

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第4248393号
(P4248393)

(45) 発行日 平成21年4月2日(2009.4.2)

(24) 登録日 平成21年1月23日(2009.1.23)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 2 5 U

C 1 2 N 11/14 (2006.01)

C 1 2 N 11/14

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 F

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 D

GO 1 N 33/545 (2006.01)

GO 1 N 33/53 M

請求項の数 24 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-513921 (P2003-513921)	(73) 特許権者	502205846
(86) (22) 出願日	平成14年7月5日(2002.7.5)		サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェ
(65) 公表番号	特表2004-534959 (P2004-534959A)		ルシュ シアンティフィク
(43) 公表日	平成16年11月18日(2004.11.18)		フランス国 エフ-75016 パリ リ
(86) 国際出願番号	PCT/FR2002/002364		ュ ミシエルーアンジュ 3
(87) 国際公開番号	W02003/008360	(73) 特許権者	504011117
(87) 国際公開日	平成15年1月30日(2003.1.30)		エコール サントラル ド リヨン
審査請求日	平成17年7月4日(2005.7.4)		ECOLE CENTRALE DE L
(31) 優先権主張番号	01/09082		YON
(32) 優先日	平成13年7月9日(2001.7.9)		フランス、エフ-69130 エクリー、
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		アヴェニュー ギュイ ド コロニュー、3
			6
			36, avenue Guy de Co
			llongue, F-69130 Ecu
			lly, France
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固形支持体の機能化方法、機能化された固形支持体、およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

表面にヒドロキシ官能基またはハイドライド官能基を含む固形支持体の機能化方法であって、以下の工程：

a) 次の式 (I)：



[式中、

— Aは、式 (I) の 2 官能性化合物の、支持体のヒドロキシまたはハイドライド官能基への共有結合を許容する基を表し、

— Rは、カルボン酸官能基を保護する基を表し、

— Xは、任意にN、OまたはSから選ばれる一つ以上のヘテロ原子で中断されていてもよい、飽和または不飽和の、直鎖状または分枝鎖状のC₂～C₁₈炭化水素をベースとする鎖を表す]

の保護されたカルボン酸官能基を含む少なくとも一つの 2 官能性化合物の共有結合によるグラフティング

b) グラフティング工程 a) の間に脱保護されなかったカルボン酸官能基の脱保護を含み、工程 a) が式 (I) (ここで、Aは単官能基である) の化合物を用いて 50～200℃の温度で行われること、および该方法が式 (I) の化合物と反応しなかった支持体の残留するヒドロキシまたはハイドライド官能基の不動態化の工程 c) も含むことを特徴とする、固形支持体の機能化方法。

【請求項 2】

固形支持体がプラスチック材料、金属酸化物、シリカおよびその誘導体、ならびに半導体から選ばれることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

単官能基 A が、ジアルキル(ジアルキルアミノ)シラン、ジアルキルハロシラン、ジフェニル(ジアルキルアミノ)シラン、ジフェニルハロシラン、[(モノアルキル)、(モノフェニル)、(ジアルキルアミノ)]シラン、[(モノアルキル)、(モノフェニル)、(ハロ)]シラン、アルケン、アルキンの群および有機金属化合物から選ばれる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

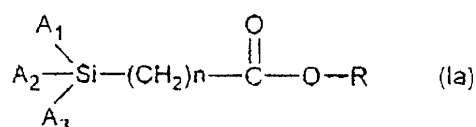
【請求項 4】

保護基 R が、C₁—C₄アルキル基または環状基であることを特徴とする請求項 1～3 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 5】

固形支持体の表面が表面でヒドロキシ官能性を示すこと、および式 (I) の化合物が次の式 (I a) :

【化 1】



(式中、

- A₁およびA₂は 同一または異なって、C₁—C₄アルキルまたはフェニル基を表し、
- A₃はC₁—C₄アルコキシ基、(C₁—C₄)ジアルキルアミノ基、または塩素のようなハロゲン原子を表し、
- RはC₁—C₄アルキル基および環状基から選ばれる保護基を表し、
- nは2～18の整数である)

の有機シリコン化合物から選ばれることを特徴とする、請求項 1～4 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 6】

式 (I a) の化合物が、

- A₁およびA₂は同一であって、メチル基を表し、
- A₃はジメチルアミノ基または塩素原子を表し、
- n=10であり、
- Rはtert-ブチル基を表す)

のものから選ばれることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

固形支持体の表面がその表面でハイドライド官能性を示すこと、および式 (I) の化合物がアルケン、アルキン、アルデヒド、過酸化物またはその他の有機金属化合物から選ばれることを特徴とする、請求項 1～4 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 8】

式 (I) の化合物が、ウンデシレン酸のメチルまたはtert-ブチルエステルから選ばれることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

工程 a) が、以下の工程：

- i) 固形支持体からの夾雑物の除去、およびその表面のヒドロキシ化、
- ii) 上で定義された一般式 (Ia) の有機シリコン化合物の、無極性の炭化水素ベースの溶媒、極性溶媒およびそれらの混合物から選ばれる溶媒への、不活性雰囲気下での導入、
- iii) 工程ii) で調製される溶液への浸漬による、工程 i) で得られる支持体のシラン化、および

iv) 不活性雰囲気下、50～200℃までの温度、好ましくは140℃で2～72時間の溶媒の蒸発後、工程iii) で得られるシラン化された支持体の再硬化、
v) 工程iv) で得られる変性支持体の洗浄および乾燥
を含む、有機相でのシラン化工程であることを特徴とする、請求項1～6のいずれか一つに記載の方法。

