

(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2005-516114

(P2005-516114A)

(43) 公表日 平成17年6月2日(2005.6.2)

(51) Int.C1.⁷

F 1

テーマコード(参考)

C08F 20/30
C08F 20/36
C08F 20/38
C08F 20/58
C08F 20/60

C08F 20/30
C08F 20/36
C08F 20/38
C08F 20/58
C08F 20/60

4J100

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 64 頁)

(21) 出願番号	特願2003-564190 (P2003-564190)	(71) 出願人	501497253 サイファージェン バイオシステムズ, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 945 5, フレモント, ダンバートン サーク ル, 6611
(86) (22) 出願日	平成14年12月20日 (2002.12.20)	(74) 代理人	100107489 弁理士 大塙 竹志
(85) 翻訳文提出日	平成16年9月22日 (2004.9.22)	(72) 発明者	キタガワ, ナオタカ アメリカ合衆国 カリフォルニア 945 55, フレモント, レイク ガリソン ストリート 33143
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/041197	F ターム(参考)	4J100 AL08P AL66P AM21P AM23P BA12P BA16P BA40P BA51P BC43P CA01 CA04 JA15 JA50
(87) 國際公開番号	W02003/064594		最終頁に続く
(87) 國際公開日	平成15年8月7日 (2003.8.7)		
(31) 優先権主張番号	60/351,971		
(32) 優先日	平成14年1月25日 (2002.1.25)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/408,255		
(32) 優先日	平成14年9月4日 (2002.9.4)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	10/327,511		
(32) 優先日	平成14年12月19日 (2002.12.19)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

(54) 【発明の名称】被分析物の脱離／イオン化に有用なエネルギー吸収部分を有するモノマーおよびポリマー

(57) 【要約】

本発明は、エネルギー吸収性分子(EAM)から誘導される部分を組み込んでいる重合性モノマーを提供する。また、本発明は、このモノマーをベースとするポリマーを提供する。このポリマーは、被分析物の脱離／イオン化質量分析などの種々の分析用に最適となる独自の特性を有している。また、本発明は、本発明のポリマー配合物を組み込んでいるデバイス、このデバイスを用いて被分析物を検出、定量および同定する方法、ならびに本発明のデバイスを作製する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 重合性部分、および

(b) 置換基を有するアリール核を含む光反応性部分であって、該置換基が該アリール核の系に共役するカルボニル基もしくはカルボキシル基を含む光反応性部分を含む重合性モノマー。

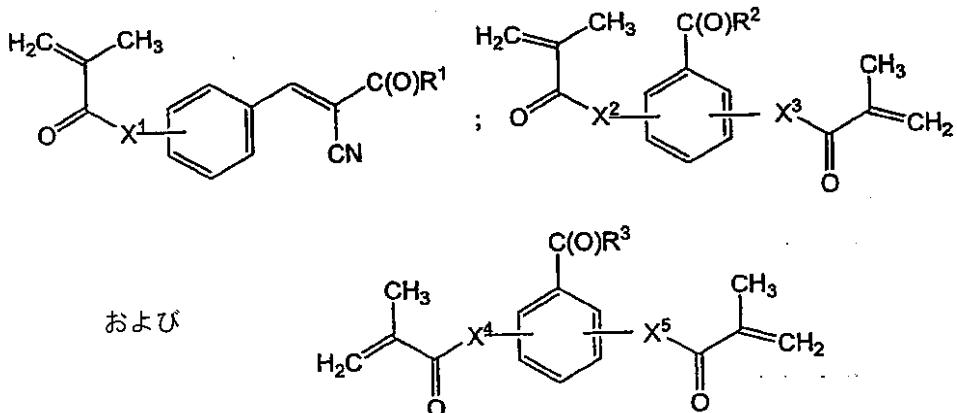
【請求項 2】

請求項 1 に記載の重合性モノマーであって、該重合性部分がビニル部分、アクリレート部分もしくはメタクリレート部分である重合性モノマー。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の重合性モノマーであって、

【化 1】



から選ばれるメンバーである式を有し、式中

R^1 、 R^2 および R^3 が H、NR⁴、R⁵、OR⁶、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキルおよび置換もしくは非置換アリールからなる群から独立して選ばれるメンバーであり、

X^1 、 X^2 および X^3 が O、NR⁷、R⁸ および S からなる群から独立して選ばれるメンバーであり、ならびに

R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、および R^8 が H、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキルおよび置換もしくは非置換アリールからなる群から独立して選ばれるメンバーであるものとする

重合性モノマー。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の重合性モノマーであって、-シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸、2,5-ジメチタクリロイルオキシ安息香酸および2,6-ジメチタクリロイルオキシアセトフェノンから選ばれる重合性モノマー。

【請求項 5】

光反応性ポリマーを含むポリマー物質であって、該光反応性ポリマーが高フルエンス源からの光線を吸収して熱エネルギーを発生し、該熱エネルギーを転移して、光反応性ポリマーと有効に接触している被分析分子の脱離およびイオン化を可能にするポリマー物質。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のポリマー物質であって、該光反応性ポリマーが置換基を有するアリール核を含有する部分を含み、該置換基が該アリール核の系に共役するカルボニル基もしくはカルボキシル基を含むポリマー物質。

【請求項 7】

請求項 5 に記載のポリマー物質であって、該光反応性ポリマーが式：

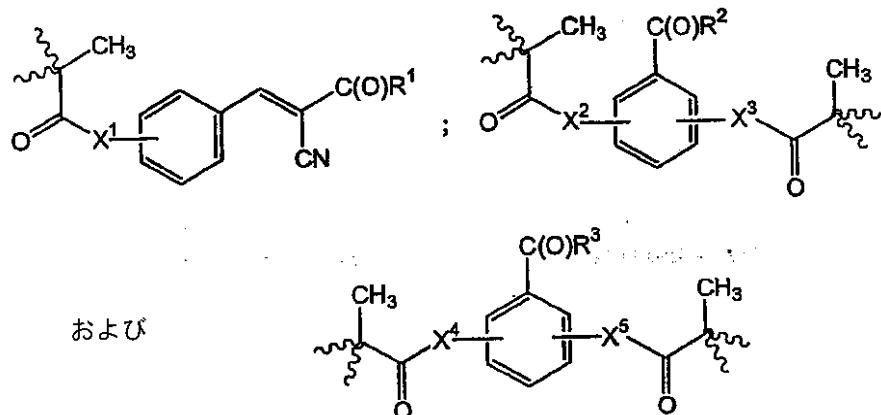
10

20

30

40

【化2】



を有し、式中

R^1 、 R^2 および R^3 が H、 NR^4 、 R^5 、 OR^6 、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキルおよび置換もしくは非置換アリールからなる群から独立して選ばれるメンバーであり、

X^1 、 X^2 および X^3 が O、 NR^7 、 R^8 および S からなる群から独立して選ばれるメンバーであり、ならびに

R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、および R^8 が H、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキルおよび置換もしくは非置換アリールからなる群から独立して選ばれるメンバーであるものとする

サブユニットを含むポリマー物質。

【請求項8】

請求項5に記載のポリマー物質であって、該光反応性ポリマーが -シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸、2,5-ジメチタクリロイルオキシ安息香酸、2,6-ジメチタクリロイルオキシアセトフェノンおよびこれらの組合せからなる群から選ばれるモノマーを含むポリマー物質。

【請求項9】

請求項5に記載のポリマー物質であって、該光反応性ポリマーが赤外レーザーからの光を吸収する部分を含むポリマー物質。

【請求項10】

請求項5に記載のポリマー物質であって、さらに結合官能部分もしくは反応性官能部分を含むポリマー物質。

【請求項11】

請求項10に記載のポリマー物質であって、該結合官能部分もしくは反応性官能部分が静電官能部分、疎水性官能部分、水素結合官能部分、配位共有結合官能部分、共有結合官能部分、エポキシド官能部分、カルボジイミダゾール官能部分、生体特異的結合官能部分およびこれらの組合せから選ばれるポリマー物質。

【請求項12】

請求項10に記載のポリマー物質であって、該光反応性ポリマーが光反応性モノマーサブユニット、および該官能部分で誘導体化された官能化モノマーサブユニットを含むコポリマーであるポリマー物質。

【請求項13】

請求項10に記載のポリマー物質であって、該光反応性ポリマー、および該官能部分で誘導体化された官能化モノマーもしくはポリマーを含有するポリマー混合物を含むポリマー物質。

【請求項14】

請求項6に記載のポリマー物質であって、該ポリマーが直鎖ポリマーであるポリマー物質。

【請求項 15】

請求項 6 に記載のポリマー物質であって、 - シアノ - 4 - メタクリロイルオキシケイ皮酸とオクタデシルメタクリレートとの間で形成されるポリマーを含むポリマー物質。

【請求項 16】

請求項 14 に記載のポリマー物質であって、該直鎖ポリマーがコポリマーであるポリマー物質。

【請求項 17】

請求項 15 に記載のポリマー物質であって、該直鎖コポリマーがスペーサ・モノマーサブユニットを含むポリマー物質。

【請求項 18】

請求項 15 に記載のポリマー物質であって、該直鎖コポリマーが結合官能部分を有するモノマー単位を含むポリマー物質。

【請求項 19】

請求項 6 に記載のポリマー物質であって、該ポリマーが架橋型ポリマーであるポリマー物質。

【請求項 20】

請求項 18 に記載のポリマー物質であって、該架橋型ポリマーがスペーサ・モノマー単位を含むポリマー物質。

【請求項 21】

請求項 18 に記載のポリマー物質であって、該架橋型ポリマーが結合官能部分を有するモノマー単位を含むポリマー物質。

【請求項 22】

(a) 表面を有する基体、および

(b) 該表面に結合したポリマー物質であって、光反応性ポリマーを含み、該光反応性ポリマーが高フルエンス源からの光線を吸収して熱エネルギーを発生し、該熱エネルギーを転移して、該光反応性ポリマーと有効に接触している被分析分子の脱離およびイオン化を可能にするポリマー物質

を含むデバイス。

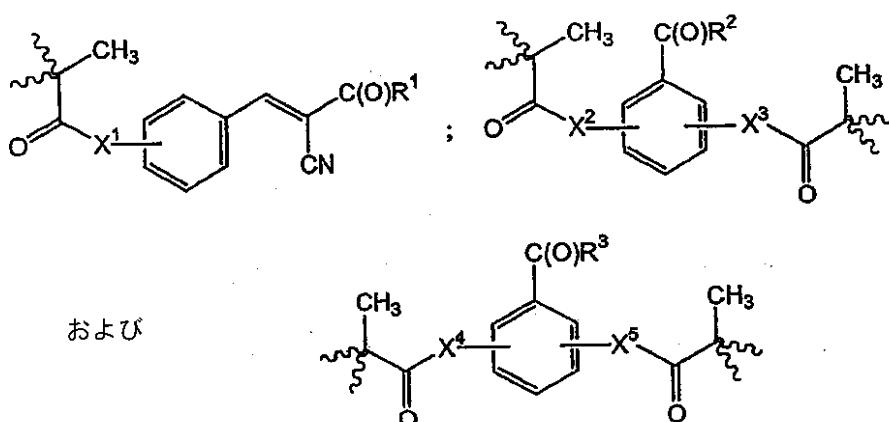
【請求項 23】

請求項 21 に記載のデバイスであって、該光反応性ポリマーが置換基を有するアリール核を含有する部分を含み、該置換基が該アリール核の一系に共役するカルボニル基もしくはカルボキシル基を含むデバイス。

【請求項 24】

請求項 21 に記載のデバイスであって、該光反応性ポリマーが式：

【化 3】



を有し、式中

R^1 、 R^2 および R^3 が H、NR⁴、R⁵、OR⁶、置換もしくは非置換アルキル、置換

10

20

30

40

50

もしくは非置換ヘテロアルキルおよび置換もしくは非置換アリールからなる群から独立して選ばれるメンバーであり、

X^1 、 X^2 および X^3 がO、NR⁷R⁸およびSからなる群から独立して選ばれるメンバーであり、ならびに

R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、およびR⁸がH、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキルおよび置換もしくは非置換アリールからなる群から独立して選ばれるメンバーであるものとする

サブユニットを含むデバイス。

【請求項 2 5】

請求項 2 1 に記載のデバイスであって、該光反応性ポリマーが - シアノ - 4 - メタクリロイルオキシケイ皮酸、2，5 - ジメチタクリロイルオキシ安息香酸、2，6 - ジメチタクリロイルオキシアセトフェノンおよびこれらの組合せからなる群から選ばれるモノマーを含むデバイス。

【請求項 2 6】

請求項 2 1 に記載のデバイスであって、該光反応性ポリマーが赤外レーザーからの光を吸収する部分を含むデバイス。

【請求項 2 7】

請求項 2 1 に記載のデバイスであって、該ポリマー物質が、さらに結合官能部分もしくは反応性官能部分を含むデバイス。

【請求項 2 8】

請求項 2 1 に記載のデバイスであって、該光反応性ポリマーが - シアノ - 4 - メタクリロイルオキシケイ皮酸とオクタデシルメタクリレートとの間で形成されるポリマーを含むデバイス。

【請求項 2 9】

請求項 2 6 に記載のデバイスであって、該結合官能部分もしくは反応性官能部分が静電官能部分、疎水性官能部分、水素結合官能部分、配位共有結合官能部分、共有結合官能部分、エポキシド官能部分、カルボジイミダゾール官能部分、生体特異的結合官能部分およびこれらの組合せから選ばれるデバイス。

【請求項 3 0】

請求項 2 2 に記載のデバイスであって、該ポリマーが直鎖ポリマーであるデバイス。

【請求項 3 1】

請求項 2 8 に記載のデバイスであって、該直鎖ポリマーがコポリマーであるデバイス。

【請求項 3 2】

請求項 2 9 に記載のデバイスであって、該直鎖コポリマーがスペーサ・モノマーサブユニットを含むデバイス。

【請求項 3 3】

請求項 2 9 に記載のデバイスであって、該直鎖コポリマーが結合官能部分を有するモノマー単位を含むデバイス。

【請求項 3 4】

請求項 2 1 に記載のデバイスであって、該ポリマー物質が、さらに静電官能部分、疎水性官能部分、水素結合官能部分、配位共有結合官能部分、共有結合官能部分、生体特異的結合官能部分およびこれらの組合せから選ばれる官能部分を含むデバイス。

【請求項 3 5】

請求項 2 1 に記載のデバイスであって、該光反応性ポリマーが光反応性モノマーサブユニット、および該官能部分で誘導体化された官能化モノマーサブユニットを含むコポリマーであるデバイス。

【請求項 3 6】

請求項 2 1 に記載のデバイスであって、該ポリマー物質が、該光反応性ポリマー、および該官能部分で誘導体化された官能化モノマーもしくはポリマーを含有するポリマー混合物を含むデバイス。

10

20

30

40

50

【請求項 3 7】

請求項 2 2 に記載のデバイスであって、該ポリマーが架橋型ポリマーであるデバイス。

【請求項 3 8】

請求項 3 2 に記載のデバイスであって、該架橋型ポリマーがモノマーサブユニットを含むデバイス。

【請求項 3 9】

請求項 3 2 に記載のデバイスであって、該架橋型ポリマーが結合官能部分を有するモノマー単位を含むデバイス。

【請求項 4 0】

請求項 2 1 に記載のデバイスであって、該ポリマー物質が、物理的付着によって該表面に 10 結合しているデバイス。

【請求項 4 1】

請求項 2 1 に記載のデバイスであって、該ポリマー物質が、共有結合によって該表面に結合しているデバイス。

【請求項 4 2】

請求項 3 9 に記載のデバイスであって、該共有結合によって、該基体上の重合性部分と該ポリマーを形成するモノマーの重合性部分との間に重合反応が起こるデバイス。

【請求項 4 3】

請求項 2 1 に記載のデバイスであって、さらに該ポリマー物質上に吸着した被分析物を含むデバイス。

【請求項 4 4】

請求項 2 1 に記載のデバイスであって、該基体が質量分析計に取り出し可能に挿入可能なプローブの形をとるデバイス。

【請求項 4 5】

請求項 3 2 に記載のデバイスであって、該光反応性ポリマーが該官能部分で誘導体化されたホモポリマーであるデバイス。

【請求項 4 6】

請求項 2 1 に記載のデバイスであって、該ポリマーが複数のアドレス可能な位置にある該基体に結合しているデバイス。

【請求項 4 7】

デバイスの作製方法であって、

- (a) 第 1 の該光反応性重合性モノマーを含むポリマー前駆体と基体表面を接触させ、
- (b) 該ポリマー前駆体を重合することにより光反応性ポリマーの層を形成し、および
- (c) 該光反応性ポリマーの層を該表面に固定化すること

を含む方法。

【請求項 4 8】

請求項 4 5 に記載の方法であって、該光反応性ポリマーが

(i) 置換基を有するアリール核を含有する光反応性部分であって、該置換基が該アリール核の 系に共役するカルボニル基もしくはカルボキシル基を有する光反応性部分を有する第 1 の光反応性モノマーを含む方法。

【請求項 4 9】

請求項 4 6 に記載の方法であって、該ポリマー前駆体が、さらに該第 1 の重合性モノマーと異なる構造を有する第 2 のモノマーを含む方法。

【請求項 5 0】

請求項 4 7 に記載の方法であって、該第 2 のモノマーが第 2 の光反応性モノマー、結合官能部分もしくは反応性官能部分を含む部分、架橋性モノマーおよびこれらの組合せから選ばれる 1 種である方法。

【請求項 5 1】

請求項 4 5 に記載の方法であって、該表面が重合性部分を含み、固定化により該光反応性ポリマーの重合性モノマー前駆体と該表面上の重合性部分との間に共有結合が形成される

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 5 2】

デバイスの作製方法であって、

(a) 基体表面を光反応性ポリマーを含むポリマー物質と接触させ、ここで、該光反応性ポリマーは、該光反応性ポリマーが高フルエンス源からの光線を吸収して熱エネルギーを発生し、該熱エネルギーを転移して、該光反応性ポリマーと有効に接触している被分析分子の脱離およびイオン化を可能にするものとし、および

(b) 該ポリマー物質を該表面に固定化することによって該表面に該ポリマー物質の層を形成させること

を含む方法。

10

【請求項 5 3】

請求項 5 0 に記載の方法であって、該光反応性ポリマーが

(i) 置換基を有するアリール核を含有する光反応性部分であって、該置換基が該アリール核の系に共役するカルボニル基もしくはカルボキシル基を有する光反応性部分を含む方法。

【請求項 5 4】

請求項 5 0 に記載の方法であって、該光反応性ポリマーが該第 1 の光反応性ポリマーと異なる構造を有する第 2 のポリマー化学種を含む方法。

20

【請求項 5 5】

請求項 5 0 に記載の方法であって、該第 2 のポリマー化学種が、第 2 のポリマー性光反応性化学種、ポリマー性被分析物結合化学種、ポリマー性架橋性化学種およびこれらの組合せから選ばれるメンバーである方法。

【請求項 5 6】

被分析物を検出する方法であって、

(a) (i) 表面を有する基体、および

(i i) 該表面に結合しているポリマー物質であって、該ポリマー物質が光反応性物質を含み、該光反応性物質が高フルエンス源からの光線を吸収して熱エネルギーを発生し、該熱エネルギーを転移して、該光反応性ポリマーと有効に接触している被分析分子の脱離およびイオン化を可能にするものとするポリマー物質

を含有するデバイスを用意し、

30

(b) 被分析物を該表面の該ポリマー物質と接触させ、および

(c) 高フルエンス源からの光線でデバイスの表面を調べ、気相イオン分光分析法により該被分析物を検出すること

を含む方法。

【請求項 5 7】

請求項 5 4 に記載の方法であって、該気相イオン分光分析法がレーザー脱離 / イオン化質量分析法である方法。

40

【請求項 5 8】

請求項 5 4 に記載の方法であって、該ポリマー物質が、該被分析物を捕獲する結合官能部分を有するモノマー単位を含む方法。

【請求項 5 9】

(a) 表面を含む基体、

(b) 重合性モノマーを含む容器であって、該モノマーが

(i) 重合性部分、および

(i i) 置換基を有するアリール核を含有する光反応性部分であって、該置換基が該アリール核の系に共役するカルボニル基もしくはカルボキシル基を有する光反応性部分を有する容器

を含むキット。

【請求項 6 0】

請求項 5 7 に記載のキットであって、さらに

50

c) 重合開始剤を有する容器
を含むキット。

【請求項 6 1】

請求項 5 7 に記載のキットであって、さらに

c) 結合官能部分もしくは反応性官能部分を有する第 2 の重合性部分を有する容器
を含むキット。

【請求項 6 2】

請求項 5 7 に記載のキットであって、該基体表面が重合性部分を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2002年1月25日付出願の米国仮特許出願第60/351,971号、
および2002年9月4日付出願の米国仮特許出願第60/408,255号の利益を主張するものであり、これらのそれぞれの開示内容についてあらゆる目的でその全体が本明細書中に援用される。

【背景技術】

【0 0 0 2】

(発明の背景)

生体サンプル中の被分析物質の有無および / または量を調べるのにバイオアッセイが用いられている。表面ベースのアッセイでは、被分析物は、固体担体上に捕獲、検出することにより定量する。表面ベースのアッセイの 1 つの例は、DNAマイクロアレイである。DNAマイクロアレイは、多数の遺伝子を同時にモニターすることができるため、遺伝子発現および遺伝子型の特定の研究に広く利用されるようになってきた (シェーナほか (Schena et al.) 、サイエンス (Science) 270 : p 467 - 470 (1995 年) ; ポラックほか (Pollock et al.) 、ネイチャー・ジェネティックス (Nat. Genet.) 23 : p 41 - 46 (1999 年)) 。マイクロアレイ表面全体の異なる空間的位置には 100,000 を超える種々のプローブ配列を結合させることにより、各スポットを単一遺伝子に対応させることができる (シェーナほか (Schena et al.) 、トレンズ・イン・バイオテクノロジー (Tibtech) 16 : p 301 - 306 (1998 年)) 。アレイ表面の全体にわたって蛍光標識 DNA の被分析サンプルを配置すると、各アレイスポット内で個々の DNA 鎖は相補鎖とハイブリッドを形成する。蛍光の検出量によりアレイ表面に結合したコピーの数、従って各遺伝子の相対的存在量が定量され、また、各スポットの位置により遺伝子同一性が明らかにされる。アレイを用いると、ヒト・ゲノム中の全ての遺伝子の発現を同時にモニターすることが理論的に可能である。従って、これは遺伝学の全領域にわたる用途において極めて強力な手法となる。(例えば、ネイチャー・ジェネティックス (Nature Genetics) 21 (1999 年) の付録「チップ技術の先を読む (Chipping Forecast) 」参照されたい) 。また、アレイ型式の多種多様なバイオアッセイを容易にするために、抗体、蛋白質、ハプテンあるいはアブトマーなどの他の結合成分を用いてアレイを作製することもできる。

【0 0 0 3】

その他の表面ベースのアッセイとして、マイクロタイタ・プレートに基づく E L I S A があり、この方法では各ウェルの底に異なる抗体を塗布する。次いで、蛋白質サンプルを、各蛋白質の蛍光標識二次抗体と共に各ウェルに添加する。こうして、被分析蛋白質を各ウェルの表面に捕獲し、蛍光で二次標識する。各ウェルの底の蛍光強度により、サンプル中の各被分析分子の量を定量する。同様に、ポリマー・ビーズのような細粒に抗体もしくは DNA を結合させて、前述のようにアッセイすることができる。これらのアッセイ型式のそれぞれの場合も、アレイについて述べたように複数の結合成分に対して用いるのに適している。

【0004】

プロテオミクスなどの分野ではその他のバイオアッセイも利用できる。例えば、細胞の正常および異常な機能は共に、一部、その細胞によって発現される遺伝子（即ち、遺伝子機能）によって決まる。遺伝子発現は、定性的および定量的な両側面を有している。即ち、細胞間では、発現される個々の遺伝子および同じ遺伝子の相対的発現量の両方の観点から異なることがある。遺伝子発現の差異は、例えば、遺伝子のコードする蛋白質の発現、あるいは発現された蛋白質の翻訳後の修飾における相違によってよって明らかとなる。例えば、蛋白質は炭水化物もしくはリン酸基が付加され、あるいはペプチド開裂によるプロセッシングを受けることがある。従って、生化学的な基準では、細胞は、有機生体分子の複雑な混合体を意味している。

10

【0005】

機能的ゲノム学（「プロテオミクス」）の1つの目標は、細胞タイプにより発現に差異のある有機生体分子を特定し、その性質を決定することにある。発現を比較することにより、細胞の特定の異常な活動の原因となり得る分子をつきとめることができる。例えば、癌細胞では発現されるが正常細胞では発現されない蛋白質をつきとめれば、診断、および最終的には創薬ならびにその病変の治療のために役に立つ。ヒト・ゲノム・プロジェクト（Human Genome Project）が完了する頃には、全てのヒト遺伝子がクローンされ、配列が決定され、データベースに構成されていることになる。この「ポスト・ゲノム」の世界では、発現に差異のある蛋白質を特定できれば、次には、コードする遺伝子が特定されることになる。従って、細胞機能の問題に対し遺伝学の威力を発揮することができる。

20

【0006】

遺伝子の発現および機能に関する化学的な差異分析には、たとえ微量であろうと、細胞内の分子の複雑な混合物を分離し、これらを定量し、同定する手段が必要である。現在、こうした分野のそれぞれにおいて、このための分析化学の現行の手段は十分とは言えない。一般的な生体分子分離方法の1つは、ゲル電気泳動法である。等電点ゲル電気泳動により蛋白質を分離する第1の方法を、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（SDS-PAGE）により分離する第2の方法と組み合わせて用いることが多い。その結果得られるものは、等電点（正味荷電）およびサイズ（即ち、質量）の大きさによって蛋白質を分離するマップである。この方法は、有用ではあるが、いくつかの点で不十分である。第一に、この方法では、生体分子の質量および等電点（「PI」）の2つの特性についてしか情報が得られない。第二に、これらの大きさのそれぞれにおける分離能がゲルの分離能によって限定されることである。例えば、質量が約5%未満あるいは約0.5pI未満だけ異なる分子は分離困難な場合が多い。第三に、ゲルが負荷容量を限定てしまっているため感度が不十分であり、微量で発現される生体分子を検出できないことが多い。第四に、分子量が約10乃至20kD未満の小さな蛋白質およびペプチドは、確認できないことである。

30

【0007】

ゲルに代わって質量分析法が、バイオアッセイに好まれる方法として使用されつつある。アッセイの感度を向上させる努力がなされた結果、いくつかの質量分析方式が生体関連サンプルの分析に応用されるようになった。質量分析技術に革新が見られたことに加えて、被分析物を吸着する基体（「チップ」）も開発され、初期の頃のデザインは改良されている。

40

【0008】

バイオアッセイを行う方法として特に有用なものは、質量分析法との併用で吸着性チップを使用することに依拠している。これまで、研究者達は質量分析法を用いて被分析物を検出する種々の方法を報告しているが、特に、容量が少なく特定できないサンプル中の被分析物の検出に限界があるなど、これらの方法は、感度および選択性において固有の限界があるため、欠陥のあるものであった（ハイレンカンプ（Hilレンカンプ）、ボルドー・マス・スペクトロメトリー・カンファレンス・レポート（Bordeaux Ma

50

ss Spectrometry Conference Report)、p 354-62 (1988年) ; カラス (Karas)、ハイレンカンプ (Hillenkamp)、ボルドー・マス・スペクトロメトリー・カンファレンス・レポート (Bordeaux Mass Spectrometry Conference Report)、p 416-17 (1988年) ; カラス (Karas)、ハイレンカンプ (Hillenkamp)、アナリティカル・ケミストリー (Analytical Chemistry)、60 : p 2299-2301 (1988年) ; カラスほか (Karas et al.)、バイオメディカル・アンド・エンバイロンメンタル・マス・スペクトロメトリー (Biomed. Environ. Mass Spectrometry)、18 : p 841-843 (1989年))。飛行時間型質量分析計においてレーザー光線を使用した例は、米国特許第4,694,167号、第4,686,366号、第4,295,046号および第5,045,694号に見られ、これらは引用により本明細書に組み込まれている。

【0009】

質量分析方式の例としては、マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化質量分析法 (MALDI) (例えば、米国特許第5,118,937号 (ハイレンカンプほか (Hillenkamp et al.) および米国特許第5,045,694号 (ビービス (Beavis)、チェイト (Chait)) 参照) および表面増強脱離 / イオン化質量分析法 (SELDI) (例えば、米国特許第5,719,060号 (ハイレンカンプ (Hillenkamp)、イップ (Yip)) 参照) が挙げられ、これらは引用により本明細書に組み込まれている。

