを理解するために有用である。タンパク質の存在の検出は、臨床診断に有用でもある。たとえば、血液試料中の1種のみのウィルスタンパク質の代わりに数種のウィルスタンパク質の有無を検査することは、ウイルス感染に関するより信頼できる診断方法である。タンパク質のプロファイルは、早期癌および現実の殺人者である悪性の転移癌細胞から正常な細胞を識別するのに非常に有益であろう。さらに、タンパク質発現プロファイルは、医薬ターゲット選択、毒物学、および医薬応答の代用マーカーの同定のような、医薬開発の重要領域において有用である。

30

【0010】

あらゆる個別のタンパク質の発現レベルと、生体試料中の各タンパク質の異なる形態とを信頼かつ再現可能な方法で定量することができる技術を開発することは、分子生物学者の長年の目標であった。しかしながら、このことを達成することは極めて困難であることが判明した。伝統的には、1種または少数のタンパク質は、免疫学的方法、たとえばウエスタンプロットティングおよび酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA)によって検出されることができる。2次元ゲル電気泳動は、試料中で発現されたタンパク質を分析するために用いることができる。しかしながら、これは複雑な手続を要求し、2次元ゲルに表示されたタンパク質の同一性を決定することが必要であり、これを達成することはほとんどのタンパク質に関して困難である。近年、タンパク質アレイは、タンパク質発現パターンの研究に用いられる。1つの戦略において(米国特許第6,197,599号; Haab, et al., Genome Biol. 2, research0004.1-0004.13, 2001)、抗体アレイをタンパク質試料とインキュベーションし、インキュベーションおよび洗浄後、該アレイにおいてそれぞれの抗体と特異的に結合されたタンパク質を検出する。

40

【0011】

免疫化学的染色は、抗体の有無および位置の両方を決定する多用途の技術であり(Harlow and Lane, Antibodies, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Press, 1988)、この情報は、生物医学研究および臨床医学において莫大な値である。抗体溶液と細胞とをインキュベーションするステップを用いる現在の方法の多くは、一度に1種または数種の抗体によって細胞を染色することを可能にするのみである。これらの方法は、多数の異なる

50

タンパク質の発現と亜細胞局在性との検査を必要とする用途に適していない。したがって、このような目的で、多数の異なる抗体によって細胞を染色可能な新規な方法が必要とされる。

【 0 0 1 2 】

本発明の目的は、アレイ支持体において試薬の位置を維持することを可能にするとともに、該試薬は、別の支持体に固定化される相互作用のパートナーに接触して配置されるときに、前記支持体から解離することを可能にする生物試薬のアレイを提供することである。

【 0 0 1 3 】

また、本発明の目的は、他のリガンドの中から、一度に 1 種または 2 種以上のタンパク質を検出する生物試薬の新規なアレイを形成かつ使用する方法を提供することである。本発明の好適な方法は、前記アレイを形成かつ使用するための様々な支持体材料と固定化方法とに適合される。

【 0 0 1 4 】

さらに、本発明の目的は、タンパク質およびこれらの性質を検出するために、特に、細胞内の 1 種または 2 種以上のタンパク質の有無および亜細胞位置を検出かつ比較するために、生物試薬のアレイを使用することを可能にする方法およびアレイを提供することである。

【 0 0 1 5 】

本発明の方法およびアレイは、タンパク質およびその他の生体分子の検出の分野において、生物アレイの用途を実質的に拡張するように設計される。たとえば、好ましくは固体の第 1 支持体に固定化された抗体のアレイは、1 種または 2 種以上の抗体がそれぞれの抗原と結合するように第 2 支持体に固定化されたタンパク質試料と接触し、結合後、これらの抗体は、第 2 支持体における抗原との関連を維持すると同時に、第 1 支持体から解離される。

【 0 0 1 6 】

1 種または 2 種以上の生体分子を検出する本発明の好適な方法は、一般的に、1 種または 2 種以上の試薬が固定化される第 1 支持体を供給するステップと、1 種または 2 種以上のリガンドが固定化される第 2 支持体を供給するステップと、第 1 支持体に固定化された試薬を第 2 支持体に固定化されたリガンドと接触させることによって、1 種または 2 種以上の試薬が 1 種または 2 種以上のリガンドに結合するステップと、第 1 支持体を第 2 支持体から分離するステップと、前記第 2 支持体における 1 種または 2 種以上の試薬を検出するステップとを含む。前記試薬は、好ましくは、前記接触ステップにおいて前記試薬を固定化するとともに、前記分離ステップにおいて前記結合された試薬を前記第 1 支持体から解離可能にするに足る強度で前記第 1 支持体に固定化される。前記第 1 支持体に固定化された試薬は、1 種または 2 種以上の抗体を含み得る。

【 0 0 1 7 】

リガンドは、前記第 2 支持体に固定化される前に、少なくとも部分的に分子量に基づくゲル電気泳動と、少なくとも部分的に等電点に基づくゲル電気泳動と、少なくとも部分的に分子量および等電点の一方または両方にに基づく 2 次元ゲル電気泳動と、1 個または 2 個以上の抗体アレイを用いるなどの免疫学的方法とを含むがこれらに限定されない様々な方法を用いて、相互に分離され得る。前記試薬は、抗体、組換えタンパク質、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド、炭水化物および小さい化学物質からなる群から選択され得る。これらの試薬は、前記第 1 支持体において 1 つまたは 2 つ以上の所定位置で固定化され得る。もし、選択された試薬が 1 種または 2 種以上の抗体であれば、抗体は、リン酸化タンパク質のような翻訳後修飾されたタンパク質に特異的になり得る。

【 0 0 1 8 】

1 種または 2 種以上の試薬は、支持体において 1 つまたは 2 つ以上の所定位置でそれぞれ固定化され得る。いずれの任意の支持体においても異なる種類の試薬の数は、好ましくは、2 ~ 50、5 ~ 100、000、200 ~ 10,000、50 ~ 1,000、5 ~ 500、5 ~ 100、および 5 ~ 50 である。

10

20

30

40

50

【0019】

第1および第2支持体は、ニトロセルロース、ナイロン、ポリビニリデンジフルオライド、ガラスまたは合成樹脂と、これらの誘導体とからなる群から選択された材料を含み得る。

【0020】

細胞中の1種または2種以上の生体分子を検出する本発明の別の好適な方法は、一般的に、(a)抗体が固定化される位置によって抗体が同定され得るように、前記第1支持体において所定位置で供給される1種または2種以上の抗体を、第1支持体に固定化するステップと、(b)第2支持体に前記細胞を配置するステップと、(c)前記抗体を前記細胞中の対応するいずれの抗原にも結合可能にするために、前記第1支持体における前記抗体を前記第2支持体における前記細胞と接触させるステップと、(d)前記第1支持体を前記第2支持体から分離した後、1種または2種以上の前記結合された抗体が、対応する抗原との結合を維持するステップと、(e)前記第2支持体における前記細胞中の抗原に結合した前記抗体を検出するステップとを含む。この方法は、前記第2支持体において固定化される細胞を利用することができ、前記細胞は、1個または2個以上の組織切片を含み得る。

【0021】

抗体は、リン酸化タンパク質のような翻訳後修飾されたタンパク質に特異的となり得る。1つまたは2つ以上の所定位置に固定化され得る異なる種類の試薬の数は、5~100, 000、200~10, 000、50~1, 000、5~500および2~50を含み得る。支持体は、ニトロセルロース、ナイロン、ポリビニリデンジフルオライド、ガラス、または合成樹脂と、これらの誘導体とからなる群から選択された材料を含み得る。抗体のようなタンパク質は、円形状、細長い形状および多角形状からなる群から選択された1つまたは2つ以上の形状で前記支持体に固定化され得る。

【0022】

第1および第2支持体は、アレイを含み得る。このアレイは、多数の全体的または部分的な毛細管を含むがこれに限定されない様々な材料を用いて形成され得る。

【0023】

抗体は、修飾されたプロテインAと修飾されたプロテインGとからなる群から選択された1種または2種以上の中间物を前記支持体に施し固定化することが可能である。プロテインAまたはプロテインGは、結合親和性を変化させるために修飾される。1種または2種以上の前記抗体は、1種または2種以上の前記修飾されたタンパク質に連結するように構成される少なくとも1つの定常領域と、1種または2種以上の抗原に対する結合に利用可能な少なくとも1つの可変領域とを有し得る。

【0024】

前記検出ステップは好ましくは、1種または2種以上の前記抗体が一方または両方の支持体に存在するか否かを決定するステップと、前記分離ステップ後に前記抗体の1つまたは2つ以上の位置を同定するステップと、前記抗体の1つまたは2つ以上の数量を決定するステップと、抗体の1つまたは2つ以上のタイプを同定するステップとからなる群から選択された1つまたは2つ以上の検出ステップを含む。

【0025】

1種または2種以上の生体分子を検出する本発明の別の好適な方法は、(a)第2支持体に1種または2種以上のリガンドを固定化するステップと、(b)1種または2種以上の前記リガンドと相互作用するように適合される1種または2種以上の試薬を第1支持体に固定化するステップと、(c)1種または2種以上の前記試薬を1種または2種以上の前記リガンドと結合可能にするために前記試薬を前記リガンドに接触させるステップと、(d)1種または2種以上の前記試薬を1種または2種以上の前記リガンドに架橋するステップと、(e)1種または2種以上の前記リガンドと結合される1種または2種以上の前記試薬を前記第1支持体から解離可能にするために、前記第1支持体を前記第2支持体から分離するステップと、(f)前記第2支持体において1種または2種以上の前記試薬を

10

20

30

40

50

検出するステップとを含む。

【0026】

1種または2種以上の前記リガンドおよび前記試薬は、好ましくはホルムアルデヒドおよびグルタルデヒドであるがこれらに限定されない1種または2種以上のアルデヒドを少なくとも部分的に用いて架橋され得る。

【0027】

生体分子の検出に用いる本発明のアレイの好適な一実施形態は、一般的に、1種または2種以上の試薬を少なくとも一時的に固定化するように適合されるとともに、1種または2種以上のリガンドが固定化される第2支持体と接触して配置されるように適合される第1支持体を含み、1種または2種以上の前記試薬は、1種または2種以上の前記リガンドと結合可能にされ、続いて前記第1支持体から解離し、かつ前記第2支持体において前記リガンドとの結合を維持可能にされる。

10

【0028】

前記支持体は、ナイロン、ニトロセルロース、ポリビニリデンジフルオライド、ガラスまたは合成樹脂およびこれらの誘導体のうち1種または2種以上の材料を含むがこれらに限定されない様々な材料を含み得る。たとえば、前記支持体は、1つもしくは2つ以上のナイロン膜、または1つもしくは2つ以上の毛細管の全体もしくは一部を含み得る。支持体に固定化される1種または2種以上の前記試薬は、円形状、細長い形状および多角形状からなる群から選択された1つまたは2つ以上の形状で固定化され得る。

20

【0029】

本発明は、生物試薬の新規なアレイと、該アレイの形成および使用方法とに関する。この方法は、1種または2種以上の試薬を固定化する第1支持体を供給するステップと、1種または2種以上のリガンドを固定化する第2支持体を供給するステップと、前記試薬を前記リガンドに接触させることによって、1種または2種以上の試薬が前記リガンドに結合するステップと、結合後前記支持体を分離することによって、結合された試薬が前記リガンドとの結合を維持するステップと、様々な生物ターゲットを検出および/または比較するステップとを特徴とする。

20

【0030】

前記方法の1つは、固体支持体に固定化された試薬が別の支持体に固定化される相互作用のパートナーに結合することを可能にする。特に、抗体アレイは、固定化された抗体が、第2支持体に固定化されるそれぞれの抗原に結合した後に前記支持体から解離可能に形成される。各抗体・抗原の結合は、予め決定された位置で生じる。

30

【0031】

ここで用いる用語「試薬」は、生物関連のあらゆる分子、たとえば抗体、組換えタンパク質、合成ペプチド、DNA、RNA、ヌクレオチドおよび小さい化学物質を指す。

【0032】

ここで用いる用語「リガンド」は、1種または2種以上の試薬と相互作用するあらゆる生体分子を指す。

【0033】

ここで用いる用語「アレイ」は、固体支持体および複数の試薬またはリガンドを含むがこれらに限定されないデバイスを指す。たとえば、抗体は、各抗体を支持体における特定の位置によって同定可能なように所定の各位置で支持体に固定化されることができる。

40

【0034】

ここで用いる用語「固定化」は、支持体における試薬の拘束を指し、ゆえに該支持体における試薬の動作は制限される。たとえば抗体が支持体に固定化されるときに、抗体は該支持体に付着されるため該支持体から解離されず、該支持体における抗体の動作はまた制限される。しかしながら、いくつかの条件下で、本発明に記載されたように、固定化された試薬は、前記支持体から解離されることができる。この固定化の物理的性質および化学的性質は、固定化された試薬が前記支持体から解離し得るか否かと、解離がどれほど効果的であるかとを決定する。

50

【0035】

ここで用いる用語「支持体」は、明細書および特許請求の範囲に関して、生物試薬が沈着かつ固定化される構造を意味する。好適な実施形態において、この支持体は、ニトロセルロース、ナイロン、ポリビニリデンジフルオライド(PVDF)もしくはこれらの誘導体から形成される硬いプレート(ガラスまたは合成樹脂)または膜であるがこれらに限定されない。膜はより扱いやすく、試薬を容易に固定化することができる。ガラスまたは合成樹脂のプレートは硬い支持体を供給し、いくつかの用途において必要とされる。