【請求項10】

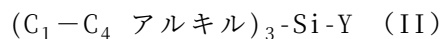
固形支持体が、ガラスまたはシリカ製の支持体であり、工程a) が以下の工程：

i) 固形支持体からの夾雑物の除去およびその表面の水和、
ii) 無水メタノールのような無水アルコール中での支持体の洗浄、
iii) アルゴン下で予め脱酸素化したアルケンに支持体を接触させる、
iv) 90～200℃の温度で2～24時間触媒を添加することによる支持体のヒドロシリル化
を含むヒドロシリル化工程であることを特徴とする、請求項1～4、7または8のいずれか一つに記載の方法。

10

【請求項11】

支持体を次の式(II)：



(ここで、Yはヨウ素、臭素または塩素のようなハロゲン原子を表す)

のシランと反応させてシリルエステルを形成することにより脱保護工程b) を行うことを特徴とする、請求項1～10のいずれか一つに記載の方法。

20

【請求項12】

シリルエステルの形成が、

- 室温でまたは約60℃に加熱して、無水の有機溶媒中での支持体とヨードトリアルキルシランとの反応によるか、
- あるいは室温または約40℃で、無水アセトンまたはアセトニトリル中、ヨウ化ナトリウムの存在下での、支持体とクロロトリメチルシランとの反応により、
得られることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項13】

工程c) が工程b) により同時に行われることを特徴とする、請求項11または12に記載の方法。

30

【請求項14】

工程b) が熱的脱保護工程であることを特徴とする、請求項1～10のいずれか一つに記載の方法。

【請求項15】

熱的脱保護工程が、工程a) の最後に単に温度を上げることにより、工程a) と同時に行われることを特徴とする、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

請求項1～15のいずれか一つに従って得られる機能化された固形支持体。

【請求項17】

アミノまたはヒドロキシ官能基を有する対象となる生物学的分子を共有結合により固定化するための、請求項16に記載の少なくとも一つの機能化された固形支持体の使用。

40

【請求項18】

生物学的分子が、核酸、ポリペプチド、脂質、炭水化物およびホルモンから選ばれることを特徴とする、請求項17に記載の使用。

【請求項19】

次の工程：

a) 請求項1～15のいずれか一つに定義される方法による、エステルの形態にある末端カルボン酸官能基を含む機能化された固形支持体の製造、
b) 末端カルボン酸官能基の脱保護および活性化、
c) 工程a) またはb) で得られる変性固形支持体に、末端の一つにアミン官能基、また

50

はヒドロキシ官能基、または一級アミン官能基で官能化されたスペーサアームを有する固定化すべき生物学的分子の一つ以上の溶液を局部的に適用して、該固体支持体を該溶液と接触させること、

d) カルボン酸官能基のレベルで生物学的分子の共有結合を生じさせるために、溶液の溶媒を蒸発させること、

e) 生物学的分子と反応しなかった活性カルボン酸官能基の気相中または溶液中でのアミンによる不活性化、および

f) 上記の生物学的分子が固定化されている固形支持体の洗浄

を含むことを特徴とする、機能化された固形支持体上の生物学的分子の固定化方法。

【請求項 20】

10

工程 e) で用いられるアミンがメチルアミンおよびジメチルアミンから選ばれることを特徴とする請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

工程 e) が同じ支持体の所定の領域においてのみ行われ、不活性化されてはならないこれらの領域が予め保護されていることを特徴とする、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 22】

請求項 19 ～ 21 のいずれか一つに定義される固定化方法により得られる固形支持体。

【請求項 23】

固定化される生物学的分子が核酸またはポリペプチドであり、それが核酸チップまたはポリペプチドチップを構成することを特徴とする、請求項 22 に記載の固形支持体。

20

【請求項 24】

一 固形支持体上での合成、
一 分子の分離および精製、
二 バイオセンサーとして
のための、請求項 22 または 23 に記載の固形支持体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は固形支持体の機能化方法、該方法を用いて得られる機能化された固形支持体、ならびに特に核酸、ポリペプチド、脂質、炭水化物およびホルモンのような生物学的分子を固定化するためのそれらの使用に関する。

30

【背景技術】

【0002】

固定化された生物学的分子を担持する支持体は、生物学的種の検知および認知に有利に用いられるが、支持体上での化学的な合成もしくは修飾、または支持体上での生物学的反応の再強化のような、これらの支持体の他の適用も可能である。

【0003】

生物学的種の検知および認知という特別な場合においては、ある数の特性を発揮する機能化された固形支持体をもつことが不可欠である。

40

【0004】

再生可能な固定化は、それ自体が再生可能である検知の一条件であるので、これらの支持体は、特に対象となる生物学的分子の再生可能な固定化を許容しなければならない。

【0005】

これらの支持体は、対象となる生物学的分子の固定化を感度の良い方法で許容しなくてはならない。機能化された固形支持体の感度は、固定化量およびシグナル検知方法、および特に背景のノイズレベル(非特定シグナル)に依存している。

【0006】

背景ノイズの減少は、シグナル／ノイズ比を改善する。事実、生物学的種の存在を表面付近で検知する装置では、固定化が望ましく、それゆえに制限されるべき対象となる生物

50

学的分子以外の分子の非特定のな吸収から、背景ノイズは本質的に起こる。

【0007】

さらに、再使用可能な機能化された固形支持体をもつことが重要である。事実、現在利用し得るほとんどの機能化された支持体は、使い捨てと記載されており、それは当然ながら利点であると使用者にみなされ得る。

【0008】

しかしながら、特に測定されるシグナルの実質的なドリフトにより、きわめて単純に何回も使用することができないので、これらの支持体は使い捨てである。

「使い捨て」という用語は、よって「並の品質」と同意語となる。

【0009】

再使用可能な支持体をもつ可能性は、一つの同じ装置でいくつかの生物学的サンプルの分析が可能になり、量的な比較を行うことができるようになるため、非常に有利である。

【0010】

さらに、再使用可能な支持体は同じサンプルになされるべきいくつかの測定を許容し、このようなことは、統計的な見地から支持体上に生物学的分子が十分に固定化されていないため、あまりにも急速にドリフトする使い捨て支持体では想像できない、結果の改善を可能ならしめる。