【0010】

一般に、ポリペプチドおよび核酸のような生体分子を直接レーザー脱離イオン化すると、生体分子の分解が起こる。分子量が数百乃至数千ダルトンの生体分子を完全な状態のままで脱離、イオン化するために、種々の手法が用いられてきた。MALDIと呼ばれる1980年代に開発された1つの方法では、生体分子を、「マトリックス」と呼ばれるエネルギー吸収性有機分子 (「EAM」) を含む溶液中に混合する。次いで、質量分析プローブ上にこのマトリックスを結晶化させてマトリックス内に生体分子を捕獲する。SELDIでは、固相に結合している吸着剤に生体分子を捕獲させた後、この捕獲された生体分子にマトリックス溶液を塗布する。極めて一般的なマトリックス物質としては、蛋白質などの大きな生体分子に対して用いるのに好適なシナピン酸 (sinnapinic acid)、およびペプチドおよびオリゴヌクレオチドに対して用いるのに好適なシアノヒドロキシルケイ皮酸の2つがある。

【0011】

これまでのマトリックスにはいくつかの問題および制約がある。例えば、被分析物もしくはマトリックス中に存在する混入物質を洗い流すのが困難である。その他の問題としては、被分析物 - 塩イオン付加体が形成されること、マトリックスへの被分析物の溶解度が最適値を下回ること、固体マトリックス内の被分析分子の位置と濃度が不明であること、多数の成分が同時に存在することによりシグナル (分子イオン) が阻害「汚染 (poisoning)」されること、および被分析物が選択的に脱離イオン化されることが挙げられる。

【0012】

さらに、レーザー脱離 / イオン化飛行時間型質量分析法による分析には、プローブの露出表面に付着させた大過剰モルのマトリックス物質中に蛋白質その他の被分析物を混合した結晶性固体混合体を作製する必要がある。被分析物をこのようなマトリックスに埋め込むことは、脱離手段、例えば、レーザー光線による被分析分子の破壊および分解を防止するのに必要な条件であると考えられている。言い換えれば、このマトリックスがなければ、被分析分子はレーザーエネルギーによって容易に分解され、対象とする高分子の質量および同一性を明らかにすることが極めて困難、または殆ど不可能になる。分析を行う度毎に常に被分析物に対して大量のマトリックス分子を適性に使用するというの、ルーチンの方法としては面倒な作業になる。重要なことは、必要な全ての工程において少しでも不

10

20

30

40

50

整合が生じると、被分析分子の正確な測定が殆ど不可能になるということである

既知のマトリックスの欠陥を解決しようとした注目すべき1つの試みは、チップの表面に低分子EAMを結合させることによりチップを化学的に修飾することに依拠したものであった。例えば、米国特許第6,027,942号；第6,020,208号；6,124,137号；およびハッテンズ(Hutchens)、イップ(Yipp)、テトラヘドロン・レターズ(Tetrahedron Lett.)37:p5669-5672(1996年)を参照されたい。この化学的に修飾したチップは、チップへの固定後に被分析物を修飾もしくは誘導体化することが所望される分析に有利なように、開示されている。

【0013】

低分子EAMを用いるチップ基体の化学的誘導体化に依拠したこれまでの方法は、いくつかの点で汎用性に欠けるものである。例えば、EAMを基体に結合させるには、EAMと相補的な反応基を有する基体物質とを使用することが必要であり、このため、このチップと基体の両方に關して用いることのできる物質が限定される。さらに、EAMとチップ基体との反応が不完全であると、チップを用いるアッセイが妨害される。例えば、未反応EAMが付隨的に残ったり、チップ表面の反応基がEAMに対して官能化されないままとなることがある。未反応EAMは、それ自体が質量分析の過程でイオン化されるため、バックグラウンドのレベルを高めたり、被分析物からのデータを不明瞭にする。また、チップの未官能化基は、親和性部位として作用し、付隨的に被分析物を結合してそのチップからの脱離を妨げる。

【0014】

従って、基体への化学的結合を必要とせず、作製が簡単で容易に入手できるEAMをベースとするマトリックスが望ましい。また、このようなマトリックスを種々の条件下で広範なEAMから構築することができるならば、当該分野の大きな進歩となるはずである。本発明は、このようなマトリックス、およびこのマトリックスを組み込むチップ、ならびにこのマトリックスを作製し、使用する方法を提供する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0015】

(発明の要旨)

今回、脱離/イオン化質量分析法に、エネルギー吸収性モノマー分子から得られたサブユニットを組み込んでいるポリマーをベースとしたマトリックスが使用できることを発見した。本発明のマトリックスは、その構造および作製方法において先例を見ない程の汎用性が得られる点で、独自のものである。さらに、本発明のマトリックスでは、分子検出の精度、およびチップなどの分析用デバイス上のEAM分布の再現性が向上する。さらに、本発明のポリマー性EAMマトリックスを用いる分析では、分析を準備し処理する工程をかなり少なくすることができ、例えば、このポリマーマトリックスを用いてインサイチュでチップを作製することができるので、分析の実施前にマトリックス成分をピペットでチップ上に移す必要がなくなる。

【0016】

第一の態様として、本発明は、重合性部分、および置換基を有するアリール核を含む光反応基を含有する重合性モノマーを提供する。この置換基としては、好ましくは、このアリール核の系と電子的に共役するカルボニル基またはカルボキシル基が挙げられる。

【0017】

これらのモノマーの他に、本発明は、光反応性ポリマー物質を提供する。本発明のポリマー物質としては、高フルエンス源からの光線を吸収して熱エネルギーを発生し、この熱エネルギーを転移して被分析分子の脱離およびイオン化を可能にする光反応性ポリマーが挙げられる。本発明の一実施態様として、当該ポリマー物質は、光線を吸収する部分、およびビニル基もしくはメタクリル基などの重合性部分を含むモノマーから作製される(任意に架橋された)ホモポリマーである。別の実施態様として、当該光反応性ポリマーは、

10

20

30

40

50

光反応性モノマー、および結合官能部分を有するモノマーを含む（必要に応じて架橋された）ホモポリマーである。別の実施態様として、当該ポリマー物質は、光反応性ポリマーおよび結合官能部分により誘導体化したポリマーを含む。

【0018】

本発明のマトリックスは、当該分野で認められている重合法によって容易に作製することができる。当該チップ上にモノマーの溶液を付着させた後、これを重合し、あるいは、モノマーを重合した後、得られるポリマーをチップ上に付着させる。当該マトリックスは、E A Mのホモポリマー、2種以上のE A Mの混合物、または1種以上のE A Mと所望の性質（例えば、電荷、親水性、疎水性）を有するモノマーとの混合物とすることができる。従って、本発明によれば、当該ポリマーマトリックスの構成成分の性質および濃度を変えることによってマトリックスの特性を「最適化する」ことができる。

【0019】

当該ポリマーは、化学的な性質の他に、その形態を変えることもできる。例えば、当該ポリマーは薄膜とすることができる、あるいは懸濁重合もしくは乳化重合の条件下に形成してマトリックスのビーズまたは粒子とすることができる。さらに、当該ポリマーは、無孔質、微小孔質、またはポロジエン（porogen）によりマクロ孔質とすることができる。

【0020】

当該マトリックスは、脱離／イオン化質量分析用のチップを作製するのに有用である。従って、第一の態様として、本発明は、表面を有する基体およびその表面に結合させたポリマー物質を含むデバイスを提供する。このポリマー物質は、被分析分子を収容するのに適したものである。さらに、当該ポリマー物質は、高フルエンス源からの光線を吸収して熱エネルギーを発生し、この熱エネルギーを転移して被分析分子の脱離およびイオン化を可能にする光反応性ポリマーを包含する。

【0021】

別の態様として、表面を有する基体を含むデバイスを提供する。また、このデバイスは、表面と接触しているポリマー物質も含む。このポリマー物質は、当該表面上に可逆性に層状とすることができる、あるいは結合様式で固定することができる。当該ポリマー物質は、光反応性ポリマーであって、高フルエンス源からの光線を吸収して熱エネルギーを発生し、この熱エネルギーを転移して、光反応性ポリマーと有効に接触している被分析分子の脱離およびイオン化を可能にする光反応性ポリマーを包含する。

【0022】

また、本発明のチップを作製する方法も提供する。この方法は、上記の、被分析物を収容する性質およびエネルギー吸収性を有するE A Mを含むポリマーをチップ上に付着させることを含む。このポリマーは、チップに付着させる前に、あるいはインサイチュでチップ上に形成させることができる。従って、例示的な実施態様として、当該方法は、基体の表面をポリマー前駆体と接触させることを含む。この前駆体は、第1の光反応性重合性モノマーを包含する。このポリマー前駆体を重合させることにより、光反応性ポリマーの層が形成される。得られる光反応性ポリマーの層は、必要に応じて当該表面に固定化する。別の例示的な実施態様として。

【0023】

さらに別の態様として、本発明は、サンプルを分析する方法を提供する。この方法は、E A Mを含有するポリマーマトリックスを含むチップからサンプルを脱離およびイオン化することを含む。このマトリックスは、チップに付着させる前に形成させるか、あるいはインサイチュでチップ上に形成させるディスクリートの（discrete）ポリマーである。また、本発明は、その他の実施態様の共重合直鎖ポリマーも提供する。一例として、この合成物は、-シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸とアクリレートのコポリマーである。別の実施態様として、当該合成物は、-シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸、アクリレートおよび3-(トリ-メトキシ)シリルプロピルメタクリレートのコポリマーである。さらに別の実施態様として、当該合成物は、-シアノ-4-メ

10

20

30

40

50

タクリロイルオキシケイ皮酸とオクタデシルメタクリレートのコポリマーである。

【0024】

別の態様として、本発明は、キットを提供する。例示的なキットは基体を包含する。また、重合性部分および光反応性部分を含む重合性モノマーも包含する。例示的な光反応性部分は、アリール核の系と電子的に共役するカルボニル基またはカルボキシル基のような置換基を有するアリール核である。

【0025】

本発明のその他の目的、利点および態様は、以下の詳細な説明から明らかになろう。

【0026】

(略語および定義)

本明細書で用いている「CHCA」とは、-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸を意味する。

10

【0027】

本明細書で用いている「CHCAMA」とは、-シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸を意味する。「ポリ-CHCAMA」とは、CHCAMAから誘導されたモノマーを組み込んでいるポリマーを意味する。

【0028】

本明細書で用いている「DHBMA」とは、2,5-ジメチタクリロイルオキシ安息香酸を意味する。「ポリ-DHBMA」とは、DHBMAから誘導されたモノマーを組み込んでいるポリマーを意味する。

20

【0029】

本明細書で用いている「DHPheMA」とは、2,6-ジメチタクリロイルオキシアセトフェノンを意味する。「ポリ-DHPheMA」とは、DHPheMAから誘導されたモノマーを組み込んでいるポリマーを意味する。

【0030】

本明細書で用いている「DEGDMA」とは、ジ(エチレングリコール)ジメチルアクリレートを意味する。「ポリ-DEGDMA」とは、DEGDMAから誘導されたモノマーを組み込んでいるポリマーを意味する。

【0031】

本明細書で用いている「MALDI」とは、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化を意味する。

30

【0032】

本明細書で用いている「SELDI」とは、脱離/イオン化のための表面増強を意味する。

【0033】

本明細書で用いている「SEND」とは、ニート(Neat)脱離のための表面増強を意味する。

【0034】

本明細書で用いている「TOF」とは、飛行時間を意味する。

40

【0035】

本明細書で用いている「MS」とは、質量分析法を意味する。

【0036】

本明細書で用いている「MALDI-TOF MS」とは、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析法を意味する。

【0037】

本明細書で用いている「エネルギー吸収性分子(部分)」という用語は、「光反応性ポリマー」の成分のことである。

【0038】

本明細書で用いている「有効な接触」という用語は、被分析物と光反応性ポリマーとの関係、または被分析物と、外部供給源からEAMに転移されたエネルギーにより被分析物

50

を光反応性ポリマーから脱離させることができる光反応性ポリマーのエネルギー吸収性部分との関係のことを指す。

【0039】

本明細書で用いている「被分析物脱離／イオン化」という用語は、被分析物をイオンとして気相に変換することを意味する。

【0040】

「マトリックス」という用語は、被分析物を、完全な状態の分子イオンとして、気相もしくは蒸気相へと脱離（例えば、レーザー照射によって）およびイオン化するのを補助する複数の略酸性エネルギー吸収性化学物質（例えば、ニコチン酸もしくはシナピン酸）のことを意味する。

10

【0041】

本明細書で用いている「エネルギー吸収性分子もしくは部分（EAM）」とは、（SENDの場合のように）プローブ・エレメントの表面に提示された時、分子が気相または蒸気相へとニート脱離し、その後完全な状態の分子イオンとしてこれが促進されるのを容易にする光吸収性化学種のことを意味する。

【0042】

本明細書で用いている「脱離」とは、被分析物が当該表面から離脱すること、および／または被分析物が気相に入ることを意味する。

【0043】

本明細書で用いている「イオン化」とは、被分析物上にプラスまたはマイナス1以上の電子単位に等しい電荷を生じ、あるいは保持する過程のことを意味する。

20

【0044】

置換基が、左から右へ書かれる通常の化学式で特定される場合、この構造を右から左へ書くことにより得られるはずの化学的に同一の置換基もこれに等しく含め、例えば、-C₂H₅O-は-OCH₂-をも表すものであり、-NH₂(O)₂-は-S(O)₂HN-をも示すものであるなどである。

【0045】

「アルキル」という用語は、それ自体または別の置換基の一部として、特記しない限り、指定された炭素原子数（即ち、C₁-C₁₀は1乃至10個の炭素を意味する）を有する直鎖もしくは分枝鎖または環状の炭化水素基、あるいはこれらの組合せのことを意味し、完全飽和型または単もしくは多価不飽和型であってもよく、二価もしくは多価の基を含むことができる。飽和炭化水素基の例としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、t-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、シクロヘキシル、（シクロヘキシル）メチル、シクロプロピルメチル、例えば、n-ペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチルなどの同族体および異性体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。不飽和アルキル基とは、1つ以上の二重結合または三重結合を有する基である。不飽和アルキル基の例としては、ビニル、2-プロペニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-(ブタジエニル), 2,4-ペンタジエニル、3-(1,4-ペンタジエニル)、エチニル、1-および3-プロピニル、3-ブチニル、ならびにこれらの高級同族体および異性体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、「アルキル」という用語は、特に明記しない限り、「ヘテロアルキル」など、以下により詳細に定義するアルキル誘導体を含ものである。炭化水素基に限定されるアルキル基は、「ホモアルキル」と呼ばれる。

30

【0046】

「ヘテロアルキル」という用語は、それ自体または別の用語との併用で、特記しない限り、指定数の炭素原子と、O、N、SiおよびSからなる群から選ばれる少なくとも1種のヘテロ原子とからなる安定な直鎖もしくは分枝鎖または環状の炭化水素基、あるいはこれらの組合せのことを意味し、当該窒素および硫黄原子は任意に酸化されていてもよく、当該窒素ヘテロ原子は任意に四級化されていてもよいものとする。ヘテロ原子O、NおよびSならびにSiは、ヘテロアルキル基の任意の内部に、あるいはアルキル基が分子の残

40

50

部に結合している位置に配置されていてもよい。例としては、-CH₂-CH₂-O-C_H₃、-CH₂-CH₂-NH-CH₃、-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃、-CH₂-S-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂、-S(O)-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃、-CH=CH-O-CH₃、-Si(CH₃)₃、-CH₂-CH=N-OCH₃、および-CH=CH-N(CH₃)-CH₃が挙げられるが、これらに限定されるものではない。例えば、-CH₂-NH-OCH₃および-CH₂-O-Si(CH₃)₃のように、最大2つのヘテロ原子を連続したものとができる。同様に、「ヘテロアルキレン」という用語は、それ自体または別の置換基の一部として、ヘテロアルキルから誘導される2価の基を意味し、例えば、-CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂、および-CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂が挙げられるが、これらに限定されるものではない。ヘテロアルキレン基の場合、ヘテロ原子は、鎖末端の一方または両方に配置されていてもよい(例えば、アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノなど)。さらに、アルキレンおよびヘテロアルキレン結合基の場合、結合基の式が書かれている方向は、結合基の位置付けを意味しない。例えば、式-C(O)₂R'は-C(O)₂R'、-R'C(O)₂の両者を意味する。

【0047】

アルキルおよびヘテロアルキル基(アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニル、およびヘテロシクロアルケニルと呼ばれることが多い基を含む)に対する置換基は、mをここに挙げたような基の炭素原子の総数とした場合、ゼロ乃至(2m'+1)個の数からなる、-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R'、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R'R'、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO₂R'、-CONR'R'、-OC(O)NR'R'、-NR'R'C(O)R'、-NR'C(O)NR'R'、-NR'R'C(O)₂R、-NR-C(NR'R')R'、=NR'R'、-NR-C(NR'R')=NR'R'、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R'、-NR₂SO₂R'、-CNおよび-NO₂(但し、これらに限定されるものではない)から選ばれる種々の基の1種以上とができる。この場合、R'、R''、R'''およびR''''は、それぞれ好ましくは独立して水素、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、例えば、1乃至3個のハロゲンで置換したアリール、置換もしくは非置換アルキル、アルコキシまたはチオアルコキシ基、あるいはアリールアルキル基を意味するものとする。本発明の化合物が2つ以上のR基を含む場合、例えば、R'、R''、R'''およびR''''基のうちの2種以上が存在する場合にそれがR'、R''、R'''およびR''''基であるように、各R基は独立して選ばれる。R'、R''が同じ窒素原子に結合する場合、これらはこの窒素原子と結合して5、6、もしくは7員環を形成することができる。例えば、-NR'R'の意味するものとして、1-ピロリジニルおよび4-モルホリニルが挙げられるが、これらに限定されるものではない。置換基についての以上の説明から、「アルキル」という用語には、水素基以外の基に結合した炭素原子を含む基、例えば、ハロアルキル(-CF₃、-CH₂CF₃など)およびアシリル(-C(O)CH₃、-C(O)CF₃、-C(O)CH₂OCH₃など)を含めるものであることは当業者に了承されよう。

【0048】

「アリール」という用語は、特記しない限り、単環または縮合もしくは共有結合している多環(好ましくは1乃至3環)とすることができる多価不飽和、芳香族、炭化水素置換基のことを意味する。「ヘテロアリール」という用語は、N、OおよびSから選ばれる1乃至4個のヘテロ原子を含むアリール基(または環)であって、窒素および硫黄原子が任意に酸化され、窒素原子が任意に四級化されているアリール基(または環)のことを意味する。ヘテロアリール基は、ヘテロ原子を介して分子の残部に結合することができる。アリールおよびヘテロアリール基の例としては、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、

10

20

30

40

50

4 - ピフェニル、1 - ピロリル、2 - ピロリル、3 - ピロリル、3 - ピラゾリル、2 - イミダゾリル、4 - イミダゾリル、ピラジニル、2 - オキサゾリル、4 - オキサゾリル、2 - フェニル - 4 - オキサゾリル、5 - オキサゾリル、3 - イソキサゾリル、4 - イソキサゾリル、5 - イソキサゾリル、2 - チアゾリル、4 - チアゾリル、5 - チアゾリル、2 - フリール、3 - フリール、2 - チエニル、3 - チエニル、2 - ピリジル、3 - ピリジル、4 - ピリジル、2 - ピリミジル、4 - ピリミジル、5 - ベンゾチアゾリル、ブリニル、2 - ベンズイミダゾール、5 - インドリル、1 - イソキノリル、5 - イソキノリル、2 - キノキサリニル、5 - キノキサリニル、3 - キノリル、および6 - キノリルが挙げられるが、これらに限定されるものではない。上記アリールおよびヘテロアリール環系のそれに対する置換基は、下記の許容可能な置換基の群から選ばれる。

10

【0049】

簡略のため、他の用語との組合せで用いる場合（例えば、アリールオキシ、アリールチオキシ、アリールアルキル）の「アリール」という用語には、上記で定義したアリールおよびヘテロアリールの両者を含める。

【0050】

アルキル基について説明した置換基の場合と同様に、アリールに対する置換基およびヘテロアリールに対する置換基は、それぞれ一般に「アリール置換基」および「ヘテロアリール置換基」と呼ばれ、例えば、ハロゲン、-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R''、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R''R'''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO₂R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR'C(O)R'、-NR'C(O)R'、-NR-C(NR'R'')=NR'''、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R''、-NRSO₂R'、-CN、-NO₂、-R'、-N₃、-CH(Ph)₂、フルオロ(C₁-C₄)アルコキシおよびフルオロ(C₁-C₄)アルキルから、ゼロから芳香族環系のオープンバレンスの総数までの個数の範囲で、変更および選択される。但し、R'、R''、R'''およびR''''は、好ましくは独立してハロゲン、(C₁-C₈)アルキル、(C₁-C₈)ヘテロアルキル、非置換アリール、非置換ヘテロアリール、(非置換アリール)- (C₁-C₄)アルキル、および(非置換アリール)オキシ-(C₁-C₄)アルキルから選ばれるものとする。本発明の化合物が2つ以上のR基を含む場合、例えば、R'、R''、R'''およびR''''基のうちの2種以上が存在する場合にそれがR'、R''、R'''およびR''''基であるように、各R基は独立して選ばれる。

20

【0051】

アリール環もしくはヘテロアリール環の隣接原子におけるアリール置換基のうち2個は、式-T-C(O)-(CRR')_q-U-の置換基であって、TおよびUが独立してNR-、-O-、-CRR'-もしくは単結合であり、qが0乃至3の整数であるものとする置換基によって任意に置換することができる。あるいは、アリール環もしくはヘテロアリール環の隣接原子における置換基のうち2個は、式-A-(CH₂)_r-B-の置換基であって、AおよびBが独立してCRR'-、-O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂NR'-もしくは単結合であり、rが1乃至4の整数であるものとする置換基によって任意に置換することができる。この新たな環の上記単結合のうちの1つは、任意に二重結合で置換することができる。あるいは、アリール環もしくはヘテロアリール環の隣接原子における置換基のうち2個は、式-(CRR')_s-X-(CRR''R''')_d-の置換基であって、sおよびdが独立して0乃至3の整数であり、Xが-O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-S(O)₂-もしくは-S(O)₂NR'-であるものとする置換基によって任意に置換することができる。置換基R、R'、R''およびR'''は、好ましくは独立して、水素または置換もしくは非置換(C₁-C₂)₀)アルキルから選ばれる。

30

【0052】

上記の用語はそれぞれ、示された基の置換および非置換型を含むものである。

40

50

【0053】

「部分 (Moiety)」とは、別の部分 (moiety) に結合している分子の基のことを意味する。

【0054】

「R」という記号は、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、および置換もしくは非置換ヘテロシクリル基から選ばれる置換基を表す一般的な略号である。