【0036】

好ましくは、固体支持体は、これらに沈着される生物試薬が特定用途に適合した強度で固定され得るように、前処理される。固体支持体処理の1つの方法は、次には非特異的な非共有結合によって生物試薬と相互作用するであろうポリマー層で被覆することである。たとえば、ポリリシンまたはポリエチレンイミンを含むポリマーを、生体分子の固定化に使用されるスライドガラスまたはカバースリップを被覆するために用いることが可能である。

10

【0037】

たとえばLehnreichなど(Hybridization fingerprinting in genome mapping and sequencing, genome analysis, Vol.1, Davies and Tilgham, Eds, Cold Spring Harbor Press, pp.39-81, 1990)およびBrownなど(米国特許第5,807,522号)によって記載されたようないくつかの技術は、複数の生物試薬を固体支持体に沈着かつ固定化するのに利用可能である。前述の各論文は、全体的に参照して組込まれる。たとえば、水溶液中の数ナノリットルの抗体は、ロボットアレイヤを用いてスライドガラス上にプリントすることができます。したがって、生物試薬のアレイは、平坦な固体支持体に複数の試薬を、一度に1種または数種の試薬を、所定位置に各試薬を沈着することによって形成される。

20

【0038】

抗体の固定化は、吸着によってなされ得る(Trevan, 1980, *Immobilized Enzymes: an introduction and their application in biotechnology*. Wiley, Chichester)。関係する吸着力は、非特異的な疎水性またはイオン性の相互作用でよい。主として、用いられる吸着材料は、粘土、木炭、ヒドロキシアパタイト、および最も多くはDEAEセファデックス(DEAE-Sephadex)のようなイオン交換体を含むが、これらに限定されない。

30

【0039】

エントラップメントは抗体を固定化するための別の方法である(Trevan, 1980, *Immobilized Enzymes: an introduction and their application in biotechnology*. Wiley, Chichester)。このエントラップされた抗体はポリマーに付着されず、これらの自由な拡散が単に抑制されるのみである。1つの広く用いられるマトリクスは、ポリアクリルアミドゲルである。ある好適な実施形態において、毛細管は、生物試薬のアレイ形成および固定化を容易にする。この用語「毛細管」は、生物試薬を含有および支持可能な、全体または部分的に囲まれた細長いあらゆる構造を意味して用いられる。毛細管は合成樹脂およびガラスのような材料から形成され、これらは好ましくは生物試薬の特性に干渉しない。毛細管の高さは、数マイクロメートルから数メートルまで異なるであろう。生物試薬は、溶液状で毛細管中に通常充填される。充填後、試薬溶液は凝固され、該試薬は固定化される。固定化の強度は、任意の用途によって左右され得る。

40

【0040】

試薬は、固体支持体に直接または間接に固定化される。たとえば、試薬は支持体において高い密度で直接沈着され、支持体は顕微鏡のスライドと同じ位小さくすることができる。類似技術は、高密度DNAマイクロアレイを形成するために開発された(Shalon et al., *Genome Research*, 1996 Jul; 6(7): 639-645)。試薬はまた、支持体に間接に固定化され得る。たとえばプロテインAもしくはプロテインGまたはこれらの突然変異体は、中間物として支持体にまずプリントされることができる。抗体はその後プロテインAまたはGとの相互作用によって支持体に固定化される。本発明の1つの利点は、抗体の定常領域がプロテインAまたはGに連結することによって、抗体(抗原結合ドメイン)の可変領域は

50

完全に露出され、かつ抗原との結合のために利用可能となることである。別の利点は、抗体の結合親和性を変化させるようにプロテインAまたはGを修飾可能であることから、プロテインAまたはGの入念に設計された突然変異体が用いられるとき、抗体は所望の強度で支持体に固定化され得ることである。したがって、抗体は、一方で位置情報を失うことなしに支持体に固定化できること、他方で支持体から分離するとともに、より高い親和性のその他のリガンドに結合することができる。組換え融合タンパク質は、これらのタンパク質のタグと、支持体に付着されたリガンドとの間の相互作用によって固定化されることができる。たとえば、リガンド（たとえばグルタチオンまたはニッケル）は、まず支持体に共有結合して付着されることができ、その後タグ（たとえばGSTまたは6×His）を含有する組換え融合タンパク質が、前記リガンドとの相互作用によって同支持体に固定化される。タグおよびリガンドは、これらの親和性を変化させるように修飾することができ、ゆえに固定化は所望の強度を有することができる。10

【0041】

抗体は、通常円形点状で支持体に通常沈着される。しかしながら、抗体はその他の形状で沈着されることもできる。たとえば、抗体は、細長い形状、たとえば、数ミクロン～数センチメートルの幅と、数ミクロン～数センチメートルの長さの長方形で固定化されることができる。このような形状で固定化された抗体は、様々な方法に従って分離後に抗原と結合するために用いられることができる。

【0042】

抗原に特異的な抗体は支持体における特定位置に固定化され得る。一般に、抗体は、抗体がタンパク質試料と接触するときに各抗体がそれ自身の抗原に接触するであろう位置で固定化される。したがって、特定の抗体は、抗原の位置によって決定される特定の位置に固定化され得る。たとえば、抗原がまず2次元ゲル電気泳動によって分離されるとともに、支持体に移動かつ固定される。各抗原はその分子量および等電点によって決定された特定の位置に固定化される。したがって、各抗体は、支持体における抗原の位置に従って固定化される。20

【0043】

ここで用いられる用語「タンパク質試料」は、様々なタンパク質およびタンパク質混合体を指す。たとえば、これは、細胞系または組織からの溶解物でもよい。または、これは、無傷の細胞、もしくは支持体に固定された細胞であってもよい。タンパク質試料は、たとえば、培養された細胞系、ヒトもしくは動物の組織、または血液であるがこれらに限定されない異なるソースからでもよい。30

【0044】

ある好適な実施形態において、タンパク質試料はスライドガラスに配置されかつ固定化され得る培養された細胞または組織切片である。使用前に、これらの細胞は、タンパク質を露出するために、固定され、かつ透過性にされ得る。これらの固定された細胞は特定の細胞の形態を保持し、多くのタンパク質はこれらの当初の細胞位置で留まっている。細胞および組織を固定し、かつ透過性にする方法は複数存在する（Harlow and Lane, Antibodies, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Press, 1988.）。広く用いられている固定液は、ホルムアルデヒドまたはグルタルアルデヒド溶液である。別の広く用いられている固定液は、代替的にメタノールを含有する。40

【0045】

リンパ球などの浮遊細胞は、支持体に沈降して、これに固定化される。これらは、パラフィン、コラーゲンまたはゼラチンなどの媒体に埋込まれた後、支持体において切片化され、かつ配置される。多くの既知の方法が、細胞試料を調製するために利用可能である（Jones, T.C., Ward, J.M., Mohr, U. and Hunt, R.D. (editors), 1990, Hemopoietic System. Berlin, Springer-Verlag; Polak, J.M. and Van Noorden, S., 1997, Introduction to Immunocytochemistry. New York, Springer）。

【0046】

別の好適な実施形態において、タンパク質試料は、溶解によって細胞または組織から調製50

される。典型的な溶解緩衝液は、ドデシル硫酸ナトリウム（S D S）、トリトン（Triton）X-100などの界面活性剤を含有する。タンパク質試料の固定化は、共有結合または非共有結合によってもよく、固定化の方法は当該技術分野において知られている。タンパク質試料が支持体に固定化される領域の寸法は、用途、ならびに固定化されたタンパク質試料の体積および量によって異なる。たとえば、膜が支持体として用いられる場合、もし膜の結合能力が1平方センチメートルあたり10mgのタンパク質であれば、その後最大10mgのタンパク質溶解物が1センチメートル平方の寸法の膜に固定化されることがある。

【0047】

タンパク質溶解物は、支持体に均一に配置され、これに固定化され得る。しかしながら、他の用途に関して、タンパク質は、まず分離された後、支持体に固定化され得る。タンパク質の分離に関する多くの方法が当該技術分野において知られている。たとえば、タンパク質は、分子量に従ってドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動（S D S - P A G E）によって分離されてもよく、または分子量および等電点の両方に従って2次元電気泳動によって分離されてもよい。電気泳動による分離後、タンパク質は支持体に移動かつ固定化され得ることができる。

【0048】

別の好適な実施形態において、タンパク質試料は、免疫学的方法、たとえば抗体アレイによる分離によって、分離されることができる。タンパク質試料は、第1に、抗体が該タンパク質試料中に存在する抗原を捕捉して分離可能なように、第1支持体において抗体アレイとインキュベーションされる。結合していないタンパク質を洗い流した後、各位置で捕捉されたタンパク質は抗体から解離されるとともに、第2支持体に移動され、かつこれに固定化される。抗体と第1固体支持体との間の相互作用は、抗体と抗原との間の相互作用よりも相当強くすることができる。したがって、条件は、抗体・抗原相互作用を分裂する一方で第1支持体における抗体の固定化を無傷のままにするように求められる。このような条件下において、抗体を除いた抗原は第2支持体に移動され、かつこれに固定化され得る。第1固体支持体から抗体が解離するのを防ぐために、抗体は支持体に共有結合で固定される。

【0049】

典型的な移動では、抗体および抗原を含有する第1支持体は、第2支持体と接触される。その後、これらは抗原と抗体との間の相互作用を分裂し得る緩衝液中に置かれる。そして、同時に、解離されたタンパク質が第1支持体から第2支持体まで移動するように電流を加える。完成後、2つの支持体が分離される。この移動および固定化は、同時に（タンパク質が同時に移動かつ固定化される。）、または連続して（タンパク質が移動された後固定化される。）行われる。そして、もし固定化が所望よりも弱い場合は、タンパク質はたとえば共有結合によってさらに固定化されてもよい。固体支持体におけるタンパク質の共有結合による固定化に関する方法は、当該技術分野において知られている。

【0050】

一旦調製されると、タンパク質試料は、別の抗体アレイと接触される。好ましくは、特異的な結合を可能にするために各抗体が対応する抗原と接触するように、接触が行われる。このアレイにおける抗体は、支持体から解離される。したがって、抗体アレイ支持体とタンパク質試料支持体との分離後、抗原に結合する抗体は試料支持体上に存在するであろう。抗体を検出することによって、試料中の抗原の有無および存在量が検出される。

【0051】

前記方法の一部は、一方の支持体に固定化された抗体が他方の支持体に固定化された抗原と結合可能となるように適合される。1つの好適な方法において、一方の支持体に固定化された抗体は、接触するように二つの支持体をともに配置することによって、第2支持体に固定化された抗原と相互作用可能にされる。一定時間のインキュベーションの後、2つの支持体は分離される。抗体と抗原との間の相互作用次第で、いくつかの抗体は、第1支持体から解離するとともに、抗原が固定化する第2支持体と結合するであろう。第1支持

10

20

30

40

50

体における抗体固定化の強度は、好ましくは抗体と抗原との間の相互作用よりも弱く、また、第2支持体における抗原の固定化の強度よりも弱い。電界のような条件は支持体からの抗体の解離を容易にするように適用され得る。

【0052】

抗原および抗体の結合後、抗原・抗体複合体は共有結合架橋を用いて安定化され得る。架橋は、好ましくは、抗体・抗原複合体が架橋される一方で、抗体が支持体に架橋されないようにして行われる。これは抗体に特異的な架橋物質および特別な支持体を選択することによって達成される。数百の既知の架橋物質が存在し、様々な方法がタンパク質を架橋するためにこれらを用いるべく開発された (Wong, Shan S., *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*. Boca Raton: CRC Press, 1993)。たとえば、広く用いられる架橋物質は、たとえばホルムアルデヒドおよびグルタルデヒドであるがこれらに限定されないアルデヒドを含む。

【0053】

抗原に結合された抗体はその後検出される。多くの知られている方法が抗体の検出に用いられることができる。ありふれた方法は、酵素複合二次抗体、たとえばホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ複合抗ウサギヤギ抗体および抗マウスヤギ抗体を用いることである。蛍光標識二次抗体を用いてもよい。使用可能なその他の技術は、immuno-PCR法 (Sano et al., 1992, *Science* 258, 120-122)、ローリングサークルDNA增幅技術 (Schweitzer et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10113-10119)、およびTRNAポリメラーゼによって增幅された免疫検出 (Zhang et al., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 98, 5497-5502) を含む。

【0054】

本発明のアレイの好適な一実施形態において、抗体のアレイは細胞を染色するために用いられ、このことは図1に概略的に示す。細胞は、カバースリップに播種され、培養され、固定され、かつ抗原を露出するために透過性にされる。その後、細胞調製物は、抗体が対応する抗原に結合可能となるように抗体アレイとインキュベーションされる。結合後、抗体アレイ支持体と細胞支持体とは分離される。抗体の一部は、抗原との相互作用に起因して細胞支持体に移動されるであろう。結合かつ移動された抗体の量は、細胞中に存在する抗原の量に関係するであろう。

【0055】

細胞支持体にトラップされた抗体の有無および数量を検出することによって、細胞中の抗原の有無および数量を決定することができる。もし抗体が酵素と複合される場合、これらの抗体を酵素反応によって明らかにすることができます。アルカリホスファターゼは広く用いられ、既知の基質は、反応後に不溶性の有色産生物を生じさせるであろう。さらに、もし抗体が蛍光分子で標識付けされる場合、抗体は直接に蛍光顕微鏡検査によって観察されてもよい。多くの場合、蛍光または酵素複合二次抗体を、一次抗体の有無を明らかにするために用いることができる。

【0056】

抗原の有無および数量を明らかにする目的で、染色は、低倍率で容易に観察され得る。しかしながら、亜細胞の局在性など、抗原のその他の特性を明らかにするために、染色は好ましくは高倍率で観察される。