【0011】

最後に、汚れやリングのリスクを避けるため、固定化された種を正確にプロットに配置することが望まれる機能化された支持体上で、固定化工程は、プロットの表面に対して明確に局所化された、均一な方法で、行われなければならない。

【0012】

生物学的分子の固形支持体上への固定化は、通常、二つの異なる工程で行われる。

- 支持体に生物学的分子を確実に付着させる合成分子（カップリング剤）をグラフト化することにより、その表面を化学修飾することからなる、支持体の機能化を含む最初の工程；

- 生物学的分子とこれらの機能化された支持体との間の共有結合の形成からなる第二の固定化工程

【0013】

かかる共有結合を形成するために、先ずカップリング剤の性質により、そして第二に固定化される生物学的分子の性質に従って、種々のタイプの反応が行われる。

【0014】

かくして、（アミノ Spacer アームを有する）プロテインまたはオリゴヌクレオチドの付着については、表面との反応はアミン官能基を含む。そのような官能基の表面付着は、主にチオ尿素またはアミドタイプの結合によってもたらされる。

【0015】

チオウレアの形成は、Z. Guo らの Nucleic Acid Research、1994, 22, 5456-5465 に記載されており、例えばフェニレンジイソチオシアネートのような硫黄含有分子でアミノ化された表面を活性化し、次いでそのように活性化された表面に当該分子を反応させることからなる。アミド結合の形成は、例えば、米国特許 5,919,523、5,667,976 および 6,043,353 に記載の通り、一般に（例えば無水コハク酸または重合反応で）アミノ化された支持体の化学修飾による、アミンとカルボン酸との反応により得られる。

【0016】

カルボン酸での固形支持体上での直接的な機能化は、金のデポジット上でのアルカンチオール酸の自己組織化層の形成によって（M. BONCHEVA ら、Langmuir, 1999, 15, 4317-4320; E. HUANG ら、Langmuir, 2000, 16, 3272-3280）、またはシリコン支持体上でのヒドロシリル化反応により行われ得る（T. Strother ら、J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 1205-1209）；しかしながら、後者の場合、生物学的分子の付着は錯化反応を含む。

【0017】

プロテインの固定化の特別な場合には、後で脱保護されるエステル基をもつシランで、石英でできた支持体を機能化することがすでに提案されている (J.D.Brennanら、Can.J.Chem., 1994, 72, 721-728)。

【0018】

生物学的分子の化学的な修飾は、他の固定化方法の開発も可能にした。かくして、ピロールの重合に基づく電気化学的な固定化方法が提案されている (T. Livache ら、Biosensors & Bioelectronics, 1998, 13, 629-634 および F.Garnier ら、Synthetic Metals, 1999, 100, 89-94)。

【0019】

この方法は、ピロリル基を有する分子 (オリゴヌクレオチド、ペプチド) を局在化された付着により固定化することを可能にしたが、伝導性の支持体の使用を必要とし、多重アドレッシングの方法を要する。

【0020】

ヒドラジド官能基への付着を許容するために、ジアルデヒド基でオリゴヌクレオチドを修飾することも提案されている (D. Proudnikov ら、Analytical Biochemistry, 1998, 259, 3441 および S.Dubiley ら、Nucleic Acid Research, 1997, 25, 2259-2265)。

【0021】

機能化された支持体は、この場合、ポリアクリルアミドのゲルまたはニトロセルロースのゲルであり、これらは同じ表面に対して、固定化されたストランドの密度を高める利点を有する、厚くてそれゆえ三次元のネットワークを形成する。しかしながら、これらのゲルは、デポジットされるプロットの大きさおよびハイブリダイズされ得る DNA ストランドの大きさに関して、ある限界を示す (G.Yershov ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 4913-4918)。

【0022】

最後に、増加的に使用されているアプローチは、チオール官能基を末端に有すスパーサーアームを有するオリゴヌクレオチドとハロアセテートで官能化された表面との反応を含む (US 5412087 および K.Tang ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96, 10016-10020)。

【0023】

ピリジルスルフィド基をオリゴヌクレオチドに加えた後のジスルフィド架橋またはチオエーテル結合の形成は (WO 99/20640)、チオールで官能化された表面上で可能である。チオール類は非常に反応性であり、湿度に影響されないように見えるが、これらの官能基は酸化されてジスルフィドになりやすいため、使用するには慎重を要する。したがって、再生可能な結果を得ようとするのであれば、ジスルフィドをその場所で予め還元することがしばしば必要となる。

【0024】

したがって、対象となる生物学的分子の固定化を許容する機能化された支持体を製造するのに広範な可能性が存在する。しかしながら、現在までのところ、再生可能で感度のよい、対象となる生物学的分子の固定化、およびシグナル／ノイズ比を制限することによるシグナルの検知を許容する、再使用できる機能化された固形支持体を、完全に満足に行く方法で入手することはできていない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0025】

この理由のため、発明者はかかる支持体を製造する目的を自らに課し、本発明の主題を形成するものを開発してきた。

【課題を解決するための手段】

【0026】

本発明の第一の主題は、表面にヒドロキシまたはハイドライドの官能性を含む固形支持体の機能化方法であり、次の工程を含む：

10

20

30

40

50

a) 次の式 (I) :