【0055】

記号

【0056】

10

【化4】

~~~

は、結合として用いられていようと結合に直角に示されていようと、示された部分が分子、固体担体などの残部に結合している箇所を示すものである。

## 【0057】

本明細書で用いている「ヘテロ原子」という用語は、酸素 (O)、窒素 (N)、硫黄 (S) およびケイ素 (Si) を含むものである。

## 【0058】

本明細書で用いている「被分析物」とは、アッセイ混合物中の対象とする化学種を意味する。被分析物の例としては、細胞とその部分、酵素、抗体その他の生体分子、薬物、農薬、除草剤、兵器用薬剤 (agents of war) およびその他の生物活性剤が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

## 【0059】

本明細書で用いている「アッセイすべき物質」とは、本発明の方法またはデバイスによって定性的もしくは定量的に検出する物質のことを意味する。このような物質の例としては、抗体、抗体断片、抗原、ポリペプチド、糖蛋白質、多糖、複合糖脂質、核酸、エフェクター分子、受容体分子、酵素、阻害剤などが挙げられる。

## 【0060】

「アッセイ混合物」という用語は、被分析物その他の成分を含む混合物のことを意味する。その他の成分とは、例えば、被分析物と混在している希釈剤、緩衝剤、界面活性剤、汚染物質、デブリなどである。実例としては、尿、血清、血漿、全血、唾液、涙液、脳脊髄液、乳首などからの分泌液が挙げられる。また、緩衝液、抽出用溶剤、溶媒などの液状物質に懸濁もしくは溶解させた粘液、体組織、細胞などの固形、ゲル状またはゾル状物質も挙げられる。

## 【0061】

本明細書で用いている「核酸」とは、一本鎖、二本鎖もしくはさらに高度に一体化したハイブリッドモチーフのDNA、RNA、およびこれらの任意の化学的修飾体を意味する。修飾体としては、核酸リガンド塩基 (base) または全体としての核酸リガンドに、さらに電荷、分極性、水素結合、静電相互作用、および流動性 (fluidity) を付加する化学基を有するものが挙げられるが、これに限定されるものではない。このような修飾体としては、ペプチド核酸 (PNAs)、ホスホジエステル基修飾体 (例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート)、2'位糖修飾体、5位ピリミジン修飾体、8位プリン修飾体、環外アミン修飾体、4-チオウリジン置換体、5-ブロモもしくは5-ヨード-ウラシル置換体；バックボーン修飾体、メチル化体、イソシチジン、イソグアニンなどのイソ塩基のような特異塩基対結合体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、核酸は、例えば、ニトロインドールのような非天然塩基も含むことができる。また、修飾には、BHQ、発蛍光団もしくは別の成分によるキャッピングなどの3'および5'修飾を含めることができる。

## 【0062】

50

「ペプチド」とは、モノマーがアミノ酸であってこれがアミド結合によって結合しているポリマーであり、あるいはポリペプチドとも呼ばれる。アミノ酸が - アミノ酸である場合、L - 光学異性体またはD - 光学異性体を用いることができる。さらに、非天然アミノ酸、例えば、- アラニン、フェニルグリシンおよびホモアルギニンも挙げられる。遺伝子によりコードされていないよく見かけるアミノ酸も本発明に用いることができる。本発明に用いるアミノ酸は全てD - またはL - 異性体とすることができます。概して、L - 異性体が好ましい。さらに、ペプチド模倣体も本発明に有用である。一般的な概説としては、スパトーラ、エー・エフ (Spatola A. F.)、「アミノ酸、ペプチドおよび蛋白質の化学と生化学 (CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS)」、ビー・ウェインステイン (B. Weinstain) 編、マーセル・デッカー (Marcel Dekker)、ニューヨーク、p 267 (1983年) を参照されたい。  
10

## 【0063】

「アミノ酸」という用語は、天然および合成アミノ酸、ならびにアミノ酸類似体、および天然アミノ酸と同様に機能するアミノ酸模倣体のことを意味する。天然アミノ酸とは、遺伝暗号によりコードされているもの、ならびにその後修飾されたアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、- カルボキシグルタメートおよびO - ホスホセリンである。アミノ酸類似体とは、天然アミノ酸と同じ基本化学構造、即ち、水素、カルボキシル基、アミノ基およびR基を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムのことを意味する。このような類似体は、R基が修飾されていたり（例えば、ノルロイシン）、ペプチド・バックボーンが修飾されていたりするが、天然アミノ酸と同じ基本化学構造を保持している。アミノ酸模倣体とは、アミノ酸の一般化学構造と異なる構造を有するが、天然アミノ酸と同様に機能する化合物のことを意味する。  
20

## 【0064】

「治療剤」もしくは「薬物」とは、患者に適切に投与された時、所望の治療効果をもたらすことができるあらゆる化学的もしくは生物学的物質、化合物または配合物のことを意味する。一部の薬物は、生体内 (in vivo) で薬物作用を有する代謝体に変換される不活性型として販売されている。本発明では、「治療剤」もしくは「薬物」という用語は、この不活性型薬物および活性代謝体の両者を包含するものである。  
30

## 【0065】

本明細書で用いている「結合官能部分」という用語は、「アッセイすべき物質」のような特定の物質に親和性を有する部分、即ち、特定の物質と相互作用して本発明のチップ上にこれを固定することができる部分のことを意味する。本発明を実施する際に利用できる結合官能部分は一般にである。クロマトグラフ結合官能部分は、電荷 - 電荷、親水性 - 親水性、疎水性 - 疎水性、ファンデルワールス相互作用およびこれらの組合せを介して特定の物質を結合する。一般に、生体特異的 (biосpecific) 結合官能部分は、上記相互作用のうちの1つ以上を必要とする相補的な3次元構造を含む。

## 【0066】

本明細書で用いている「検出手段」という用語は、アッセイすべき物質を結合官能部分に固定化することにより生じるシグナルを、目視判断、またはシグナルの特性に応じた適切な外部測定機器によって検出することを指している。  
40

## 【0067】

「結合した」および「固定化した」という用語は、本明細書では区別なく用いており、これらは、共有結合、イオン結合、静電相互作用、水素結合、疎水性 - 疎水性相互作用、親水性 - 親水性相互作用、化学吸着、物理吸着およびこれらの組合せ（但し、これらに限定されるものではない）を含む相互作用を包含する。

## 【0068】

「独立して選ばれる」という用語は、そのように記載された基が同一または異なるものであり得ることを示すために、本明細書では用いている。  
50

## 【0069】

「生体分子」もしくは「生物有機分子」という用語は、生きている生物により通常作られる有機分子のことを意味する。この例としては、ヌクレオチド、アミノ酸、糖、脂肪酸、ステロイド、核酸、ポリペプチド、ペプチド、ペプチド断片、炭水化物、脂質、およびこれらの複合体（例えば、糖蛋白質、リボ核蛋白質、リボ蛋白質など）を含む分子が挙げられる。

## 【0070】

「生体物質」という用語は、生物、器官、組織、細胞またはウイルスから得られる任意の物質のことを意味する。これには、唾液、血液、尿、リンパ液、前立腺液、精液、乳汁などの生体液、およびこれらのうちの任意のものの抽出物、例えば、細胞抽出物、細胞培養メジウム、分画サンプルなどがある。

10

## 【0071】

「気相イオン分光計」とは、気相イオンを検出する装置のことを意味する。気相イオン分光計は、気相イオンを供給するイオン供給源を内蔵している。気相イオン分光計としては、例えば、質量分析計、イオン移動度分光分析計、およびイオン電流測定装置が挙げられる。「気相イオン分光分析」とは、気相イオン分光計を用いて気相イオンを検出することを意味する。

## 【0072】

「質量分析計」とは、気相イオンの質量／電荷比に変換することのできるパラメータを測定する気相イオン分光計のことを意味する。一般に、質量分析計は、イオン供給源および質量分析器を内蔵している。質量分析計の例としては、飛行時間型、磁場型、四重極フィルター型、イオントラップ型、イオンサイクロトロン共鳴型、静電場型分析器およびこれらのハイブリッドがある。「質量分析」とは、質量分析計を用いて気相イオンを検出することを意味する。

20

## 【0073】

「レーザー脱離質量分析計」とは、レーザーを手段として用いて被分析物を脱離、揮発およびイオン化させる質量分析計のことを意味する。

## 【0074】

「タンデム質量分析計」とは、イオン混合物中のイオンなどのイオンのm/z比に基づく識別または測定の連続する2工程を行うことができる全ての質量分析計のことを意味する。この語句には、イオンのm/z比に基づく識別または測定の連続する2工程を空間的に2台並べて行うことができる2台の質量分析器を有する質量分析計が含まれる。さらに、この語句には、イオンのm/z比に基づく識別または測定の連続する2工程を時間連続的に行うことができる単一の質量分析器を有する質量分析計も含まれる。従って、この語句に、Oq-TOF質量分析計、イオントラップ質量分析計、イオントラップ-TOF質量分析計、TOF-TOF質量分析計、およびフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計、静電場・磁場型質量分析計、ならびにこれらの組合せが含まれることは明らかである。

30

## 【0075】

「質量分析器」とは、気相イオンの質量／電荷比に変換することのできるパラメータを測定する手段を含む質量分析計のサブアセンブリのことを意味する。飛行時間型質量分析計では、質量分析器は、イオン光学アセンブリ（ion optic assembly）、ライト・チューブ（flight tube）およびイオン検出器を含む。

40

## 【0076】

「イオン供給源」とは、気相イオンを供給する気相イオン分光計のサブアセンブリを意味する。一実施態様として、イオン供給源は、脱離／イオン化工程を通じてイオンを供給する。概して、このような実施態様は、イオン化工エネルギーの供給源（例えば、レーザー脱離／イオン化供給源）と中継可能で、気相イオン分光計の検出器と常圧もしくは減圧で同時交信できるような位置にプローブを連結するプローブ接合部分を含む。

## 【0077】

50

固相からの被分析物を脱離 / イオン化するイオン化工エネルギーの形態としては、例えば、(1) レーザーエネルギー、(2) (高速原子衝撃に用いられる) 高速原子、(3) (プラズマ脱離に用いられる) 放射性核種のベータ崩壊を介して発生する高エネルギー粒子、および(4) (二次イオン質量分析に用いられる) 二次イオンを発生する一次イオンが挙げられる。固相被分析物に対するイオン化工エネルギーの好ましい形態は、(レーザー脱離 / イオン化に用いられる) レーザー、特に、窒素レーザー、Nd-Yag レーザー、Er YAG レーザー、Nd YAG、CO<sub>2</sub> レーザー、波長可変 OPO レーザーその他のパルスレーザー供給源である。

## 【0078】

「フルエンス」とは、中継されるイメージの単位面積当たりの放出レーザーエネルギーのことを意味する。通常、プローブの表面にサンプルを載せ、このプローブをプローブ接合部分と連結し、プローブ表面にイオン化工エネルギーを当てる。その結果、このイオン化工エネルギーはその表面から気相中へ被分析分子を脱離させ、これをイオン化する。本明細書で用いている「高フルエンス」とは、約 1 mJ / mm<sup>2</sup> 乃至 50 mJ / mm<sup>2</sup> のフルエンスのことを言う。「高フルエンス」のエネルギーを供給するのに、種々のレーザーおよび放電ランプが出すことのできる一部の高輝度プラズマを用いることができる。

## 【0079】

被分析物に対するイオン化工エネルギーのその他の形態としては、例えば、(1) 気相中性粒子をイオン化する電子、(2) 気相、固相もしくは液相中性粒子のイオン化を誘発する強電場、および(3) イオン化粒子または電場と中性化学物質を併用して気相、固相もしくは液相中性粒子の化学的イオン化を誘発する供給源が挙げられる。

## 【0080】

本発明の文脈中の「プローブ」とは、被分析物から得られるイオンを質量分析計などの気相イオン分光計中に誘導するのに用いられるデバイスである。一般に、「プローブ」は、被分析物がイオン化工エネルギーの供給源に提示されるサンプル提示表面を有する(可とう性または剛性の) 固体基体を含む。

## 【0081】

「表面増強レーザー脱離 / イオン化」即ち、「SELDI」とは、被分析物をエネルギー供給源に提示するプローブの表面が、被分析分子の脱離 / イオン化に対し有効な役割を果たす気相イオン分光分析(例えば、質量分析)の方法のことである。SELDI の手技については、例えば、米国特許第 5,719,060 号(ハッテンズ(Hutchens)、イップ(Yipp))および米国特許第 6,225,047 号(ハッテンズ(Hutchens)、イップ(Yipp))に開示されている。

## 【0082】

表面増強ニート脱離 (Surface-Enhanced Neat Desorption)、即ち「SEND」と呼ばれる SELDI の 1 つのバージョンは、プローブ表面に化学的に結合させたエネルギー吸収性分子を有するプローブ(「SEND プローブ」)を使用するものである。「エネルギー吸収性分子」(「EAM」)とは、レーザー脱離イオン化供給源からエネルギーを吸収する分子であって、これと接触している被分析分子の脱離およびイオン化に寄与することができる分子のことを意味する。この語句には、「マトリックス」と呼ばれることが多い、MALDI に用いられる分子が含まれ、また、ケイ皮酸誘導体、シナピン酸(「SPA」)、シアノ-ヒドロキシ-ケイ皮酸(「CHCA」)およびジヒドロキシ安息香酸、フェルラ酸、ヒドロキシアセトフェノン誘導体などが含まれることは明らかである。また、SELDI に用いられる EAM もこれに含まれる。

## 【0083】

「表面増強アフィニティキャプチャー」、即ち、「SEAC」と呼ばれる別のバージョンの SELDI は、表面に吸着剤(「捕獲剤(capture agent)」とも呼ばれる)を結合したプローブを使用するものである。(「SEAC プローブ」)「吸着剤表面」とは、吸着剤が結合している表面のことを言う。「化学的に選択的な表面」とは、吸着剤(捕獲剤)が結合する表面、あるいは、例えば、共有結合もしくは配位共有結合を

10

20

30

40

50

形成する反応により、捕獲剤を結合することができる反応性部分が結合する表面のことを意味する。

【0084】

「吸着剤」または「結合官能部分」とは、被分析物（例えば、対象ポリペプチド）を結合することができる任意の物質のことを意味する。「クロマトグラフ吸着剤」とは、クロマトグラフィーに通常用いられる物質のことを指している。クロマトグラフ吸着剤としては、例えば、イオン交換物質、金属キレート化剤、疎水的相互作用吸着剤、親水的相互作用吸着剤、染料、混合モード（mixed mode）吸着剤（例えば、疎水力／静電反発吸着剤）が挙げられる。「生体特異的吸着剤」とは、生体分子、例えば、ヌクレオチド、核酸分子、アミノ酸、ポリペプチド、単糖、多糖、脂肪酸、脂質、ステロイド、およびこれらの複合体（例えば、糖蛋白質、リポ蛋白質、糖脂質）を含む吸着剤のことを意味する。場合によっては、この生体特異的吸着剤は、多蛋白質複合体、生体膜もしくはウイルスなどの巨大分子構造とすることができる。生体特異的吸着剤の例には抗体、受容体蛋白質および核酸がある。通常、生体特異的吸着剤は、クロマトグラフ吸着剤よりも対象被分析物に対する特異性が高い。SELDIに用いられる吸着剤の別の例は、米国特許第6,225,047号（ハッチエンズ（Hutchens）、イップ（Yip）、「差の分布図（difference map）を作成するための保持物質（retentate）クロマトグラフィーの利用」、2001年5月1日）に見いだすことができる。

10

20

30

40

50

【0085】

「反応性部分（Reactive Moiety）」とは、捕獲剤を結合することができる化学的部分のことを意味する。エポキシドおよびカルボジイミダゾールは、ポリペプチド捕獲剤を共有結合するための有用な反応性部分である。ニトリロ三酢酸は、金属キレート化剤を配位共有結合により結合する有用な反応性部分である。

【0086】

「吸着」とは、吸着剤もしくは捕獲剤への被分析物の非共有結合のことを意味する。

【0087】

「溶離剤」もしくは「洗浄溶液」とは、吸着剤表面への被分析物の吸着に影響を与え、もしくは修正し、および／またはその表面から未結合物質を除去するために用いられる物質、通常は溶液のことを意味する。溶離剤の溶離特性は、例えば、pH、イオン強度、疎水性、カオトロピズムの程度、洗浄強度（detergent strength）および温度に左右され得る。

【0088】

「重合性部分」とは、重合反応に関与することができ、その重合反応によってポリマーの成分に変換され得る官能基のことを意味する。代表的な「重合性部分」としては、ビニル、アクリロイル、カルボン酸、カルボン酸エステル、無水物、アルデヒド、尿素などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。その他の「重合性部分」も当業者に知られている。例えば、シーモア・アールほか（Seymour, R. et al.）、ポリマー・ケミストリー（Polymer Chemistry）第2版、マーセル・デッカー社（Marcel Dekker, Inc.）、ニューヨーク、1998年を参照されたい。

【0089】

（導入）

本発明は、特に脱離／イオン化方式の質量分光分析との併用で用いるのに適したポリマー・エネルギー吸収性マトリックスを提供する。本発明のマトリックスの特性は、このポリマーマトリックスを形成するのに用いるモノマーの構造を変えることによって最適化することができる。例えば、マトリックス内のEAMの濃度を（共有もしくは非共有）結合したエネルギー吸収性分子が適切な密度となるように変えることによって、このエネルギー吸収性分子による種々の質量の被分析分子の脱離を容易にすることができます。吸収もしくは結合されるエネルギー吸収性分子の被分析物に対する最適な比率は、概して、検出すべき被分析物の質量によって異なる。さらに、本発明は、特定の被分析分子もしくは被分析

分子のクラスを捕獲(吸着)した後、この被分析分子を調製、修飾および脱離するという特定の目的のために、当該エネルギー吸収性分子が化学的および/または生物学的な親和性反応物(「結合官能部分」)と結合しているマトリックスを提供する。

【0090】

さらに、本発明の目的は、提示表面に含まれている被分析物の未利用部分が化学的におよび/または酵素的その他の処理(例えば、分子認識による被分析物関連分子の発見)を行った後、修飾された被分析物を質量分析その他の検出手段で逐次分析することができるような被分析物の脱離およびイオン化のための方法ならびに装置を提供することにある。その引き継ぎ行う被分析物の修飾によって被分析物およびその成分の一次、二次、三次あるいは四次構造を解明することができる。

【0091】

以下の諸節では、本発明のポリマーマトリックスについて説明する。質量分析用のチップによって例示されるような分析用デバイスにこのマトリックスを使用することについても説明する。さらに、当該ポリマーマトリックスを用いて分析用デバイスを作製する方法について説明し、併せて、この分析用デバイスを用いて被分析物を検出し、定量化し、あるいはそれとも特徴付ける方法についても説明する。

【0092】

(モノマー)

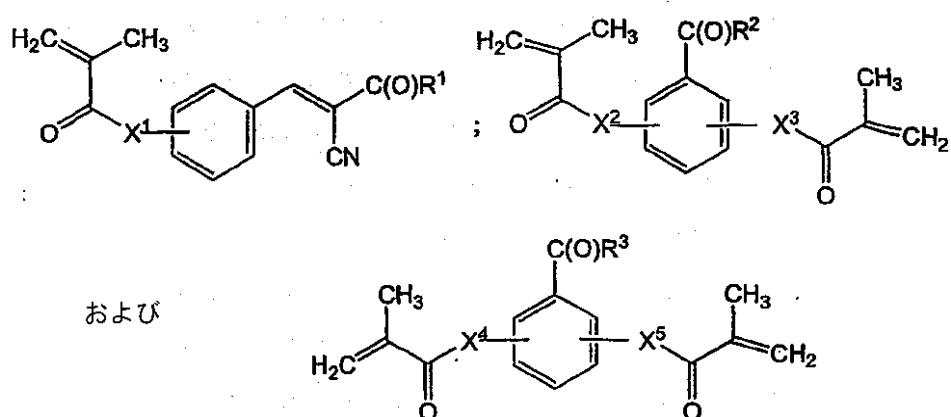
第一の態様として、本発明は、重合性部分、および置換基を有するアリール核を含む光反応基を含有する重合性モノマーを提供する。この置換基としては、好ましくは、このアリール核の系と電子的に共役するカルボニルまたはカルボキシル基が挙げられる。

【0093】

一部の例示的実施態様として、本発明のモノマーは、下記のような構造:

【0094】

【化5】



を有し、記号R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>はH、NR<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、OR<sup>6</sup>、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキルおよび置換または非置換アリールから独立して選ばれるメンバーを表すものとする。記号X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>およびX<sup>3</sup>はO、NR<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>およびSからなる群から独立して選ばれるメンバーを表す。記号R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、およびR<sup>8</sup>はH、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキルおよび置換または非置換アリールから独立して選ばれるメンバーを表す。

【0095】

今回の好ましい実施態様として、本発明の重合性モノマーは、-シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸、2,5-ジメチタクリロイルオキシ安息香酸、または2,6-ジメチタクリロイルオキシアセトフェノンである。

【0096】

(マトリックス)

10

20

30

40

50

これまでに説明したように、本発明は、EAMから誘導されるサブユニットを含むポリマー・マトリックスを提供する。本発明を実施するのに有用なEAMに対して構造上の制約は殆ど設けない。その最も一般的な実施態様として、本発明のマトリックスは、高フルエンス源（例えば、レーザー、フラッシュランプ）からの光線を吸収して熱エネルギーを発生し、この熱エネルギーを転移して、EAMに接触もしくは近接している被分析分子の脱離およびイオン化を可能にするEAMを含む。このEAMは、当該ポリマーの一体化している共有結合成分とすることができる、あるいはポリマー・マトリックス内に閉じこめられている化学種とすることができる。EAMは、当該ポリマーに共有結合していない場合、静電、イオン、親水または疎水力を介して当該ポリマーと相互作用していることが好ましい。また、EAMは、大きすぎて当該ポリマーから拡散したり出て行くことができないため、当該ポリマー内に閉じこめることができる。

10

## 【0097】

本発明を実施するのに利用できるEAMは、概して、ホモ芳香族核またはヘテロ芳香族核をベースにしている。適切な核としては単環系（例えば、ベンゼン、ピリジン、ピロール、フラン、チオフェン）および多環系があることは、当業者に了解されよう。さらに、芳香族核が多環式である場合、この環系は、縮合型（例えば、ナフタレン、ベンゾフラン）、あるいは別的方式の結合型（例えば、ビフェニル）とすることができる。

20

## 【0098】

芳香族核は、反応性官能基である重合性部分によって官能化される。数多くの官能基がモノマーを重合するのに適切であること、および本発明がこの重合性官能基の性質によって限定されるものではないことは当業者に了解されよう。代表的な重合反応性官能基を以下に説明する。

## 【0099】

反応性官能基（例えば、 $X^1$  および  $X^2$ ）の例としては、

(a) カルボキシル基とその種々の誘導体、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、N-ヒドロキシベンズトリアゾールエステル、酸ハロゲン化物、アシリイミダゾール、チオエステル、p-ニトロフェニルエステル、アルキル、アルケニル、アルキニルおよび芳香族エステル（但し、これらに限定されるものではない）；

(b) ヒドロキシル基であって、エステル、エーテル、アルデヒドなどに変換することができる基；

30

(c) ハロアルキル基であって、ハロゲン化物が後に求核基、例えば、アミン、カルボキシレートアニオン、チオールアニオン、カルボアニオン、もしくはアルコキシドイオンによって置換されてハロゲン原子の位置に新たな基の共有結合を生じる基；

(d) ジエノフィル基であって、例えば、マレイミド基など、ディールス・アルダー反応に関与することができる基；

(e) アルデヒド基またはケトン基であって、イミン、ヒドラゾン、セミカルバゾンもしくはオキシムなどのカルボニル誘導体の形成により、またはグリニヤール付加もしくはアルキルリチウム付加のようなメカニズムにより後に誘導体化が可能であるような基；

(f) ハロゲン化スルホニル基であって、後にアミンと反応して、例えば、スルホニアミドを形成する基；

40

(g) チオール基であって、ジスルフィドに変換することができるか、ハロゲン化アシルと反応することができる基；

(h) アミンもしくはスルフヒドリル基であって、例えば、アシル化もしくはアルキル化することができる基；

(i) 例えば、付加環化、アシル化、マイケル付加などを受けることができるアルケン；

(j) 例えば、アミンおよびヒドロキシル化合物と反応することができるエポキシドが挙げられる。

## 【0100】

反応性官能基は、この関与を目的としていない反応に関与したり妨害したりしないよ

50

うに選ぶことができる。あるいは、反応性官能基は、保護基を付けることにより反応への関与から保護することができる。選択した一連の反応条件に抵触しないよう特定の官能基を保護する方法については当業者に理解されよう。有用な保護基の例については、グリーンほか (Greene et al.)、「有機合成に用いる保護基 (PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS)」、ジョーン・ワイリー・アンド・サンズ (John Wiley & Sons)、ニューヨーク、1991年を参照されたい。

#### 【0101】

本明細書で説明した反応性官能基が本発明のマトリックスを構築するのに有用な一連の官能基のみを表すものであることは、当業者に了解されよう。

10

#### 【0102】

特に好ましい実施態様として、当該反応性官能基は、不飽和の炭素-炭素もしくは炭素-ヘテロ原子結合を含む。さらに好ましい実施態様として、当該反応性官能基は、重合反応に好適である少なくとも1つのビニル基を含む。

#### 【0103】

これらの結合の多くが種々の方法および種々の条件を用いて形成できることは、当業者に容易に了承されよう。エステルの形成については、例えば、マーチ (March) 上記文献 p 1157; チオエステルについてはマーチ (March) 上記文献 p 362-363、491、720-722、829、941および1172; 炭酸エステルについてはマーチ (March) 上記文献 p 346-347; カルバメートについてはマーチ (March) 上記文献 p 1156-57; アミドについてはマーチ (March) 上記文献 p 1152; 尿素およびチオ尿素についてはマーチ (March) 上記文献 p 1174; アセタールおよびケタールについてはグリーンほか (Greene et al.) 上記文献 p 178-210およびマーチ (March) 上記文献 p 1146; アシルオキシアルキル誘導体についてはプロドラッグ: 局所および眼ドラッグ・デリバリー (PRODRUGS: TOPICAL AND OCULAR DRUG DELIVERY)、ケー・ビー・スローン (K. B. Sloan) 編、マーセル・デッカー社 (Marcel Dekker, Inc.)、ニューヨーク、1992年; エノールエステルについてはマーチ (March) 上記文献 p 1160; N-スルホニルイミデートについてはブンドガードほか (Bundgaard et al.)、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (J. Med. Chem.) 31: p 2066 (1988年); 無水物についてはマーチ (March) 上記文献 p 355-56、636-37、990-91および1154; N-アシルアミドについてはマーチ (March) 上記文献 p 379; N-マンニッヒ塩基についてはマーチ (March) 上記文献 p 800-02および828; ヒドロキシメチルケトンエステルについてはペトラセクほか (Petrasek et al.)、アナルズ・ニューヨーク・アカデミー・オブ・サイエンス (Annals NY Acad. Sci.)、507: p 353-54 (1987年); ジスルフィドについてはマーチ (March) 上記文献 p 1160; ならびにホスホン酸エステルおよびホスホンアミデートについては、例えば、引用により本明細書に明確に組み込まれている同時係属出願第07/943, 805号を参照されたい。

20

30

40

#### 【0104】

一部の実施態様として、1段階以上の反応の間1つ以上の活性基を保護してデンドリマーもしくはデンドリマーの複合体を構築する。選択した一連の反応条件に抵触しないよう特定の官能基を保護する方法については当業者に理解されよう。有用な保護基の例については、グリーンほか (Greene et al.)、「有機合成に用いる保護基 (PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS)」、ジョーン・ワイリー・アンド・サンズ (John Wiley & Sons)、ニューヨーク、1991年を参照されたい。

#### 【0105】

例示的な実施態様として、本発明のマトリックスは、フェニル核をベースとする。マト

50

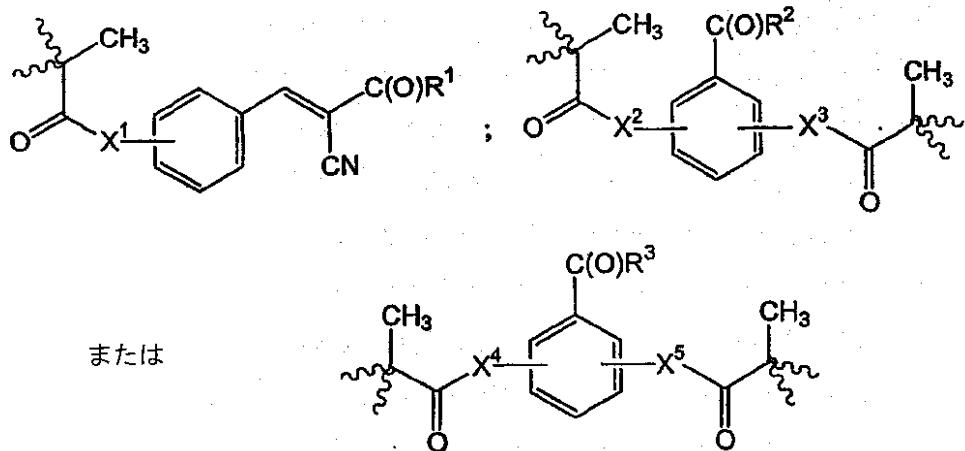
リックス成分の代表的な例は、置換基を有する任意のアリール核を含む部分である。この置換基は、系を含んでいることが好ましい。さらに好ましいのはこの系が当該アリール核の系と共に役する置換基である。本発明のマトリックスに利用できる置換基の例としては、当該アリール核の系に共役するカルボニルおよびカルボキシル基が挙げられる。

## 【0106】

代表的な実施態様として、このマトリックスは、下記構造：

## 【0107】

## 【化6】



10

20

30

を有するEAMを含む。

## 【0108】

上記の式において、記号R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>はH、NR<sup>4</sup> R<sup>5</sup>、OR<sup>6</sup>、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキルおよび置換または非置換アリールから独立して選ばれるメンバーを表す。X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>およびX<sup>3</sup>はO、NR<sup>7</sup> R<sup>8</sup>およびSから独立して選ばれるメンバーを表す。記号R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、およびR<sup>8</sup>はH、置換または非置換アルキル、置換または非置換ヘテロアルキルおよび置換または非置換アリールから独立して選ばれるメンバーである。

## 【0109】

上記の一般構造に含まれる当該ポリマーの成分の例としては、-シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸、2,5-ジメチタクリロイルオキシ安息香酸、2,6-ジメチタクリロイルオキシアセトフェノンおよびこれらの組合せから誘導されるサブユニットが挙げられる。

## 【0110】

一部の実施態様として、マトリックスのあるパーセンテージのEAMを架橋剤により架橋することが好ましい。架橋剤を用いてマトリックスの特性を「最適化」する。EAMを架橋するのに有用などんな架橋剤も本発明のマトリックスを作製するのに用いることができる。好ましい実施態様として、架橋剤は、重合性モノマーとする。好ましい付加重合性架橋前駆物質としては、エチレングリコールジメタクリレート(EGDMA)；エチレングリコールジアクリレート(EGDA)；プロピレングリコールジメタクリレート；プロピレングリコールジアクリレート；ブチレングリコールジメタクリレート；ブチレングリコールジアクリレート；ヘキサメチレングリコールジメタクリレート；ヘキサメチレングリコールジアクリレート；ペンタメチレングリコールジアクリレート；デカメチレングリコールジメタクリレート；デカメチレングリコールジメタクリレート；ビニルアクリレート；ジビニルベンゼン；グリセロールトリアクリレート；トリメチロールプロパントリアクリレート；ペンタエリスリトールトリアクリレート；ポリオキシエチル化トリメチロールプロパントリアクリレートおよびトリメタクリレートならびに米国特許第3,380,831号に開示されている同様な化合物；2,2-ジ(p-ヒドロキシフェニル)-プロパンジアクリレート；ペンタエリスリトール

40

50

テトラアクリレート；2,2-ジ-（p-ヒドロキシフェニル）-プロパンジメタクリレート；トリエチレングリコールジアクリレート；ポリオキシエチル-2,2-ジ-（p-ヒドロキシフェニル）-プロパンジメタクリレート；ビフェノールAのジ-（3-メタクリロキシ-2-ヒドロキシプロピル）エーテル；ビフェノールAのジ-（2-メタクリロキシエチル）エーテル；ビフェノールAのジ-（3-アクリロキシ-2-ヒドロキシプロピル）エーテル；ビフェノールAのジ-（2-アクリロキシエチル）エーテル；テトラクロロビフェノールAのジ-（3-メタクリロキシ-2-ヒドロキシプロピル）エーテル；テトラクロロビフェノールAのジ-（2-メタクリロキシエチル）エーテル；テトラブロモビフェノールAのジ-（3-メタクリロキシ-2-ヒドロキシプロピル）エーテル；テトラブロモビフェノールAのジ-（2-メタクリロキシエチル）エーテル；1,4-ブタジオールのジ-（3-メタクリロキシ-2-ヒドロキシプロピル）エーテル；ジフェノール酸のジ-（3-メタクリロキシ-2-ヒドロキシプロピル）エーテル；トリエチレングリコールジメタクリレート；ポリオキシプロピル1トリメチロールプロパントリアクリレート（462）；1,2,4-ブタントリオールトリメタクリレート；2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジメタクリレート；ペンタエリスリトールトリメタクリレート；1-フェニルエチレン-1,2-ジメタクリレート；ペンタエリスリトールテトラメタクリレート；トリメチロールプロパントリメタクリレート；1,5-ペンタンジオールジメタクリレート；フマール酸ジアリル；1,4-ベンゼンジオールジメタクリレート；1,4-ジイソプロペニルベンゼン；ならびに1,3,5-トリイソプロペニルベンゼンが挙げられる。

10

20

30

40

40

## 【0111】

付加重合性架橋前駆物質のクラスの例としては、炭素数2乃至15個のアルキレングリコールから合成されるアルキレンもしくはポリアルキレングリコールジアクリレートもしくはメタクリレート、またはエーテル結合1乃至10個のポリアルキレンエーテルグリコール、および米国特許第2,927,022号に開示されているもの、例えば、特に末端結合として存在する複数の付加重合性エチレン性結合を有するものがある。このクラスの各化合物は、このような結合の少なくとも1つ、好ましくは大部分が、炭素と二重結合した炭素、窒素、酸素および硫黄のようなヘテロ原子と二重結合した炭素などの二重結合炭素と共にしているものである。また、このような物質で、エチレン性不飽和基、特にビニリデン基がエステルもしくはアミド構造などと共にしているものも含まれる。