【0057】

2種のタンパク質の同時染色(二重染色)は2種の機能的に関連したタンパク質を研究するための独特的のツールである。たとえば、タンパク質相互作用の証拠は、タンパク質が同じ細胞構造においてともに局在化するという証明をしばしば含む。2種以上の抗体は、抗体アレイの同じ位置で固定化されることができ、ゆえに2種以上の抗原が同時に同じ位置で検出され得る。

【0058】

抗体に代わってDNAプローブが細胞中の特異的なDNAまたはRNAの有無を検出するために配列かつ使用され得る。そうするために、DNAまたはRNAプローブは、固体支

10

20

30

40

50

持体に固定化される。好ましくは、プローブの固定化は、支持体におけるプローブ位置を維持する程度の強度を有する一方で、好ましくはプローブとターゲットとの間の相互作用よりも弱く、ゆえにプローブがターゲットに結合するとき、プローブは支持体から解離され得る。この方法は、1または数個のDNAまたはRNA配列を通常検出するのみである *in situ*ハイブリッド形成法を超える多くの利点を有する。本発明に従って形成されたDNAまたはRNAプローブのアレイが用いられるとき、多数のDNAまたはRNA配列の有無および位置が、形態保存された組織切片または細胞調製物中で、所定の各位置において検出されることができる。支持体に配列されるDNAまたはRNAプローブを調製する方法、および組織または細胞を調製する方法は当該技術分野において知られている (Ian A. Darby (Editor), *In Situ Hybridization Protocols (Methods in Molecular Biology, 123)*, by Humana Press; ISBN:0896036863; 2nd edition, 2000)。 10

【0059】

別の好適な実施形態において、抗体アレイを、タンパク質溶解物中のタンパク質を検出するためには用いる。そうするために、第1支持体に固定化された抗体アレイは、第2支持体に固定化されたタンパク質溶解物とインキュベーションされる。一定時間のインキュベーションの後、抗体は、第2支持体に固定化される溶解物中で対応する抗原と結合するであろう。その後、第1支持体は第2支持体から分離される。特定の条件下で、抗原が結合した抗体は第1支持体から解離され、かつ抗原が固定化される第2支持体に留まるであろう。第2支持体に移動された抗体の量は、抗原のタンパク質溶解物中の存在量に比例するであろう。したがって、第2支持体における抗体の量の検出は、抗原のタンパク質試料中の存在量を明らかにするであろう。 20

【0060】

多くの用途において、タンパク質を、第1に分離し、かつ/または集中することができ、少量のタンパク質を検出することが必要となり得る。一実施形態において、タンパク質は、1次元SDS/PAGEによって第1に分離され、膜支持体に移動され、各タンパク質は分子量によって決定される位置で支持体に固定される。その後、溶解物膜が抗体アレイと接触し、抗体は特定位置で細長い形状で固定化され、ゆえに各抗体は、抗原の分子量によって決定された特定位置で抗原と接触することができるであろう。 30

【0061】

タンパク質は、2次元ゲル電気泳動によって分離されるとともに、ポリビニリデンジフルオライド(PVDF)膜のような支持体に移動されてもよい。その後、溶解物膜は抗体アレイと接触し、該抗体アレイは所定位置にそれぞれ固定化され得る複数の抗体を含有し、ゆえに各抗体は対応する抗原と接触するであろう。 30

【0062】

タンパク質を、免疫学的方法によって分離し、かつ集中してもよい。これを達成するための1つの方法は、抗体アレイを用いることである。たとえば、第1の抗体アレイをタンパク質試料とインキュベーションすることができ、ゆえにタンパク質はアレイに固定化された各抗体によって捕捉かつ分離される。この第1のアレイにおける抗体は、好ましくは共有結合によって強く固定化される。その後、抗原は、抗体から解離されるとともに、第2支持体に移動かつ固定化される。この工程は、いくつかの既知の方法によって行われ得る。第2の抗体アレイは、その後、抗原を検出するために用いられる。第2のアレイにおける抗体は、対応する抗原との結合後に抗体がアレイ支持体から解離され得るようにして固定化される。同じ抗原に対する第1および第2のアレイにおける抗体は、対応する位置で固定化ことができ、これらは一致または相違し得る。 40

【実施例】

【0063】

以下の実施例は、図面のみに関するものであり、決して本発明を限定するために意図されるものではない。実施例は、本発明に従って抗体アレイの使用を記載するけれども、抗体以外の生物試薬のアレイに関する類似の用法は、当該技術に精通している人々にとって明らかである。このような生物試薬のアレイは、組換えタンパク質、組換え抗体、単鎖抗体 50

、核酸、オリゴ、cDNAプローブ、炭水化物、脂質、および小さい化学物質のアレイを含むがこれらに限定されない。たとえば、固定化されたcDNAプローブのアレイは細胞中で複数のmRNAの発現を明らかにするためにin situハイブリッド形成法で用いられる。

【0064】

(実施例1：抗体アレイの形成)

商業的出所からの抗体(約0.5 μg/μL)を、ロボットアレイヤを用いて、ナイロン膜(アメルシャムライフサイエンス(Amersham Life Science)社製)に配列した。80nL溶液中の約40ngの抗体を、600μm間隔で空けられた各スポットで0.6mmソリッドピンを用いて沈着した。抗体を、ナイロン膜と抗体との間で非共有結合によって固定化した。抗体アレイは、直ちに用いられるか、または使用前48時間未満4で貯蔵されるかのいずれかをされた。

【0065】

(実施例2：免疫化学染色における抗体アレイの使用)

この実施例は、免疫化学染色について開示した方法によって調製された抗体アレイの使用を明らかにするものである。異なる細胞タンパク質に対する200種の抗体によって実施例1において形成された抗体アレイを用いた。

【0066】

MDCK(Madin Darby Canine Kidney)細胞を培養皿に播種し、融合まで2日間培養した。その後これらを10分間、-20でメタノール/アセトン(1:1)で固定し、かつ透過性にした。リン酸緩衝液サリン(PBS)で洗浄後、MDCK細胞を約1時間抗体アレイと接触させた。細胞をリン酸緩衝液サリンで再び洗浄し、アルカリホスファターゼ標識二次抗体を30分加えた。洗浄後、染色は、基質としての5-ブロモ-4-クロロ-インドリル-ホスファターゼ(BCIP)およびニトロブルーテトラゾリウム(NBT)との呈色反応によって視覚化された。この酵素反応はPBSで基質を洗い落とすことによって止められ、画像は平床式スキャナでスキャニングすることによって得られた(図2)。多くの位置における細胞を抗体で染色したが、固定化された抗体間の領域での染色の欠如によって判断されるように、抗体の混合はほとんど存在しなかった。染色されたスポットの通常パターンは、抗体がプリントされたパターンと適合する。

【0067】

(実施例3：蛍光免疫化学染色における抗体アレイの使用)

本実施例において、10nL溶液中に約5ngの抗体を、隣接するスポット間の間隔を300μm空けたナイロン膜上の各スポットで0.3mmソリッドピンを用いて沈着した。その後、蛍光標識二次抗体を用いたこと、および染色を蛍光顕微鏡で観察したことを除いては図1に概略的に示し、かつ図2に記載した方法によって、A431細胞を染色するために抗体を用いた(図3)。蛍光顕微鏡による低倍率観察は、各染色スポットが直径約300μmであること、および400の細胞のクラスターから成ることを示した(図3a, 図3c, 図3e, 図3g)。染色された領域と染色されていない領域との間には、明らかな境界線が存在する。高倍率観察は、詳細な染色パターン、たとえばIRF1の核局在化(図3b)、14-3-3(図3d)およびEts-1(図3f)の細胞質染色、ならびにベータ-カテニン(図3h)の細胞・細胞接触染色を明らかにした。染色は、標準の免疫染色手順によって得られるものと区別できない。

【0068】

(実施例4：毛細管中に形成された抗体アレイ)

本実施例は、細胞を染色するために毛細管によって形成された抗体アレイを用いるものである。各抗体を、低融点アガロース溶液と混合し、高さ1cm、外周2mm、および厚さ約0.2mmの合成樹脂製毛細管に注入した。ゲルが固体になった後、毛細管は、束にされ、高さ約1mmの抗体を產生するための部分を横断された。

【0069】

その後、抗体アレイをガラス支持体に配置するとともに、抗体が抗原と結合可能にするた

10

20

30

40

50

めに別のガラス支持体に固定される細胞と接触させた。抗原に結合した抗体を、蛍光標識二次抗体によって検出し、図3にあるような顕微鏡で観察した。

【0070】

(実施例5：蛍光免疫染色用に毛細管中に形成された抗体アレイ)

第1に蛍光標識抗体を高温で低融点アガロース溶液で混合し、次いで毛細管アレイを形成するために、これらの抗体溶液を毛細管に注入した。毛細管中でこれらの溶液が凝固するように温度を下げた。これらの毛細管を、高さ1mm未満の薄いアレイを形成するために切断するとともに、合成樹脂固体支持体に置いて接着した。抗体が抗原と接触可能にするために、アレイを、カバーガラスに配置された固定された細胞と接触させた。その後、細胞と抗体アレイとを2時間37でインキュベーションした。その後、温度を下げ、アレイと細胞とを分離した。カバーガラス上の細胞をその後PBSで洗浄し、顕微鏡で観察した。

【0071】

(実施例6：二重染色における抗体アレイの使用)

100のスポットを有する抗体アレイを形成し、各スポットは1種または2種の抗体を含有した。2つの異なる抗体が固定化されたスポットでは、これらの抗体のうち一方がマウスモノクローナル抗体であり、他方がウサギポリクローナル抗体であった。このアレイは、カバーガラスに播種されたA431細胞を染色するために用いられた。染色後、A431細胞を、Cy2標識抗ウサギヤギニンニク抗体、およびCy3標識抗マウスヤギニンニク抗体とインキュベーションした。抗原の有無および位置を、蛍光顕微鏡によって検査した(図4a, 図4b)。2種の抗体が存在する位置に、2種の対応する抗原が観察された。2種の抗体/抗原は異なる標識および異なる細胞局在化によって区別され得る。たとえば、図4においてタンパク質YY1の核局在化とタンパク質p130^{cas}の膜局在化とは個別に(図4aの左および中央)、かつ一緒に(図4aの右および図4b)示された。

【0072】

(実施例7：細胞試料間のタンパク質発現を比較するための抗体アレイ染色の使用)

様々なシグナル経路に関する240種のタンパク質に対するマウスモノクローナル抗体およびウサギポリクローナル抗体の両方を含有する抗体アレイを、前述の実施例に記載されたように产生した。そして、240種のタンパク質の有無を検出し、研究に広く用いられる2つのヒト癌細胞系、A431細胞およびME180細胞の間で比較した。この結果は、2つの細胞試料が相当異なるタンパク質発現パターンを有することを示した。240種のターゲットタンパク質の多くは、A431細胞およびME180細胞において異なって発現された(図5)。たとえば、A431細胞はME180細胞よりも、Cbl、cortactin、Neu、HSP70、JNK1、p53、Raf-1およびStat1を多く発現する一方で、GSK-3、Skp2p45、Plik3、およびStat5aを少なく発現する。これらのタンパク質の発現はウエスタンプローティングによっても検査された(図6)。そしてこの結果は、2つの相互に関連している方法で得られ、抗体アレイ染色がタンパク質発現をプロファイルする有効な方法であることを示唆している。

【0073】

(実施例8：抗体アレイによる経路活性化の検出)

活性化したタンパク質(リン酸タンパク質)に特異的な抗体は、抗体アレイを形成するために用いられ、これらのアレイは生体試料中の活性化したタンパク質の有無を検査するために用いられた。活性化したタンパク質の有無は、一定の情報伝達経路が試料中で活性化されることを示唆した。

【0074】

(実施例9：タンパク質溶解物中の特定のタンパク質の検出)

本実施例において、Stat1組換えタンパク質を含有する50μgの細菌溶解物は、1平方センチメートルのニトロセルロース膜に固定化した。その後、溶解物膜を、ナイロン膜においてStat1抗体を含む複数の抗体を含有する抗体アレイと接触させた。

【0075】

10

20

30

40

50

1～2時間のインキュベーションの後、いくつかの抗体は、前記溶解物中で対応する抗原と結合した。溶解物膜と抗体アレイとが物理的に分離したとき、いくつかの抗体を、抗体アレイ支持体から解離するとともに、抗原との相互作用が起因して溶解物支持体に結合した。溶解物スライドに結合された抗体の量は、溶解物に存在する抗原の存在量に左右される。抗体を、H R P 複合二次抗体によって検出し、増強化学発光 (E C L) 反応によって視覚化した。

【 0 0 7 6 】

(実施例 1 0 : H R P 複合一次抗体による S t a t 1 タンパク質の検出)

本実施例は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P) 複合 S t a t 1 一次抗体が、酵素複合二次抗体が検出に必要とされないように用いられる点を除いては実施例 9 と類似する。

【 0 0 7 7 】

(実施例 1 1 : タンパク質 A 突然変異体を介して固定化された抗体アレイによる染色)

本実施例において、1つの抗体結合ドメインを有する組換えタンパク質 A 突然変異体を、第 1 に支持体に固定化し、次いで H R P 複合抗体を、抗体アレイを形成するタンパク質 A 突然変異体との相互作用を介して該支持体に固定化した。このようにして形成された抗体アレイを、別の支持体に固定化されたタンパク質溶解物と接触させた。1時間のインキュベーションの後、抗体アレイを除去するとともに、タンパク質試料支持体に結合した抗体を E C L 反応を介して検出した。

【 0 0 7 8 】

(実施例 1 2 : S D S / P A G E によるタンパク質試料の分離)