[式中、

— Aは、式 (I) の2官能性分子の、支持体のヒドロキシまたはハイドライド官能基への共有結合を許容する基を表し、

— Rは、カルボン酸官能基を保護する基を表し、

— Xは、任意にN、OまたはSから選ばれる一つ以上のヘテロ原子で中断されていてもよい、飽和または不飽和の、直鎖状または分枝鎖状の $C_2 \sim C_{18}$ 炭化水素をベースとする鎖を表す]

の保護されたカルボン酸官能基を含む少なくとも一つの2官能性分子の共有結合によるグラフティング(シリル化またはヒドロシリル化)

10

b) グラフティング工程 a) の間に脱保護されなかったカルボン酸官能基の脱保護。

【0027】

この方法は、工程a)が式 (I) (ここで、Aは単官能基である) の化合物を用いて50～200℃の間の温度で行われること、および該方法が、式 (I) の上記分子と反応しなかった支持体の残留するヒドロキシまたはハイドライド官能基の不動態化(Passivation)の工程c) も含むことを特徴とする。

【発明を実施するための最良の形態】

【0028】

本発明によれば、式 (I) の2官能性分子の炭化水素ベースの鎖は、2～18の炭素原子を含み；(20炭素原子より少ない) そのような鎖の長さは、組織化された自己集合化単層(self-assembled monolayer) (SAM) を含む固形支持体の生成を可能ならしめない。

20

【0029】

事実、A.ULMAN, Chem. Rev., 1996, 96, 1533-1554によれば、炭化水素ベースの鎖が少なくとも20の炭素原子を有するときに、アルキルトリクロロシランタイプの3官能性の末端を含む有機シリコン化合物により、固形支持体上にSAMを形成することができる。

【0030】

逆に、本発明によれば、分子の支持体への付着を許容する基Aが単官能性である、式 (I) の分子の使用は、濃密なモノ分子またはサブモノ分子の層を、再生可能な状態で得ることを可能ならしめる。

30

【0031】

さらに、2官能性または3官能性の分子とは異なって、支持体の表面で付着する式 (I) の分子は、表面への直接係留点をそれぞれもっており、しばしば厚くて荒い、ほとんど輪郭のはっきりしないグラフト層をもたらす。

【0032】

本方法により機能化され得る固形支持体は、有機表面(プラスチック材料)か、または好ましくは多孔性または平坦な金属オキサイド、シリカおよびその誘導体(ガラス、石英など)のようなタイプの無機表面であり、すなわち表面にヒドロキシ官能性を示す表面、および表面にハイドライドを示すシリコンタイプの半導体である。

40

【0033】

単官能性の基Aは、特に、ジアルキル(アルキルアミノ)シラン、ジアルキルハロシラン、ジフェニル(ジアルキルアミノ)シラン、ジフェニルハロシラン、[(モノアルキル)、(モノフェニル)、(ジアルキルアミノ)]シラン、[(モノアルキル)、(モノフェニル)(ハロ)]シラン、アルケン、アルキンの群、および有機マグネシウム化合物または有機リチウム化合物のような有機金属化合物から選択され得る。

【0034】

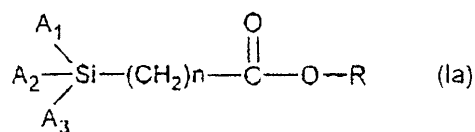
上記の式 (I) の分子の保護基Rは、Protective groups in organic synthesis(T.W.GREENら、2版、Wiley Interscience)に記載の、例えば、 $C_1 \sim C_4$ アルキル基、または環状の基のような群から選ばれ得る。

50

【0035】

本方法の有利な形態によれば、固形支持体の表面がヒドロキシ官能性を表面に示すとき、式(I)の分子は、好ましくは、次の式(Ia)：

【化1】



[式中：

- A_1 および A_2 は、同一または異なって、 $C_1 - C_4$ アルキル基またはフェニル基を表し、
- A_3 は $C_1 - C_4$ アルコキシ基、($C_1 - C_4$)ジアルキルアミノ基、または塩素のようなハロゲン原子を表し、
- R は $C_1 - C_4$ アルキル基およびベンジル基のような環状の基から選ばれる保護基を表し、
- n は2～18の整数である]

の有機シリコン化合物から選ばれる。

【0036】

A_1 および A_2 のために定義された $C_1 - C_4$ アルキル基のうち、メチル、エチル、プロピルおよびブチル基が例示され、メチル基が特に好ましい。

A_3 のために定義された($C_1 - C_4$)ジアルキルアミノ基のうち、ジメチルアミノ基が特に例示される。

基 R のために定義された $C_1 - C_4$ アルキル基のうち、メチル、エチル、イソプロピル、および $tert$ -ブチル基が例示され、 $tert$ -ブチル基が特に好ましい。

【0037】

本発明によれば、式(Ia)の化合物は、特に次のものから選ばれる：

- A_1 および A_2 は同一であってメチル基を表す、
- A_3 はジメチルアミノ基または塩素原子を表す、
- $n = 10$ 、そして
- R は $tert$ -ブチル基を表す。

【0038】

A_3 がジメチルアミノ基を表す特別な場合、相当する分子($(CH_3)_2N-Si(CH_3)_2-(CH_2)_{10}-C(=O)-O-tert$ -ブチル)は、市販されていないが、ウンデシレン酸のエステル化(B.M.Trostら、"Comprehensive organic synthesis", 1991, 6, Pergamon Press; H.A.Staab ら、"Azolides in organic synthesis and biochemistry", 1998, Wiley Weinheim) およびヒドロシリル化(I.Fleming, "Comprehensive organic synthesis", volume III, chapter 13)に記載の通常の方法により製造することができる。