## 【0112】

また、本発明のマトリックスは、このポリマー構造内に被分析物に対する結合官能部分を含むことができる。便宜上、この結合官能部分と当該結合官能部分の成分の両者を結合官能部分と呼ぶ。この結合官能部分は、静電的官能部分、疎水性官能部分、水素結合官能部分、配位共有結合官能部分、共有結合官能部分、生体特異的結合官能部分、およびこれらの組合せから選ばれる。

## 【0113】

例示的な実施態様として、この結合官能部分は、被分析物の成分と相互作用する有機官能基を含む。また、例示的な実施態様として、この有機官能基は、アミン、カルボン酸、スルホン酸、アルコール、スルフヒドリルなどの単純な基から選ばれる。薬物、キレート化剤、クラウンエーテル、シクロデキストリンなどによって提示されるようより複雑な化学種によって提示される官能基も利用できる。さらに、例示的な実施態様として、当該結合官能部分は、被分析物の、アミンに結合する構造（例えば、カルボニル基、アルキルハロ基）またはアミンをプロトン化してイオン対を形成する構造（例えば、カルボン酸、スルホン酸）と相互作用するアミンである。別の例示的な実施態様として、当該結合官能部分は、被分析物と相互作用して錯を形成（例えば、金属イオン）し、あるいは被分析物の塩基性基（例えば、アミン）をプロトン化してイオン対を形成するカルボン酸である。

## 【0114】

また、当該有機官能基は、被分析分子を特異的に認識することが可能な有機低分子の成

50

分とすることができます。有機低分子の例としては、アミノ酸、ビオチン、炭水化物、グルタチオン、および核酸が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0115】

結合官能部分として好適なアミノ酸の例としては、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-シスチン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロキシン、D-トリプトファン、L-トリプトファン、L-チロシン、およびL-バリンが挙げられる。代表的なアビジン-ビオチンリガンドとしては、アビジン、ビオチン、デスチオビオチン、ジアミノビオチン、および2-イミノビオチンが挙げられる。代表的な炭水化物としては、グルコースアミン、グリコブリラノース(glycopryranose)、ガラクトースアミン、フコサミン、フコピラノシルアミン、ガラクトシルアミン、グリコピラノシドなどが挙げられる。代表的なグルタチオンリガンドとしては、グルタチオン、ヘキシルグルタチオン、およびスルホプロモタレイン-S-グルタチオンが挙げられる。

【0116】

別の例示的実施態様として、当該結合官能部分は、生体分子、例えば、天然もしくは合成ペプチド、抗体、核酸、サッカライド、レクチン、受容体、抗原、細胞またはこれらの組合せである。従って、例示的実施態様として、当該結合官能部分は、被分析物に対して、または被分析物と構造的に類似の物質に対して產生される抗体である。別の例示的実施態様として、当該結合官能部分は、アビジンまたはその誘導体であり、これらは被分析物のビオチニル化アナログに結合する。さらに別の例示的実施態様として、当該結合官能部分は、核酸であり、これは当該結合官能部分の配列と相補的な配列を有する一本鎖もしくは二本鎖核酸被分析物に結合する。

【0117】

本発明の実施に有用な生体分子は、どんな原料からも得られる。このような生体分子は、天然原料から単離することができ、あるいは合成的方法によって作製することもできる。蛋白質は、天然蛋白質、突然変異体蛋白質あるいは融合蛋白質とすることができる。突然変異は、化学的突然変異誘発、部位特異的突然変異誘発あるいは当業者に知られている他の突然変異誘発手段によって行うことができる。本発明の実施に有用な蛋白質としては、例えば、酵素、抗原、抗体および受容体が挙げられる。抗体は、ポリクロナールまたはモノクロナールとすることができます。

【0118】

結合官能部分が抗体の場合、これを用いて、例えば蛋白質、ペプチド、核酸、サッカライドもしくは薬物のような低分子、除草剤、農薬、工業薬品、微生物、細胞および兵器用薬剤(但し、これらに限定されるものではない)を含む被分析物を識別することができる。特定の分子または微生物に対して抗体を產生させる方法は、当業者によく知られている。1992年9月15日付でフェングほか(Feng et al.)に付与された米国特許第5/147,786号；1994年8月2日付でスタンカーほか(Stanker et al.)に付与された米国特許第5/334,528号；1997年11月11日付でアル-バヤティ・エム・エー・エス(A1-Bayati, M. A. S.)に付与された米国特許第5/686,237号；1996年11月12日付でヘスほか(Hoess et al.)に付与された米国特許第5/573,922号を参照されたい。

【0119】

抗体その他のペプチドは、任意の既知の方法によって吸着剤の薄膜に結合させることができる。例えば、アミン、カルボキシル、スルフヒドリルもしくはヒドロキシル基を介してペプチドを結合させることができる。結合部位は、ペプチド末端もしくはペプチド鎖の内部に位置させることができる。さらに、ペプチド鎖を1箇所以上の部位で誘導体化して鎖に適切な反応基を結合させることができる。クリセイほか(Christey et al.)、ニュークレイック・アシックス・リサーチ(Nucaleic Acids Res

10

20

30

40

50

. ) 24 : p 3031 - 3039 ( 1996 年 ) を参照されたい。また、抗体を表面に結合させる方法も当該分野で知られている。デラマルシェほか ( D e l a m a r c h e e t a l . ) ラングミュア ( L a n g m u i r ) 12 : p 1944 - 1946 ( 1996 年 ) を参照されたい。

【 0120 】

別の例示的実施態様として、本発明のチップは、オリゴヌクレオチド・アレイであって、このアレイ内の各アドレス可能な位置の当該結合官能部分が特定ヌクレオチド配列を有する核酸を含むアレイである。特に、このアレイはオリゴヌクレオチドを含むことができる。例えば、このオリゴヌクレオチドは、対象とする特定の遺伝子配列をカバーするように選ぶことができよう。あるいは、このアレイは、遺伝子発現の解析に有用な c D N A もしくは E S T 配列を含むことができる。

【 0121 】

別の例示的実施態様として、当該結合官能部分は、薬物部分もしくは薬物部分から得られる薬理作用団である。この薬物部分は、すでに臨床使用のために受け入れられている薬剤であってもよく、あるいはその使用が試験的であるか、その活性もしくは作用機序が研究中である薬剤であってもよい。また、当該薬物部分は、特定の疾病状態に対して作用が証明されていてもよく、あるいは特定の疾病状態に望ましい作用を示すとの仮説が立てられているに過ぎないものでもよい。好ましい実施態様として、当該薬物部分は、選択した被分析物と相互作用する能力についてスクリーニングされる予定の化合物である。従って、本発明の実施に有用な薬物部分は、種々の薬理作用を有する広範囲な薬物クラスからの薬物を含む。

【 0122 】

有用な薬剤のクラスの例としては、非ステロイド性抗炎症剤 ( N S A I D S ) が挙げられるが、これに限定されるものではない。 N S A I D S は、例えば、以下のカテゴリーから選ぶことができる：( 例えば、プロピオニ酸誘導体、酢酸誘導体、フェナム酸誘導体、ビフェニルカルボン酸誘導体およびオキシカム ) ；ヒドロコーチゾンなどのステロイド性抗炎症薬；抗ヒスタミン薬 ( 例えば、クロルフェニラミン、トリプロリジン ) ；鎮咳薬 ( 例えば、デキストロメトルファン、コデイン、カルミフェンおよびカルベタベンタン ) ；止痒剤 ( 例えば、メチジリジンおよびトリメブリジン ) ；抗コリン作動薬 ( 例えば、スコポラミン、アトロピン、ホマトロピン、レボドーパ ) ；鎮吐および制吐薬 ( 例えば、シクリジン、メクリジン、クロルプロマジン、ブクリジン ) ；食欲抑制薬 ( 例えば、ベンズフェタミン、フェンテルミン、クロルフェンテルミン、フェンフルラミン ) ；中枢刺激薬 ( 例えば、アンフェタミン、メタンフェタミン、デキストロアンフェタミン、メチルフェニデート ) ；抗不整脈薬 ( 例えば、プロパノロール、プロカインアミド、ジソピラミンド、キニジン、エンカイニド ) ； - アドレナリン遮断薬 ( 例えば、メトプロロール、アセブトロール、ベタキソロール、ラベタロールおよびチモロール ) ；強心薬 ( 例えば、ミルリノン、アムリノンおよびドブタミン ) ；抗高血圧薬 ( 例えば、エナラブリル、クロニジン、ヒドララジン、ミノキシジル、グアナドレル、グアネチジン ) ；利尿薬 ( 例えば、アミロライドおよびヒドロクロロサイアザイド ) ；血管拡張薬 ( 例えば、ジルチアゼム、アミオダロン、イソスプリン、ニリドリン、トラゾリンおよびベラパミル ) ；血管収縮薬 ( 例えば、ジヒドロエルゴタミン、エルゴタミンおよびメチルセルギド ) ；抗潰瘍薬 ( 例えば、ラニチジンおよびシメチジン ) ；麻酔薬 ( 例えば、リドカイン、ブピバカイン、クロルプロカイン、ジブカイン ) ；抗うつ薬 ( 例えば、イミプラミン、デシプラミン、アミトリプチリン、ノルトリプチリン ) ；トランキライザーおよび鎮静薬 ( 例えば、クロルジアゼポキサイド、ベナシチジン、ベンズキナミド、フルラゼバム、ヒドロキシジン、ロキサビンおよびプロマジン ) ；抗精神病薬 ( 例えば、クロルプロチキセン、フルフェナジン、ハロペリドール、モリンダン、チオリダジンおよびトリフルオペラジン ) ；抗微生物薬 ( 抗菌薬、抗真菌薬、抗原虫薬および抗ウイルス薬 ) 。

【 0123 】

本発明の配合物に添合するのに好適な抗微生物薬としては、例えば、 - ラクタム系薬

10

20

30

40

50

物、キノロン系薬物、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、テトラサイクリン、エリスロマイシン、アミカシン、トリクロサン、ドキシサイクリン、カブレオマイシン、クロルヘキシジン、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、クリンダマイシン、エタンプトール、チオニ酸ヘキサミジン、メトロニダゾール、ペニタミジン、ゲンタマイシン、カナマイシン、リネオマイシン、メタサイクリン、メテナミン、ミノサイクリン、ネオマイシン、ネチルミシン、パロモマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン、ミコナゾールおよびアマンファジンの医薬用として許容可能な塩が挙げられる。

【0124】

本発明の実施に利用できるその他の薬物部分としては、抗悪性腫瘍薬（例えば、抗アンドロゲン薬（例えば、リュープロライドもしくはフルタマイド）、殺細胞薬（例えば、アドリアマイシン、ドキソルビシン、タキソール、シクロホスファミド、ブスルファン、シスプラチニン、-2-インターフェロン）、抗エストロゲン薬（例えば、タモキシフェン）、代謝拮抗薬（例えば、フルオロウラシル、メトトレキセート、メルカブトプリン、チオグアニン））が挙げられる。

【0125】

また、当該結合官能部分は、ホルモン剤（例えば、メドロキシプロゲステロン、エストラジオール、リュープロライド、メゲストロール、オクトレオチドもしくはソマトスタチン）；筋弛緩薬（例えば、シンナメドリン、シクロベンザブリニン、フラボキサート、オルフェナドリン、パパベリン、メベベリン、イダベリン、リトドリン、デフェノキシレート、ダンドロレンおよびアズモレン）；鎮痙薬；骨活性薬（例えば、ジホスホネートおよびホスホノアルキルホスフィネート系化合物）；内分泌調節剤（例えば、避妊薬（例えば、エチノジオール、エチニルエストラジオール、ノルエチンドロン、メストラノール、デソゲストレル、メドロキシプロゲステロン）、糖尿病調節薬（例えば、グリブライドもしくはクロルプロパマイド）、テストラクトン、スタノゾロールなどの蛋白同化薬、アンドロゲン（例えば、メチルテストステロン、テストステロンもしくはフルオキシメステロン）、抗利尿薬（例えば、デスモプレシン）およびカルシトニン）を含むことができる。

【0126】

また、エストロゲン（例えば、ジエチルスチルベストロール）、グルココルチコイド（例えば、トリアムシノロン、ベタメタゾンなど）、ノルエチンドロン、エチノジオール、ノルエチンドロン、レボノルゲストレルなどのプロゲステロン；甲状腺剤（例えば、リオチロニンもしくはレボチロキシン）または抗甲状腺剤（例えば、メチマゾール）；抗高プロラクチン血症薬（例えば、カベルゴリン）；ホルモン抑制剤（例えば、ダナゾールもしくはゴセレリン）；子宮収縮剤（例えば、メチルエルゴノビンもしくはオキシトシン）、ならびにミオプロストール、アルプロスタジルもしくはジノプロストーンなどのプロスタグランジンも本発明に利用できる。

【0127】

その他の有用な結合官能部分として、免疫調節薬（例えば、抗ヒスタミン薬、ロドキサミドおよび/またはクロモリンのような肥満細胞安定化薬、ステロイド（例えば、トリアムシノロン、ベクロメタゾン、コチゾン、デキサメタゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ベクロメタゾンもしくはクロベタゾール）、ヒスタミンH<sub>2</sub>拮抗薬（例えば、ファモチジン、シメチジン、ラニチジン）、免疫抑制薬（例えば、アザチオプリン、シクロスボリン）などが挙げられる。スリンダック、エトドラック、ケトプロフェンおよびケトロラックのような抗炎症作用を有する薬剤群も利用できる。本発明と共に利用できるその他の薬物については、当業者に明瞭に理解されよう。

【0128】

当該結合官能部分がキレート化剤のクラウンエーテルもしくはシクロデキストリンである場合、ホスト-ゲスト化学がこの結合官能部分と被分析物との相互作用の中心となる。ホスト-ゲスト化学を利用すると、本発明のデバイス中に高い親和性-部分-被分析物特異性を導くことができる。特定の化合物に結合するこれらの化合物を用いることについては、当業者によく知られている。例えば、ピットほか（Pitt et al.）「鉄過

10

20

30

40

50

負荷治療用キレート化剤のデザイン (The Design of Chelating Agents for the Treatment of Iron Overload)」イノーガニック・ケミストリー・イン・バイオロジー・アンド・メディシン (INORGANIC CHEMISTRY IN BIOLOGY AND MEDICINE)、マーテル・エー・イー (Martell, A. E.) 編、アメリカン・ケミカル・ソサエティ (American Chemical Society)、ワシントン DC、1980年、p 279 - 312; リンドイ・エル・エフ (Lindoy, L. F.) 、ザ・ケミストリー・オブ・マクロサイクリック・リガンド・コンプレックス (THE CHEMISTRY OF MACROCYCLIC LIGAND COMPLEXES)、ケンブリッジ・ユニバーシティ・プレス (Cambridge University Press)、ケンブリッジ、1989年; ダガス・エイチ (Dugas, H.) 、バイオオーガニック・ケミストリー (Bioorganic Chemistry) 、シュプリンガー出版 (Springer-Verlag)、ニューヨーク、1989年、およびこれらに引用されている参考文献を参照されたい。  
 【0129】

さらに、キレート化剤クラウンエーテルおよびシクロデキストリンの他の分子への結合を可能にするいくつかの手段が当業者に利用可能である。例えば、ミアーズほか (Mears et al.) 「生体内キレート結合蛋白質およびポリペプチドの特性 (Properties of In Vivo Chelate-Tagged Proteins and Polypeptides)」、モディフィケーション・オブ・プロテインズ: フード・ニュートリショナル・アンド・ファーマコロジカル・アスペクト (MODIFICATION OF PROTEINS: FOOD, NUTRITIONAL, AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS)、フィーニー・アール・イー (Feeney, R. E.) 、ウィタカー・ジェイ・アール (Whitaker, J. R.) 編、アメリカン・ケミカル・ソサエティ (American Chemical Society)、ワシントン DC、1982年、p 370 - 387; カシーナほか (Kasina et al.) バイオコンジュゲート・ケミストリー (Bioconjugate Chem.) 9: p 108 - 117 (1998年); ソングほか (Song et al.) 、バイオコンジュゲート・ケミストリー (Bioconjugate Chem.) 8: p 249 - 255 (1997年) を参照されたい。  
 【0130】

例示的な実施態様として、当該結合官能部分は、市販の二無水物 (アルドリッチ・ケミカル社 (Aldrich Chemical Co. ) 、ミルウォーキー (Milwaukee) 、WI) を利用して当該基体もしくはスペーサ・アーム上のアミンに結合させるエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) またはジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) などのポリアミノカルボキシレート・キレート化剤である。金属イオンと錯体が形成される場合、その金属キレートは、被分析化学種を識別し結合するのに用いることができるポリヒスチジル標識蛋白質などの標識化学種に結合する。あるいは、この金属自体、またはこの金属と錯体を形成している化学種が被分析物であってもよい。

【0131】  
 別の例示的な実施態様として、当該結合官能部分は、対象被分析物と包摂錯体を形成する。好ましい実施態様として、当該結合官能部分は、シクロデキストリンまたは修飾シクロデキストリンである。シクロデキストリンは、多数の微生物により產生される一群の環状オリゴ糖である。シクロデキストリンは、かご状の形をした環構造を有する。この形によってシクロデキストリンは、多くの種類の分子を内部の空洞に包摂することができる。例えば、ゼトリ・ジエイ (Szejtli, J.) 、シクロデキストリンズ・アンド・ゼア・インクルージョン・コンプレックス (CYCLOCDEXTRINES AND THEIR INCLUSION COMPLEXES) 、アカデミア・クラド (Akademiai Kladó) 、ブタペスト、1982年; およびベンダーほか (Bender et al.) 、シクロデキストリン・ケミストリー (CYCLOCDEXTRIN 50

C H E M I S T R Y ) 、 シュプリンガー出版 ( S p r i n g e r - V e r l a g ) 、 ベルリン、 1978 年を参照されたい。シクロデキストリンは、例えば、薬物、農薬、除草剤、兵器用薬剤など数多くのいろんな有機分子と包摂錯体を形成することができる。テンジャーラほか ( T e n j a r l a e t a l . ) 、 ジャーナル・オブ・ファーマシューティカル・サイエンス ( J . P h a r m . S c i . ) 、 8 7 : p 4 2 5 - 4 2 9 ( 1 9 9 8 年 ) ; ツグールほか ( Z u g h u l e t a l . ) 、 ファーマシューティカル・ディベロップメント・アンド・テクノロジー ( P h a r m . D e v . T e c h n o l . ) 3 : p 4 3 - 5 3 ( 1 9 9 8 年 ) ; およびアルバースほか ( A l b e r s e t a l . ) 、 クリティカル・レビュー・イン・テラピューティック・ドラッグ・キャリア・システムズ ( C r i t . R e v . T h e r . D r u g C a r r i e r S y s t . ) 1 2 : p 3 1 10 1 - 3 3 7 ( 1 9 9 5 年 ) を参照されたい。重要なことであるが、シクロデキストリンは、その包摂錯体中の化合物のエナンチオマーを区別することができる。従って、好ましい一実施態様として、本発明は、エナンチオマーの混合物中の特定のエナンチオマーの検出法を提供する。コッペンホーヘルほか ( K o p p e n h o e f e r e t a l . ) ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー ( J . C h r o m a t o g r . ) A 7 9 3 : p 1 5 3 - 1 6 4 ( 1 9 9 8 年 ) を参照されたい。当該シクロデキストリン結合官能部分は、スペーサ・アームに、もしくは直接基体に結合させることができる。ヤマモトほか ( Y a m a m o t o e t a l . ) 、 ザ・ジャーナル・オブ・フィジカル・ケミストリー ( J . P h y s . C h e m . ) B 1 0 1 : p 6 8 5 5 - 6 8 6 0 ( 1 9 9 7 年 ) を参照されたい。シクロデキストリンを他の分子に結合する方法については、クロマトグラフィーおよび医薬分野の当業者によく知られている。スリーニバサン・ケー ( S r e e n i v a s a n , K . ) ジャーナル・オブ・アプライド・ポリマー・サイエンス ( J . A p p l . P o l y m . S c i . ) 6 0 : p 2 2 4 5 - 2 2 4 9 ( 1 9 9 6 年 ) を参照されたい。

### 【 0 1 3 2 】

別の好ましい実施態様として、当該結合官能部分は、アプタマーおよび特定の被分析物を認識するアプタザイムなどの核酸化学種から選ばれる。

### 【 0 1 3 3 】

#### ( マトリックスの作製 )

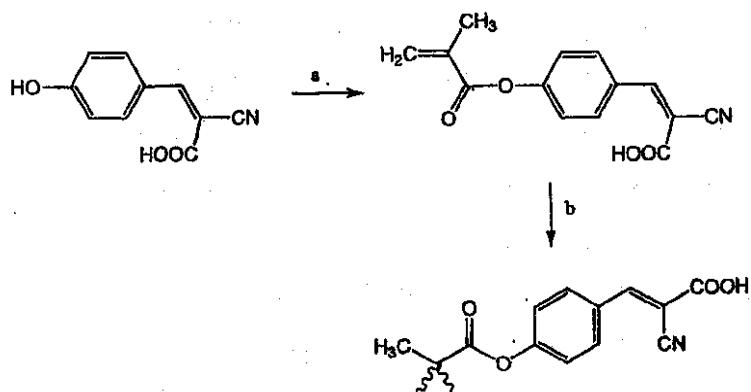
最も一般的な態様のマトリックスの作製は、適切な重合性 E A M モノマーを選び、このモノマーを重合してホモ - もしくはコ - ポリマーを形成するものであり、このポリマーは直鎖または架橋型ポリマーとすることができます。この重合性 E A M モノマーは、市販のモノマーとすることができます、あるいは当業者が容易に利用できる方法によって作製することができます。概して、当該重合性 E A M モノマーは、 E A M 部分および重合性部分を含む。重合性部分は当該分野でよく知られており、例えば、ビニル、アクリルおよびアリル基ならびにこれらの誘導体が挙げられる。

### 【 0 1 3 4 】

1 例として、重合性 C H C A モノマーの作製に導く代表的な手法をスキーム 1 で説明する。

### 【 0 1 3 5 】

## 【化7】



10

## (スキーム1)

スキーム1において、メタクリロイル基のような重合性基を含む基で芳香族核を官能化する。工程aにおいて、ショッテン・バウマン(Shotten-Baumann)の条件(例えば、KOH、アセトン/H<sub>2</sub>O)下で-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸を塩化メタクリロイルで処理する。得られたモノマーは、標準的な方法で精製する。その方法としては、結晶化、沈殿、クロマトグラフィー(例えば、フラッシュ、HPLC、TLC)などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。同様に、当該分野で認められている方法、例えば、NMR、融点、元素分析などによりこのモノマーの性質を決定する。<sup>1</sup>H NMRスペクトル、およびNMRピーク位置を化合物のプロトンと対応付ける表をそれぞれ、図2および図1に示した。

20

## 【0136】

工程bにおいて、上記のメタクリロイル化化合物を単独重合または共重合させる。一部の実施態様の共重合は、ポリ(エチレングリコール)ジメタクリレートなどの架橋剤を用いて進め、架橋型ポリマーを形成する。重合は、過酸化ラウロイルなどの過酸化物を添加することにより開始させる。得られたポリマーは、当該分野で知られている方法、例えば、未反応モノマーの抽出、沈降、結晶化、分別晶出、サイズ排除クロマトグラフィー、透析などにより精製する。また、このポリマーについても、当分野で認められている方法、例えば、NMR、IR、サイズ排除クロマトグラフィー、元素分析などにより性質決定を行う。

30

## 【0137】

本発明は、直鎖および架橋型エネルギー吸収性ポリマーの両者共企図している。本発明の直鎖ポリマーは、ホモポリマーあるいはコポリマーとすることができます。コポリマーには、種々のエネルギー吸収性分子が組み込まれること、エネルギー吸収性分子が、同じ波長のエネルギーを吸収しない「スペーサ・モノマー」(「スペーサ・モノマー・サブユニット」)に対して間隔を置いて配置されること、および結合官能部分を有するモノマーが組み込まれることなどの利点がある。

## 【0138】

例えば、CHCA-MAのようなエネルギー吸収性モノマーを、トランス-3,5-ジメトキシ-4-アクリロイルオキシケイ皮酸のような別のエネルギー吸収性モノマーと共に重合させることができる。また、CHCA-MAのようなエネルギー吸収性モノマーを、アクリル酸もしくはメタクリル酸のようなスペーサ・モノマーと共に重合させることができる。

40

## 【0139】

別の実施例では、エネルギー吸収性モノマーを、結合官能部分を含むモノマーと共に重合させることができる。本発明の一実施態様として、この結合官能部分は疎水性を有する。より詳細には、結合官能部分を含むこのモノマーは、オクタデシル-メタクリレートとすることができる。

## 【0140】

50

本発明の架橋型ポリマーは、エネルギー吸収性モノマーと架橋モノマーを含むコポリマーである。例えば、このような架橋型ポリマーは、CHCA-MAおよびビス-アクリルアミドを含むことができる。別のエネルギー吸収性モノマー、スペーサ・モノマーおよび/または結合官能部分を有するモノマーを含むように、架橋型ポリマーを共重合させることは、明らかであろう。

#### 【0141】

以下に詳細を説明するが、本発明は、直鎖もしくは架橋型ポリマーを、サンプルとの混合前または混合後に、共有結合その他の化学的結合により基体の表面に結合させるか、あるいは基体の表面に塗布することを企図している。当該ポリマーが結合官能部分を含む場合、このポリマーを洗浄してサンプルと接触後未結合の分子を除去することができる。

10

#### 【0142】

分析における本発明のポリマーの有効性については、本発明のポリマーを組み込んでいるチップに、例えばペプチド、核酸などの標準的もしくは既知のサンプルを塗布し、目的とする分析を行うことによって評価することができる。例示的な実施態様として、チップに標準的なペプチド溶液を塗布した後、脱離/イオン化分析を行う。例えば、DHBMA(図4)、DHA Ph e MA(図5)、架橋CHCAMA(図6)、ポリ-DEGDMA-CHCAMA(図7)、ポリ-CHCAMA/DHBMAコポリマー(図8)、2,5-ジメタクリルロイルオキシ安息香酸/アクリル酸コポリマー(図11)およびポリ-2,6-ジメタクリロイルオキシアセトフェノン(図12)を用いてペプチドの質量スペクトルを得た。

20

#### 【0143】

意外にも、脱離/イオン化質量分光分析と併せて本発明のポリマーを用いると、当該分野で認められている低分子マトリックス配合物を用いて得られる結果より優れた結果が得られる。例えば、本発明のポリマーを組み込んだチップを用いて標準的ペプチド溶液を分析すると、バックグラウンド・レベルのより低い質量スペクトル(図9)が、特にスペクトルの低質量領域で得られる(図10)。

#### 【0144】

上記スキームは、本発明の表面増強ニート脱離(SEND)用ポリマー化合物を作製する一般的概念を例示するために提示したものである。本発明の当該ポリマー化合物が、モノマーを重合もしくは共重合するための当該分野で認められている方法により形成することは、当業者によって了解されよう。この重合方法は、いくつかの考え得る手段を用いて遂行することができ、これらの手段としては、遊離基もしくはイオン重合反応、光開始剤による光重合などの均一系もしくは不均一系連鎖重縮合、および付加-脱離反応、付加-置換反応、求核置換反応、多重-結合付加反応などの逐次重合が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明の配合物は、塊状重合、溶液重合、乳化重合、懸濁重合、縮重合などにより作製することができる。好適なモノマーは、利用される重合のタイプによって決まり、所望の性質もしくは結果を得るために適正なモノマーおよび重合条件を選択するのは当業者の能力の範囲内にある。

30

#### 【0145】

合成後のモノマーおよび/または完成ポリマーは、当業者によく知られている種々の化学反応によってさらに改変することができる。例えば、陰イオン交換性を有するマトリックスを得るために、アミノ化または四級化することができる第一級、第二級、第三級、第四級アミンまたはクロロメチル基を有するモノマーと当該モノマーを共重合させることができる。また、陽イオン交換部位を含む類似のSEND用化合物の作製は、いくつかのよく知られている合成スキームによって遂行することができる。同様に、当該モノマーを、スルホン酸もしくはカルボン酸を有するモノマーと共に重合させて陰イオン性化合物を得ることができる。SEND用イオン性化合物を作製する別の異なる方法として、本発明によって合成したモノマーをスチレンモノマーと共に重合し、得られたコポリマーをクロロメチル化もしくはスルホン化またはカルボキシル化を経てさらにアミノ化することによりSEND用イオン性化合物を得ることができる。また、別の代表的な方法は、最初に塩化ビニ

40

50

ルベンジル含有マトリックス成分を硫化ジメチル溶液と反応させる硫化ジメチル置換反応を用いることに依拠している。これにより得られる反応生成物は、スルホニウムをベースとした陰イオン交換性化合物である。次いで、この反応混液に別の陽イオン交換部位生成試薬を加え、これを加熱することによって反応が完結するよう促進することができる。この目的のための試薬の例としてはメルカプトプロピオン酸がある。この酸の溶液を先ずpH約1.1に調整し、次いでスルホニウムをベースとした陰イオン交換性マトリックスの上記懸濁液と混合する。この懸濁液を約70度で所定の時間加熱すると、置換反応が完結し、これにより得られる吸着剤薄膜成分は、弱酸性陽イオン交換マトリックスである。

#### 【0146】

他の結合官能部分を有するSEND用化合物およびSEND用成分を作製するのに同様な反応経路を利用することができる。SEND用化合物およびSEND用成分に対し、選択した結合官能部分を結合させるのに適した反応経路を決定することは、当業者の能力の範囲内にある（例えば、ハーマンソン（Hermannson）、バイオコンジュゲート・テクニクス（BIOCONJUGATE TECHNIQUES）、アカデミック・プレス社（Academic Press）、サン・迭ゴ（San Diego）、1996年；およびダンほか（Dunn et al.）編、ポリメリック・ドラッグズ・アンド・ドラッグ・デリバリー・システムズ（POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS）、ACSシンポジウム・シリーズ（Symposium Series）第469巻、アメリカン・ケミカル・ソサエティ（American Chemical Society）、ワシントンD.C. 1991年参考）。

10

20

30

30

40

50

#### 【0147】

##### （チップ）

また、本発明は、本発明のSEND用化合物を組み込んでいる分析用デバイスをも提供する。本発明は、本発明のSEND用化合物を組み込んでいる種々の分析用デバイスを企図するものである。分析デバイス中に当該SEND用化合物を使用することについては、本明細書では、脱離／イオン化質量分光分析法の基体またはプローブ成分として利用できるチップを参照することによって例示する。以下の説明でチップの形態およびその質量分光分析における使用に焦点を当てるのは、単に説明を明確化するためであり、本発明の範囲を限定するものではない。

#### 【0148】

従って、一態様として、本発明は、表面を有する基体、およびこの表面に結合しているポリマー物質を含むデバイスを提供する。当該ポリマー物質は被分析分子を収容するのに適したものであり、例えば、光反応性ポリマーである。この光反応性ポリマーは、高フルエンス源からの光線を吸収して熱エネルギーを発生し、この熱エネルギーを被分析物に転移してこれの脱離およびイオン化を促進する。

#### 【0149】

概して、本発明のSEND用化合物は、チップ基体の表面に固定される。当該SEND用化合物と当該表面との間の、当該SEND用化合物を当該表面に固定する相互作用は、共有結合性、静電性、イオン性、水素結合性、疎水性-疎水性、あるいは親水性-親水性相互作用とすることができます。この相互作用が非共有結合性の場合、本明細書では「物理的付着」と呼ぶ。

#### 【0150】

##### （基体）

本発明のチップでは、当該SEND用化合物は、基体に対して直接、または基体と当該SEND用化合物の間に挿入するリンカー・アームを介して固定化する。当該SEND用化合物は、基体表面の平面に固定化するか、基体に対し同一平面にあるか、隆起（例えば、島状に）または陥凹（例えば、井戸状、桶状に）していてもよい基体表面の外形構造に結合させる。本発明の実施に有用な基体は、任意の安定な材料または材料の組合せでできたものとすることができます。さらに、任意の都合のよい形状または構造的特徴の組合せを

有するよう有用な基体を構成することができる。当該基体は、剛性または可とう性とすることができる、また、光学的に透明または光学的に不透明なものとすることができます。また、当該基体は、電気的な絶縁体、伝導体または半導体とすることができます。チップに塗布されるサンプルが水をベースとしたものである場合、基体は水溶性であることが好ましい。

### 【 0 1 5 1 】

当該基体を形成する物質は、薄膜、担持粉末 ( supported powders ) 、ガラス、結晶などの種々の物理的形態で用いられる。例えば、基体は、単一の無機酸化物、または 2 種以上の無機酸化物の複合物ならなることができる。基体を形成するのに 2 種以上の成分が用いられる場合、これらの成分は、例えば、重構造 ( 即ち、第 1 の酸化物上に第 2 の酸化物を付着させる ) に構築することができ、あるいは 2 種以上の成分を連続した非重構造に配置することができる。さらに、これらの基体を、液体、蒸気および / または気体に対して実質的に非透過性とすることができます、あるいはこれらの基体を、このようなクラスの物質の 1 種以上に対して透過性とすることができます。さらに、1 種以上の成分を種々の大きさの粒子として混合し、ガラス、石英もしくは金属シートのような担体に付着させることができます。さらに、1 種以上の成分の 1 層を 2 つの他の基体層の間に挿入することができる ( 例えば、金属 - 酸化物 - 金属、金属 - 酸化物 - 結晶 ) 。当業者は、特定の用途のための適切な材料から作製した適当な構成の基体を選ぶことができる。