本実施例において、カーテンゲルを用いる S D S / P A G E によって、A 4 3 1 のタンパク質溶解物を分離するとともに、P V D F 膜に移動した。よく研究されたタンパク質に対する 12 種の抗体を含有する抗体アレイは、ナイロン膜を支持体として用いて形成され、このアッセイに用いられた。抗体を、長方形に固定化するとともに、形成されたアレイが P V D F 膜に固定化されたタンパク質溶解物と接触するときに抗体が対応する抗原と結合し得るように、アレイに入念に配置した。抗体と抗原との結合後、ナイロン膜支持体を P V D F 膜から除去した。対応する抗原との相互作用を介して P V D F 膜に付着した抗体を、H R P 複合二次抗体を用いて検出し、E C L 反応によって明らかにした。図 7 に示すように、数種の抗体を A 4 3 1 細胞中で発現したように検出した。そしてこれらは予期される分子量の位置で P V D F 膜において検出される。誤った位置で意図的に固定化された抗体は比較的低い信号を与え、この方法がタンパク質発現を有効にプロファイルすることを示唆する。

【 0 0 7 9 】

(実施例 1 3 : 2 次元ゲル電気泳動によるタンパク質試料の分離)

本実施例は、タンパク質が 2 次元ゲル電気泳動によって分離されるとともに、ポリビニリデンジフルオライド (P V D F) 膜に移動される点を除いて、実施例 1 2 と類似する。その後、溶解物膜を、複数の抗体を含有し、かつ各抗体が抗原と接触するように所定位置で抗体をそれぞれ固定化した抗体アレイと接触させた。

【 0 0 8 0 】

(実施例 1 4 : 抗体アレイによるタンパク質試料の分離)

本実施例において、タンパク質は抗体アレイによって第 1 に分離され、かつ集中される。共有結合で支持体に抗体を固定することによって抗体アレイを形成し、次いで該アレイを、タンパク質がアレイに固定化された各抗体によって捕捉かつ分離されるようにタンパク質試料とインキュベーションした。その後、抗原を、抗体から解離するとともに、試料支持体に移動かつ固定化した。抗体が共有結合で固定化されたことから、試料支持体に移動したものは全くないか、またはほんの少しであった。その後、同じ抗原の抗体が抗体が第 1 抗体アレイに存在するのと同じ対応位置に存在するようにして、二次抗体アレイを形成した。第 2 抗体アレイが、抗原が固定化された試料支持体と接触したときに、各抗体は、対応する抗原と接触し、かつ結合した。結合後、アレイを試料支持体から分離した。いく

10

20

30

40

50

つかの抗体がこれらの抗原と結合したことから、抗体はアレイ支持体から解離するとともに、試料支持体に結合した。

【0081】

いくつかの図において本発明の特徴を示すけれども、これはあくまで、便宜のためだけであって、何らかの特徴を本発明に従った他のいずれかのまたは他のすべての特徴と組合わせててもよい。他の実施形態および変形は、当業者に想到されるであろうし、特許請求の範囲に記載された請求項の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【0082】

【図1】複数のタンパク質を検出するための本発明の好適な方法を概略的に示す図である 10
。

【図2】複数のタンパク質を検出するための本発明の好適な方法およびアレイを用いた後の結果を示す。この例において、M D C K 細胞を、200種の抗体のアレイによって染色した。この染色を、アルカリホスファターゼを媒介した基質としてのB C I P / N B T と 20
の呈色反応によって観察した。

【図3a】蛍光染色を用いる本発明の好適な方法およびアレイを用いた後の結果を示す。200種のウサギポリクローナル抗体を用いた。1つの位置でのタンパク質I R F 1 の染色を300 μm の目盛で示す。

【図3b】30 μm の目盛での図3aの画像の部分拡大図である。

【図3c】蛍光染色を用いる本発明の好適な方法およびアレイを用いた後の結果を示す。200種のウサギポリクローナル抗体を用いた。1つの位置での目印の分子14-3-3 の染色を示す。 30
。

【図3d】図3cの画像の部分拡大図である。

【図3e】蛍光染色を用いる本発明の好適な方法およびアレイを用いた後の結果を示す。200種のウサギポリクローナル抗体を用いた。1つの位置での細胞接着性タンパク質-カテニンの染色を示す。

【図3f】図3eの画像の部分拡大図である。

【図3g】蛍光染色を用いる本発明の好適な方法及びアレイを用いた後の結果を示す。200種のウサギポリクローナル抗体を用いた。1つの位置での転写因子E t s - 1 の染色を示す。 30
。

【図3h】図3gの画像の部分拡大図である。

【図4a】A 4 3 1 細胞を、ウサギ抗Y Y 1 抗体（左側緑）、マウス抗p 1 3 0 ^{c a s} 抗体（中央赤）、ならびにY Y 1 抗体（右側緑）およびp 1 3 0 ^{c a s} 抗体（右側赤）の両方を隣接する位置で含有するアレイによって染色した本発明の好適な方法およびアレイを用いた後の結果を示す。抗ウサギC y 2 標識ヤギニン抗体と、抗マウスC y 3 標識ヤギニン抗体とを用いた。

【図4b】図4aで示すY Y 1（緑）およびp 1 3 0 ^{c a s}（赤）の二重染色の拡大図である。

【図5】2つの生体試料においてタンパク質発現を検出する本発明の好適な方法およびアレイを用いた後の結果を示す。M E 1 8 0 細胞におけるタンパク質発現は左に示し、A 4 3 1 細胞におけるタンパク質発現は右に示す。240種の抗体を有する抗体アレイをこの実施例に用いる。染色を、アルカリホスファターゼを媒介した基質としてのB C I P / N B T との呈色反応によって観察した。 40
。

【図6】図5に示すタンパク質発現の相違を決定するためにウエスタンプロッティングを用いた結果を示す。ウエスタンプロッティングによって検出されたM E 1 8 0 細胞中（左側レーン）およびA 4 3 1 細胞中（右側レーン）の19のタンパク質の発現を示す。試験されたタンパク質は、A , C b 1 (1 2 0 k D) 、 B , C b c 2 (3 4 k D) 、 C , C o r t a c t i n (8 0 k D) 、 D , N e u (1 8 5 k D) 、 E , E R K 1 (4 4 k D) 、 F , E t s - 1 (5 1 k D) 、 G , G S K - 3 (5 1 k D) 、 H , H S P 7 0 (7 0 k D) 、 I , J N K 1 (4 6 k D) 、 J , L y n (5 6 k D) 、 K , N F k B p 5 0 (5 50
。

0 kD)、L, Skp2 p45 (45 kD)、M, p53 (53 kD)、N, Plk3 (70 kD)、O, SH-PTP2 (60 kD)、P, Raf-1 (74 kD)、Q, Rb p107 (107 kD)、R, Stat1 (84 kD)、およびS, Stat5a (95 kD)である。図5の各抗体に対応する位置を上端に示す。等しい培養領域を占めるA431およびME180細胞のタンパク質溶解物を各レーンに入れる。

【図7】SDS/PAGEによって分離されたA431細胞のタンパク質溶解物中のタンパク質発現を検出する本発明の好適な方法およびアレイを用いた後の結果を示す。12種のタンパク質に対する抗体が特定の位置で固定化された。検査されたタンパク質は、1, IKK_{beta}、2, E2F1、3, ERK2、4, 14-3-3、5, Rb p107、6, ERK1 control (抗体は抗原の存在しない位置で固定化された。)、7, Ets-1、8, ERK1、9, Stat1、10, 14-3-3 control、11, JNK1、12, Stat2、13, Lyn、および14, p38である。各抗体に対応する位置を、対応するスポットの右側に示す。

【図1】

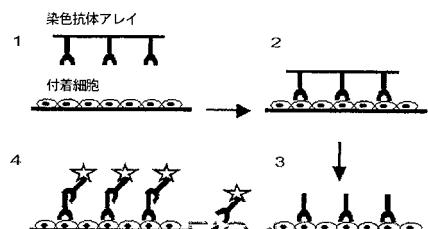


FIG.1

【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
10 April 2003 (10.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/029490 A1

(51) International Patent Classification: C12Q 1/68, 1/70, C07H 21/04, 21/00, G01N 33/53, C07K 16/00

(21) International Application Number: PCT/US02/19346

(22) International Filing Date: 18 June 2002 (18.06.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/329,311 1 October 2001 (01.10.2001) US

(71) Applicant and

(72) Inventor: WANG, Yingjian [US/US]; 65 Frank Street, Worcester, MA 01604 (US).

(74) Agent: HAECKL, Jenifer, E.; Micir, O'Connell, DeMille & Longee, I.I.P., 1700 West Park Drive, Westborough, MA 01581 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KU, 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, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): AR IPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report

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



WO 03/029490 A1

(54) Title: METHODS AND ARRAYS FOR DETECTING BIOLOGICAL MOLECULES

(57) Abstract: Arrays and methods for detecting one or more biological molecules, where the methods generally comprise the steps of: providing a first support immobilized with one or more reagents; providing a second support immobilized with one or more ligands; contacting the reagents immobilized to the first support with the ligands immobilized on the second support whereby one or more of the reagents bind to one or more of the ligands; and separating the first support from the second support so that one or more of the bound reagents remain bound to one or more ligands on the second support after separation. In one preferred method, proteins are immobilized on a support with adequate strength so that the proteins can be dissociated from the support under certain conditions, such as after binding with other proteins immobilized on another support. For example, antibody arrays produced according to the present invention may be used to detect protein expressions in a protein lysate and may be used in immunostaining to reveal the presence and location of proteins in cells.

WO 03/029490

PCT/US02/19346

METHODS AND ARRAYS FOR DETECTING BIOLOGICAL MOLECULESFIELD OF THE INVENTION

The present invention generally relates to novel methods and arrays for detecting a plurality of proteins and more particularly to methods and arrays for detecting the expressions, activities and functions of multiple proteins.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The availability of a large number of biological reagents, such as hundreds of thousands of cloned DNA sequences, numerous antibodies and recombinant proteins, millions of compounds obtained through combinatorial chemical synthesis, has promoted the development of technologies that make use of these reagents in biological research, clinical diagnostics and drug development. Special position-addressable arrays of biological reagents have been designed, in which each of the reagents is placed at a pre-defined position so that it can be identified later by the position. For example, in a DNA array, a large number of cDNA or oligos are immobilized, each at a pre-defined position and can be identified later by that position. DNA arrays are used in large-scale hybridization assays for applications such as monitoring gene expressions (Schena et al., 1995, *Science* 270:467-470; DeRisi et al., 1996, *Nature Genetics* 14:457-460). Arrays of DNA clones in expression vectors are also used to express their encoded proteins in mammalian cells (Ziauddin and Sabatini, 2001, *Nature* 411, 107-110).

In a protein array, many proteins are immobilized on a support, each at a predetermined position so that it can be identified subsequently by this unique position. Two types of protein arrays are particularly useful: antibody arrays and recombinant protein arrays, which contain a plurality of antibodies and a plurality of recombinant proteins, respectively. Because antibody arrays are capable of binding cellular proteins, they are particularly useful in revealing protein *in vivo* activities. Therefore, the technology makes it possible to study the properties of a large number of cellular proteins in a single assay. Specifically, antibody arrays have been applied in studying *in vivo* protein-protein interactions, protein posttranslational modifications and protein expression patterns (US patent 6,197,599).

In addition, arrays of cells, tissues, lipids, polymers, drugs and other chemical substances can be fabricated for large scale screening assays in medical diagnostics, drug

WO 03/029490

PCT/US02/19346

discovery, molecular biology, immunology and toxicology (Kononen, et al., *Nature Medicine*, 4:844-7, 1998).

Proteins are important component of cells and they are the real players in various cellular processes; and they are the targets of most drugs. The entire human genome encodes about 40,000 proteins. Although a given cell may contain the DNA encoding all the proteins, it usually only expresses a fraction of them. A cell line usually expresses about 10,000 proteins and an even higher number is expressed in tissues. The protein expression pattern of a cell determines its shape and function; and abnormal protein expressions cause diseases. Therefore, one major task of proteomics is to identify the proteins expressed in a given source.

A protein (with an identical primary amino acid sequence) may be present in different forms in the cells largely due to posttranslational modifications. Since, in many cases, only special posttranslationally modified proteins are activated and directly involved in a cellular process, the detection of the presence of these activated proteins in the cells can provide valuable information on that cellular process.

There are many different protein posttranslational modifications such as phosphorylation, glycosylation, and ubiquitination. And they play important roles in regulating protein activities. Phosphorylation in either serine, threonine or tyrosine residues is an important mechanism in signal transduction. Aberrant protein phosphorylation contributes to many human diseases. Among the methods of detecting protein phosphorylations, metabolic labeling of cells with radioisotopes and immuno-detection with antibodies against phosphoproteins is most commonly used. However, these methods are usually only applicable to the analysis of one or a few proteins at a time. Although antibodies specific for phosphorylated amino acids, such as PY20 and 4G10, can reveal multiple phosphorylated proteins, they alone are unable to identify individual phosphorylated proteins. New methods for simultaneously detecting the presence of multiple phosphorylated proteins or other modified proteins are highly desirable for signal transduction studies and clinical diagnosis.

Quantification of protein expressions has applications in a variety of fields including biomedical research, disease diagnosis, identification of therapeutic markers and targets, and in profiling cellular responses to toxins and pharmaceuticals. In basic

WO 03/029490

PCT/US02/19346

biomedical research, it is usually desirable to know what proteins are expressed in specific cells or under specific conditions. And by comparing the protein expression profiles between different cell types, it is possible to identify those proteins whose expressions and activations characterize a particular cell type. In many signal transduction pathways, certain proteins are specifically activated; and the detection of these active proteins, e.g., phosphorylated proteins, may provide important information on the activations of specific signal transduction pathways.