【0039】

本方法のもう一つの有利な形態によれば、固形支持体の表面がハイドライド官能性を表面に示すとき、式(I)の分子は、好ましくは、アルケン、アルキン、アルデヒド、過酸化化物またはその他の有機金属化合物から選ばれる。これらの化合物のなかで、ウンデシレン酸のメチルまたは $tert$ -ブチルエステルが特に好ましい。

【0040】

工程a)が、シリル化工程であるとき、それは触媒の存在下または不存在下における有機相または水相の両方で、または気相で行われる。

【0041】

それが有機相で行われるときは、工程a)は次の工程を含むのが有利である：

- i) 固形支持体からの夾雑物の除去、およびその表面のヒドロキシ化、
- ii) 上で定義された一般式(Ia)の有機シリコン化合物の、無極性の炭化水素ベースの溶

10

20

30

40

50

媒、極性溶媒およびそれらの混合物から選ばれる溶媒への、不活性雰囲気下での導入、
 iii) 工程ii)で調製される溶液への浸漬による、工程i)で得られる支持体のシラン化、および
 iv) 不活性雰囲気下、50～200℃までの温度、好ましくは140℃で2～72時間の溶媒の蒸発後、工程iii)で得られるシラン化された支持体の再硬化 (re-curing)、
 v) 工程iv)で得られる変性支持体の洗浄および乾燥。

【0042】

固形支持体の「夾雑物」という用語は、支持体の表面に存在し、支持体自体の化学構造の一部をなさない、油脂、埃などのあらゆる化合物を意味する。

【0043】

固形支持体の性質に従って、工程i)は1つまたはそれ以上の溶媒、および／または酸化剤および／またはヒドロキシ化剤（例えばスルホクロミック混合物）を用いた方法、洗浄剤（例えばHellmanexR）を用いた方法、オゾンでの光化学的処理を用いた方法、またはその他の適切な処理により行うことができる。

【0044】

工程ii)で、式(Ia)の有機シリコン化合物の溶媒中での濃度は、好ましくは 10^{-5} ～1モル／リットルである。

【0045】

工程a)がヒドロシリル化工程であるとき、および用いられる固形支持体がガラス製またはシリカ製であるとき、該工程a)は次の工程を含むのが好ましい：

- i) 固形支持体からの夾雑物の除去およびその表面の水和、
- ii) 無水メタノールのような無水アルコール中での支持体の洗浄、
- iii) アルゴン下で予め脱酸化されたアルケンに支持体を接触させること、
- iv) 90～200℃の温度で2～24時間、触媒（SpeierまたはKarstedt触媒、エチルジクロロアルミニウム）の添加による、支持体のヒドロシリル化。

【0046】

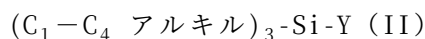
本発明によれば、グラフティング工程a)は、基体に対して1～8 μ モル/ m^2 の量の式(I)の分子を付着させることを可能ならしめる。

グラフト層のより良好な構造、グラフティングの密度、および反応の再生性をも確保するために、グラフティング工程は、好ましくは、式(I)の2官能性分子のカルボン酸の保護をそのままの完全な状態にしておかなくてはならない。しかしながら、場合によっては、特定のヒドロシリル化反応中に、またはクロロシランが式(Ia)の化合物として用いられるときに、カルボン酸官能基の脱保護が起こることがある。

したがって、グラフティング工程a)が終了したとき、グラフティング工程の間に脱保護されなかったカルボン酸官能基を脱保護する必要がある。

【0047】

本発明による方法の第1の変法によれば、好ましくは支持体を、次の式(II)：



（ここで、Yはヨウ素、臭素または塩素のようなハロゲン原子を表す）のシランと反応させることにより水中で容易に加水分解されるシリルエステルを形成することからなる方法による、緩和な条件下で脱保護工程b)を行うことができる。

【0048】

式(II)の少量のシラン分子の使用は、この少量のシラン分子がグラフティング反応中に式(I)の2官能性分子と反応しなかった、またはヒドロシリル化工程中にシリコン上の水素化物のヒドロキシ化により形成された、支持体の残留ヒドロキシ官能基とも反応するので、支持体のカバー(不動態化)を完全にするという長所を有する。

【0049】

これらのエステルの形成は、次の方法により得られる：

- 室温でもしくは約60℃に加熱して、(クロロホルムもしくはジクロロメタンのような)無水の有機溶媒中での、支持体とヨードトリメチルシランのようなヨードトリアル

10

20

30

40

50

キルシランとの反応によるか、

- または、室温または約40℃で、無水アセトンもしくはアセトニトリル中、ヨウ化ナトリウムの存在下での、支持体とクロトリメチルシランとの反応による。

それゆえ、この場合、不動態化工程c)は工程b)により同時に行われる。

【0050】

本発明による方法の第2の変法によれば、工程b)は熱脱保護である。この脱保護の方法は、イソプロピルおよびtert-ブチルエステルのような特定のカルボン酸エステルに適用できる。

【0051】

この熱脱保護は、不活性雰囲気(例えばアルゴンまたは窒素)下に、250～280℃の温度で、30～60分間、機能化された支持体を処理することにより行うことができる。

【0052】

シリル化またはヒドロシリル化工程の後に行われるこの熱脱保護工程は、単に温度を上げることにより、表面カルボン酸官能性をその場で発生させ得る。

有利なことに、この熱脱保護工程は、したがって、単に工程a)の最後に温度を上げることにより、工程a)と同時に行うことができる。

また、有利なことに、熱脱保護は、カルボン酸官能基が保護されたまま残る領域により囲まれた活性化可能な領域を限定するために、例えばレーザー光線、またはその他の適切な手段によって、局部的に温度を上げることにより、局部化された方法で行われ得る。