### 【 0 1 5 2 】

基体材料の例としては、無機結晶、無機ガラス、無機酸化物、金属、有機ポリマーおよびこれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されるものではない。当該基体において利用できる無機ガラスおよび結晶としては、LiF、NaF、NaCl、KBr、KI、CaF<sub>2</sub>、MgF<sub>2</sub>、HgF<sub>2</sub>、BN、AsS<sub>3</sub>、ZnS、Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>、AlNなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらの結晶およびガラスは、当該分野の標準的な技術により作製することができる。例えば、グッドマン (Goodman) 、クリスタル・グロース・セオリー・アンド・テクニクス (CRYSTAL GROWTH THEORY AND TECHNIQUES) 、プレナム出版 (Plenum Press) 、ニューヨーク 1974 年を参照されたい。あるいは、これらの結晶は、市販品 ( 例えば、フィッシャー・サイエンティフィック社 (Fischer Scientific) ) を購入することができる。本発明において利用できる無機酸化物としては、Cs<sub>2</sub>O、Mg(OH)<sub>2</sub>、TiO<sub>2</sub>、ZrO<sub>2</sub>、CeO<sub>2</sub>、Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、NiO、ZnO、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、SiO<sub>2</sub> ( ガラス ) 、石英、In<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、SnO<sub>2</sub>、PbO<sub>2</sub>などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明の基体において利用できる金属としては、金、銀、白金、パラジウム、ニッケル、銅および合金ならびにこれらの金属の複合物が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

### 【 0 1 5 3 】

また、金属は、本発明の基体としても利用できる。この金属は、結晶、シートあるいは粉末として用いることができる。金属が別の基体成分との重構造をとる実施態様として、当業者に知られている方法により金属をもう一方の基体上に付着させることができ、この方法としては、蒸着、スパッタリングおよび無電解メッキが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

### 【 0 1 5 4 】

当該金属層は、液体、溶液、蒸気および気体のような物質に対して透過性または非透過性とすることができます。この場合の好ましい金属としては、金、銀、白金、パラジウム、ニッケル、アルミニウム、銅、ステンレス鋼、および他の鉄合金が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

### 【 0 1 5 5 】

有用な基体を形成する有機ポリマーとしては、例えば、ポリアルルケン ( 例えば、ポリエチレン、ポリイソブテン、ポリブタジエン ) 、ポリアクリル ( 例えば、ポリアクリレート、ポリメチルメタクリレート、ポリシアノアクリレート ) 、ポリビニル ( 例えば、ポリビ

10

20

30

40

50

ニルアルコール、ポリビニルアセテート、ポリビニルブチラール、塩化ポリビニル)、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリウレタン、ポリアミド、ポリイミド、ポリスルホン、ポリシロキサン、ポリヘテロサイクル、セルロース誘導体(例えば、メチルセルロース、酢酸セルロース、ニトロセルロース)、ポリシラン、フッ化ポリマー、エポキシド、ポリエーテルおよびフェノール樹脂が挙げられる。

【0156】

好みの実施態様として、基体物質は、被分析物に対して実質的に非反応性であり、従って、基体と、被分析物もしくはアッセイ混合物中の他の成分との間の非特異的な結合は防止される。非特異的な結合を防止する物質で基体をコーティングする方法については、当該分野で広く知られている。コーティング剤の例としては、ウシ血清アルブミン、およびポリ(エチレングリコール)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。特定の用途に適したコーティング剤については、当業者には明らかであろう。

10

【0157】

さらに好みの実施態様として、基体物質は、実質的に非蛍光性であり、あるいは被分析物の検出を妨害する波長範囲の光を発しない。低バックグラウンドの基体の例としては、カサンほか(Cassin et al.)の米国特許第5,910,287号およびファムほか(Pham et al.)の米国特許第6,063,338号に開示されているものが挙げられる。

20

【0158】

本発明を実施するのに利用できる基体の表面は、平滑面、粗面および/またはパターン面とすることができます。このような表面は機械工学的および/または化学的技術を利用して作ることができる。例えば、摩擦、エッティング、溝削り、延伸、および金属薄膜の斜め蒸着によって表面を粗面化またはパターン面化する。また、フォトリソグラフィ(クレインフィールドほか(Kleinfield et al.)、ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス(J. Neurosci.)8:p4098-120(1998年)、フォトエッティング、化学エッティングおよびマイクロコンタクト・プリンティング(クマールほか(Kumar et al.)、ラングミュア(Langmuir)10:p1498-511(1994年))などの技法を用いて基体をパターン面化することができる。基体面にパターンを形成するその他の技法についても当業者には容易に理解されよう。

30

【0159】

当該パターンのサイズおよび複雑さは、利用する技法の解像力(resolution)および目的とする当該パターンの効果によってのみ制限される。例えば、マイクロコンタクト・プリンティング法を用いて、基体面に200nm程度の微小な外形構造が重層されている。キシア・ワイ(Xia, Y.)、ホワイトサイズ・ジー(White sides, G.)、ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ(J. Am. Chem. Soc.)117:p3274-75(1995年)を参照されたい。同様に、フォトリソグラフィ法を用いて、1μm程度の微小な外形構造のパターンが作られている。ヒックマンほか(Hickman et al.)、ザ・ジャーナル・オブ・バキューム・サイエンス・アンド・テクノロジー(J. Vac. Sci. Technol.)12:p607-16(1994年)を参照されたい。本発明において有用なパターンとしては、窪み(well)、筐体、隔壁(partition)、陥凹(recess)、入口、出口、溝、トラフ、回析格子などが挙げられる。

40

【0160】

例示的実施態様として、このパターン化により、検出手段を用いて各外形構造が別々に識別可能である複数の隣接するアドレス可能な外形構造を有する基体を作製する。別の例示的実施態様として、アドレス可能な外形構造は、他の隣接外形構造と流体的に連通しない。従って、特定の外形構造に入った被分析物その他の物質は、この外形構造に実質的に閉じこめられたままとなる。別の好みの実施態様として、このパターン化により、流体がデバイスに入り、および/または出るデバイスを通る溝を作ることができる。

50

【0161】

S E N D 用化合物、リンカー・アームまたはこれらの組合せを基体面にプリントする実施態様として、当該パターンを基体面に直接プリントするか、あるいは「リフトオフ」技法を用いることができる。リフトオフ技法では、基体表面にパターン化レジストを置き、このレジストに覆われていない領域にチップの成分を載せ、その後、レジストを除去する：レジストについては当業者に知られている。例えば、クレインフィールドほか ( K l e i n f i e l d e t a l . ) 8 : p 4 0 9 8 - 1 2 0 ( 1 9 9 8 年 ) を参照されたい。一部の実施態様として、上記レジストを除去した後、最初このレジストに覆われていた領域の基体面に、上記の第 1 の成分層と異なる構造を有する第 2 のチップ成分をプリントする；これは、所望の様式を有するチップを得るために種々の成分を用いて、選ばれたどんな回数でも繰り返すことのできる工程である。

10

## 【 0 1 6 2 】

上記に説明した技法を用いると、種々の化学的特性の領域を有するパターン面を持つ基体を作製することができる。従って、例えば、パターン成分の疎水性 / 親水性、電荷その他の化学的特性を変化させることによって、隣り合った別個のいろんな外形構造を有するパターンが作製される。例えば、疎水性物質からなる隣り合う外形構造間に「壁」のパターンを形成することによって、親水性化合物を個々の親水性外形構造に閉じこめることができる。同様に、正または負の電荷の化合物を、この化合物と同様な電荷を持つ化合物でできた「壁」を有する外形構造に閉じこめることができる。同様な基体構成は、所望の特性を有する層を直接基体面にマイクロプリントングすることによっても入手可能である。マーキッシュ・エム ( M r k i s h , M . ) 、ホワイトサイズ・ジー・エム ( W h i t e s i d e s , G . M . ) 、アニユアル・レビュー・オブ・バイオフィジックス・アンド・バイオモレキュラー・ストラクチャー ( A n n . R e v . B i o p h s . B i o m o l . S t r u c t . ) 2 5 : p 5 5 - 7 8 ( 1 9 9 6 年 ) を参照されたい。

20

## 【 0 1 6 3 】

チップ基体中に空間的コード化 ( 例えば、スポット・マイクロアレイ ( s p o t t e d m i c r o a r r a y ) ) を組み込むことにより、本発明のチップの特異性および多重化能を増大させることが出来る。空間的コード化は、本発明のチップのそれぞれに導入することができる。例示的な実施態様として、当該チップ表面全体に種々の被分析物に対する結合官能部分を配列することにより、特定のデータコード ( 例えば、被分析物を結合する官能部分の特異性 ) を各位置で再利用することができる。この場合、配列位置は、付加的なコード化パラメータであり、これにより事実上無数の異なる被分析物を検出することができる。

30

## 【 0 1 6 4 】

空間的コード化を利用する本発明の実施態様として、好ましくは、基体の  $m$  個の領域に分布した  $m$  個の結合官能部分を含む空間的にコード化したアレイを利用する。 $m$  個の結合官能部分のそれぞれは、異なる官能部分もしくは同じ官能部分とすることができます、あるいは種々の官能部分を当該表面にパターンを形成して配列することができる。例えば、アドレス可能な位置の S E N D 用化合物アレイの場合、単一の行または列のすべての位置は、同じ結合官能部分を有することができる。好ましくは、これら  $m$  個の結合官能部分は、その  $m$  個の位置のそれぞれの同一性を確認することができるよう、基体面にパターン化する。好ましい実施態様として、 $m$  個の結合官能部分は、 $( p \times q )$  個の別々の位置の  $q$  分の  $p$  個の S E N D 用化合物の形で配列し、 $( p \times q )$  個の位置のそれぞれには  $m$  個の結合官能部分の少なくとも 1 個が結合しているものとする。このマイクロアレイは本質的にどのタイプの結合官能部分からもパターン化することができる。

40

## 【 0 1 6 5 】

この空間的にコード化されたアッセイ基体は、本質的にどんな数の化合物も含むことができる。当該結合官能部分がポリヌクレオチド ( オリゴヌクレオチドもしくは核酸 ) またはポリペプチドである実施態様として、 $m$  は 1 乃至 1 0 0 、より好ましくは 1 0 乃至 1 , 0 0 0 、さらに好ましくは 1 0 0 乃至 1 0 , 0 0 0 の数である。

50

## 【0166】

特に好ましい実施態様として、当該基体は二酸化ケイ素の層で被覆されたアルミニウム担体を含む。さらに好ましい実施態様として、この二酸化ケイ素の層の厚さは約1000乃至3000である。当該二酸化ケイ素は、ポリマーをチップの表面に結合もしくは固定する機能を果たすことができる-OH反応基をもたらすことが出来る。

## 【0167】

上記その他の方法が核酸の他に多種多様な化合物のアレイを作製するのに有用であり、核酸の他に多種多様な化合物のアレイを作製するのに有用であることは、当業者によって了解されよう。

## 【0168】

## (被分析物)

本発明のデバイスおよび方法は、検出可能なように結合官能部分と相互作用する任意の被分析物もしくは任意のクラスの被分析物を検出するのに用いることができる。被分析物と結合官能部分との相互作用は、共有結合、イオン結合、水素結合、ファンデルワールス相互作用、電子的引力相互作用および疎水性/親水性相互作用など、任意の物理化学的相互作用とすることができます。

## 【0169】

例示的実施態様として、当該相互作用は、イオン性相互作用である。この実施態様では、酸、塩基、金属イオンもしくは金属イオン結合リガンドが被分析物である。別の例示的実施態様として、当該相互作用は、水素結合相互作用である。

## 【0170】

好ましい実施態様として、被分析分子は、ポリペプチド(例えば、ペプチドもしくは蛋白質)、ポリヌクレオチド(例えば、オリゴヌクレオチドもしくは核酸)、炭水化物(例えば、単炭水化物、複合糖質)、または脂質(例えば、脂肪酸もしくはポリグリセリド、リン脂質など)のような生体分子である。蛋白質の場合、被分析物の性質は、結合官能部分の性質によって決まることがある。例えば、結合官能部分としてのリガンドの受容体を用いてリガンドを捕獲する、例えば、抗原に対する抗体を用いて抗原を、または基質に作用する酵素を用いて基質を捕獲することができる。

## 【0171】

被分析物は、血液、血清、唾液、尿、精液、精漿、リンパ液などの体液を含むどんな種類の生体原料からも得ることができる。また、これは、細胞ライセート、細胞培養メジウムなどの生体サンプルからの抽出物も含む。例えば、細胞ライセートサンプルは、例えば、一次組織もしくは細胞、培養組織もしくは細胞、正常組織もしくは細胞、病変組織もしくは細胞、良性組織もしくは細胞、癌組織もしくは細胞、唾液腺組織もしくは細胞、腸管組織もしくは細胞、神経組織もしくは細胞、腎組織もしくは細胞、リンパ組織もしくは細胞、膀胱組織もしくは細胞、前立腺組織もしくは細胞、尿生殖器組織もしくは細胞、腫瘍組織もしくは細胞、腫瘍新生血管組織もしくは細胞などから、必要に応じて得られる。

## 【0172】

別の実施態様として、被分析物は、酸、塩基、有機イオン、無機イオン、医薬、除草剤、農薬、および毒ガスからなる群から選ばれる物質である。これらの被分析物はそれぞれ、気体または液体として検出することができる。当該被分析物は、構造的に関連のない化合物の混合物、アッセイ混合物、立体異性体のラセミ混合物、立体異性体の非ラセミ混合物、ジアステレオマーの混合物、位置異性体の混合物の1成分として、あるいは純粋な化合物として存在することができる。混合物内の他の物質からの妨害を受けないで特定の対象被分析物を検出する方法は、本発明の範囲内にある。

## 【0173】

当該被分析物は、発蛍光団その他の検出可能な基を用いて直接的に、あるいは検出可能な基が結合している別の化学種との相互作用を介して間接的に標識することができる。別の標識化化学種が間接的標識剤として用いられる場合、これは被分析化学種と相互作用することが知られている任意の化学種から選ばれる。好ましい別の標識化化学種としては、

10

20

30

40

50

抗体、アプタザイム、アプタマー、ストレプトアビジン、およびビオチンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0174】

被分析分子の標識は、これが結合官能部分と相互作用する前または後に行うことができる。また、被分析分子は、1種の検出可能な基または2種以上の検出可能な基で標識することができる。被分析化学種を2種以上の検出可能な基で多重標識する場合、これらの基は互いに識別できることが好ましい。

【0175】

実質的に非酸性および非塩基性の有機塩（例えば、第四級アルキルアンモニウム塩）は、結合官能部分により検出することができる。例えば、イオン交換性を有する結合官能部分は、本発明において有用である。具体的な例としては、負電荷の化学種を提示するスペーサ・アームを用いた、ドデシルトリメチルアンモニウム陽イオンなどの陽イオンのナトリウムなどの金属イオンとの交換がある。また、有機陽イオンと包摶錯体を形成する結合官能部分も利用できる。例えば、クラウンエーテルおよびクリプタンドを用いて第四級アンモニウム陽イオンなどの有機イオンと包摶錯体を形成することができる。

【0176】

また、金属イオンおよび錯イオンのような無機イオン（例えば、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ ）も本発明のデバイスおよび方法を用いて検出することができる。例えば、吸着剤層に結合した物質による錯化もしくはキレート化によって金属イオンを検出することができる。この実施態様では、当該結合官能部分は、単純な錯化部分（例えば、カルボキシレート、アミン、チオール）とすることができる、あるいはさらに構造の複雑な物質（例えば、エチレンジアミン五酢酸、クラウンエーテル、アザクラウン、チアクラウン）とすることもできる。

【0177】

無機錯イオンは、例えば、リガンド-金属錯体中の結合金属イオンのリガンドと競合する能力によって検出することができる。スペーサ・アームもしくは基体に結合したリガンドが、金属と錯イオンの錯体より低い熱力学的安定度定数を有する金属錯体を形成している場合、この錯イオンは固定化リガンド上の金属イオンに置き換わることになる。金属イオンとリガンドとの間に形成される化合物の安定度定数を測定する方法については、当業者によく知られている。この安定度定数を用いて、特定のイオンに特異的な親和性部分を含む基体を作製することができる。マーテル・エー・イー（Martell, A. E.）、モテカイティス・アール・ジェイ（Moteckaitis, R. J.）、デターミネーション・アンド・ユース・オブ・スタビリティ・コンスタンツ（DETERMINATION AND USE OF STABILITY CONSTANTS）、第2版、VCHパブリッシャーズ（VCH Publishers）、ニューヨーク、1992年を参照されたい。

【0178】

農薬、除草剤などの低分子は、いくつかの異なる結合官能部分モチーフを用いることによって検出することができる。酸性または塩基性成分は上述のようにして検出することができる。また、被分析物の金属結合能も、錯イオンについて前述したように、都合よく用いることができる。さらに、この被分析物が特定されている生体構造体（例えば、受容体）に結合する場合、この受容体は、基体のスペーサ・アームに固定化することができる。また、特定の化学種に対して高度に特異的な抗体を産生させる技術も当該分野で利用可能である。従って、低分子、農薬、兵器用薬剤などに対する抗体をこれらの物質の検出のために利用することは、本発明の範囲内にある。除草剤および農薬に対する抗体を産生させる技術については、当業者に知られている。ハーロー（Harlow）、レイン（Lane）、モノクロナール・アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル（Monoclonal Antibodies: A Laboratory Manual）、コールド・スプリングス・ハーバー・ラボラトリー（Cold Springs Harbor Laboratory）、ロングアイランド（Long Island）、ニュー

10

20

30

40

50

ヨーク、1988年を参照されたい。

【0179】

別の例示的実施態様として、固定化結合官能部分に結合することにより検出される被分析物は、殺虫剤などの有機リン化合物である。

【0180】

(チップの作製方法)

別の態様として、本発明は、SEND用化合物および本発明のチップの作製方法を提供する。前記に説明したように、当該SEND用化合物は、実質的にあらゆる適切なEAMもしくはEAMの組合せから形成することができる。さらに、当該SEND用化合物は、ホモポリマーもしくはコポリマーとすることができます。架橋型ポリマーも本発明のSEND用化合物として有用である。

【0181】

本発明のチップの作製方法は、上記で説明したような被分析物収容性およびエネルギー吸収性を有するEAMを含むポリマーを基体上に付着させることを包含する。当該ポリマーは、インサイチュでチップ上に、あるいはチップ上に付着させる前に形成することができる。

【0182】

従って、例示的な実施態様として、本発明は、被分析分子のレーザー脱離分析との併用で用いるデバイスの作製方法を提供する。この方法は、光反応性ポリマーの第1の重合性モノマー前駆体を含むポリマー前駆体を基体の表面と接触させ、このモノマー性前駆体を重合することによって光反応性ポリマーの層を形成することを含む。一般に、当該SEND用化合物は、化学的もしくは物理的相互作用を介して基体に付着させる。

【0183】

上記で説明した方法の例示的な実施態様として、さらに、当該ポリマー前駆体は、当該光反応性ポリマーの第2の重合性モノマー前駆体を含む。この第2の重合性モノマー前駆体の構造は、第1の構造とは異なる。例えば、当該第2のモノマー性前駆体は、重合性モノマー性光反応性化学種、重合性被分析物結合性化学種、重合性架橋性化学種およびこれらの組合せから選ぶことができる。

【0184】

別の例示的実施態様として、本発明は、本発明のチップを作製する別の方法を提供する。この方法は、基体の表面を第1のポリマー性光反応性化学種を含む光反応性ポリマーと接触させることを包含する。上記で説明した方法と同様に、一般に、当該方法も、化学的もしくは物理的相互作用を介して基体に当該ポリマーを結合させることを含む。

【0185】

さらに別の例示的実施態様として、本発明のチップは、本発明のポリマーマトリックスを基体表面に付着させた後に洗浄する。洗浄工程は、水、または有機溶媒、例えば、アルコール、エーテル、エステル、DMF、ハロカーボン(例えば、CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>、HCCCL<sub>3</sub>、CCL<sub>4</sub>)、アミドなどのような溶媒を用いて行う。当該洗浄工程は、例えば、チップから試薬、反応物および低分子もしくは重合不完全な化学種を除去したり、当該ポリマー・マトリックスを膨潤もしくは収縮させたりするのに有用である。これに対して、MALDIおよびSELDIに使用されるマトリックスをこのような洗浄工程によりチップから除去すると、分析に対するマトリックスの有益な効果が失われる。

【0186】

上記で説明した方法では、当該光反応性ポリマーは、必要に応じて、当該第1のポリマー性光反応性前駆体と異なる構造を有する第2のポリマー化学種を含む。例えば、この第2のポリマー性化学種は、第2のポリマー性光反応性化学種、ポリマー性被分析物結合性化学種、ポリマー性架橋性化学種およびこれらの組合せから選ぶことができる。

【0187】

(アッセイ)

本発明のチップは、実質的にどんな方式のアッセイを実施するのにも有用であり、この

アッセイ方式としては、クロマトグラフ捕獲、イムノアッセイ、競合アッセイ、DNAもしくはRNA結合アッセイ、蛍光インジツツ(in situ)ハイブリダイゼーション(FISH)、蛋白質および核酸解析アッセイ、サンドイッチ・アッセイなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

## 【0188】

従って、別の態様として、本発明は、サンプルを検出または分析する方法を提供する。この方法は、本発明のポリマー性SEND用化合物を含むチップからサンプルを脱離およびイオン化することを包含する。このSEND用化合物はEAMを含む。当該SEND用化合物は、チップへの付着前に形成されるか、インサイチュでチップ上に形成される別個のポリマーである。あるいは、本発明のポリマー物質、特に直鎖ポリマーは、(例えば、混合された)被分析分子と接触させ、後の検出のための化学的結合を行わないで質量分析プローブの表面にセットすることができる。一部の実施態様として、本発明のポリマー物質は、MALDIの遂行に用いられる従来のマトリックス物質に取って代わって、特に低分子量範囲における検出を向上させることができる。その他の実施態様として、このポリマー物質は、SELDI(表面増強レーザー脱離/イオン化)質量分析実施用の結合官能部分を含む。(例えば、米国特許5,719,060号(ハッテンズ(Hutchens)、イップ(Yipp)参照)。

## 【0189】

以下に、例示的アッセイを実施する際の本発明の方法の利用に焦点を当てて説明する。このように焦点を当てるのは、単に説明を明確化するためであり、本発明の範囲を規定または限定するものではない。本発明の方法が、対象物の有無および/または量を検出するどんなアッセイ手法にも広く適用できることは、当業者によって了解されよう。

## 【0190】

本発明のチップは、保持物質(retentate)クロマトグラフィーを実施するのに有用である。保持物質クロマトグラフィーは、生物学および医学において多くの用途がある。これらの用途としては、被分析物の組み合わせ(combinatorial)生化学的分離および精製、生体サンプルの蛋白質解析、識別的蛋白質発現および分子認識事象の研究、診断ならびに創薬が挙げられる。保持物質(retentate)クロマトグラフィーについては、ハッテンズ(Hutchens)、イップ(Yipp)、米国特許第6,225,047号に開示されている。

## 【0191】

分析手段としての保持物質クロマトグラフィーの1つの基本的な用途は、サンプルに対し種々の組み合わせの異なる吸着剤/溶離剤併用を行い、種々の条件下で被分析物の挙動を検出するものである。これにより、被分析物を精製すると共に、サンプル中の被分析物検出に有益な条件を特定する。こうして特定した吸着剤を有する基体は、被分析物の特異的な検出器として使用することができる。連続的な抽出方法では、サンプルに第1の吸着剤/溶離剤の組み合わせを作用させ、第1の吸着剤により吸着される被分析物を欠くこの洗浄物に、これからその他の被分析物を枯渇させるための第2の吸着剤を作用させる。また、被分析物を保持するために特定した選択性条件は、被分析物を含む不純なサンプルにこれを保持する吸着諸剤に逐次作用させ、不純物を除去し、保持された被分析物をその後のラウンドのために吸着剤から回収する調製的な精製方法においても用いることができる。例えば、米国特許第6,225,047号を参照されたい。

## 【0192】

本発明のチップは、溶液からの被分析物の逐次的な抽出、サンプル中の被分析物の連続的な分離、被分析物の調製的精製、被分析物の特異的検出プローブの作製、蛋白質の同定方法、多量体分子の構築方法、酵素アッセイの実施方法、生体原料間で異なった形で発現される被分析物の同定方法、受容体に対するリガンドの同定方法、創薬のための方法(例えば、スクリーニング・アッセイ)、および被分析物を特異的に結合する物質の作製方法などの用途に有用である。

## 【0193】

10

20

30

40

50

その他の用途として、特異的結合反応に基づくチップ・ベースのアッセイは、薬物、ホルモン、酵素、蛋白質、抗体、ならびに種々の生体液および組織サンプル中の病原菌などの多種多様な対象物を検出するのに有用である。一般に、このアッセイは、対象物、対象物に対する結合官能部分、およびこの結合官能部分による固定化後の対象物の検出手段（例えば、検出可能な標識）からなる。免疫学的なアッセイは、種々の化合物および物質（抗原）の特異的な抗原決定基と結合することができる免疫グロブリン（抗体）間の反応を必要とする。その他のタイプの反応としては、アビシンとビオチン間、プロテインAと免疫グロブリン間、レクチンと糖部分間の結合などが挙げられる。例えば、リューベリング（Leuvering）に付与された米国特許第4,313,734号；ズク（Zuk）に付与された米国特許第4,435,504号；ゴードン（Gordon）に付与された米国特許第4,452,901号および第4,960,691号；ならびにキャンベルに付与された米国特許第3,893,808号を参照されたい。10

#### 【0194】

本発明は、サンプル中の対象物の有無を確認し、サンプル中の対象物を定量するのに有用なアッセイを行うのに役立つチップを提供する。本発明を利用できるアッセイ方式の例としては、競合アッセイなどのイムノアッセイ、およびサンドイッチ・アッセイがある。これらの2つのアッセイ方式を用いて本発明をさらに説明する。以下の説明では、競合アッセイおよびサンドイッチ・アッセイに焦点を当てているが、これは説明を明確化するためであり、本発明の範囲を規定または限定するものではない。本明細書に開示した本発明が、いくつかの他のアッセイ方式との併用で実施し得ることは、当業者によって了解されよう。20

#### 【0195】

競合的結合アッセイの例では、うち1種が対象物である2種の化学種が吸着剤の薄膜表面の結合官能部分に対して競合する。インキュベーション期間の後、未結合物質を洗い流し、当該官能部分に結合した対象物その他の化学種の量について、アッセイ混合物中の対象物その他の化学種の濃度測定のための基準量と比較する。標識化対象物および/または標識化結合官能部分および/または標識化試薬を用いるその他の競合アッセイモチーフについては、当業者によって明瞭に理解されよう。

#### 【0196】

もう一つのタイプのアッセイは、サンドイッチ・アッセイと呼ばれ、概して、対象物に免疫学的に特異的な第1の結合官能部分を固定化した表面に対して、アッセイ混合液を接触させるものである。次いで、検出可能な結合性物質を含む別の溶液をこのアッセイ混合液に加える。この標識化結合性物質は、結合官能部分に結合している対象物と結合することになる。次に、このアッセイ系を、対象物と結合しなかった標識化結合性物質を除去する洗浄工程にかけると、チップ上に残っている検出可能な物質の量は、通常、結合した対象物の量に比例する。代表的なアッセイでは、対象物、結合官能部分もしくは結合性物質のうちの1種以上を蛍光標識で標識する。30

#### 【0197】

結合官能部分と対象物との相互作用を検出することの他に、2種以上の結合相手物質間の親和性の大きさを定量することを目的とする場合が多い。2種の分子の親和性データを引き出すためのアッセイの方式については、受容体に結合することが知られているリガンドが、その受容体に対する抗体によって置換される実施態様を参照することにより理解することができる。この方式に対して他の変更態様があり得ることは、当業者に明瞭に理解されよう。当該競合方式については当業者によく知られている。例えば、米国特許第3,654,090号および第3,850,752号を参照されたい。40

#### 【0198】

受容体に対する抗体の結合については、その受容体のリガンドおよび抗体を用いる競合的結合方法によってアッセイすることができる。3種の結合相手物質（即ち、リガンド、抗体または受容体）のうちの1種は当該結合官能部分に結合するか、当該結合官能部分である。例示的な実施態様として、この受容体を、当該吸着剤薄膜に結合させる。異なるチ50

ップ領域に種々の濃度のリガンドを添加する。次いで、検出可能な抗体を、選択した最終濃度となるよう各領域に塗布する。通例、こうして処理したチップは、事前に選択した時間の間、室温でインキュベーションすることになる。当該受容体結合抗体は、ろ過、洗浄もしくはこれらの手法の組み合わせにより未結合抗体から分離することができる。チップ上に残った結合抗体は、本明細書に説明したようにして、測定することができる。この一般的な実験方法に対していくつかの変更例があり得ることは、当業者に明瞭に理解されよう。

#### 【0199】

競合結合のデータについては、非線形最小二乗法による曲線あてはめ法などのいくつかの手法により解析することができる。リガンドが受容体の抗体である場合、この方法により、抗体のIC50（平衡状態でリガンドの特異的結合を50%抑制する抗体の濃度）が得られる。このIC50は、チエン（Cheng）およびプラソフ（Prusoff）の方程式： $K_i = IC50 / (1 + L / K_d)$ （式中、Lは競合的結合アッセイに用いられるリガンドの濃度であり、Kdはスキヤチャード（Scatchard）解析により求められるリガンドの解離定数である）に基づく抗体の平衡解離定数（Ki）に関連づけられる。これらのアッセイについては、特に、マドックスほか（Maddox et al.）、ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン（J. Exp. Med.）、158: p1211（1983年）；ハンプトンほか（Hampton et al.）、セロロジカル・メソッド、ア・ラボラトリー・マニュアル（SEROLOGICAL METHODS, A LABORATORY MANUAL）、APS出版（APS Press）、セントポール（St. Paul）、ミネソタ（Minn.）、1990年に開示されている。

#### 【0200】

また、本発明のチップおよび方法は、コンビナトリアル・ライブラリなどの化合物のライブラリをスクリーニングする際に利用できる。現在、新規な生物活性および材料科学特性（material science properties）を有する化合物を同定するための化学ライブラリの合成およびスクリーニングはかなり普及している。合成されたライブラリとしては、例えば、オリゴヌクレオチド、オリゴペプチドならびに低および巨大分子量有機または無機分子のコレクションが挙げられる。モランほか（Moran et al.）の1997年9月25日付で公開されたPCT公開第WO96/35198号；バインデュールほか（Baindur et al.）の1996年12月19日付で公開されたPCT公開第WO96/40732号；ギャロップほか（Gallop et al.）、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー（J. Med. Chem.）37: p1233-51（1994年）を参照されたい。

#### 【0201】

ペプチド、核酸、サッカライド、低および巨大分子量有機または無機化合物を含む事実上どんなタイプの化合物ライブラリも本発明の方法を用いてプローブすることができる。本発明の好ましい実施態様として、合成されたライブラリは、10種を超える独自化合物、好ましくは100種を超える独自化合物、さらに好ましくは1000種を超える独自化合物を含む。

#### 【0202】

これらのライブラリの性質については、ペプチドをベースとしたコンビナトリアル・ライブラリ（combinatorial library）を例として参照することによりよく理解されよう。本発明は、ペプチドをベースとしたコンビナトリアル・ライブラリを構築するのに有用であるが、このライブラリに限定されるものではない。本発明の方法は、有機低分子、炭水化物、核酸、ポリマー、有機金属化合物など、実質的にどんな分子型式のライブラリをスクリーニングするのにも用いることができる。従って、以下の説明は、ペプチド・ライブラリに焦点を当てているが、例示的なものであり、限定的なものではない。

#### 【0203】

10

20

30

40

50