Many diseases alter protein expressions and in many cases abnormal protein expressions are the causes of the diseases. Therefore, determination of protein expression profiles and comparison of the expression profiles between normal and abnormal biological samples are useful for understanding disease mechanisms. Detecting the presence of proteins is also useful in clinical diagnostics. For example, examination of the presence of several viral proteins instead of just one in a blood sample is a more reliable diagnostic method for viral infections. Profiling proteins will be invaluable in distinguishing normal cells from early-stage cancers and also from malignant, metastatic cancer cells that are the real killers. In addition, protein expression profiling is useful in key areas of drug development, such as in drug target selection, toxicology and the identification of surrogate markers of drug response.

It has long been the goal of molecular biologists to develop technologies that can quantify, in a reliable and reproducible manner, the expression level of every individual protein and the different forms of each protein in a biological sample. However, this has turned out to be extremely difficult to achieve. Traditionally, the expression of one or a small number of proteins can be detected by immunological methods, such as western blotting and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Two-dimensional gel electrophoresis can be used to analyze the proteins expressed in a sample. However, it requires complicated procedures and it is necessary to determine the identities of the proteins displayed on the two-dimensional gel, which is difficult to achieve for most proteins. Recently, protein arrays are applied in studying protein expression patterns. In one strategy (US patent 6,197,599; Haab, et al., *Genome Biol.* 2, research0004.1-0004.13, 2001), an antibody array is incubated with a protein sample and after

WO 03/029490

PCT/US02/19346

incubation and washing, proteins specifically bound to their respective antibodies on the array are detected.

Immunochemical staining is a versatile technique in determining both the presence and localization of an antigen (Harlow and Lane, *Antibodies*, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Press, 1988), which information is of immense value in biomedical research and clinical medicine. Most of the current methods, which employ the steps of incubating cells with an antibody solution, only allow cell staining with one or a few antibodies at a time. These methods are not suitable for applications in which the expressions and sub-cellular localizations of a large number of different proteins need to be examined. Therefore, a new method that is capable of staining cells with a large number of different antibodies is needed for such purposes.

SUMMARY OF THE INVENTION

It is an object of the invention to provide an array of biological reagents that enables one to maintain the positions of the reagents on the array support and yet allows the reagents to dissociate from the support when placed in contact with their interacting partners that are immobilized on another support.

It is also an object of the invention to provide methods of making and using the novel arrays of biological reagents for detecting, among other ligands, one or more proteins at one time. The preferred methods of invention are adapted to utilize various support materials and immobilization methods to make and use the arrays.

It is a further object of the invention to provide methods and arrays that enable one to use arrays of biological reagents to detect proteins and their properties, and more particularly, to detect and compare the presences and sub-cellular locations of one or more proteins in the cells.

The methods and arrays of the invention are designed to substantially expand the use of biological arrays in the field of detecting proteins and other biological molecules. For example, arrays of antibodies immobilized on a first, preferably solid, support are contacted with a protein sample immobilized on a second support so that one or more of the antibodies bind to their respective antigens and, after binding, the antibodies are then dissociated from the first support while maintaining association with their antigens on the second support.

WO 03/029490

PCT/US02/19346

A preferred method of the invention for detecting one or more biological molecules, generally comprises the steps of: providing a first support on which one or more reagents are immobilized; providing a second support on which one or more ligands are immobilized; contacting the reagents immobilized on the first support with the ligands immobilized on the second support whereby one or more of the reagents bind to one or more of the ligands; separating the first support from the second support; and detecting one or more reagents on said second support. The reagents are preferably immobilized on said first support with strength sufficient to immobilize said reagents in the contacting step and yet allow said bound reagents to dissociate from said first support in said separating step. The reagents immobilized on said first support may comprise one or more antibodies.

The ligands may be separated from each other before being immobilized on said second support using a variety of methods including, but not limited to: using gel electrophoresis based, at least in part, on their molecular weights; using gel electrophoresis based, at least in part, on their isoelectric points; using two-dimensional gel electrophoresis based at least in part on one or both of their molecular weights and isoelectric points; immunologically such as by using one or more antibody arrays. The reagents may be selected from a group consisting of antibodies, recombinant proteins, DNA, RNA, oligo nucleotides, carbohydrates, and small chemicals. The reagents may be immobilized at one or more predetermined positions on said first support. If the reagent selected is one or more antibodies, antibodies may be specific for posttranslationally modified proteins such as phosphorylated proteins.

One or more of the reagents may be each immobilized at one or more predetermined positions on the support. The number of different kinds of reagents on any given support are preferably: 2 to 50; 5 to 100,000; 200 to 10,000; 50 to 1,000; 5 to 500; 5 to 100; and 5 to 50.

The first or second support may comprise materials selected from a group consisting of nitrocellulose, nylon, polyvinylidene difluoride, glass, or plastic, and their derivatives.

Another preferred method of the invention to detect one or more biological molecules in cells, generally comprises the steps of: (a) immobilizing one or more

WO 03/029490

PCT/US02/19346

antibodies on a first support, wherein said antibodies are provided at predetermined positions on said first support such that said antibodies can be identified by the position where they are immobilized; (b) placing said cells on a second support; (c) contacting said antibodies on said first support with said cells on said second support to allow said antibodies to bind to any corresponding antigens in said cells; (d) separating said first support from said second support whereby one or more of said bound antibodies remain bound to the corresponding antigens after separation; (e) detecting said antibodies bound to antigens in said cells on said second support. The method may utilize cells that are immobilized on said second support, wherein said cells may comprise one or more tissue sections.

The antibodies may be specific for posttranslationally modified proteins such as phosphorylated proteins. The number of different kinds of reagents that can be immobilized at one or more predetermined positions may include 5 to 100,000; 200 to 10,000; 50 to 1,000; 5 to 500; and 2 to 50. The supports may comprise materials selected from a group consisting of nitrocellulose, nylon, polyvinylidene difluoride, glass, or plastic, and their derivatives. Proteins such as antibodies may be immobilized on the supports in one or more shapes selected from a group consisting of circular, elongated, and polygonal.

The first or second support may comprise an array. The array may be made using various materials including, but not limited to, a plurality of whole or partial capillary tubes.

The antibodies may be immobilized on said support using one or more intermediaries selected from a group consisting of modified protein A and modified protein G. Protein A or protein G are modified to alter its binding affinity. One or more of said antibodies may have at least one constant region, that is adapted to engage one or more of the modified proteins, and at least one variable region that is available to bind to one or more antigens.

The step of detecting preferably comprises one or more steps of detecting selected from a group consisting of, determining whether one or more of said antibodies is present on one or both supports, identifying one or more locations of said antibodies after the

WO 03/029490

PCT/US02/19346

separating step, determining one or more quantities of said antibodies, and identifying one or more types of antibodies.

Another preferred method of the invention for detecting one or more biological molecules comprises the steps of: (a) immobilizing one or more ligands on a second support; (b) immobilizing one or more reagents, that are adapted to interact with one or more of said ligands, on a first support; (c) contacting said reagents with said ligands to allow one or more of said reagents to bind with one or more of said ligands; (d) cross-linking one or more said reagents with one or more of said ligands; (e) separating said first support from said second support to allow one or more of said reagents that are bound to one or more of said ligands to dissociate from said first support; (f) detecting one or more of said reagents on said second support.

One or more of said ligands and said reagents may be cross-linked using, at least in part, one or more aldehydes which are preferably, but not necessarily limited to, formaldehyde and glutaldehyde.

A preferred embodiment of one of the arrays of the invention for use in detecting biological molecules, generally comprises: a first support adapted to at least temporarily immobilize one or more reagents and adapted to be placed in contact with a second support, to which one or more ligands are immobilized, so that one or more of said reagents is allowed to bind with one or more of said ligands and to subsequently dissociate from said first support and remain bound to said ligands on said second support.

The supports may comprise various materials, including, but not limited to, one or more of the following materials: nylon, nitrocellulose, polyvinylidene difluoride, glass, or plastic, and their derivatives. For example, the support may comprise one or more nylon membranes or a whole or a portion of one or more capillary tubes. One or more of said reagents are immobilized on a support may be immobilized in one or more shapes selected from a group consisting of circular, elongated and polygonal. The ligands may also be immobilized, at least in part, by covalent bonds.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 is a schematic diagram of a preferred method of the invention for detecting multiple proteins.

WO 03/029490

PCT/US02/19346

FIG. 2 shows the result after using a preferred method and array of the invention to detect multiple proteins. In this example, MDCK cells were stained with an array of 200 antibodies. The staining was observed via alkaline phosphatase-mediated color reaction with BCIP/NBT as substrates.

FIG. 3a shows the result after using a preferred method and array of the invention using fluorescent staining. An array of 200 rabbit polyclonal antibodies was used and the staining of protein IRF1 at one position is shown here at a scale bar of 300 μ m.

FIG. 3b is a partial, enlarged view of the image in FIG. 3a at a scale bar of 30 μ m.

FIG. 3c shows the result after using a preferred method and array of the invention using fluorescent staining. An array of 200 rabbit polyclonal antibodies was used and the staining of signaling molecule 14-3-3 β at one position is shown.

FIG. 3d is a partial, enlarged view of the image from FIG. 3c.

FIG. 3e shows the result after using a preferred method and array of the invention using fluorescent staining. An array of 200 rabbit polyclonal antibodies was used and the staining of cell adhesion protein β -catenin at one position is shown.

FIG. 3f is partial, enlarged view of the image from FIG. 3e.

FIG. 3g shows the result after using a preferred method and array of the invention using fluorescent staining. An array of 200 rabbit polyclonal antibodies was used and the staining of transcriptional factor Ets-1 at one position is shown here.

FIG. 3h is a partial, enlarged view of the image from FIG. 3g.

FIG. 4a shows the result after using a preferred method and array of the invention whereby A431 cells were stained with an array containing rabbit anti-YY1 antibodies (left in green), mouse anti-p130^{cas} antibodies (middle in red), and both YY1 (right in green) and p130^{cas} (right in red) antibodies at neighboring positions. Goat anti-rabbit Cy2-labeled secondary antibodies and goat anti-mouse Cy3-labeled secondary antibodies were used.

FIG. 4b is an enlarged view of the double staining of YY1 (green) and p130^{cas} (red) shown in FIG. 4a.

FIG. 5 shows the result after using a preferred method and array of the invention to detect protein expressions in two biological samples. Protein expressions in ME180 cells are shown at left and protein expressions in A431 cells are shown at right. Antibody

WO 03/029490

PCT/US02/19346

arrays with 240 antibodies were used in this example. The staining was observed via alkaline phosphatase-mediated color reaction with BCIP/NBT as substrates.

FIG. 6 shows the result using Western blotting to determine the differences in protein expression as detected in FIG. 5. Expressions of 19 proteins in ME180 cells (left lanes) and in A431 cells (right lanes) as detected by Western blotting are shown here. Proteins examined are: A, Cb1 (120 kD); B, Cdc2 (34 kD); C, Cortactin (80 kD); D, Neu (185 kD); E, ERK1 (44 kD); F, Ets-1 (51 kD); G, GSK-3 α (51 kD); H, HSP 70 (70 kD); I, JNK1 (46 kD); J, Lyn (56 kD); K, NF κ B p50 (50 kD); L, Skp2 p45 (45 kD); M, p53 (53 kD); N, Plk3 (70 kD); O, SH-PTP2 (60 kD); P, Raf-1 (74 kD); Q, Rb p107 (107 kD); R, Stat1 (84 kD); S, Stat5a (95 kD). The corresponding position for each of the antibodies in FIG. 5 is indicated on the top. Protein lysates of A431 and ME180 cells occupying equal culture areas were loaded in each lane.

FIG. 7 shows the results after using a preferred method and array of the invention to detect protein expressions in a protein lysate of A431 cells separated by SDS/PAGE. Antibodies against 12 proteins were immobilized at proper positions. Proteins examined are: 1, IKK beta; 2, E2F1; 3, ERK2; 4, 14-3-3; 5, Rb p107; 6, ERK1 control (antibodies were immobilized at positions where there was no antigen); 7, Ets-1; 8, ERK1; 9, Stat1; 10, 14-3-3 control; 11, JNK1; 12, Stat2; 13, Lyn; 14, p38. The corresponding position for each of the antibodies is indicated at the right of the corresponding spot.

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENT'S AND METHODS

The invention relates to novel arrays of biological reagents and methods for making and using the arrays. The method generally feature the steps of providing a first support immobilized with one or more reagents, providing a second support immobilized with one or more ligands, contacting the reagents with the ligands whereby one or more of the reagents bind to the ligands, separating the supports after binding whereby the bound reagents remain bound to the ligands, and detecting and/or comparing various biological targets.

One of the methods allows for a reagent, immobilized on a solid support, to bind its interacting partner that is immobilized on another support. In particular, antibody arrays are made so that the immobilized antibodies can dissociate from the support after

WO 03/029490

PCT/US02/19346

binding their respective antigens that are immobilized on a second support. The binding of each antibody-antigen occurs at a pre-determined position.

The term "reagents" as used herein refers to any molecules of biological interest, such as antibodies, recombinant proteins, synthesized peptides, DNA, RNA, nucleotides, and small chemicals.

The term "ligands" as used herein refers to any biological molecule that is interactive with one or more reagents.

The term "array" as used herein refers to a device that includes, but is not limited to, a solid support and a plurality of reagents or ligands. For example, antibodies may be immobilized on the support, each at a predefined position so that each antibody can be identified by a specific position on the support.