【0053】

本発明によれば、穏やかな条件下でのカルボン酸官能基の生成と支持体(支持体不動態化工程)の残留ヒドロキシ官能基の阻止の両方をこの方法が可能ならしめるため、カルボン酸官能基の脱保護は、シリルエステルの形成により行うのが好ましい。その結果、支持体への不特定の分子の吸着を制限することが可能となる。実際、検出中に背景ノイズの原因となっているのは、不特定の生物学的分子の吸着である。

【0054】

したがって、カルボン酸官能基の脱保護が熱により行われると、支持体のヒドロキシまたはハイドライド官能性の不動態化工程は、次いで、例えば、該支持体を上記の式(II)のシランと反応させることにより、または例えば支持体とヘキサメチルジシラザンとの反応のような、当業者に知られているその他の一般的な方法により、あるいはメタノールのような小分子の強い吸着の方法により行われる。

【0055】

カルボン酸官能基の脱保護および支持体の不動態化工程が終了すると、機能化された支持体は水洗され、例えば圧縮空気の噴射で乾燥される。

【0056】

本発明の主題は、本発明による官能化方法および上記のような官能化方法を用いて得られる機能化された固形支持体でもある。

これらの機能化された支持体は、対象となる生物学的分子の再生可能な固定化を許容し、同時に不特定の分子の吸着を制限し、それゆえ検出中のシグナル／ノイズ比を増加する。また、それらの試薬の滴の広がり調節することにより、局部化された沈積物の汚染およびリングの制限も可能ならしめる。

【0057】

これらの機能化された支持体は、共有結合により、核酸、ポリペプチド(プロテイン、酵素)、脂質、炭水化物またはホルモンのような、アミノまたはヒドロキシ官能基を有する対象となる生物学的分子を固定化するために、特に用いることができる。

【0058】

本発明の目的のため、および本文書の残り部分において、用語「核酸」はオリゴヌクレオチドおよびDNAもしくはRNAの両方、またはホスホジエステル結合の代わりにペプチド結合を含むペプチド核酸(PNA)のような、修飾された基幹もしくは修飾された塩基を有するその他の核酸を意味する。

【0059】

本発明の主題は、したがって、以下の工程を含むことにより特徴づけられる、機能化された固形支持体への生物学的分子の固定化方法でもある：

- a) 上で定義されたような方法による、エステル形態にある末端カルボン酸官能基を含む機能化された固形支持体の製造、
- b) 末端カルボン酸官能基の脱保護および活性化、
- c) 工程a)またはb)で得られる変性固形支持体を、末端の一つにアミン官能基、またはヒドロキシ官能基、または一級アミン官能基で官能化されたスパーサームを有する、固定化される生物学的分子の、一つ以上の溶媒中の一つ以上の局部的に適用される溶液と接触させること、
- d) カルボン酸官能基のレベルで生物学的分子の共有結合を生じさせるための溶媒の蒸発、
- e) 生物学的分子と反応しなかった活性化されたカルボン酸官能基の、気相中または溶液中でのアミンによる不活性化、および
- f) 上記の生物学的分子が固定化されている固形支持体の洗浄。

10

【0060】

カルボン酸官能基の活性化工程b)は、例えば、N-ヒドロキシコハク酸イミド、カルボニルジイミダゾールもしくはカルボジイミド、または当業者に知られている好適なその他の活性化試薬の溶液を用いて行うことができる。

【0061】

例えば、この活性化工程は、カルボニルジイミダゾール (0.1 M) の存在下に、無水テトラヒドロフラン (THF) 中、約2時間かけて室温で行うことができる。特に、このタイプの活性化により、求核性の試薬(アミン、アルコール、水)に関して非常に反応しやすい活性化表面を得ることができる。

20

【0062】

この場合、生物学的分子は、その官能基のアミノ形態の存在を確実にするために、トリエチルアミンのような三級アミンの存在下に無水の溶媒中で反応させられる。

【0063】

工程c)の間、生物学的分子の溶液の濃度は、好ましくは 10^{-6} ~ 10^{-3} モル/リットルである。

30

工程c)の間、生物学的分子を可溶化するために、その良好な溶解性および、それに続く溶液の蒸発の調整を許容する水性または無水の溶媒はいずれも用いることができることは、明かに理解される。溶媒の性質は、当然ながら、分離されるべき生物学的分子の性質の機能として選ばれなければならない。非限定的な例として、リン酸緩衝液、ジメチルスルホキシド (DMSO)、無水アセトニトリル、またはアセトニトリル/水混合液が挙げられる。

【0064】

固定化されるべき生物学的分子の各溶液は、マイクロデポジションの適当な方法により支持体上の所定の場所に沈積され得る。

【0065】

かくして、例えばオリゴヌクレオチドを固定化するために、固定化反応が無水の条件下で行われるとき、例えば無水のDMSOを使用することが可能である。この反応は、当然のことながら、無水の環境下で行われる。この場合、オリゴヌクレオチドは、好ましくは溶液中に 10^{-5} ~ 10^{-3} モル/リットルの濃度で存在する。

40

【0066】

DNAストランドおよびオリゴヌクレオチドは、水性溶液中にどのような比率でも溶解し得る。その結果、このタイプの生物学的分子の固定化が望まれる場合、その固定化工程は、水性の条件下で行われることが好ましい。N-ヒドロキシサクシンイミドでのカルボン酸官能基の活性化は、水性の条件下でこの工程を行うことを可能にする。

【0067】

50

本発明によれば、溶媒の蒸発による生物学的分子の固定化工程d)は、固定化方法を正しく進めることが重要である。なぜなら、それは対象となる生物学的分子の機能化された支持体への共有結合を許容するからである。事実、本発明による固定化方法は、生物学的分子の ($10^{-6} \sim 10^{-3}$ モル/リットルのオーダーの) 非常に希薄な溶液を用いることが好ましく、その検出は共有結合によるグラフティングが行われなければ不可能であろう。この蒸発工程は、ゆっくり、すなわちおよそ1～10時間をかけて行われるのが好ましい。