ペプチドおよび「ペプトイド」と呼ばれるあるタイプのペプチド模倣体が構築され、さまざまな方法により望ましい生物活性の有無がスクリーニングされている（ゴードンほか（Gordon et al.）、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー（J. Med. Chem.）、37：p 1385-1401（1994年）；ゲイセン（Geysen）、バイオオーガニック・アンド・メディシナル・ケミストリー・レターズ（Bioorg. Med. Chem. Letters）、3：p 397-404（1993年）；プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）、81：p 3998（1984年）；ホートン（Houghton）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）、82：p 5131（1985年）；アイヒラーほか（Eichler et al.）、バイオケミストリー（Biochemistry）、32：p 11035-11041（1993年）；および米国特許第4,631,211号；フォーダーほか（Fodor et al.）、サイエンス（Science）、251：p 767（1991年）；ヒューブナーほか（Huebner et al.）（米国特許第5,182,366号参照）。また、有機低分子もコンビナトリアル手法により作製されている。例えば、カンプスほか（Camps et al.）、アナクス・ド・クイミカ（Annaks de Quimica）、70：p 848（1990年）；米国特許第5,288,514号；米国特許第5,324,483号；チェンほか（Chen et al.）、ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ（J. Am. Chem. Soc.）、116：p 2661-2662（1994年）を参照されたい。10 20

#### 【0204】

例示的な実施態様として、例えば、受容体の結合ドメインは、創薬のためのアッセイの中心的役割を果たしており、このアッセイでは、例えば、この受容体を固定化し、その結合ドメインと相互作用することが知られている物質（即ち、リガンド）およびある量の試験用の特定の薬物もしくは抑制剤と共にインキュベートする。次いで、当該薬物が受容体と結合することによって受容体・リガンド複合体の形成を抑制する程度を測定することができる。創薬のためのアッセイが行われるこのような可能性については、本明細書で企図されており、本発明の範囲内にあると考えられる。その他の重要な役割および適切なアッセイ型式については当業者には明らかであろう。30

#### 【0205】

上記に説明したアッセイのそれぞれにおいて、必要に応じて洗浄工程を組み込む。この洗浄工程は、チップを被分析物と接触させる前、および/またはチップを被分析物と接触させた後に実施することができる。さらに別の例示的実施態様として、本発明のチップは、本発明のポリマーマトリックスを基体表面に付着させた後に洗浄する。当該洗浄工程は、アルコール、エーテル、エステル、DMF、ハロカーボン（例えば、CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>、HCCCL<sub>3</sub>、CCL<sub>4</sub>）、アミドなどの有機溶媒を用いて実施する。溶媒の選択は、当該ポリマーによって左右され、また、当該ポリマーを被分析物と接触させた後に洗浄を行う場合は、当該ポリマーおよび被分析物によって左右される。特定の用途に対して正しい溶媒を選択することについては、十分、当業者の能力の範囲内にある。当該洗浄工程は、例えば、チップから試薬、反応物および低分子もしくは重合不完全な化学種を除去し、あるいは当該ポリマーマトリックスを膨潤または縮小させるのに有用である。さらに、当該洗浄工程は、分析を妨害するアッセイ混合物の成分、および所望の被分析混合物成分のチップとの相互作用を継続させる条件下でチップからの除去の対象となるアッセイ混合物の成分を除去するのに用いることができる。これに対して、現在MALDIおよび SELDIに用いられているマトリックスは、このような洗浄工程によってチップから除去されるため、分析に対するマトリックスの有益な効果が失われる。従って、MALDIまたは SELDIでは、マトリックスをチップ上に付着させた後の洗浄工程を実施することができない。40

#### 【0206】

## (検出)

SEND用化合物と相互作用する被分析物の有無については、顕微鏡、分光分析、電気的手法などを用いることによって検出することができる。例えば、一部の実施態様として、そのスペクトルの可視領域の光を用い、SEND用化合物の詳細（例えば、反射率、透過率、複屈折、回折など）を解明する。あるいは、SEND用化合物に光を照射し、透過、吸収または反射された光の量を測定することができる。その装置としては、米国特許第5,739,879号に開示されているようなバックライティング装置を用いることができる。本発明には紫外および赤外領域の光も利用できる。

## 【0207】

診断分野における低濃度の被分析物の検出には、化学発光および電気化学発光による方法が広く受け入れられている。こうした化学発光および電気化学発光による方法は、発光分子もしくは光子発生事象の数を何倍にも増幅して得られる「信号増幅」により低濃度の被分析物の検出が可能となることで、低濃度の被分析物を検出する手段となる。

## 【0208】

別の実施態様として、蛍光標識を用いてチップの1つ以上のアッセイ成分もしくは領域を標識する。蛍光標識には、取り扱いに際して必要な注意事項が殆どなく、高スループット可視化技法（コンピュータを具備する集積システムを用いた分析画像のデジタル処理を含む光学的分析）に適用できるという利点がある。通常、好ましい標識は、以下の1つ以上を特徴としている：高感度、高安定性、低バックグラウンド、低環境感度、および高標識特異性。蛍光標識の多くは、シグマ・ケミカル社（SIGMA chemical company）（セントルイス（Saint Louis）、MO）、モレキュラー・プローブズ社（Molecular Probes）（ユージーン（Eugene）、OR）、R&Dシステムズ社（R&D Systems）（ミネアポリス（Minneapolis）、MN）、ファルマシアLKBバイオテクノロジー社（Pharmacia LKB Biotechnology）（ピスカタウェイ（Piscataway）、NJ）、クロンテク・ラボラトリーズ社（CLONTECH Laboratories, Inc.）（パロアルト（Palo Alto）、MN）、ケム・ジーンズ・コーポレーション社（Chem Genes Corp.）、アルドリッヂ・ケミカル・カンパニー社（Aldrich Chemical Company）（ミルウォーキー（Milwaukee）、WI）、グレン・リサーチ社（Glen Research, Inc.）、ギブコBRLライフ・テクノロジーズ社（GIBCO BRL Life Technologies, Inc.）（ゲイサーズバーグ（Gaithersburg）、MD）、フルカ・ケミカ・バイオケミカ・アナリティカ社（Fluka Chemical Biochemika Analytika）（フルカ・ケミー・アー・ゲー（Fluka Chemie AG）、ブックス（Buchs）、スイス）、およびアプライド・バイオシステムズ社（Applied Biosystems）（フォスター・シティ（Foster City）、CA）、ならびに当業者に知られているその他の多くの販売供給元から市販されている。さらに、当業者は、特定の用途に適切な発蛍光団の選定の仕方について理解されようし、市販品が容易に入手できない場合には、必要な発蛍光団を新たに合成するか、市販の発蛍光化合物を合成的に修飾して所望の蛍光標識を得ることができよう。

## 【0209】

低分子発蛍光団の他に、天然の蛍光蛋白質およびこの蛋白質の改変類似体も本発明に有用である。このような蛋白質としては、例えば、刺胞動物の緑色蛍光蛋白質（ワードほか（Ward et al.））フォトケミストリー・アンド・フォトバイオロジー（Photochem. Photobiol.）35:p803-808（1982年）；レビンほか（Levine et al.）、コンパラティブ・バイオケミストリー・アンド・フィジオロジー（Comparative Biochemistry and Physiology）、72B:p77-85（1982年））、ビブリオ・フィッシェリ（Vibrio fischeri）菌株からの黄色蛍光蛋白質（ボールドウィンほか（Boldwin et al.）、バイオケミストリー（Biochemistry）29

10

20

30

40

50

: p 5 5 0 9 - 1 5 ( 1 9 9 0 年 ) ) 、渦鞭毛藻シンビオディニウム属 ( S y m b i o d i n i u m s p . ) からのペリディニン ( P e r i d i n i n ) - クロロフィル ( モリスほか ( M o r r i s e t a l . ) 、プラント・モレキュラー・バイオロジー ( P l a n t M o l e c u l a r B i o l o g y ) 2 4 : p 6 7 3 : 7 7 ( 1 9 9 4 年 ) ) 、シネココッカスなどの海洋シアノバクテリアからのフィコビリン蛋白質、例えば、フィコエリスリンおよびフィコシアニンが挙げられる。

【 0 2 1 0 】

本発明の実施に利用できる顕微鏡的手技としては、単純光学顕微鏡法、共焦点顕微鏡法、偏光顕微鏡法、原子間力顕微鏡法 ( フーほか ( H u e t a l . ) 、ラングミュア ( L a n g m u i r ) 1 3 : p 5 1 1 1 4 - 5 1 1 9 ( 1 9 9 7 年 ) ) 、走査型トンネル顕微鏡法 ( エボイほか ( E v o y e t a l . ) 、ザ・ジャーナル・オブ・バイオヌ・サイエンス・アンド・テクノロジー A ( J . V a c . S c i . T e c h n o l . A ) 1 5 : p 1 4 3 8 - 1 4 4 1 、パート ( P a r t ) 2 ( 1 9 9 7 年 ) ) などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【 0 2 1 1 】

本発明の実施に利用できる分光学的手技としては、例えば、赤外分光法 ( ザオーホカ ( Z h a o e t a l . ) 、ラングミュア ( L a n g m u i r ) 1 3 : p 2 3 5 9 - 2 3 6 2 ( 1 9 9 7 年 ) ) 、ラマン分光法 ( ズーほか ( Z h u e t a l . ) 、ケミカル・フィジックス・レターズ ( C h e m . P h y s . L e t t . ) 、2 6 5 : p 3 3 4 - 3 4 0 ( 1 9 9 7 年 ) ) 、X線光電子分光法 ( ジアングほか ( J i a n g e t a l . ) 、バイオエレクトロケミストリー・アンド・バイオエナージェティックス ( B i o e l e c t r o c h . B i o e n e r . ) 4 2 : p 1 5 - 2 3 ( 1 9 9 7 年 ) ) などが挙げられる。

【 0 2 1 2 】

特に関心があるのは、S E N D 用化合物を用いて被分析物を検出する質量分光分析法、特に、S E N D 用化合物からの被分析物の脱離および脱離被分析物の直接検出を利用する質量分光分析法の使用である。一実施態様として、この方法は、被分析物がをバイオチップの表面に捕獲し、例えば、レーザー脱離 / イオン化質量分析によって検出する質量分光分析法の S E L D I である。

【 0 2 1 3 】

S E N D 用化合物からの被分析物の脱離は、被分析物を適切なエネルギー供給源にさらすことを必要とする。通常、このことは、被分析物に放射エネルギーもしくはエネルギー粒子を当てるることを意味する。例えば、このエネルギーは、レーザーエネルギーもしくはフラッシュランプからのエネルギーの形をとる光エネルギーとすることができます。あるいは、当該エネルギーは、高速原子流とすることができます。また、脱離を誘発 / 促進するために熱を利用することもできる。

【 0 2 1 4 】

脱離した被分析物は、いくつかの手段により検出することができる。レーザー脱離 / イオン化質量分析法のように、被分析物が脱離の過程でイオン化される場合、検出器はイオン検出器とすることができます。一般に、質量分析計は、脱離イオンの飛行時間を測定する手段を含む。この情報が質量に変換される。但し、脱離イオンを分離、検出するためにこれの質量を測定する必要はない。なぜなら、イオン化した被分析物が種々の時間に検出器に当たるという事実がこれを検出および分離することになるからである。

【 0 2 1 5 】

複数の検出手段を連続的に遂行して、アレイの各位置の保持物質と関連付けられる被分析物の成分および機能を詳しく調べることができる。

【 0 2 1 6 】

脱離検出器は、被分析物を吸着剤から脱離する手段および脱離した被分析物を直接検出する手段を含む。即ち、当該脱離検出器は、別の固相に被分析物を捕獲し、これをその後の分析にかけるという中間的な工程を経ないで脱離被分析物を検出する。通常、被分析物

10

20

30

40

50

の検出は、信号強度の検出を伴うことになる。言い換えると、これが吸着剤に吸着された被分析物の量を反映する。

【0217】

また、脱離検出器は、他のエレメント、例えば、被分析物をこの検出器の方へと加速させる手段、および脱離からこの検出器による検出までの飛行時間を測定する手段を含むことができる。

【0218】

好みの脱離検出器は、当該分野でよく知られているレーザー脱離／イオン化質量分析計である。この質量分析計は、吸着された被分析物を担持する基体、例えばプローブを挿入するポートを具備する。この被分析物にレーザーエネルギーのようなエネルギーを当てるとき、被分析物は脱離する。当該被分析物にレーザーを照射すると、この完全な状態の被分析物は飛行チューブ中へと脱離し、イオン化される。一般に、飛行チューブには真空スペースが設けられている。この真空チューブの一部分の帯電板が、イオン化された被分析物を検出器の方へ加速する電位を生じる。時計が飛行時間を測定し、システム・エレクトロニクスが被分析物の速度を測定してこれを質量に変換する。当業者には明らかなように、これらのエレメントのどれもが、脱離、加速、検出、時間測定などの種々の手段を用いる脱離検出器の構築において本明細書で説明した他のエレメントと併用することができる。さらに、例示的な検出器は、アレイ上のどのスポットもレーザー光線に対して一列となるように表面の形を変える手段を含む。

【0219】

(インフォマティックス)

本発明の方法を用いて得られる高分離能、高感度データセットが当該分野で利用可能になるので、診断、治療、薬剤開発、バイオセンサー開発その他の関連領域において特筆すべき進歩が見られよう。例えば、疾病の状態もしくは段階をより適切に確認するために、疾病の指標を特定し、利用することができる（米国特許第5,672,480号；第5,599,677号；第5,939,533号；および第5,710,007号参照）。細胞内毒性情報を形成させて薬物構造と活性の直接的な相関関係を改善することができる（アンダーソン・エル（Anderson, L.）「医薬・プロテオミクス：ターゲット、メカニズムおよび機能（Pharmaceutical Proteomics：Targets, Mechanism, and Function）」IBCプロテオミクス・カンファレンス（IBC Proteomics conference）で発表された論文、コロナド（Coronado）、CA（1998年6月11-12日）参照）。また、細胞内毒性情報を生体センサー・デバイスに利用して化学物質暴露により起こり得る毒性作用および推定許容暴露閾値を予測することができる（米国特許第5,811,231号参照）。他の生体分子および生物活性物質（たとえば、核酸、サッカライド、脂質、薬物など）に関連したデータセットからも同様な利益が得られる。

【0220】

従って、別の好みの実施態様として、本発明は、少なくとも1セットのデータ・アッセイ・データを含むデータベースを提供する。このデータベースに含まれるデータは、本発明の方法、および／または個々にもしくはライブラリ型式で本発明のQD-標識化学種を用いて得られる。当該データベースは、データを維持し伝送し得る実質的にどんな形のものでもよいが、好みの電子データベースである。本発明の電子データベースは、データベースの保存およびアクセスを可能にするパソコンなどの電子デバイスを用いて維持することができるが、好みのワールド・ワイド・ウェブなどの広域ネットワーク上に配信する。

【0221】

本節がペプチド配列特異性データを含むデータベースに焦点を当てるのは、単に説明を明確化するためである。本発明のアッセイ法を用いて得られるどんなアッセイデータに対しても類似のデータベースを構築することができることは、当業者に明瞭に理解されよう。

10

20

30

40

50

## 【0222】

生体サンプルからの相対的および／または絶対的多量の種々の分子種および高分子種を同定、定量するための本明細書で説明した配合物および方法は、特に、病的状態、病気に罹りやすい体质、薬物検査、治療管理、遺伝子・病気の因果関係、免疫と生理的状態との関連の検証に対して対応付けることができる豊富な情報をもたらす。本発明のアッセイ法から得られるデータは、手作業の調査および分析に適しているが、好ましい実施態様として、高速コンピュータを用いる事前のデータ処理が利用される。

## 【0223】

生体分子情報にインデックスをつけて検索する数多くの方法が、当該分野で知られている。例えば、米国特許第6,02,659号および第5,966,712号では、生体分子配列情報に關し、蛋白質機能の1つ以上の分類段階によって配列を分類整理し検索できるように保存するための関係型データベース・システムが開示されている。また、米国特許第5,953,727号では、部分長の配列のコレクションから完全長の配列を得る1つ以上の配列決定プロジェクトとの共同によって、部分長のDNA配列のコレクションを分類整理し検索できる形式で、配列記録を含む情報を有する関係型データベースが開示されている。米国特許第5,706,498号では、キー配列と対象配列との類似性の程度に基づいて遺伝子データベースの配列データ項目と同様な遺伝子配列の検索を行うための遺伝子データベース検索システムが開示されている。米国特許第5,538,897号では、ペプチドの質量分析断片化パターン(fragmentation pattern)を用いて、一致度測定値を利用して実験的に得られる質量スペクトルと予測質量スペクトルを比較することによりコンピュータデータベースでアミノ酸配列を同定する方法が開示されている。米国特許第5,926,818号では、2つ以上の連結経路(consolidation path)もしくは次元によって予測および実データの連結を必要とする多次元分析(OLAP)と呼ばれる多次元データ分析の機能を含む多次元データベースが開示されている。米国特許第5,295,261号では、各データベースの記録の領域がナビゲーションデータと情報データの2つのクラスに分けられ、ナビゲーション領域が、1つのツリー構造もしくは2つ以上のツリー構造の融合として表示できる階層的位相マップ内に保存されるハイブリッドデータベース構造が開示されている。

## 【0224】

本発明は、例えば、各配列特異性記録が得られる対象物を含むサンプルの原料を特定するデータに対してクロス集計されたアッセイデータ記録をコンピュータにより検索可能な形で保存するためのコンピュータおよびソフトウェアを含むコンピュータデータベースを提供する。

## 【0225】

例示的な実施態様として、対象物を含むサンプルの原料の少なくとも1つは、病的異常のないことが分かっている組織サンプルからのものである。変形態様として、当該原料の少なくとも1つは、既知の病理組織標本、例えば、腫瘍性病巣、またはウイルス、細菌などの病原体を含む組織標本である。別の変形態様として、アッセイ記録では、サンプル中の各対象化学種について以下のパラメータの1つ以上をクロス集計する：(1) 例えば、対象分子構造および／または特性分離座標(例えば、電気泳動座標)を含むことができる独自識別コード；(2) サンプルの原料；および(3) サンプルに存在する対象物質の絶対および／または相対量。

## 【0226】

また、本発明は、磁気ディスク、光ディスク、磁気・光ディスク、DRAM、SRAM、SGRAM、SDRAM、DDR RAM、磁気バブル記憶素子、およびCPUレジスタ、オン-CPU(on-CPU)、データ記憶アレイなどのその他のデータ記憶素子を含むことができるコンピュータのデータ記憶装置を用いた対象データのコレクションの保存ならびに検索方法を提供する。通常、対象データの記録は、磁化可能媒体上の磁気ドメイン・アレイのビット・パターンとして、あるいはDRAM素子のセル(例えば、トランジスタおよびトランジスタ上にあり得る電荷蓄積領域からなる各セル)のアレイのような荷

10

20

30

40

50

電状態またはトランジスタ・ゲート状態のアレイとして記憶される。一実施態様として、本発明は、そのような記憶素子、およびこれを用いて構築され、対象原料とクロス集計された少なくとも10個の対象データ記録の独自識別子を含む蛋白質発現フィンガープリント記録をコード化するビット・パターンを有するコンピュータ・システムを提供する。

#### 【0227】

対象物がペプチドまたは核酸の場合、好ましくは、本発明は、コンピュータの記憶素子もしくはデータベースに記憶され、そこから検索されるペプチドまたは核酸配列アッセイ記録と、少なくとも1つの他の配列とをコンピュータにより比較することを含む、関連ペプチドまたは核酸配列の同定方法を提供する。この比較は、配列解析もしくは比較アルゴリズムまたはこれらのコンピュータプログラムによる実施（例えば、F A S T A、T F A S T A、G A P、B E S T F I T）を含むことができ、および／または当該比較は、標本のポリペプチドまたは核酸サンプルから決定した配列プール内のペプチドまたは核酸配列の相対的な量の比較とことができる。

#### 【0228】

また、本発明は、好ましくは、検索に好適なファイル形式で本発明のアッセイからのデータをコード化するビット・パターンを含み、コンピュータによる配列の解析、比較もしくは相対的定量方法で処理する、I B M互換性（D O S、ウインドウ95／98／2000、ウインドウズN T、O S／2）もしくは他型式（例えば、リナックス、サンO S、ソラリス、A I X、S C O ユニックス、V M S、M V、マッキントッシュなど）フロッピー（登録商標）ディスクまたはハード（固定、ウィンチエスター（W i n c h e s t e r））ディスクドライブのような磁気ディスクを提供する。

#### 【0229】

また、本発明は、イーサネット（登録商標）（E t h e r n e t（登録商標））ケーブル（同軸もしくは10ベースT）、電話回線、I S D N回線、無線ネットワーク、光ファイバーその他の好適な単一伝送媒体のようなデータ・リンクを介して接続された複数のコンピュータ・デバイスを含み、それによって少なくとも1つのネットワーク装置（例えば、コンピュータ、ディスク・アレイなど）が、本発明のアッセイから得られるデータをコード化するビット・パターンを構成する磁気ドメイン（例えば、磁気ディスク）および／または荷電ドメイン（例えば、D R A Mセルのアレイ）のパターンを有するネットワークを提供する。

#### 【0230】

また、本発明は、モデム、I S D Nターミナル・アダプター、D S L、ケーブル・モデム、A T Mスイッチなどの電子通信デバイスに信号を発生させることを含むアッセイ・データの伝送方法であって、当該信号が、アッセイからのデータ、あるいは本発明の方法により得られる複数のアッセイ結果を有するデータベースからのデータをコード化するビット・パターンを（そのまま、または暗号化された形で）含む伝送方法を提供する。

#### 【0231】

好ましい実施態様として、本発明は、本発明の方法により得られるアッセイ結果などの数多くのデータ構造を含むデータベースとクエリ対象を比較し、対象データに対する同一性および相違の大きさの程度に基づいてデータベース対象をランク付けするコンピュータ・システムを提供する。好ましくは、中央処理装置を初期化し、コンピュータプログラムを取り込ませ、実行させてアッセイ結果を整列、比較する。クエリ対象のデータは、入出力装置を介して中央処理装置に入れる。コンピュータプログラムを実行させると、中央処理装置が、アッセイ結果の2進記述を含むデータファイルからアッセイデータを検索する。

#### 【0232】

対象データもしくは記録およびコンピュータプログラムは、通常ランダム・アクセス・メモリ（例えば、D R A M、S R A M、S G R A MまたはS D R A M）である補助記憶装置に転送することができる。対象は、選択されたアッセイ特性（例えば、選択された結合官能部分への結合）とクエリ対象の同じ特性との間の相関関係の程度によってランク付け

10

20

30

40

50

され、入出力装置を介して結果が出力される。例えば、中央処理装置は、在来のコンピュータ（例えば、インテル・ペンティアム（登録商標）（Intel Pentium（登録商標））、パワーPC（PowerPC）、アルファ（Alpha）、PA-8000、SPARC、MIPS4400、MIPS10000、VAXなど）、プログラムは、市販または公有の分子生物学ソフトウェア・パッケージ（例えば、UWGC Gシークエンス・アナリシス・ソフトウェア（Sequence Analysis Software）、ダーウィン（Darwin））、データファイルは、光または磁気ディスク、データ・サーバー、メモリ素子（例えば、DRAM、SRAM、SGRAM、SDRAM、EPROM、バブル・メモリ、フラッシュ・メモリなど）、入出力装置は、ビデオディスプレおよびキーボードを含む端末機、モデム、ISDNターミナル・アダプター、イーサネット（登録商標）ポート、パンチカード読み取り機、磁気ストリップ・リーダーその他の好適な入出力装置とすることができる。10

### 【0233】

また、本発明は、好ましくは、（1）コンピュータ、（2）コンピュータに蓄積することができる、本発明の方法により得られるペプチド配列特異性記録のコレクションをコード化する蓄積ビット・パターン、（3）クエリ対象などの比較対象、および（4）通常、類似性計算値に基づく比較結果のランク付を伴う、整列および比較のプログラムを含む、上述のようなコンピュータ・システムの利用方法を提供する。20

### 【0234】

本発明の物質、方法およびデバイスについては、さらに、以下の実施例によって説明する。これらの実施例は、説明のために提示するものであって、特許請求する本発明を限定するものではない。20

### 【実施例】

### 【0235】

#### （材料および方法）

以下の実施例では、特記しない限り、温度はセ氏温度（）で示し、操作は室温もしくは環境温度（通常、約18乃至25の範囲）で行い、溶媒の蒸発は、ロータリー・エバポレータを用いて減圧下（通常、4.5乃至30mmHg）、60までの浴温で行い、反応過程の後には通常TLCを実施し、反応時間は単に説明のために示したものであり、融点の補正は行わず、生成物は期待通りの<sup>1</sup>H-NMRおよび/または微量分析データを示し、収量は単に説明のために示したものであり、また、以下の通常の略号を用いた：mp（融点）、L（リットル）、mL（ミリリットル）、mmol（ミリモル）、g（グラム）、mg（ミリグラム）、min（分）、およびh（時間）。30

### 【0236】

本発明のポリマーEAMの効果は、およそ4μMのバソプレシン、2μMのソマトスタチン、4μMのインスリンB鎖、7μMのh、r-インスリンおよび5μMのヒルジンを含有する緩衝ペプチド混合液を用いて評価した。このペプチド混合液のうちの約1乃至2μLは、チップ上の、以下に説明するポリマー薄膜を有する各スポットに付着させた

#### （実施例1：-シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸の合成）

マグネチックスターラーを備えた100mLの三つ口ガラスリアクター中、35gの水および30gのアセトン（VWR社、ウエストチェスター（West Chester）、PAから購入）に2.00gの水酸化カリウム（アルドリッヂ社（Aldrich））を溶かした溶液に、3.2gの-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸（シグマ-アルドリッヂ社（Sigma-Aldrich）、ミルウォーキー（Milwaukee）、米国から購入。融点：IA6200で242）を加え、このリアクターを氷浴中に入れた。別に、塩化メタクリロイル（アルドリッヂ社製）2.2mLを滴下漏斗に入れ、これを上記三つ口ガラスリアクターに取り付けた。塩化メタクリロイルは、このリアクター中に一滴ずつゆっくりと加えた。反応は、氷浴中で2時間継続させた。40

### 【0237】

得られた反応混液は、塩酸希釈水溶液で酸性化した。生じた沈殿は、ろ別し、真空乾燥50

した。乾燥したろ過ケーキを 10 mL の冰酢酸（アルドリッヂ社製）に溶かし、一夜冷蔵庫中で冷却した。生じた再結晶物を乾燥した後、メタノール（アルドリッヂ社製）に溶かした。このメタノール溶液は、一夜フリーザに入れておいた。得られた結晶をろ別し、真空乾燥した。収量は 0.9 g であった。融点は、デジタル・メルティング・ポイント・アパレイタス (Digital Melting Point Apparatus) IA 9200 (英国、エセックス (Essex)、エレクトロサーマル・エンジニアリング社 (Electrothermal Engineering) 製) により測定して、190 乃至 192 であった。NMR スペクトルは、-シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸に相当する吸収を示した。

## 【0238】

（実施例 2：-シアノ-4-アクリロイルオキシケイ皮酸の合成）

マグネチックスターラーを備えた 100 mL の三つ口ガラスリアクター中、25 g の水および 4.5 g のアセトン (VWR 社、ウエストチェスター (West Chester)、PA から購入) に 2.00 g の水酸化カリウム (アルドリッヂ社 (Aldrich)) を溶かした溶液に、1.7 g の -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (シグマ - アルドリッヂ社 (Sigma-Aldrich)、ミルウォーキー (Milwaukee)、WI から購入。融点：IA 9200 で 242) を加え、このリアクターを氷浴中に入れれた。

## 【0239】

別に、塩化アクリロイル (アルドリッヂ社製) 1.7 mL を滴下漏斗に入れ、これを上記三つ口ガラスリアクターに取り付けた。塩化アクリロイルは、このリアクター中に一滴ずつゆっくりと加えた。反応は、氷浴中で 2 時間継続させた。

## 【0240】

得られた反応混液は、塩酸希釈水溶液で酸性化した。生じた沈殿は、ろ別し、真空乾燥した。乾燥したろ過ケーキを 9 mL の冰酢酸 (アルドリッヂ社製) に溶かし、一夜冷蔵庫中で冷却した。生じた再結晶物を乾燥した後、メタノール (アルドリッヂ社 (Aldrich) 製) に溶かした。このメタノール溶液は、一夜フリーザに入れておいた。得られた結晶をろ別し、真空乾燥した。収量は 0.7 g であった。融点は、デジタル・メルティング・ポイント・アパレイタス (Digital Melting Point Apparatus) IA 9200 (英国、エセックス (Essex)、エレクトロサーマル・エンジニアリング社 (Electrothermal Engineering) 製) により測定して、187 乃至 191 であった。

## 【0241】

（実施例 3：2,5-ジメチタクリロイルオキシ安息香酸の合成）

100 mL の三つ口ガラスリアクター中、12 mL の水および 12 g のアセトン (VWR 社、ウエストチェスター (West Chester)、PA から購入) に 6.2 g の水酸化カリウム (アルドリッヂ社 (Aldrich) 製) を溶かした溶液に、3.0 g の 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (シグマ - アルドリッヂ社 (Sigma-Aldrich)、ミルウォーキー (Milwaukee)、米国から購入。融点：IA 6200 で 154) を加え、このリアクターを氷浴中に入れられた。別に、塩化メタクリロイル (アルドリッヂ社製) 4.16 mL を滴下漏斗に入れ、これを上記三つ口ガラスリアクターに取り付けた。塩化メタクリロイルは、このリアクター中に一滴ずつゆっくりと加えた。反応は、氷浴中で 2 時間継続させた。

## 【0242】

得られた反応混液は、塩酸希釈水溶液で酸性化した。生じた沈殿は、ろ別し、真空乾燥した。乾燥したろ過ケーキを 10 mL の冰酢酸 (アルドリッヂ社 (Aldrich) 製) に溶かし、一夜冷蔵庫中で冷却した。生じた再結晶物を、ろ過し、乾燥した後、メタノール (アルドリッヂ社製) に溶かした。このメタノール溶液は、一夜フリーザに入れておいた。得られた結晶をろ別し、真空乾燥した。収量は 0.8 g であった。融点は、デジタル・メルティング・ポイント・アパレイタス (Digital Melting Point Apparatus) IA 9200 (英国、エセックス (Essex)、エレクトロサーマル・エンジニアリング社 (Electrothermal Engineering) 製) により測定して、187 乃至 191 であった。

10

20

30

40

50

t Apparatus) IA 9200により測定して、140乃至141であった。

【0243】

(実施例4: 2,6-ジメチタクリロイルオキシアセトフェノンの合成)

100mLの三つ口ガラスリアクター中、12gの水および12gのアセトン(VWR社製)に3.0gの水酸化カリウム(アルドリッチ社(Aldrich)製)を溶かした溶液に、1.5gの2,6-ジヒドロキシアセトフェノン(シグマ-アルドリッチ社(Sigma-Aldrich)、ミルウォーキー(Milwaukee)、米国から購入。融点: IA 6200で125)を加え、このリアクターを氷浴中に入れた。別に、塩化メタクリロイル(アルドリッチ社製)2.08mLを滴下漏斗に入れ、これを上記三つ口ガラスリアクターに取り付けた。塩化メタクリロイルは、このリアクター中に一滴ずつゆっくりと加えた。反応は、氷浴中で2時間継続させた。

【0244】

得られた反応混液は、塩酸希釈水溶液で酸性化した。生じた沈殿は、ろ別し、真空乾燥した。乾燥したろ過ケーキを10mLの冰酢酸(アルドリッチ社(Aldrich)製)に溶かし、一夜冷蔵庫中で冷却した。生じた再結晶物を、ろ別し、乾燥した後、メタノール(アルドリッチ社製)に溶かした。このメタノール溶液は、一夜フリーザに入れておいた。得られた結晶をろ別し、真空乾燥した。収量は0.8gであった。融点は156乃至158であった。

【0245】

(実施例5: トランス-3,5-ジメトキシ-4-アクリロイルオキシケイ皮酸の合成)

100mLの三つ口ガラスリアクター中、30gの水および5mLのアセトン(VWR社製)に3.0gの水酸化カリウム(アルドリッチ社(Aldrich)製)を溶かした溶液に、2.0gのトランス-3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシケイ皮酸(シグマ-アルドリッチ社(Sigma-Aldrich)、ミルウォーキー(Milwaukee)、米国から購入したシナピン酸。融点: IA 6200で202)を加え、このリアクターを氷浴中に入れた。別に、塩化アクリロイル(アルドリッチ社製)1.8mLを滴下漏斗に入れ、これを上記三つ口ガラスリアクターに取り付けた。塩化アクリロイルは、このリアクター中に一滴ずつゆっくりと加えた。反応は、氷浴中で2時間継続させた。