The term "immobilization" is used herein, means the restriction of a reagent on a support so that the movement of the reagent on the support is limited. For example, when an antibody is immobilized on a support, the antibody is attached to the support so that it may not dissociate from the support and the movement of the antibody on the support is also limited. However, under some conditions, as described in the invention, an immobilized reagent can dissociate from the support. The physical and chemical nature of the immobilization determines whether an immobilized reagent can dissociate from the support; and how efficient the dissociation will be.

The term "support" is used herein, for the purposes of the specification and claims, to mean the structure on which biological reagents are deposited and immobilized. In the preferred embodiments, the supports may be, but are not limited to, rigid plates (glass or plastics) or membranes made of nitrocellulose, nylon, polyvinylidene difluoride (PVDF), or their derivatives. Membranes are easier to handle and reagents can be readily immobilized on them. Glass or plastic plates provide rigid support and are necessary in some applications.

Preferably, the solid supports are pretreated so that biological reagents deposited on them can be immobilized with adequate strength suitable for specific applications. One way to treat the solid support is to coat it with a layer of polymers that in turn will interact with biological reagents through non-specific, non-covalent bonds. For example,

WO 03/029490

PCT/US02/19346

polymers comprising polylysine or polyethyleneimine may be used to coat glass slides or coverslips for use in immobilizing biological molecules.

Several techniques are available for depositing and immobilizing a plurality of biological reagents on solid supports, such as those described by Lehrach, et al. (Hybridization fingerprinting in genome mapping and sequencing, genome analysis, Vol. 1, Davies and Tilgham, Eds, Cold Spring Harbor Press, pp. 39-81, 1990) and Brown et al. (U.S. patent 5,807,522). Each of the aforementioned articles is incorporated by reference in its entirety. For example, nanolitre volumes of antibodies in an aqueous solution can be printed on a glass slide using a robotic arrayer. Therefore, arrays of biological reagents may be formed by depositing a plurality of reagents onto a flat solid support, one or a few reagents at a time, and each reagent at a pre-defined position.

The immobilization of antibodies may be via adsorption (Trevan, 1980, Immobilized Enzymes: an introduction and their application in biotechnology. Wiley, Chichester). The adsorption forces involved may be nonspecific, hydrophobic or ionic interactions. Typically adsorbent materials used include, but are not limited to, clay, charcoal, hydroxyapatite, and most frequently, ion-exchange materials such as DEAE-Sephadex.

Entrapment is another way to immobilize antibodies (Trevan, 1980, Immobilized Enzymes: an introduction and their application in biotechnology. Wiley, Chichester). The entrapped antibodies are not attached to the polymer; their free diffusion is merely restrained. One commonly used matrix is a polyacrylamide gel. In one preferred embodiment, capillary tubes are used to facilitate arraying and immobilizing biological reagents. The term "capillary tube" is used herein, to mean any wholly or partially enclosed elongated structure capable of containing and supporting biological reagents. The capillary tubes may be made from materials such as plastics and glass, which preferably do not interfere with the properties of biological reagents. The heights of the capillary tubes may be varied from micrometers to meters. A biological reagent is usually filled into a capillary tube as liquid solution. After filling, the reagent solution becomes solidified and the reagent is immobilized. The strength of immobilization may be varied depending on a given application.

WO 03/029490

PCT/US02/19346

Reagents are immobilized on a solid support directly or indirectly. For example, reagents may be directly deposited at high density on a support, which can be as small as a microscopic slide. Similar technology was developed for making high density DNA microarray (Shalon et al., *Genome Research*, 1996 Jul; 6(7): 639-645). Reagents may also be immobilized indirectly on the support. For instance, protein A or protein G, or their mutants can be first printed on a support as intermediates. Antibodies are then immobilized on the support through their interactions with protein A or G. One advantage of this method is that, by engaging the constant regions of antibodies with protein A or G, the variable regions of the antibodies (antigen-binding domains) will be fully exposed and available to bind antigens. Another advantage is that, since protein A or G can be modified to change their binding affinity for antibodies, when carefully designed mutants of protein A or protein G are used, antibodies can be immobilized on the support with desired strength. As such, antibodies on one hand can be immobilized on the support without losing positional information but on the other hand can leave the support and bind to other ligands of higher affinity. Recombinant fusion proteins can be immobilized through the interactions between their tags and the ligands attached on the support. For example, ligands (e.g., glutathione or nickel) can be first covalently attached on a support and then recombinant fusion proteins containing a tag (e.g., GST or 6xHis) are immobilized on the same support via interacting with the ligands. The tags and ligands can be modified to change their affinities so that the immobilization will have desired strength.

Antibodies are usually deposited on a support as circular dots. However, antibodies can also be deposited in other shapes. For example, antibodies can be immobilized in an elongated shape, such as a rectangular shape of a few microns to a few centimeters wide and a few microns to a few centimeters long. Antibodies immobilized in such a shape can be used to bind antigens after separation according to a variety of methods.

An antibody specific for an antigen may be immobilized at a specific position on a support. In general, antibodies are immobilized at positions that when they make contacts with protein samples, each antibody will make contact with its own antigens. Therefore, a specific antibody may be immobilized at a specific position which is

WO 03/029490

PCT/US02/19346

determined by the position of its antigen. For example, when antigens are first separated by two-dimensional gel electrophoresis and transferred and immobilized on a support; each antigen is immobilized at a specific position determined by its molecular weight and isoelectric point. Therefore, each of the antibodies can be immobilized according to the position of the antigen on the support.

The term "protein sample" as used herein refers to a variety of proteins and protein mixtures. For example, it can be a lysate from a cell line or tissue. Or it can be intact cells, or cells fixed on a support. A protein sample can be from different sources such as, but not limited to, cultured cell lines, human or animal tissue, or blood.

In one preferred embodiment, protein samples are cultured cells or tissue sections that can be placed on glass slides and immobilized. Before use, the cells can be fixed and permeabilized to expose proteins. The fixed cells retain certain cell morphology and most proteins stay at their original cellular positions. There are multiple methods for fixing and permeabilizing cells and tissues (Harlow and Lane, *Antibodies*, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Press, 1988.). A commonly used fixation solution is a formaldehyde or glutaldehyde solution. Another commonly used fixation solution contains methanol instead.

Suspension cells, such as lymphocytes can be spun down on a support and immobilized on it. They may also be embedded in a medium, such as paraffin, collagen, gelatin, and then sectioned and placed on a support. Many known methods are available to prepare cell samples (Jones, T.C., Ward, J.M., Mohr, U. and Hunt, R.D. (editors), 1990, *Hemopoietic System*, Berlin, Springer-Verlag; Polak, J.M. and Van Noorden, S., 1997, *Introduction to Immunocytochemistry*, New York, Springer).

In another preferred embodiment, protein samples are prepared from cells or tissues by lysis. A typical lysis buffer contains detergents such as sodium dodecyl sulphate (SDS), Triton X-100, etc. The immobilization of protein samples can be via covalent or non-covalent bond and methods for immobilization are known in the arts. The size of the area on which a protein sample is immobilized on the support may be different depending on applications and the volume and amount of the protein sample immobilized. For example, when a membrane is used as support, if the binding capacity of the

WO 03/029490

PCT/US02/19346

membrane is 10 mg protein per square centimeter, then up to 10 mg of protein lysate can be immobilized on a membrane with a size of 1 square centimeter.

The protein lysates may be evenly placed on a support and immobilized on it. However, for other applications, proteins may be first separated and then immobilized on a support. Many methods for protein separations are known in the art. For example, proteins can be separated by one-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to molecular weight; or separated by 2-dimensional electrophoresis according to both molecular weight and isoelectric point. After separation by electrophoresis, proteins can be transferred and immobilized on a support.

In another preferred embodiment, protein samples can be separated by immunological methods, such as separation by an antibody array. A protein sample is first incubated with an antibody array on a first support to allow antibodies to capture and therefore separate their antigens present in the protein sample. After washing away non-binding proteins, the proteins captured at each position are dissociated from the antibodies and transferred onto a second support and immobilized on it. The interactions between antibodies and the first solid support can be much stronger than the interactions between antibodies and antigens. Therefore, conditions may be found to disrupt antibody-antigen interactions but leave antibody immobilization on the first support intact. Under such conditions, the antigens but not the antibodies may be transferred onto the second support and immobilized on it. To avoid antibody dissociation from the first solid supports, the antibodies may be covalently immobilized on the supports.

In a typical transfer, the first support containing the antibodies and the antigens is contacted with a second support. Then they are placed in a buffer solution that could disrupt the interactions between the antigens and antibodies. And at the same time, an electric current is applied so that the disassociated proteins will move from the first support to the second support. After completion the two supports are separated. The transfer and immobilization may take place simultaneously (proteins are transferred and immobilized at the same time) or sequentially (proteins are transferred first and then immobilized). And if the immobilization is not as strong as desired the proteins could be

WO 03/029490

PCT/US02/19346

further immobilized, e.g., through covalent bond. Methods are known in the art for covalent immobilization of proteins on solid support.

Once prepared, the protein samples are contacted with another antibody array. The contact is preferably carried out so that each antibody contacts its respective antigen to allow for specific binding. The antibodies on this array are dissociable from the support. Therefore, after separation of the antibody array support and the protein sample support, antibodies that bond to the antigens will be present on the sample support. By detecting the antibodies, the presence and abundance of antigens in the sample are detected.

Some of the methods are adapted to allow antibodies immobilized on one support to bind antigens immobilized on another support. In one preferred method, antibodies immobilized on one support are allowed to interact with antigens immobilized on a second support by placing the two supports together to make contact. After incubation for a certain time, the two supports are separated. Depending on the interactions between antibodies and antigens, some antibodies will dissociate from the first support and bind to the second support where antigens are immobilized. The strength of antibody immobilization on the first support is preferably weaker than the interactions between antibodies and antigens, and weaker than the strength of the immobilization of antigens on the second support. Conditions such as an electric field can be applied to facilitate the dissociation of the antibodies from the support.

After the binding of antigen and antibodies, the antigen-antibody complexes can be stabilized using covalent cross-linking. The cross-linking is preferably performed in such a way that antibody-antigen complexes are cross-linked but the antibodies are not cross-linked on their support. This can be achieved by choosing specific cross-linkers and special support for antibodies. There are hundreds of known cross-linkers and a variety of methods have been developed to use them to cross-link proteins (Wong, Shan S., *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*, Boca Raton: CRC Press, 1993). For example, commonly used cross-linkers include aldehydes such as, but not limited to, formaldehyde and glutaldehyde.

The antibodies bound to the antigens are then detected. Many known arts can be used to detect antibodies. A common method is to use enzyme-conjugated secondary

WO 03/029490

PCT/US02/19346

antibodies, such as horseradish peroxidase or alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit and goat anti-mouse antibodies. Fluorescent-labeled secondary antibodies can also be used. Other technologies that can be used include immuno-PCR (Sano et al., 1992, *Science* 258, 120-122), rolling circle DNA amplification technique (Schweitzer et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10113-10119), and immuno-detection amplified by T7 RNA polymerase (Zhang et al., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 98, 5497-5502.).

In one preferred embodiment of the arrays of the invention, arrays of antibodies may be used to stain cells, which is shown schematically in FIG. 1. Cells can be seeded on a coverslip, cultured, fixed and permeabilized to expose the antigens. Cell preparations are then incubated with an antibody array to allow the antibodies to bind to their respective antigens. After binding, the antibody array support and the cell support are separated. Some of the antibodies will be transferred to the cell support due to their interactions with their antigens. The amount of the bound and transferred antibodies will be related to the amount of antigens present in the cells.

By detecting the presence and quantities of the antibodies trapped on the cell support, the presence and quantities of their antigens in the cells can be determined. If the antibodies are conjugated with an enzyme, they can be revealed by enzymatic reactions. Alkaline phosphatase is commonly used and known substrates will give insoluble color products after reaction. In addition, if the antibodies are labeled with fluorescent molecules, they may also be observed directly under fluorescent microscopy. In many cases fluorescent- or enzyme-conjugated secondary antibodies can be used to reveal the presences of the primary antibodies.

For the purpose of revealing the presences and quantities of the antigens, the staining may simply be observed at a low magnification. However, to reveal other properties of the antigens, such as their sub-cellular localizations, the staining is preferably observed at a higher magnification.

Simultaneous staining of two proteins (double staining) is a unique tool for studying two functionally related proteins. For example, evidence of protein interactions often includes the demonstration that the proteins co-localize in the same cellular structure. Two or more antibodies can be immobilized on the same position of the

WO 03/029490

PCT/US02/19346

antibody array so that two or more antigens can be detected at the same location simultaneously.

DNA probes instead of antibodies may be arrayed and used to detect the presence of specific DNA or RNA in the cells. To do so, DNA or RNA probes are immobilized on a solid support. Preferably, the immobilization of the probes is strong enough to maintain probes' positions on the support; but are preferably weaker than the interactions between the probes and their targets, so that when the probes bind to their targets, the probes can dissociate from the support. This method has many advantages over *in situ* hybridization, which usually only detects one or a few DNA or RNA sequences. When an array of DNA or RNA probes made according to the present invention is used, the presence and locations of a large number of DNA or RNA sequences can be detected in morphologically preserved tissue sections or cell preparations, each at a pre-defined position. The methods for preparing DNA and RNA probes, to be arrayed on a support, and the methods for preparing tissues or cells are known in the art (Jan A. Darby (Editor), *In Situ Hybridization Protocols* (Methods in Molecular Biology, 123), by Humana Press; ISBN: 0896036863; 2nd edition, 2000).

In another preferred embodiment, an antibody array is used to detect proteins in a protein lysate. To do so, an antibody array immobilized on a first support is incubated with a protein lysate immobilized on a second support. After incubation for certain time, the antibodies will bind their respective antigens in the lysate that are immobilized on the second support. Then the first support is separated from the second support. Under proper conditions, the antigen-bound antibodies will be dissociated from the first support and stay on the second support, on which their antigens are immobilized. The amount of an antibody transferred to the second support will be proportional to the abundance of its antigens in the protein lysate. Therefore, the detection of the amount of antibodies on the second support will reveal the abundance of their antigens in the protein sample.

In many applications, proteins can be first separated and/or concentrated, which may be necessary to detect low abundant proteins. In one embodiment, proteins are first separated by one-dimensional SDS/PAGE and transferred to a membrane support so that each protein is immobilized on the support at the position determined by its molecular weight. Then the lysate membrane is contacted with an antibody array, in which

WO 03/029490

PCT/US02/19346

antibodies are immobilized in elongated shapes at specific positions, so that each of the antibodies will be able to contact its antigen at the specific position determined by the molecular weight of that antigen.

Proteins may also be separated by two-dimensional gel electrophoresis and transferred to a support such as a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Then the lysate membrane is contacted with an antibody array, which may contain multiple antibodies that each may be immobilized at a predetermined position so that each antibody will contact its corresponding antigen.

Proteins may also be separated and concentrated by immunological methods. One way to achieve this is to use antibody arrays. For example, a first antibody array can be incubated with a protein sample so that the proteins are captured and separated by each antibody immobilized on the array. The antibodies in this first array are preferably strongly immobilized, e.g. via covalent bond. Then the antigens are dissociated from the antibodies and transferred and immobilized on a second support. This process can be performed with several known methods. A second antibody array is then used to detect the antigens. Antibodies on the second array are immobilized in such a way that after binding their respective antigens, antibodies can be dissociated from the array support. Antibodies in the first and second arrays against the same antigen may be immobilized at corresponding positions; and they can be identical or different.

EXAMPLES:

The following examples are for illustration only and in no way are intended to limit the present invention. Although the examples describe the use of antibody arrays according to the invention, similar usage for arrays of biological reagents other than antibodies are obvious to the people familiar with the arts. Such arrays of biological reagents include but are not limited to arrays of recombinant proteins, recombinant antibodies, single chain antibodies, nucleic acids, oligos, cDNA probes, carbohydrates, lipids, small chemicals. For example, an array of immobilized cDNA probes can be used in *in situ* hybridization to reveal the expressions of multiple mRNA in cells.

Example 1: Making of antibody arrays.

Antibodies from commercial sources (about 0.5 μ g/ μ l) were arrayed on Nylon membranes (from Amersham Life Science) using a robotic arrayer. About 40 ng

WO 03/029490

PCT/US02/19346

antibodies in 80 nl solutions were deposited at each spot using a 0.6 mm solid pin, spaced 600 μ m apart. Antibodies were immobilized by non-covalent bonds between nylon membranes and the antibodies. Antibody arrays were either used immediately or stored at 4 $^{\circ}$ C for less than 48 hrs before use.

Example 2: Use of antibody array in immunochemical staining.

This example is to demonstrate the use of antibody arrays prepared by the method disclosed for immunochemical staining. Antibody arrays made in Example 1 with 200 antibodies against different cellular proteins were used.

Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cells were seeded on a culture dish and cultured for 2 days until confluence. Then they were fixed and permeabilized in Methanol/Acetone (1:1) for 10 min at -20 degree. After rinsing with phosphate-buffered saline (PBS), MDCK cells were contacted with an antibody array for about 1 hour. During the incubation the antibodies bound their antigens present in the cells. After that, antibody array support and cell support were separated. Cells were rinsed with phosphate-buffered saline again and alkaline phosphatase-labeled secondary antibodies were added for half an hour. After wash, the staining was visualized by color reaction with 5-bromo-4-chloro-indolyl-phosphatase (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT) as substrates. The enzymatic reaction was stopped by washing off substrates with PBS and the image was obtained by scanning with a flat-bed scanner (FIG. 2). Cells at many positions were stained with antibodies and there was little mixing of the antibodies, as judged by the lack of staining at the areas between immobilized antibodies. The regular pattern of the stained spots matches the pattern in which the antibodies were printed.

Example 3: Use of antibody array in fluorescent immunochemical staining.

In this example, about 5 ng antibodies in 10 nl solutions were deposited at each spot on Nylon membrane using a 0.3 mm solid pin, spaced 300 μ m apart between neighboring spots. Then the antibody array was used to stain A431 cells by the method represented schematically in FIG. 1 and described in Example 2, except that fluorescent-labeled secondary antibodies were used and the staining was observed under fluorescent microscope (FIG. 3). A low magnification observation under fluorescent microscopy showed that each staining spot is about 300- μ m in diameter and consists of a cluster of 400 cells (FIG. 3a, 3c, 3e, and 3g). There are clear boundaries between the stained areas

WO 03/029490

PCT/US02/19346

and non-stained areas. A high magnification observation revealed the detailed staining patterns, e.g., nuclei localization of IRF1 (FIG. 3b), cytoplasmic staining of 14-3-3 β (FIG. 3d) and Ets-1 (FIG. 3f), and cell-cell contacts staining of beta-catenin (FIG. 3h). The staining is indistinguishable from that obtained with standard immunostaining procedure.

Example 4: Antibody arrays made in capillary tubes.

This example is to use antibody arrays made with capillary tubes to stain cells. Each antibody was mixed with low-melting agarose solution and injected into a plastic capillary tube of 1-cm high, 2-mm in outer diameter and about 0.2 mm thick. After the gel became solid, capillary tubes were bundled together and cut across section to produce arrays of about 1-mm high.

Then the antibody array was placed on a glass support and contacted with cells fixed on another glass support to allow the binding of antibodies to their antigens. Antibodies that bound to the antigens were detected with fluorescent-labeled secondary antibodies and observed under microscope as in Example 3.

Example 5: Antibody arrays made in capillary tubes for fluorescent immunostaining.

Fluorescent-labeled antibodies were first mixed with a low-melting agarose solution at high temperature and then the antibody solutions were injected into capillary tubes to make a capillary array. Temperature was lowered to solidify the solutions in the capillary tubes. The tubes were then cut to make thin arrays; less than 1 mm high; and put on a plastic solid support and glued on it. The array was contacted with fixed cells which were placed on a cover glass to allow antibodies to contact antigens. Then the cells and antibody array were incubated at 37°C for 2 hrs. After that, temperature was lowered and the array and cells were separated. Cells on the cover glass were then washed with PBS and observed under microscope.

Example 6: Use of antibody arrays in double staining.

An antibody array was made that had 100 spots; each spot contained one or two antibodies. At the spots where two different antibodies were immobilized, one of them was mouse monoclonal and the other one was rabbit polyclonal. The array was used to stain A431 cells seeded on a cover glass. After staining, A431 cells were incubated with

WO 03/029490

PCT/US02/19346

Cy2-labeled goat anti-rabbit secondary antibodies and Cy3-labeled goat anti-mouse secondary antibodies. The presence and locations of the antigens were examined by fluorescent microscopy (FIG. 4a and 4b). At the positions where two antibodies were present, the two corresponding antigens were observed. The two antibodies/antigens can be distinguished by different labeling and different cellular localizations. For example, in FIG. 4 the nuclear localization of protein YY1 and membrane localization of protein p130^{gag} were seen individually (FIG.4a, left and middle) and together (FIG. 4a, right; and FIG. 4b).

Example 7: Use of antibody array staining to compare protein expressions between cell samples.

Antibody arrays containing both mouse monoclonal and rabbit polyclonal antibodies against 240 proteins involved in various signaling pathways were produced as described in previous examples. And the presence of the 240 proteins were detected and compared between A431 cells, and ME180 cells, two human cancer cell lines that are widely used in research. The result showed that the two cell samples have very different protein expression patterns. Many of the 240 target proteins are expressed differently in A431 and ME180 cells (FIG. 5). For example, A431 cells express more Cbl, cortactin, Neu, HSP 70, JNK1, p53, Raf-1, and Stat1; but less GSK-3 α , Skp2 p45, Plk3, and Stat5a than ME180 cells. The expressions of these proteins were also examined by Western blotting (FIG. 6). And the results obtained with the two methods correlated well, suggesting that antibody array staining is a valid method for profiling protein expressions.

Example 8: Detecting pathway activation with antibody arrays.

Antibodies that are specifically against activated proteins (phosphorylated proteins) were used to make antibody arrays and the arrays were used to examine the presence of these activated proteins in a biological sample. The presence of activated proteins suggested that certain signal transduction pathways were activated in the sample.

Example 9: Detection of specific proteins in a protein lysate.

In this example, 50 μ g bacterial lysate containing Stat1 recombinant protein was immobilized on a 1-square-centimeter nitrocellulose membrane. Then the lysate membrane was contacted with an antibody array, which contains multiple antibodies including Stat1 antibodies on a nylon membrane.

WO 03/029490

PCT/US02/19346

After 1-2 hr incubation, some antibodies bound their respective antigens in the lysate. When the lysate membrane and antibody array were physically separated, some antibodies were dissociated from the antibody array support and bound to the lysate support due to their interactions with antigens. The amount of an antibody bound to the lysate slide depends on the abundance of the antigen present in the lysate. Antibodies were detected with HRP-conjugated secondary antibodies and visualized through enhanced chemiluminescence (ECL) reaction.

Example 10: Detection of Stat1 protein with HRP-conjugated primary antibodies.

This example is similar to Example 9 except that horseradish peroxidase (HRP)-conjugated stat1 primary antibodies were used so that enzyme-conjugated secondary antibodies were not needed for the detection.

Example 11: Staining with antibody array immobilized via protein A mutant.

In this example, a recombinant protein A mutant with one antibody binding domain was first immobilized on a support; and then HRP-conjugated antibodies were immobilized on the support via interaction with the protein A mutant to form an antibody array. Such made antibody array was contacted with a protein lysate immobilized on another support. After 1 hr incubation, the antibody array was removed and the antibodies bound to the protein sample support were detected via ECL reaction.

Example 12: Separation of protein samples by SDS/PAGE.

In this example, protein lysates of A431 cells were separated by SDS/PAGE using a curtain gel and transferred to a PVDF membrane. Antibody arrays containing 12 antibodies against well-studied proteins were made using nylon membrane as support and used in the assay. The antibodies were immobilized in rectangular shapes and were carefully positioned on the array so that when the arrays made contacts with the protein lysate immobilized on the PVDF membrane, antibodies can bind their respective antigens. After binding between antibodies and antigens, nylon membrane support was removed from the PVDF membrane. The antibodies that attached on the PVDF membrane via interactions with respective antigens were detected using HRP-conjugated secondary antibodies and revealed by ECL reaction. As shown in FIG. 7, several antigens were detected as expressed in A431 cells. And they are detected on the PVDF membrane at positions of expected molecular weights. Antibodies intentionally immobilized at wrong

WO 03/029490

PCT/US02/19346

positions gave lower signals, suggesting that the method is valid for profiling protein expressions.

Example 13: Separation of protein samples by two-dimensional gel electrophoresis.

This example is similar to Example 12 except that proteins were separated by two-dimensional gel electrophoresis and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Then the lysate membrane was contacted with an antibody array, which contained multiple antibodies and each of them was immobilized at a predetermined position so that each antibody would contact with its antigen.

Example 14: Separation of protein samples by antibody arrays.

In this example, proteins are first separated and concentrated by antibody arrays. An antibody array was made by immobilizing antibodies on a support covalently; then the array was incubated with a protein sample so that the proteins were captured and separated by each antibody immobilized on the array. Then the antigens were dissociated from the antibodies and transferred and immobilized on a sample support. Because the antibodies were covalently immobilized, no or very little was transferred to the sample support. A second antibody array was then made in such a way that antibodies against the same antigen were at the same relative positions as the antibodies were in the first antibody array. When the second antibody array contacted the sample support on which antigens were immobilized, each of the antibodies made contact with respective antigen and bound to it. After binding, the array was separated from the sample support. Because some antibodies bound their antigens, they dissociated from the array support and bound to the sample support.

Although specific features of the invention are shown in some drawings and not others, this is for convenience only as some feature may be combined with any or all of the other features in accordance with the invention. Other embodiments and modifications will occur to those skilled in the art and are within the following claims:

What is claimed is:

WO 03/029490

PCT/US02/19346

CLAIMS

1. Method for detecting one or more biological molecules, comprising the steps of:
 - providing a first support on which one or more reagents are immobilized;
 - providing a second support on which one or more ligands are immobilized;
 - contacting the reagents immobilized on the first support with the ligands immobilized on the second support whereby one or more of the reagents bind to one or more of the ligands;
 - separating the first support from the second support; and
 - detecting one or more reagents on said second support.
2. The method of claim 1, wherein said reagents are immobilized on said first support with strength sufficient to immobilize said reagents in the contacting step and yet allow said bound reagents to dissociate from said first support in said separating step.
3. The method of claim 1, wherein said reagents comprise one or more antibodies.
4. The method of claim 1, wherein said reagents comprise one or more DNA probes.
5. The method of claim 1, wherein said ligands are separated from each other before being immobilized on said second support.
6. The method of claim 5, wherein said ligands are separated from each other using gel electrophoresis based, at least in part, on their molecular weights.
7. The method of claim 5, wherein said ligands are separated from each other using gel electrophoresis based, at least in part, on their isoelectric points.
8. The method of claim 5, wherein said ligands are separated from each other using two-dimensional gel electrophoresis based at least in part on one or more or both of their molecular weights and isoelectric points.
9. The method of claim 5, wherein said ligands are separated from each other immunologically.

WO 03/029490

PCT/US02/19346

10. The method of claim 9, wherein said ligands are separated from each other using one or more antibody arrays.

11. The method of claim 1, wherein said reagents are immobilized on said first support in one or more shapes selected from a group consisting of circular, elongated, and polygonal.

12. The method of claim 1, wherein said reagents are selected from a group consisting of antibodies, recombinant proteins, DNA, RNA, oligo nucleotides, carbohydrates, and small chemicals.

13. The method of claim 1, wherein one or more of said reagents is immobilized at one or more predetermined positions on said first support.

14. The method of claim 1, wherein each of said reagents is immobilized at a predetermined position on said first support.

15. The method of claim 14, wherein said reagents are antibodies.

16. The method of claim 15, wherein one or more of said antibodies are specific for one or more posttranslationally modified proteins.

17. The method of claim 16, wherein one or more of said antibodies are specific for one or more phosphorylated proteins.

18. The method of claim 13, wherein 5 to 100,000 different kinds of reagents are each immobilized at one or more predetermined positions on said first support.

19. The method of claim 13, wherein 200 to 10,000 different kinds of reagents are each immobilized at one or more predetermined positions on said first support.

20. The method of claim 13, wherein 50 to 1,000 different kinds of reagents are each immobilized at one or more predetermined positions on said first support.

21. The method of claim 13, wherein 5 to 500 different kinds of reagents are each immobilized at one or more predetermined positions on said first support.

22. The method of claim 13, wherein 2 to 50 different kinds of reagents are each immobilized at one or more predetermined positions on said first support.

23. The method of claim 1, wherein said step of providing said first support on which one or more reagents are immobilized, comprises the steps of, applying one or more intermediates to said first support, wherein one or more of said intermediates is selected from a group consisting of protein A, protein G and their mutants; and applying

WO 03/029490

PCT/US02/19346

one or more of said reagents to said first support so that one or more of said reagents interacts with one or more of said intermediates.

24. The method of claim 1, wherein said first support comprises materials selected from a group consisting of nitrocellulose, nylon, polyvinylidene difluoride, glass, or plastic, and their derivatives.

25. The method of claim 24, wherein said first support comprises materials selected from a group consisting of nylon and its derivatives.

26. A method for detecting one or more biological molecules in cells, comprising the steps of:

(a) immobilizing one or more antibodies on a first support, wherein said antibodies are provided at predetermined positions on said first support such that said antibodies can be identified by the position where they are immobilized;

(b) placing said cells on a second support;

(c) contacting said antibodies on said first support with said cells on said second support to allow said antibodies to bind to any corresponding interacting biological molecules in said cells;

(d) separating said first support from said second support whereby one or more of said bound antibodies remain bound to the corresponding biological molecules after separation;

(e) detecting said antibodies bound to said biological molecules in said cells.

27. The method of claim 26, wherein said cells are fixed to said second support.

28. The method of claim 26, wherein said cells are one or more tissue sections.

29. The method of claim 26, wherein one or more of said antibodies are specific for one or more posttranslationally modified proteins.

30. The method of claim 26, wherein one or more of said antibodies are specific for one or more phosphorylated proteins.

31. The method of claim 26, wherein 5 to 100,000 different kinds of reagents are each immobilized at one or more predetermined positions on said first support.

WO 03/029490

PCT/US02/19346

32. The method of claim 26, wherein 200 to 10,000 different reagents are each immobilized at one or more predetermined positions on said first support.

33. The method of claim 26, wherein 50 to 1,000 different reagents are each immobilized at one or more predetermined positions on said first support.

34. The method of claim 26, wherein 5 to 500 different reagents are each immobilized at one or more predetermined positions on said first support.

35. The method of claim 26, wherein 2 to 50 different reagents are each immobilized at one or more predetermined positions on said first support.

36. The method of claim 26, wherein said first support comprises materials selected from a group consisting of nitrocellulose, nylon, polyvinylidene difluoride, glass, plastic, and their derivatives.

37. The method of claim 26, wherein said first support comprises materials selected from a group consisting of nylon and its derivatives.

38. The method of claim 26, wherein said reagents are immobilized on said first support in one or more shapes selected from a group consisting of circular, elongated, and polygonal.

39. The method of claim 26, wherein said first support comprises an array.

40. The method of claim 39, wherein said array comprises a plurality of whole or partial capillary tubes.

41. The method of claim 26, wherein said step of immobilizing said antibodies comprises the steps of, applying one or more intermediates to said first support; and applying one or more of said antibodies to said first support so that one or more of said antibodies interacts with one or more of said intermediates.

42. The method of claim 41, wherein one or more of said intermediates is selected from a group consisting of protein A, protein G and their mutants.

43. The method of claim 26, wherein said step of detecting comprises the one or more steps of detecting selecting from a group consisting of, determining whether one or more of said antibodies is present on one or both supports, identifying one or more locations of said antibodies after the separating step, determining one or more quantities of said antibodies, and identifying one or more types of antibodies.

WO 03/029490

PCT/US02/19346

44. A method of detecting one or more biological molecules comprising the steps of:
- (a) immobilizing one or more reagents on a first support;
 - (b) immobilizing one or more ligands, that are adapted to interact with one or more of said reagents, on a second support;
 - (c) contacting said reagents with said ligands to allow one or more of said reagents to bind with one or more of said ligands;
 - (d) cross-linking one or more said reagents with one or more of said ligands;
 - (e) separating said first support from said second support to allow one or more of said reagents that are bound to one or more of said ligands to dissociate from said first support;
 - (f) detecting one or more of said reagents or ligands.
45. The method of claim 44, wherein said one or more of said ligands and reagents are cross-linked using, at least in part, one or more aldehydes.
46. The method of claim 45, wherein one or more of said aldehydes is selected from a group consisting of formaldehyde and glutaldehyde.
47. An array for use in detecting one or more biological materials, comprising, a first support adapted to immobilize one or more reagents and adapted to be placed in contact with a second support on which one or more ligands are immobilized, so that one or more of said reagents is allowed to bind with one or more of said ligands and to subsequently dissociate from said first support and remain bound to said ligands on said second support.
48. The array of claim 47, wherein said first support comprises one or more materials selected from a group consisting of nylon, nitrocellulose, polyvinylidene difluoride, glass, plastic, and their derivatives
49. The array of claim 47, wherein said first support comprises all or a portion of one or more capillary tubes.
50. The array of claim 47, wherein one or more of said reagents are immobilized in one or more shapes selected from a group consisting of circular, elongated and polygonal.

WO 03/029490

PCT/US02/19346

51. The array of claim 47, wherein one or more of said reagents comprises an antibody.

52. The array of claim 47, wherein one or more of said reagents comprises DNA probes.

53. The array of claim 47, wherein one or more of said reagents is selected from a group consisting of antibodies, recombinant proteins, DNA, RNA, oligo nucleotides, carbohydrates, and small chemicals.

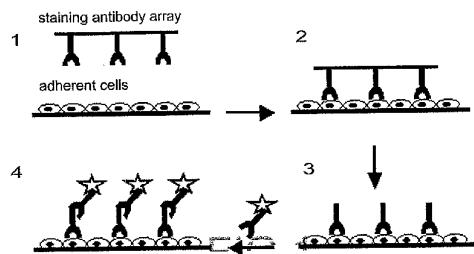


FIG. 1

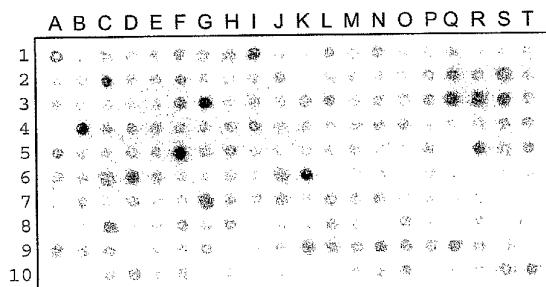
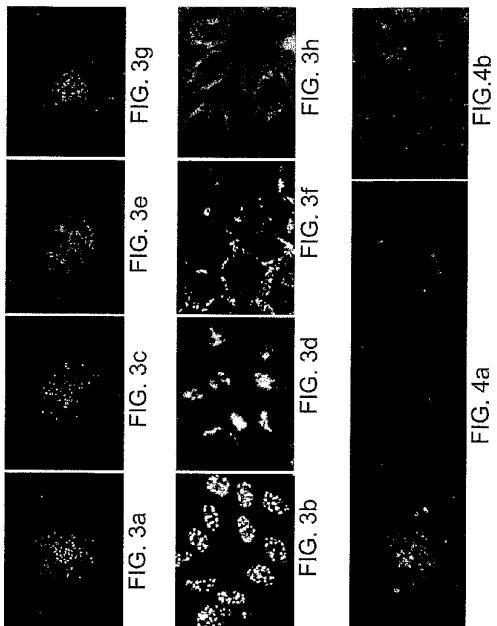


FIG. 2



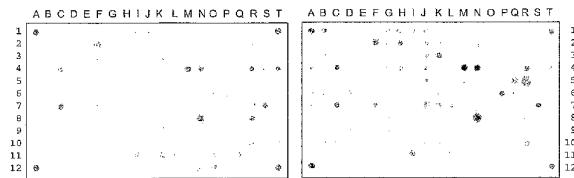


FIG. 5

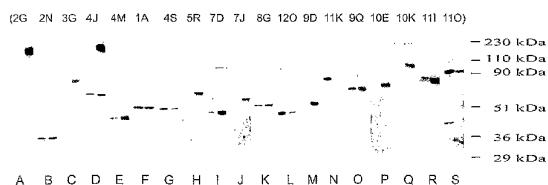


FIG. 6

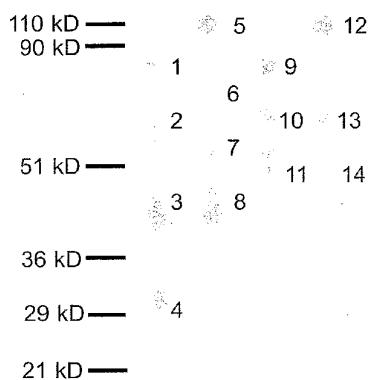
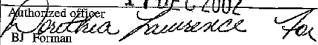


FIG. 7

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/19346																														
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68, 1/70; C07H 21/04, 21/00; G01N 33/53; C07K 16/00 US CL : 435/6, 7, 7.2, 174, 287.2 536/23.1, 24.3; 530/333, 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. : 435/6, 7, 7.2, 174, 287.2 536/23.1, 24.3; 530/333, 387.1																																
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																																
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, DIALOG																																
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">US 6,180,348 B1 (L4) 30 January 2001 (30.01.2001) column 6-7 and Fig. 1.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-5, 12-16, 47-53</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">—</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">—</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">—</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">US 5,516,635 A (EKJNS et al) 14 May 1996 (14.05.1996) columns 10-14 and Fig. 3-5.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">6-11, 17-46</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">US 5,702,896 A (COLLINS et al) 30 December 1997 (30.12.1997) columns 7-9 and Fig. 3-4.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-5, 12-17, 24-25, 42-53</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">—</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">—</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">—</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">US 6,197,506 B1 (FODOR et al) 06 March 2001 (06.03.2001) columns 3-4.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">6-11, 18-23, 26-46</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">—</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">—</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">47-53</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">—</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">—</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">—</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">—</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-46</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 6,180,348 B1 (L4) 30 January 2001 (30.01.2001) column 6-7 and Fig. 1.	1-5, 12-16, 47-53	—	—	—	Y	US 5,516,635 A (EKJNS et al) 14 May 1996 (14.05.1996) columns 10-14 and Fig. 3-5.	6-11, 17-46	X	US 5,702,896 A (COLLINS et al) 30 December 1997 (30.12.1997) columns 7-9 and Fig. 3-4.	1-5, 12-17, 24-25, 42-53	—	—	—	Y	US 6,197,506 B1 (FODOR et al) 06 March 2001 (06.03.2001) columns 3-4.	6-11, 18-23, 26-46	—	—	47-53	Y	—	—	—	—	1-46
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																														
X	US 6,180,348 B1 (L4) 30 January 2001 (30.01.2001) column 6-7 and Fig. 1.	1-5, 12-16, 47-53																														
—	—	—																														
Y	US 5,516,635 A (EKJNS et al) 14 May 1996 (14.05.1996) columns 10-14 and Fig. 3-5.	6-11, 17-46																														
X	US 5,702,896 A (COLLINS et al) 30 December 1997 (30.12.1997) columns 7-9 and Fig. 3-4.	1-5, 12-17, 24-25, 42-53																														
—	—	—																														
Y	US 6,197,506 B1 (FODOR et al) 06 March 2001 (06.03.2001) columns 3-4.	6-11, 18-23, 26-46																														
—	—	47-53																														
Y	—	—																														
—	—	1-46																														
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																																
* Special category of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "C" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition, or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																																
Date of the actual completion of the international search 20 September 2002 (20.09.2002)		Date of mailing of the international search report 17 DEC 2002																														
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer  Dorothy Lawrence BJ Forman Telephone No. (703) 308-0196																														

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

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 01 N 33/545	G 01 N 33/545	Z
G 01 N 33/566	G 01 N 33/566	
G 01 N 37/00	G 01 N 37/00	102
	C 12 N 15/00	F
	G 01 N 27/26	315C

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,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,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ワン,インジアン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州, ウスター, フランク ストリート 65

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 HA12
 4B029 AA07 BB20 CC03 FA12 FA15
 4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR08 QR42 QR55 QR62 QR82 QS16
 QS25 QS34 QS36 QX02