【0068】

固定化工程を終えるとき、生物学的分子と反応しなかった活性化されたカルボン酸官能基は、気相中または溶液中でアミンにより不活性化される(工程e)。

【0069】

この不活性化工程により、次の工程の間、液滴の汚れ、異物混入または汚染の問題を回避できる。それはキャッピングとも言われる。

【0070】

本発明による固定化方法の有利な形態に従えば、この不活性工程は、メチルアミンまたはジメチルアミン、好ましくはジメチルアミンを気相中で15～45分間反応させることにより行われる。

この不活性工程は、いくつかの支持体を同時に処理することを容易に可能ならしめる。

【0071】

この発明のもう一つの有利な形態によれば、不活性化工程は、同じ支持体の予め定められた領域でのみ行われる。不活性化されてはいけない領域は、例えば水、有機溶媒または鉱油の液滴で予め保護される。

【0072】

非保護領域の脱活性化は、次いで、活性化されたまたは復活可能な領域、および化学的に不活性な領域のネットワークの形成を可能ならしめる。

【0073】

本方法のこの形態は、例えば、(例えばカルボニルジイミダゾールで) 活性化されたカルボン酸官能基を含む表面上に水滴を置き、続いて気相中でアミンを用いて影響を受けやすい表面の不活性化工程を行ない、次いで支持体をすすぐことによって得られる、空間的に分散した支持体の製造を可能ならしめる。水滴で不活性化された領域は、次いで生物学的分子の共有結合の工程の前に再活性化され得る。

【0074】

最終の洗浄工程f)は、表面に吸着した生物学的分子の再生可能な濃度を得るために、本発明による機能化された支持体に共有結合しなかった分子を脱着させることを意図している。

【0075】

この洗浄工程は、例えば約80℃で約1時間の水洗いから、例えばドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の10%の濃度の水溶液中で80℃、約1時間の洗浄、次いで任意に数分間の音波処理を行うまで、厳しさが増す連続的洗浄工程に、上記の支持体を付すことによって行われるのが好ましい。

【0076】

支持体の再使用は、再生可能なシグナルを得ることにより制約される。この洗浄工程は、任意の次の検出工程の間、支持体がいかなる分子も放出しないことを保証し得るので、これらの支持体の再利用に関して一つの役割を果たす。

【0077】

この洗浄工程の意義は、共有結合していないかなりの数の生物学的分子を除去し、結果的に固定化量を低減させ、したがって検出シグナルの強度を低減することにあるが、この洗浄工程は不特定の吸着量を減少させ、それゆえに検出中の背景ノイズも減少させることができる。この洗浄工程の全体的な成果は、したがってシグナル/ノイズ比および測定の再現性の改善にもある。

【0078】

本発明の主題は、本発明による固定化方法を用いて得られる固形支持体、すなわち、対象となる生物学的分子が共有結合により固定化された固形支持体でもある。

【0079】

これらの固形支持体は、分析の道具（診断、配列決定など）として、製造のための道具（単離、複雑な分子の分離）または特定の性質を有する表面のコーティング（クロマトグラフィー用コーティング、静電的コーティング、抗菌コーティングなどのアクティブコーティング）のための道具としても使用され得る。

【0080】

したがって、次のような多くの分野での適用が見出される：

- ー 固形支持体上での合成、
- ー 分子の分離および精製（電気泳動、クロマトグラフィー）、
- ー 特に固定化された生物学的分子が酵素であるときの、分子生物学において、
- ー バイオセンサー（「イムノアッセイ」「マイクロアレイ」に基づくDNA分析技術、例えばハイブリダイゼーションSBHによる配列決定、シングルヌクレオチドポリモルフィズム（SNP）および生医学的診断）。

10

【0081】

本発明の機能化された固形支持体の使用は、種々のタイプの生物学的分子を固定化させ、したがって例えばDNAチップのような核酸チップ、プロテインチップのようなポリペプチドチップなどの種々のチップの製造を可能ならしめる。

【0082】

20

本発明による改良された固形支持体の使用は、DNAチップを製造するのに特に有利である。すなわち、公知の配列を有する一組のDNAが非常に正確な順序で共有結合している支持体で、これらのチップは何度も再使用が可能である。そのようなDNAチップは、目的の核酸またはオリゴヌクレオチドで支持体上に固定化されたDNAのハイブリダイゼーションによって、これらの目的分子の配列を決定したり、または遺伝子発現を追跡したりすることを可能ならしめる。新しい遺伝子、新しい医薬製品の発見、診断、毒性研究の提供など、多くの適用がある。

【0083】

それゆえ、本発明の主題は、本発明による生物学的分子の固定化方法により得られることを特徴とする、核酸チップまたはポリペプチドチップでもあり、ここでいう生物学的分子は核酸またはポリペプチドである。

30

【0084】

本発明による核酸チップまたはポリペプチドチップは安定であり、したがって何度も再使用できるという利点を有する。特にDNAチップは多くのハイブリダイゼーションおよび変性サイクルの中で再使用が可能である。

【0085】

上記の用途以外にも、本発明は以下の記載から浮かび上がる他の用途を含み、その記載は固形支持体の機能化の実施例、オリゴヌクレオチドの固定化の実施例、および本発明による固定化法の再現性を示す実施例に関するものである。

【0086】

40

しかしながら、これらの実施例は本発明の主題を説明するためだけに示され、制限するものでないことは、明白に理解されるべきである。

【実施例】

【0087】

実施例1 機能化された固形支持体の製造

1) サンプルの洗浄およびヒドロキシ化

ガラススライド（76×26mm）を硫酸と過酸化水素（7/3 v/v）の溶液中に80℃で1時間浸漬する。スライドを次いで超純水で完全にすすぎ、ガス送風機を用いて乾燥する。最後にそれらをガラス反応器中に置く。