【0246】

得られた反応混液は、塩酸希釈水溶液で酸性化した。生じた沈殿は、ろ別し、真空乾燥した。乾燥したろ過ケーキを10mLの冰酢酸(アルドリッチ社(Aldrich)製)に溶かし、一夜冷蔵庫中で冷却した。生じた再結晶物を、ろ過し、乾燥した後、メタノール(アルドリッチ社製)に溶かした。このメタノール溶液は、一夜フリーザに入れておいた。得られた結晶をろ過し、真空乾燥した。収量は0.6gであった。融点は178乃至180であった。

【0247】

(実施例6: 架橋-シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸の重合)

小型ガラス瓶中で、実施例1の方法により合成した-シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸4.9mgおよびポリエチレングリコールジメタクリレート(MW約250、ポリサイエンス社(Polyscience)、ワシントン(Washington)、PAから購入)1μLを炭酸プロピレン(アルドリッチ(Aldrich))10mLに溶かした。この溶液に、過酸化ラウロイル(アルドリッチ)の10%メタノール溶液1μLを加え、よく混和した。このモノマー混液の入った小型ガラス瓶を窒素ガスでバージした後、オープンに95度20時間入れておいた。

【0248】

得られたポリマー溶液1μLを8スポット・プロテインチップ(Proteinchip)(登録商標)アレイに載せ、このチップを真空オープン中、約95度最長20時間まで乾燥して溶媒を除去した。次いで、各スポットにペプチドサンプルを塗布し、PBS II分光計で走査して当該ポリマーのレーザー脱離/イオン化(LDI)特性をチェック

10

20

30

40

50

した。ペプチド混合物の成分を脱離、イオン化および分離した。得られた質量スペクトルは図6に示した。

【0249】

(実施例7: 4-メタクリロイルオキシ-3-メトキシケイ皮酸の合成)

100mLの三つ口ガラスリアクター中、60gの水および15mLのアセトン(VWR社製)に3.5gの水酸化カリウム(アルドリッヂ社(Aldrich)製)を溶かした溶液に、5.0gの4-ヒドロキシ-3-メトキシケイ皮酸(シグマ-アルドリッヂ社(Sigma-Aldrich)、ミルウォーキー(Milwaukee)、米国から購入したフェルラ酸。融点:IA6200で168乃至171)を加え、このリアクターを氷浴中に入れた。別に、塩化メタクリロイル(アルドリッヂ社(Aldrich)製)3.3mLを滴下漏斗に入れ、これを上記三つ口ガラスリアクターに取り付けた。塩化メタクリロイルは、このリアクター中に一滴ずつゆっくりと加えた。反応は、氷浴中で2時間継続させた。

【0250】

得られた反応混液は、塩酸希釈水溶液で酸性化した。生じた沈殿は、ろ別し、真空乾燥した。乾燥したろ過ケーキを12mLの冰酢酸(アルドリッヂ社製)に溶かし、一夜冷蔵庫中で冷却した。生じた再結晶物を、ろ過し、乾燥した後、メタノール(アルドリッヂ社製)に溶かした。このメタノール溶液は、一夜フリーザに入れておいた。得られた結晶をろ過し、真空乾燥した。収量は1.1g、融点は180乃至184であった。

【0251】

(実施例8: 直鎖-シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸の重合)

小型ガラス瓶中で、実施例1の方法により合成したa-シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸3.2mgを1-ブタノール(アルドリッヂ社(Aldrich)製)100μLと、穏やかに加熱した水浴上で溶液が透明になるまで混和した。次に、当該モノマー溶液に、過酸化ラウロイル1-ブタノール溶液(約7%溶液)1μLを加え、よく混和した。次いで、この瓶を窒素ガスでバージした後、オープンに入れ、20時間、92に保った。

【0252】

得られたポリマー溶液1μLを8スポット・プロテインチップ(Proteinchip)(登録商標)アレイに載せ、このチップを真空オープン中、約95で最長20時間まで乾燥して溶媒を除去した。次いで、各スポットにペプチドサンプルを塗布し、PBSII分光計で走査して当該ポリマーのレーザー脱離/イオン化(LDI)特性をチェックした。ペプチド混合物の成分を脱離、イオン化および分離した。得られた質量スペクトルは図3に示した。

【0253】

(実施例9: a-シアノ-4-アクリロイルオキシケイ皮酸のスチレンとの共重合)

小型ガラス瓶中で、実施例2の方法により合成したa-シアノ-4-アクリロイルオキシケイ皮酸23.22mgを1-ブタノール(アルドリッヂ社(Aldrich)製)1mLと、穏やかに加熱した水浴上で溶液が透明になるまで混和した。次に、当該モノマー溶液に、スチレンモノマー(アルドリッヂ社製)20μLおよび過酸化ラウロイル1-ブタノール溶液(約7%溶液)2μLを加え、よく混和した。次いで、この瓶を窒素ガスでバージした後、オープンに入れ、20時間、92に保った。得られたポリマー溶液1μLを8スポット・プロテインチップ(Proteinchip)(登録商標)アレイに載せ、このチップを真空オープン中、約95で最長20時間まで乾燥して溶媒を除去した。次いで、各スポットにペプチドサンプルを塗布し、PBSII分光計で走査して当該ポリマーのレーザー脱離/イオン化(LDI)特性をチェックした。ペプチド混合物の成分を脱離、イオン化および分離した。得られた質量スペクトルは図11に示した。

【0254】

(実施例10: 2,5-ジメチタクリロイルオキシ安息香酸とアクリル酸の共重合)

小型ガラス瓶中で、実施例3の方法により合成した2,5-ジメチタクリロイルオキシ

10

20

30

40

50

安息香酸 1.4 mg を 1 - ヘキサノール (アルドリッチ社 (Aldrich) 製) 50  $\mu$  L と、穏やかに加熱した水浴上で溶液が透明になるまで混和した。次に、当該モノマー溶液に、アクリル酸 (アルドリッチ社製) 2  $\mu$  L および過酸化ラウロイル 1 - ヘキサノール溶液 (約 3 % 溶液) 1  $\mu$  L を加え、よく混和した。次いで、この瓶を窒素ガスでバージした後、オープンに入れ、20 時間、85 に保った。得られたポリマー溶液 1  $\mu$  L を 8 スポット・プロテインチップ (ProteinChip) (登録商標) アレイに載せ、このチップを真空オープン中、約 95 で最長 20 時間まで乾燥して溶媒を除去した。次いで、各スポットにペプチドサンプルを塗布し、PBSII 分光計で走査して当該ポリマーのレーザー脱離 / イオン化 (LDI) 特性をチェックした。ペプチド混合物の成分を脱離、イオン化および分離した。得られた質量スペクトルは図 12 に示した。

10

## 【0255】

(実施例 11 : 2, 6 - ジメチタクリロイルオキシアセトフェノンの重合)

小型ガラス瓶中で、実施例 4 の方法により合成した 2, 6 - ジメチタクリロイルオキシアセトフェノン 1.76 mg を 1 - ヘプタノール (アルドリッチ社 (Aldrich) 製) 100  $\mu$  L と、穏やかに加熱した水浴上で溶液が透明になるまで混和した。次に、当該モノマー溶液に、過酸化ラウロイル 1 - ヘプタノール溶液 (約 3 % 溶液) 1  $\mu$  L を加え、よく混和した。次いで、この瓶を窒素ガスでバージした後、オープンに入れ、20 時間、95 に保った。得られたポリマー溶液 1  $\mu$  L を 8 スポット・プロテインチップ (ProteinChip) (登録商標) アレイに載せ、このチップを真空オープン中、約 95 で最長 20 時間まで乾燥して溶媒を除去した。次いで、各スポットにペプチドサンプルを塗布し、PBSII 分光計で走査して当該ポリマーのレーザー脱離 / イオン化 (LDI) 特性をチェックした。ペプチド混合物の成分を脱離、イオン化および分離した。得られた質量スペクトルは図 13 に示した。

20

## 【0256】

(実施例 12 : - シアノ - 4 - メタクリロイルオキシケイ皮酸とアクリル酸との共重合)

小型ガラス瓶中で、(実施例 1 の方法により合成した) - シアノ - 4 - メタクリロイルオキシケイ皮酸 30.43 mg およびアクリル酸 (アルドリッチ社製) 20  $\mu$  L を 1 - ペンタノール (アルドリッチ) 1 mL に溶かした。この溶液に、過酸化ラウロイル (アルドリッチ) の 5 % 1 - ペンタノール溶液 5  $\mu$  L を加え、よく混和した。このモノマー混液の入った小型ガラス瓶を窒素ガスでバージした後、オープンに 95 で 20 時間入れておいた。得られたポリマー溶液 1  $\mu$  L を 8 スポット・プロテインチップ (ProteinChip) (登録商標) アレイに載せ、このチップを真空オープン中、約 90 で 2 分間乾燥して溶媒を除去した。次いで、各スポットにペプチドサンプルを塗布し、PBSII 分光計で走査して当該ポリマーのレーザー脱離 / イオン化 (LDI) 特性をチェックした。ペプチド混合物の成分を脱離、イオン化および分離した。図 14 を参照されたい。上段図は、シアノ - 4 - メタクリロイルオキシケイ皮酸のホモポリマーを用いたレーザー照射時のペプチドサンプルの脱離 / イオン化を示し、下段は、シアノ - 4 - メタクリロイルオキシケイ皮酸とアクリル酸のコポリマーを用いたペプチドサンプルの脱離 / イオン化を示す。

30

## 【0257】

(実施例 13 : a - シアノ - 4 - アクリロイルオキシケイ皮酸のアクリル酸および 3 - (トリメトキシシリル) - プロピルメタクリレートとの共重合)

小型ガラス瓶中で、(実施例 2 の方法により合成した) a - シアノ - 4 - アクリロイルオキシケイ皮酸 26.45 mg を 1 - ペンタノール (アルドリッチ社 (Aldrich) 製) 1 mL と、穏やかに加熱した水浴上で溶液が透明になるまで混和した。次に、当該モノマー溶液に、阻害剤除去アクリル酸モノマー (アルドリッチ社) 40  $\mu$  L、3 - (トリメトキシシリル) - プロピルメタクリレート (アルドリッチ社) 20  $\mu$  L および過酸化ラウロイル (1 - ペンタノールの 5 % 溶液) 1  $\mu$  L を加え、よく混和した。次いで、この瓶を窒素ガスでバージした後、オープンに入れ、20 時間、92 に保った。得られたポリ

40

50

マー溶液  $1 \mu\text{L}$  を 8 スポット・プロテインチップ (Proteinchip) (登録商標) アレイに載せ、このチップを真空オープン中、約 95 度で最長 20 時間まで乾燥して溶媒を除去した。得られたコポリマーは、ガラス基体への付着性が改善された。

#### 【0258】

(実施例 14: - シアノ - 4 - メタクリロイルオキシケイ皮酸とオクタデシルメタクリレートの共重合)

小型ガラス瓶中で、(実施例 2 の方法により合成した) a - シアノ - 4 - アクリロイルオキシケイ皮酸  $8.20 \text{ mg}$  を 1 - ペンタノール (アルドリッヂ社 (Aldrich) 製)  $200 \mu\text{L}$  と、穏やかに加熱した水浴上で溶液が透明になるまで混和した。次に、当該モノマー溶液に、n - オクタデシルメタクリレートモノマー (アルドリッヂ社)  $5 \mu\text{L}$ 、3 - (トリメトキシシリル) - プロピルメタクリレート (アルドリッヂ社)  $10 \mu\text{L}$  および過酸化ラウロイル (1 - ペンタノールの 5 % 溶液)  $1 \mu\text{L}$  を加え、よく混和した。次いで、この瓶を窒素ガスでバージした後、オープンに入れ、20 時間、92 度に保った。得られたポリマー溶液  $1 \mu\text{L}$  を 8 スポット・プロテインチップ (Proteinchip) (登録商標) アレイに載せ、このチップを真空オープン中、約 90 度で最長 20 時間まで乾燥して溶媒を除去した。次いで、pH 7 の  $0.05 \text{ M}$  リン酸ナトリウムに  $1.7 \text{ M}$  硫酸アンモニウムを溶かした溶液を用いてペプチドサンプルを調製した。このペプチドサンプル ( $2 \mu\text{L}$ ) を各スポットに塗布し、浮遊物をピペットの先端で除去した。この洗浄したチップを PBS II 線形レーザー分光計で走査して当該ポリマーのレーザー脱離 / イオン化 (LDI) 特性をチェックした。当該ペプチド混液の成分の Arg<sup>8</sup> - バソプレシン (1084.24 ダルトン)、ソマトスタチン (1637.90)、ウシ・インスリン - 鎮 (3495.94)、ヒト・インスリン (5807.65) およびヒルジン BHK (7033.61) を脱離、イオン化および分離した。得られたスペクトルは、上段図に示した。5 種のペプチドは全て硫酸アンモニウムによる妨害を受けることなく検出された。次に、同様な実験をペプチドサンプルの尿素溶液を用いて行った。5 種のペプチドを含むサンプルを  $1 \text{ M}$  尿素溶液に溶かし、同じチップのスポットに付けた。浮遊物を除去してチップを洗浄した後、PBS II 線形レーザー分光計でこのチップを走査して当該ポリマーのレーザー脱離 / イオン化 (LDI) 特性をチェックした。得られたスペクトルは下段図に示した。ペプチドは尿素による妨害を受けることなく検出された。図 15 および図 16 を参照されたい。

#### 【0259】

以上の結果から、生体分子の高濃度塩緩衝溶液をポリマー表面に直接塗布することにより生体分子を選択的に捕獲して、塩による妨害を受けないで LDI で検出することができるることは明らかである。当該表面により、洗浄工程、例えば、塩の除去を経ないで直接、緩衝液から対象生体分子を選択的に捕捉することができ、このことは、この疎水的相互作用クロマトグラフィーによる分離が被分析物の溶液をさらに処理することなく当該表面で実施できることを証明している。

#### 【0260】

本明細書に記載した実施例および実施態様は単に説明を目的としたものであり、これらを踏まえた種々の修正または変更が当業者的心に浮かぶであろうが、これらは本出願の精神および範囲ならびに添付の特許請求の範囲の内に含まれるべきであると理解される。また、本明細書に引用した出版物、特許および特許出願は全て、あらゆる目的で全文引用により本明細書に組み込まれている。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0261】

【図 1】図 1 は、CHCAMA の  $^1\text{H}$  NMR のピークと構造の相互関係を示す。

【図 2】図 2 は、CHCAMA の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルである。

【図 3】図 3 は、金製チップ上にポリ - CHCAMA を用いて得られた、ペプチド混合物の質量スペクトルである。

【図 4】図 4 は、金製チップ上にポリ - DHBMA を用いて得られた、ペプチド混合物の

10

20

30

40

50

質量スペクトルである。

【図5】図5は、金製チップ上にポリ-D H A P h e N Aを用いて得られた、ペプチド混合物の質量スペクトルである。

【図6】図6は、金製チップ上に架橋C H C A M Aを用いて得られた、ペプチド混合物の質量スペクトルである。

【図7】図7は、金製チップ上に架橋型ポリマーのポリ-D E G D M A - C H C A M Aを用いて得られた、ペプチド混合物の質量スペクトルである。

【図8】図8は、金製チップ上にコポリマーのポリ-C H C A M A / D H B M Aを用いて得られた、ペプチド混合物の質量スペクトルである。

【図9】図9は、(A)本発明のエネルギー吸収性ポリマー(ポリ-C H C A M A)と(B)C H C Aをマトリックスとする標準的M A L D Iを用いて得られたペプチド混合物の全質量範囲質量スペクトルの比較である。 10

【図10】図10は、図9のうちの対象とする低質量範囲の質量スペクトルである。

【図11】図11は、-シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸とスチレンの直鎖コポリマーを用いて得られたペプチド混合物の質量スペクトルである。

【図12】図12は、2,5-ジメチタクリロイルオキシ安息香酸とアクリル酸のコポリマーを用いて得られたペプチド混合物の質量スペクトルである。

【図13】図13は、2,6-ジメチタクリロイルオキシアセトフェノンのポリマーを用いて得られたペプチド混合物の質量スペクトルである。 20

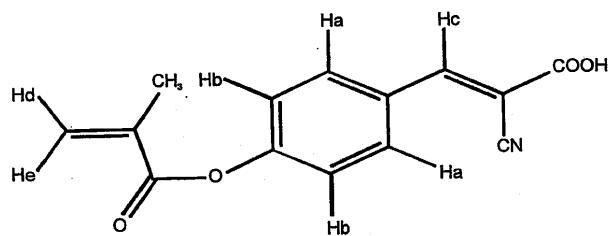
【図14】図14は、-シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸とアクリル酸のコポリマーを用いて得られたペプチド混合物の質量スペクトルである。上段の図は、シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸のホモポリマーを用いたレーザー照射によるペプチドサンプルの脱離/イオン化を示し、下段の図は、シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸とアクリル酸のコポリマーを用いたペプチドサンプルの脱離/イオン化を示す。 20

【図15】図15は、-シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸とオクタデシルメタクリレートのコポリマーを用いて得られたペプチドサンプルの質量スペクトルである。この質量スペクトルは、硫酸アンモニウム溶液を用いて実施例13のポリマー薄膜上に吸着させたペプチドのスペクトルを示す。

【図16】図16は、-シアノ-4-メタクリロイルオキシケイ皮酸とオクタデシルメタクリレートのコポリマーを用いて得られたペプチドサンプルの質量スペクトルである。この質量スペクトルは、尿素溶液を用いて実施例13のポリマー薄膜上に吸着させたペプチドのスペクトルを示す。 30

【 図 1 】

## NMR ピーク - CHCAMA



$H_a, H_b =$  二重項の二重項 @ ~ 7.3-8.2

$H_6 = -\text{重項} @ \sim 8.3$

$H_d, H_e =$  一重項 @ ~ 5.8, 6.3

CH<sub>3</sub> = 一重項 @ ~3.27

**FIG. 1**

【 図 2 】

## NMR スペクトル - CHCAMA

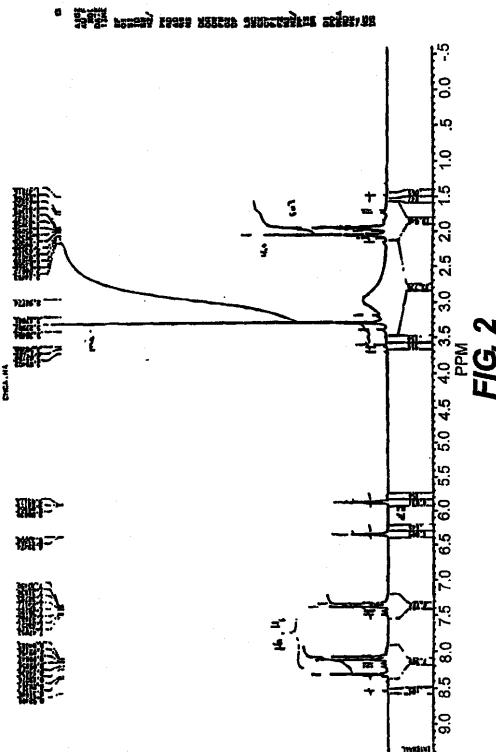


FIG. 2

【図3】

金チップ上のCHCAMA

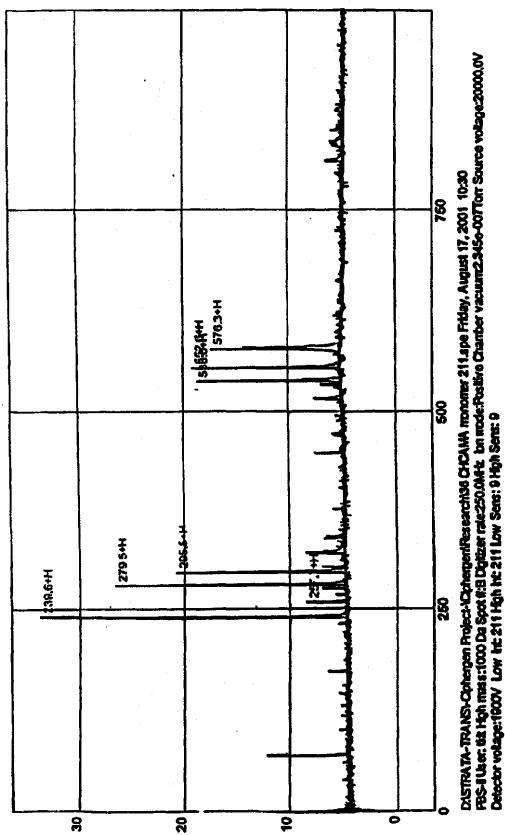


FIG. 3

【 図 4 】

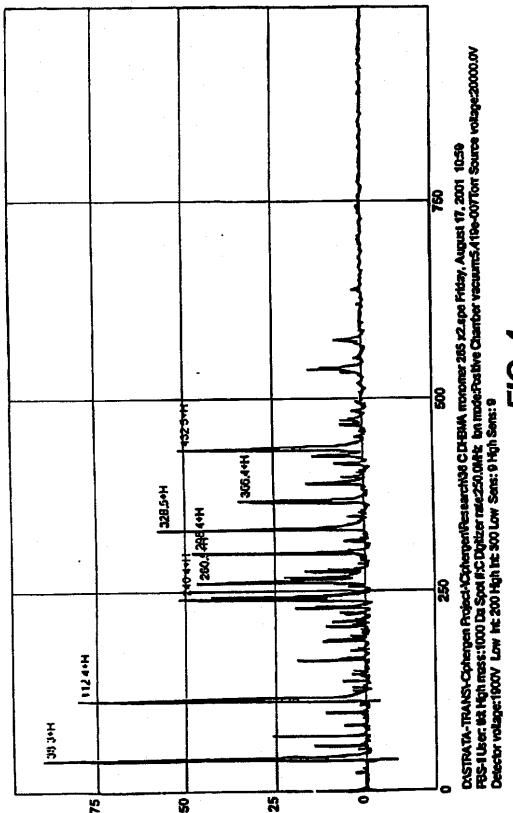
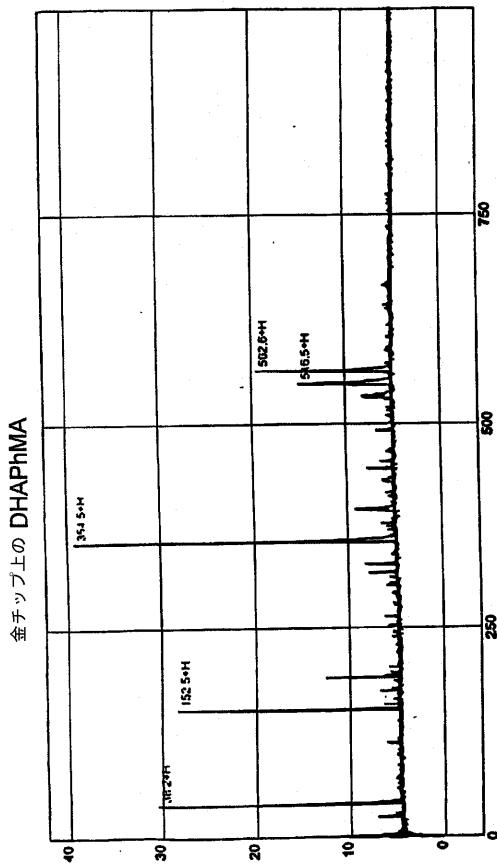


FIG. 4

【図5】



【図6】

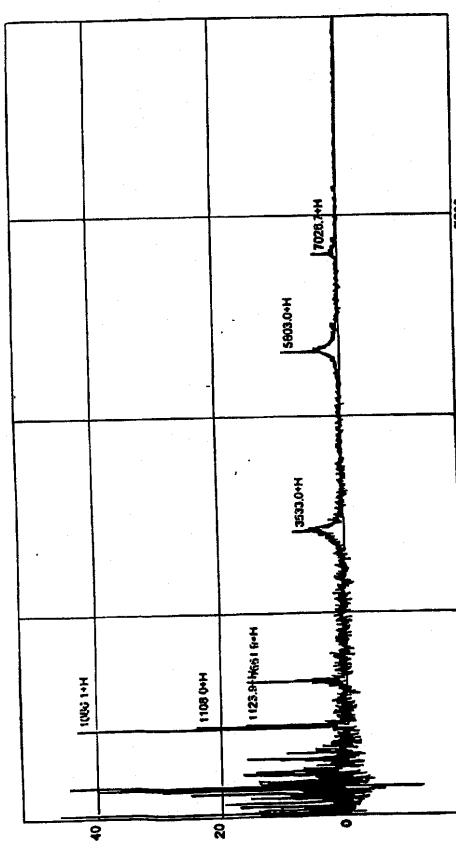


FIG. 6

【図7】

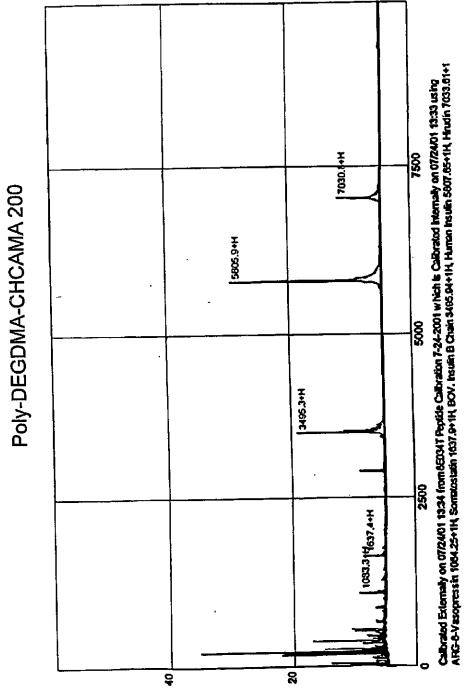


FIG. 7

【図8】

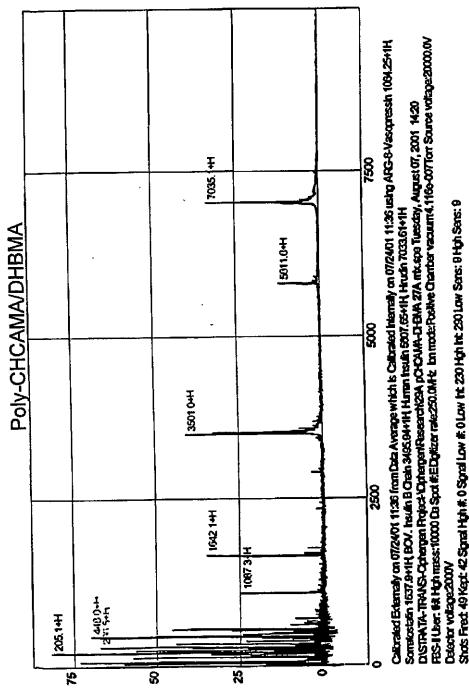


FIG. 8

Poly-DEGMA-CHCAMA 200

DISTRA-TRANS-Chemical Project-ICChpnet/Resarch05 El-DHPhMA reaction 07/24/01 11:35:16 AM  
RS-User: 841 High Intensity: 1000 Da Spot: 10000 Dpi/250.04Hz 10m/s/100m Tor Source: v0724012000.0V  
Detector voltage:1000V Low Int: 200 High Int: 250 Low Sers: 9 High Sers: 9

Calibrated Intensity on 07/24/01 11:35:16 AM which is Calculated Intensity on 07/24/01 11:35:16 AM  
Spectrum is 1000 Da Spot: 10000 Dpi/250.04Hz 10m/s/100m Tor Source: v0724012000.0V  
RS-User: 841 High Intensity: 1000 Da Spot: 10000 Dpi/250.04Hz 10m/s/100m Tor Source: v0724012000.0V  
Detector voltage:1000V Low Int: 200 High Int: 250 Low Sers: 9 High Sers: 9

Calibrated Intensity on 07/24/01 11:34 from RECON/Piezo Calibration on 07/24/01 11:32:16HQ  
RS-3-Visopressin 1000.25-1K Human testin 507.25-1K Human testin 703.25-1K Human testin 703.25-1K

【図9】

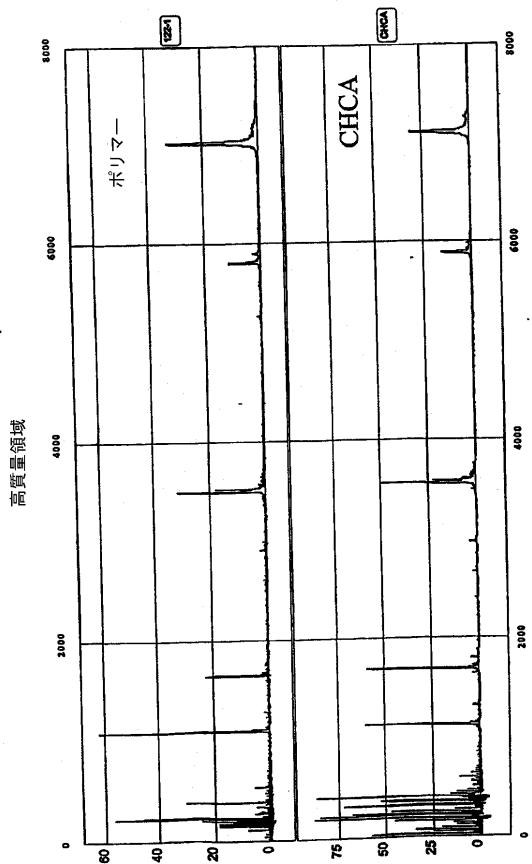


FIG. 9

【 図 1 0 】

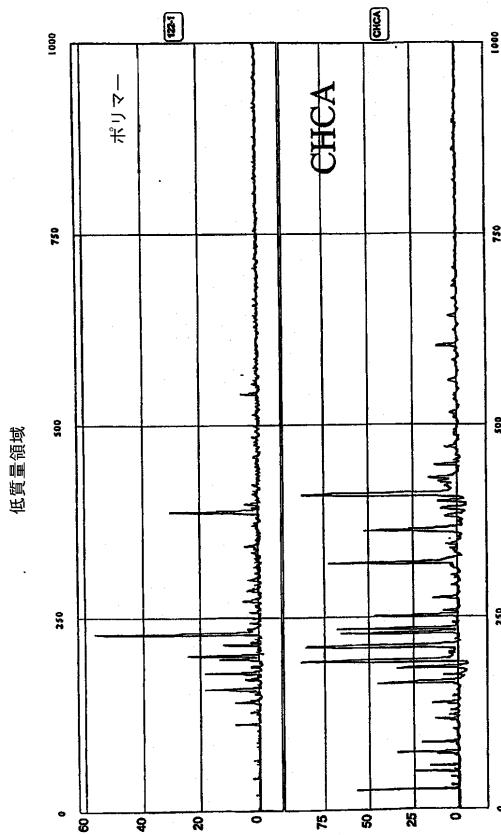


FIG. 10

【 図 1 1 】

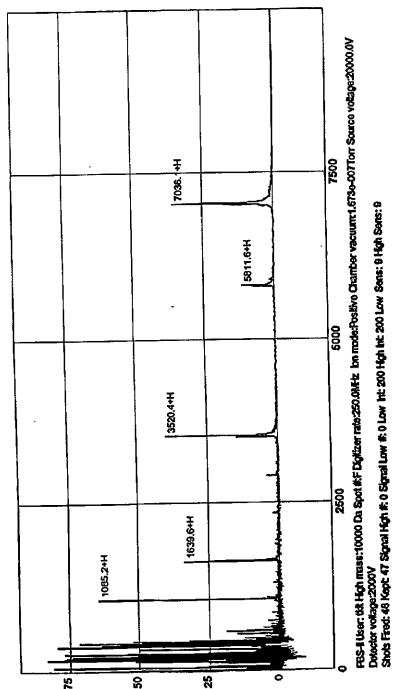


FIG. 11

【図12】

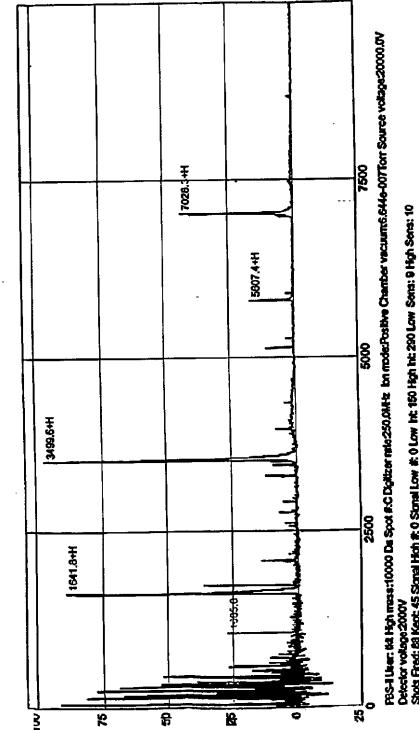


FIG. 12

【 図 1 3 】

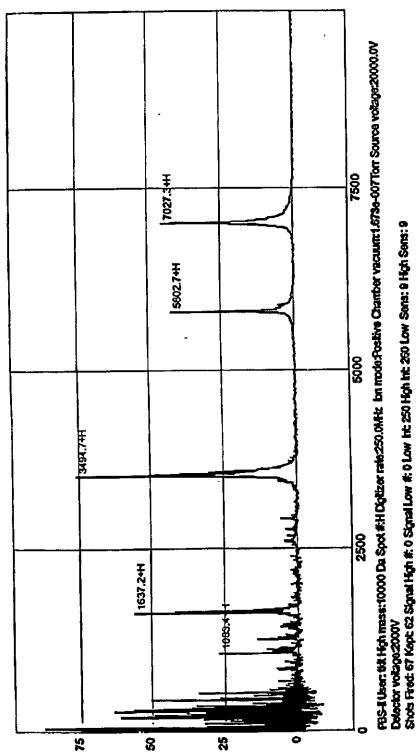


FIG. 13

【 図 1 4 】

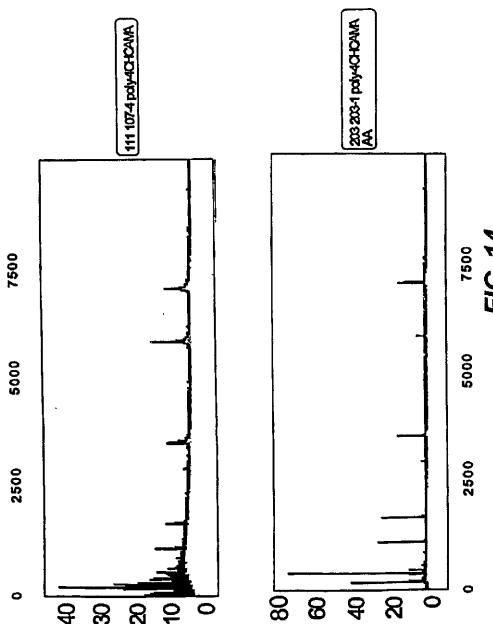


FIG. 14

【 図 1 5 】

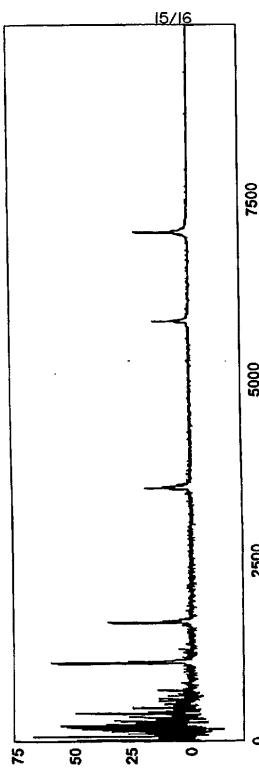


FIG. 15

【 図 1 6 】

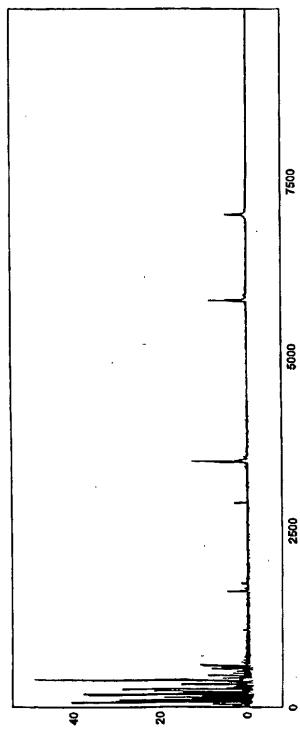
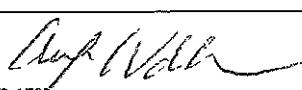


FIG. 16

## 【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                  | International application No.<br>PCT/US02/41197                                                                                                                  |            |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                  |     |   |                                                                                                                 |             |   |                                                                             |                                         |   |                                                                          |                    |   |                                                                          |             |     |  |       |   |                                                                          |                            |     |  |       |   |  |                            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|---|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---|--------------------------------------------------------------------------|--------------------|---|--------------------------------------------------------------------------|-------------|-----|--|-------|---|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-----|--|-------|---|--|----------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(7) : G01N 33/44., 21/00, 24/00<br>US CL : 436/85, 164, 173<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                  |            |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                  |     |   |                                                                                                                 |             |   |                                                                             |                                         |   |                                                                          |                    |   |                                                                          |             |     |  |       |   |                                                                          |                            |     |  |       |   |  |                            |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>U.S. : 436/85, 164, 173                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                  |            |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                  |     |   |                                                                                                                 |             |   |                                                                             |                                         |   |                                                                          |                    |   |                                                                          |             |     |  |       |   |                                                                          |                            |     |  |       |   |  |                            |
| 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)<br>Please See Continuation Sheet                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                  |            |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                  |     |   |                                                                                                                 |             |   |                                                                             |                                         |   |                                                                          |                    |   |                                                                          |             |     |  |       |   |                                                                          |                            |     |  |       |   |  |                            |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <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="padding: 2px;">US 5,719,060 A (HUTCHENS et al.) 17 February 1998 (17.02.1998), Abstract, col. 12-14, Example 4, especially col. 33, lines 42-52</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">US 3,070,442 A (COHEN et al.) 25 December 1962 (25.12.1962), the whole document, especially col. 2, lines 60-70</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-14, 16-21</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">JP 11165052 A (TORAY IND INC..) 22 June 1999 (22.06.1999), Abstract, Claims</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-14, 16-27, 29-40, 45-48, 52-54, 59-62</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">JP 04-071896 A (FUJI PHOTO FILM CO) 06 March 1992 (06.03.1992), Abstract</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-14, 16-27, 29-40</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">US 5,002,582 A (GUIRE et al.) 26 March 1991 (26.03.1991), the whole text</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-14, 16-21</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">---</td> <td style="padding: 2px;"></td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">-----</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">US 5,741,551 A (GUIRE et al.) 21 April 1998 (21.04.1998), the whole text</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">22-27, 29-43, 45-55, 59-62</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">---</td> <td style="padding: 2px;"></td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">-----</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;"></td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">22-27, 29-43, 45-55, 59-62</td> </tr> </tbody> </table> |                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                  | Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | X | US 5,719,060 A (HUTCHENS et al.) 17 February 1998 (17.02.1998), Abstract, col. 12-14, Example 4, especially col. 33, lines 42-52 | 1-2 | X | US 3,070,442 A (COHEN et al.) 25 December 1962 (25.12.1962), the whole document, especially col. 2, lines 60-70 | 1-14, 16-21 | X | JP 11165052 A (TORAY IND INC..) 22 June 1999 (22.06.1999), Abstract, Claims | 1-14, 16-27, 29-40, 45-48, 52-54, 59-62 | X | JP 04-071896 A (FUJI PHOTO FILM CO) 06 March 1992 (06.03.1992), Abstract | 1-14, 16-27, 29-40 | X | US 5,002,582 A (GUIRE et al.) 26 March 1991 (26.03.1991), the whole text | 1-14, 16-21 | --- |  | ----- | Y | US 5,741,551 A (GUIRE et al.) 21 April 1998 (21.04.1998), the whole text | 22-27, 29-43, 45-55, 59-62 | --- |  | ----- | Y |  | 22-27, 29-43, 45-55, 59-62 |