【0088】

50

2) シラン化

ガラススライドを入れた反応器を140℃で1時間、真空下に加熱し、次いで乾燥した不活性ガス(アルゴン、窒素)を排出しながら1時間加熱する。次いで反応器を氷水浴中で冷却し、サンプルの表面を覆うように150mlのペンタンを注入する。次いで、300μlのシランを注入する。

その後、ペンタンを真空下で蒸発させ、反応器を140℃に加熱し、12時間かけて不活性ガス(アルゴンまたは窒素)の気流で吹き流す。

【0089】

3) サンプルのすすぎ

シラン化の最後に、ガラススライドをテトラヒドロフラン (THF) 中で超音速洗浄した後、貯蔵し、その他の機能化工程に付す。

【0090】

実施例2 本発明による機能化支持体へのオリゴヌクレオチドの固定化

1) カルボン酸官能基の脱保護

実施例1で上記のようにして得られた機能化されたガラススライドを、不活性雰囲気下に140℃で2時間乾燥する。それらを冷却後、アルミナで予め乾燥したジクロロメタン (DCM) の溶液中に浸漬し、0.1Mの濃度に達するのに十分な量のヨードトリメチルシランを注入する。室温で一夜、加水分解を行う。反応の最後に、スライドを脱イオン水で洗浄し、圧縮空気の噴射で乾燥する。

【0091】

2) N-ヒドロキシサクシンイミドでのサンプルの活性化

スライドをアルゴン下に140℃で2時間乾燥する。冷却後、それらをN-ヒドロキシサクシンイミド (0.1M) およびジイソプロピルカルボジイミド (0.1M) を含む無水THFの溶液中に浸漬する。室温で5時間、活性化を行う。次いで、スライドを無水のTHFですすぎ、不活性雰囲気の下に保存する。

【0092】

3) オリゴヌクレオチドの固定化

オリゴヌクレオチド (25-mers、アミン官能基 (C₆-NH₂) で官能化されたスパーサームを有する) をPBS (ホスフェート-緩衝食塩水) リン酸緩衝液 pH 8.5 に可溶化する。1cm²の表面を50μlのオリゴヌクレオチド溶液で覆う。50℃でのPBS緩衝液をゆっくり蒸発させた後、オリゴヌクレオチドスパーサームのアミン官能基と反応しなかった酸官能基をブロッキング(キャッピング)することによりスライドを不活性化する。これを行うために、スライドを気相中のメチルアミンで30分間処理する。

【0093】

4) スライドの洗浄

仕上げるため、次第に厳しくなる連続浴中で表面を洗浄する: 100℃の超純水中で45分間、次いで80℃の10% SDS中で45分間、最後に10% SDS中、超音波で5分間。

【0094】

実施例3 本発明による固定化方法の再生性の実証

上記の実施例1の方法により機能化され、上記の実施例2の方法によりN-ヒドロキシサクシンイミドで活性化された種々のガラススライドを、オリゴヌクレオチドの12μmol/リットル溶液 (1μl) を固定化するために用いた (25-mers、3' の位置に一級アミン官能基を含むスパーサームを有する)。

【0095】

洗浄および相補配列のハイブリダイゼーションの後、47℃で45分間、塩化ナトリウム (3M) とクエン酸ナトリウム (3M) の混合物を含む20×SSC緩衝液の1/20希釈液である1×SSC (食塩水クエン酸ナトリウム) 緩衝液で洗浄後に、三つの異なるスライド上でcm²あたりハイブリダイズされたストランドの数に関する結果は、以下のとおりであった (³²Pで放射性標識により得られた定量的データ)。

ースライド No. 1 : 2.20×10^{10}

ースライド No. 2 : 2.26×10^{10}

ースライド No. 3 : 2.23×10^{10}

これらの結果は、本発明の固定化方法の再生性が大きいことを示している。

【0096】

別のガラススライド上では、60塩基対のPCRダブルストランドとの最初のハイブリダイゼーションが、 3.95×10^8 ストランド/cm²のオーダーのハイブリダイゼーションを与えた。前の三つのスライドと同じ条件下で変性および再ハイブリダイゼーションを行った後、 2.6×10^{10} の密度のオリゴヌクレオチドストランド/cm²が得られた。

10

【0097】

したがって、この一組の結果から、バッチ間のスライドの再生性が大きいこと、およびシグナルの損失なく支持体を再使用できる可能性があることがわかる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/552 (2006.01) G 0 1 N 33/545 Z
G 0 1 N 33/552

(74)代理人 100065248

弁理士 野河 信太郎

(72)発明者 ドゥガス, ヴィンセント

フランス、エフー69390 サン ゼニス ラヴァル、アヴェニュー ジー、クレメンス、108

(72)発明者 シェヴァリアー, イヴ

フランス、エフー69540 イリグニー、アレ ド ラ クレイリアー、47

(72)発明者 ステイランド, エリアン

フランス、エフー69130 エクリー、シュマン ジェイ. エム. ヴィアンニー、18

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 特開2001-108683 (JP, A)

特開2001-131208 (JP, A)

特開昭63-168346 (JP, A)

国際公開第99/057323 (WO, A1)

特開2001-165894 (JP, A)

国際公開第97/023496 (WO, A1)

LOSSET, BULL. SOC. CHIM. FR., 1991年, Vol.128, p.721-729

ANNIS, D.A., J. AM. CHEM. SOC., 1999年, Vol.121, p.4147-4154

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-G01N 33/98

C12N 11/14

C12N 15/09

G01N 37/00