| Category *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                               | Relevant to claim No.                                                                                                                                            |            |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                  |     |   |                                                                                                                 |             |   |                                                                             |                                         |   |                                                                          |                    |   |                                                                          |             |     |  |       |   |                                                                          |                            |     |  |       |   |  |                            |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | US 5,719,060 A (HUTCHENS et al.) 17 February 1998 (17.02.1998), Abstract, col. 12-14, Example 4, especially col. 33, lines 42-52 | 1-2                                                                                                                                                              |            |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                  |     |   |                                                                                                                 |             |   |                                                                             |                                         |   |                                                                          |                    |   |                                                                          |             |     |  |       |   |                                                                          |                            |     |  |       |   |  |                            |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | US 3,070,442 A (COHEN et al.) 25 December 1962 (25.12.1962), the whole document, especially col. 2, lines 60-70                  | 1-14, 16-21                                                                                                                                                      |            |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                  |     |   |                                                                                                                 |             |   |                                                                             |                                         |   |                                                                          |                    |   |                                                                          |             |     |  |       |   |                                                                          |                            |     |  |       |   |  |                            |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | JP 11165052 A (TORAY IND INC..) 22 June 1999 (22.06.1999), Abstract, Claims                                                      | 1-14, 16-27, 29-40, 45-48, 52-54, 59-62                                                                                                                          |            |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                  |     |   |                                                                                                                 |             |   |                                                                             |                                         |   |                                                                          |                    |   |                                                                          |             |     |  |       |   |                                                                          |                            |     |  |       |   |  |                            |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | JP 04-071896 A (FUJI PHOTO FILM CO) 06 March 1992 (06.03.1992), Abstract                                                         | 1-14, 16-27, 29-40                                                                                                                                               |            |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                  |     |   |                                                                                                                 |             |   |                                                                             |                                         |   |                                                                          |                    |   |                                                                          |             |     |  |       |   |                                                                          |                            |     |  |       |   |  |                            |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | US 5,002,582 A (GUIRE et al.) 26 March 1991 (26.03.1991), the whole text                                                         | 1-14, 16-21                                                                                                                                                      |            |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                  |     |   |                                                                                                                 |             |   |                                                                             |                                         |   |                                                                          |                    |   |                                                                          |             |     |  |       |   |                                                                          |                            |     |  |       |   |  |                            |
| ---                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                  | -----                                                                                                                                                            |            |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                  |     |   |                                                                                                                 |             |   |                                                                             |                                         |   |                                                                          |                    |   |                                                                          |             |     |  |       |   |                                                                          |                            |     |  |       |   |  |                            |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | US 5,741,551 A (GUIRE et al.) 21 April 1998 (21.04.1998), the whole text                                                         | 22-27, 29-43, 45-55, 59-62                                                                                                                                       |            |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                  |     |   |                                                                                                                 |             |   |                                                                             |                                         |   |                                                                          |                    |   |                                                                          |             |     |  |       |   |                                                                          |                            |     |  |       |   |  |                            |
| ---                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                  | -----                                                                                                                                                            |            |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                  |     |   |                                                                                                                 |             |   |                                                                             |                                         |   |                                                                          |                    |   |                                                                          |             |     |  |       |   |                                                                          |                            |     |  |       |   |  |                            |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                  | 22-27, 29-43, 45-55, 59-62                                                                                                                                       |            |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                  |     |   |                                                                                                                 |             |   |                                                                             |                                         |   |                                                                          |                    |   |                                                                          |             |     |  |       |   |                                                                          |                            |     |  |       |   |  |                            |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                  |            |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                  |     |   |                                                                                                                 |             |   |                                                                             |                                         |   |                                                                          |                    |   |                                                                          |             |     |  |       |   |                                                                          |                            |     |  |       |   |  |                            |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"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<br>06 March 2004 (06.03.2004)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                  | Date of mailing of the international search report<br>13 APR 2004                                                                                                |            |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                  |     |   |                                                                                                                 |             |   |                                                                             |                                         |   |                                                                          |                    |   |                                                                          |             |     |  |       |   |                                                                          |                            |     |  |       |   |  |                            |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US<br>Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450<br>Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. (703) 305-3230                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                  | Authorized officer<br>Yelena G. Gakh, Ph.D. <br>Telephone No. (571) 272-1700 |            |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                  |     |   |                                                                                                                 |             |   |                                                                             |                                         |   |                                                                          |                    |   |                                                                          |             |     |  |       |   |                                                                          |                            |     |  |       |   |  |                            |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|                               |
|-------------------------------|
| International application No. |
| PCT/US02/41197                |

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claim Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
2.  Claim Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
3.  Claim Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
Please See Continuation Sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

|                          |
|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> |

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/41197

**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-21, drawn to a polymerizable monomer and polymeric material comprising a photo-reactive polymer.

Group II, claim(s) 22-55, 59-62, drawn to a device and a kit comprising a substrate and a polymeric material comprising photo-reactive polymer, and a method of making a device.

Group III, claim(s) 56-58, drawn to a method of detecting an analyte.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the common technical feature for three inventions is a photo-reactive polymeric material, which is well known in the art, see e.g. US 3,070,442. Therefore, the inventions lack a common special technical feature, and the restriction requirement is proper.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:  
STN,  
EAST

---

フロントページの続き

(31) 優先権主張番号 10/326,219

(32) 優先日 平成14年12月20日(2002.12.20)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(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,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ, GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,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,M Z,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW