

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 2 部門第 4 区分

【発行日】平成28年7月21日 (2016.7.21)

【公開番号】特開2016-27959(P2016-27959A)

【公開日】平成28年2月25日 (2016.2.25)

【年通号数】公開・登録公報2016-012

【出願番号】特願2015-190667(P2015-190667)

【国際特許分類】

B 3 2 B 27/30 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

【F I】

B 3 2 B 27/30 A

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 M 1/34 Z

【手続補正書】

【提出日】平成28年6月3日 (2016.6.3)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

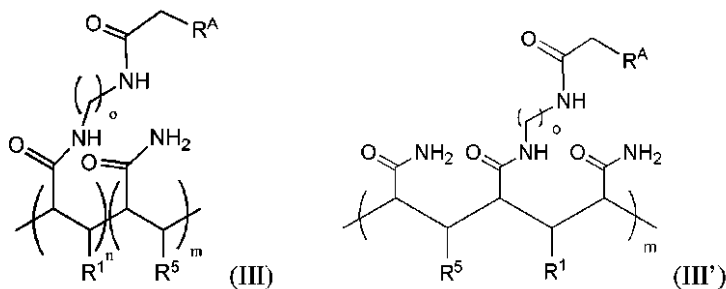
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリヌクレオチドのアレイを調製する方法であって、該方法は、
基材の表面に共有結合したポリマーコーティングを含む該基材を提供する工程であって、
該ポリマーコーティングは、式 (I I I) または (I I I ') :

【化 2 7】



(式中、R¹ は、H またはアルキルから選択され；

R^A は、水素、アミン、任意選択的に置換されているアルケン、任意選択的に置換されているアルキン、オキソ・アミン、アジド、ホルミル、ハロ、ヒドロキシ、ヒドラジニル、ヒドラゾニル、塩化シアヌル、チオシアネート、カルボン酸、グリシジル、活性型エステル、エポキシ、アジリジン、トリアゾリン、およびチオールからなる群より選択され；

各 - (CH₂) - は任意選択的に置換されていてもよく；

o は、1 ~ 50 の範囲の整数であり；

R⁵ は、H またはアルキルから選択され；

n は、1 ~ 50 , 000 の範囲の整数であり；

m は、1 ~ 100 , 000 の範囲の整数である；

ただし、 R^1 と R^5 が H であり、 α が 5 である場合、 R^A はプロモ基になり得ないものとする)

に由来するポリマーを含む、工程、および

複数の第 1 のオリゴヌクレオチドと複数の第 2 のオリゴヌクレオチドを、該ポリマーコーティングの反応性部位と反応させる工程

を含み、

ここで、該ポリマーコーティングは、該表面に結合している一連の官能基に共有結合しており、該官能基が、アクリルアミド、アルケン、アルキン、ナイトレン、アルデヒド、ヒドラジン、活性型エステル、グリシジルエーテル、アミン、マレイミド、およびオルト位にシュタウディングーライゼーションのためのホスフィン置換基を有するベンゾイルエステルからなる群より選択される、方法。

【請求項 2】

前記ポリマーコーティングに結合された前記複数の第 1 のオリゴヌクレオチドを、増幅対象の鑄型と接触させる工程をさらに含み、各鑄型が、3' 末端に、該第 1 のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズし得る配列、および 5' 末端に、その相補鎖が該第 2 のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズし得る配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記鑄型を前記第 1 のオリゴヌクレオチドと前記第 2 のオリゴヌクレオチドを用いて増幅させ、それによりポリヌクレオチドのクラスター化アレイを作製する工程をさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

R^A がアジドである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

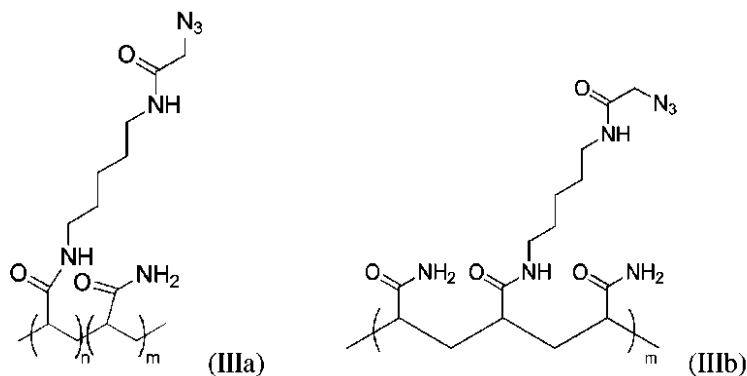
【請求項 5】

R^1 が水素であり、 α が 5 である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

式 (III) または (III') に由来する前記ポリマーコーティングが、式 (IIIa) または (IIIb) :

【化 28】



(式中、 n は 1 ~ 20, 000 の範囲の整数であり、 m は 1 ~ 100, 000 の範囲の整数である)

で表されるものでもある、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記第 1 のオリゴヌクレオチドまたは前記第 2 のオリゴヌクレオチドが、アルキン、アミン、およびアルデヒドからなる群より選択される 1 つまたは 1 つより多くの官能基を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

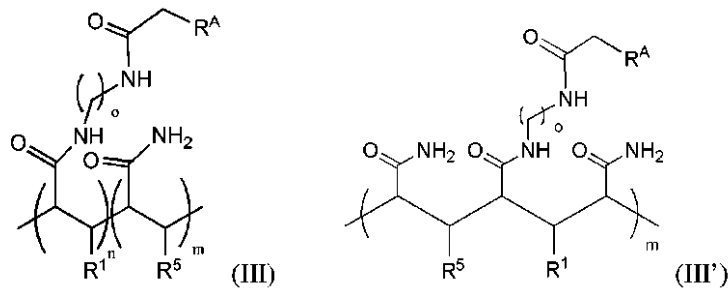
【請求項 8】

ポリヌクレオチドのアレイを調製する方法であって、該方法は、

基材の表面に共有結合したポリマーコーティングを有する該基材を提供する工程であって

、該ポリマーコーティングは、式 (I I I) または (I I I ') :

【化 2 7】



(式中、 R^1 は、H またはアルキルから選択され；

R^A は、水素、アミン、任意選択的に置換されているアルケン、任意選択的に置換されているアルキン、オキソ-アミン、アジド、ホルミル、ハロ、ヒドロキシ、ヒドラジニル、ヒドラゾニル、塩化シアヌル、チオシアネート、カルボン酸、グリシジル、活性型エステル、エポキシ、アジリジン、トリアゾリン、およびチオールからなる群より選択され；

各 $-(\text{CH}_2)_o-$ は任意選択的に置換されていてもよく；

o は、1 ~ 50 の範囲の整数であり；

R^5 は、H またはアルキルから選択され；

n は、1 ~ 50, 000 の範囲の整数であり；

m は、1 ~ 100, 000 の範囲の整数である；

ただし、 R^1 と R^5 が H であり、 o が 5 である場合、 R^A はプロモ基になり得ないものとする)

に由来するポリマーを含む、工程、および

複数の第 1 のオリゴヌクレオチドを該ポリマーコーティングの反応性部位と反応させて、該ポリマーコーティングに結合された複数の第 1 のオリゴヌクレオチドを生成する工程を含み、

ここで、該ポリマーコーティングは、該表面に結合している一連の官能基に共有結合しており、該官能基が、アクリルアミド、アルケン、アルキン、ナイトレン、アルデヒド、ヒドラジン、活性型エステル、グリシジルーエーテル、アミン、マレイミド、およびオルト位にシュタウディング-ライゲーションのためのホスフィン置換基を有するベンゾイルエステルからなる群より選択される、方法。

【請求項 9】

前記ポリマーコーティングに結合された前記複数の第 1 のオリゴヌクレオチドを、増幅対象の鋳型と接触させる工程をさらに含み、各鋳型が、3' 末端に、該第 1 のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズし得る配列を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記鋳型を前記第 1 のオリゴヌクレオチドを用いて増幅させ、それによりポリヌクレオチドのアレイを作製する工程をさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

R^A がアジドである、請求項 8 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

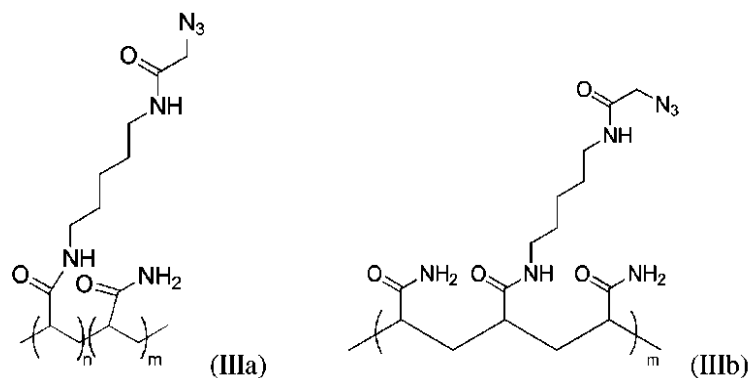
【請求項 12】

R^1 が水素であり、 o が 5 である、請求項 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

式 (I I I) または (I I I ') に由来する前記ポリマーが、式 (I I I a) または (I I I b) :

【化 2 8】



(式中、 n は 1 ~ 20 , 000 の範囲の整数であり、 m は 1 ~ 100 , 000 の範囲の整数である)

で表されるものでもある、請求項 8 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

複数の前記第 2 のオリゴヌクレオチドを前記ポリマーコーティングの反応性部位と反応させて、それにより前記ポリマーコーティングに結合された複数の第 2 のオリゴヌクレオチドを生成する工程をさらに含む、請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

鋳型の各々は、5' 末端に、その相補鎖が複数の第 2 のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズし得る配列をさらに含み、前記増幅は、該鋳型を前記第 1 のオリゴヌクレオチドと前記第 2 のオリゴヌクレオチドを用いて増幅させて、それによりポリヌクレオチドのアレイを作製する工程を含む、請求項 9 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

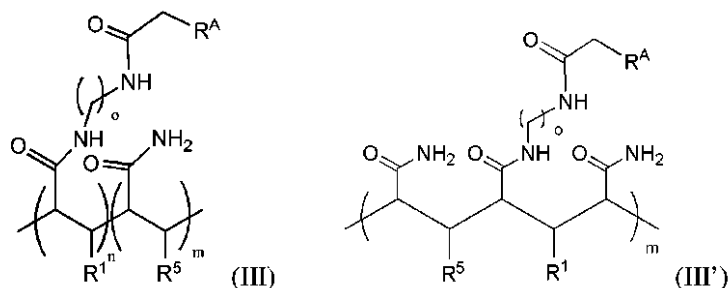
【請求項 16】

前記第 1 のオリゴヌクレオチドまたは前記第 2 のオリゴヌクレオチドがアルデヒドまたはアルキン基を含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

基材を備えたフローセルであって、
該基材は、該基材に共有結合したポリマーコーティングを含む表面を有し、
該ポリマーコーティングは、式 (III) または (III') :

【化 2 7】



(式中、 R^1 は、H またはアルキルから選択され；

R^A は、アミン、任意選択的に置換されているアルケン、任意選択的に置換されているアルキン、オキソ-アミン、アジド、ホルミル、ヒドロキシ、ヒドラジニル、ヒドラゾニル、塩化シアヌル、チオシアネート、カルボン酸、グリシジル、活性型エステル、エポキシ、アジリジン、トリアゾリン、およびチオールからなる群より選択され；

各 - (CH₂) - は任意選択的に置換されていてもよく；

o は、1 ~ 50 の範囲の整数であり；

R^5 は、H またはアルキルから選択され；
 n は、1 ～ 50，000 の範囲の整数であり；
 m は、1 ～ 100，000 の範囲の整数である）

に由来するポリマーを含み、

ここで、該ポリマーコーティングは、該表面に結合している一連の官能基に共有結合しており、該官能基が、アクリルアミド、アルケン、アルキン、ナイトレン、アルデヒド、ヒドラジン、活性型エステル、グリシジルエーテル、アミン、マレイミド、およびオルト位にシュタウディングーライゲーションのためのホスフィン置換基を有するベンゾイルエステルからなる群より選択される、
 フローセル。

【請求項 18】

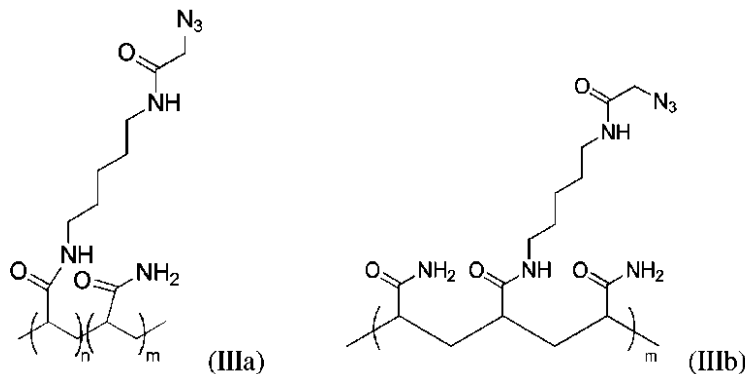
R^A がアジドである、請求項 17 に記載のフローセル。

【請求項 19】

R^1 が水素であり、 o が 5 である、請求項 17 または 18 に記載のフローセル。

【請求項 20】

式 (III) または (III') に由来する前記ポリマーが、式 (IIIa) または (IIIb)：



(式中、 n は 1 ～ 20，000 の範囲の整数であり、 m は 1 ～ 100，000 の範囲の整数である)

で表されるものでもある、請求項 17 ～ 19 のいずれか一項に記載のフローセル。

【請求項 21】

前記ポリマーコーティングを介して前記基材の前記表面に結合されるポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 17 ～ 20 のいずれか一項に記載のフローセル。

【請求項 22】

前記ポリヌクレオチドがポリヌクレオチドクラスターで存在している、請求項 21 に記載のフローセル。

【請求項 23】

単一のポリヌクレオチドクラスター内のポリヌクレオチドが同じヌクレオチド配列を有する、請求項 22 に記載のフローセル。

【請求項 24】

異なるポリヌクレオチドクラスターのポリヌクレオチドが異なるヌクレオチド配列を有する、請求項 22 に記載のフローセル。

【請求項 25】

ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定する方法であって、該方法は、

(a) ポリヌクレオチドポリメラーゼを、基材の表面に共有結合したポリマーコーティングを介して、該基材の該表面に結合されたポリヌクレオチドクラスターと接触させる工程；

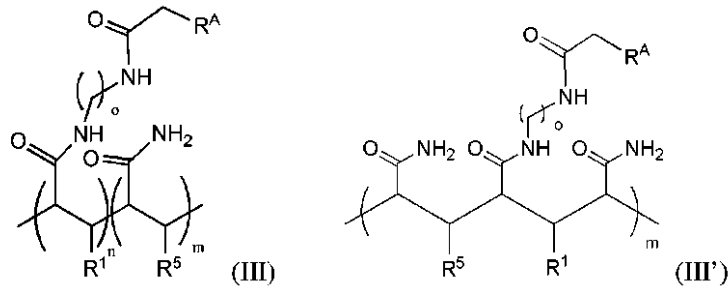
(b) 該基材の該表面にヌクレオチドを、ヌクレオチドの 1 個または 1 個より多くが該ポリヌクレオチドポリメラーゼによって利用されると検出可能なシグナルが発生するように、備える工程；

(c) 1 つまたは 1 つより多くのポリヌクレオチドクラスターにおいてシグナルを検出する工程；ならびに

(d) 工程 (b) と (c) を反復し、それにより、該 1 つまたは 1 つより多くのポリヌクレオチドクラスターに存在するポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定する工程を含み、

該ポリマーコーティングは、式 (III) または (III') ；

【化 27】



(式中、 R^1 は、H またはアルキルから選択され；

R^A は、アミン、任意選択的に置換されているアルケン、任意選択的に置換されているアルキン、オキソ-アミン、アジド、ホルミル、ヒドロキシ、ヒドラジニル、ヒドラゾニル、塩化シアヌル、チオシアネート、カルボン酸、グリシジル、活性型エステル、エポキシ、アジリジン、トリアゾリン、およびチオールからなる群より選択され；

各 $-(\text{CH}_2)_o-$ は任意選択的に置換されていてもよく；

o は、1 ~ 50 の範囲の整数であり；

R^5 は、H またはアルキルから選択され；

n は、1 ~ 50, 000 の範囲の整数であり；

m は、1 ~ 100, 000 の範囲の整数である)

に由来するポリマーを含み、

ここで、該ポリマーコーティングは、該表面に結合している一連の官能基に共有結合しており、該官能基が、アクリルアミド、アルケン、アルキン、ナイトレン、アルデヒド、ヒドラジン、活性型エステル、グリシジルエーテル、アミン、マレイミド、およびオルト位にシュタウディング-ライゲーションのためのホスフィン置換基を有するベンゾイルエステルからなる群より選択される、

方法。

【請求項 26】

R^A がアジドである、請求項 25 に記載の方法。

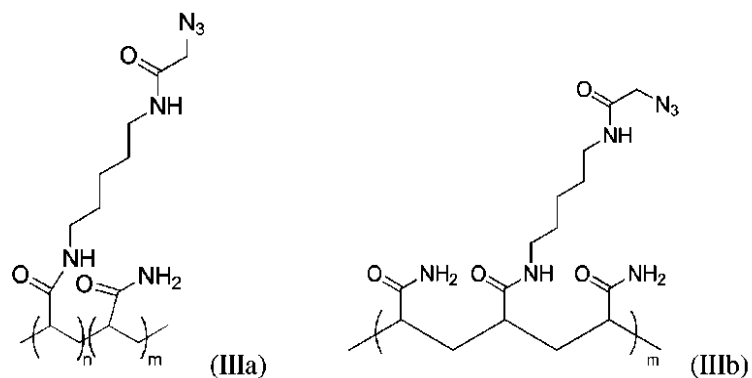
【請求項 27】

R^1 が水素であり、 o が 5 である、請求項 25 または 26 に記載の方法。

【請求項 28】

式 (III) または (III') に由来する前記ポリマーが、式 (IIIa) または (IIIb) ；

【化 2 8】



(式中、 n は1～20，000の範囲の整数であり、 m は1～100，000の範囲の整数である)

で表されるものでもある、請求項25～27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項29】

前記基材の前記表面がフローセル内に存在する、請求項25～28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

前記検出可能なシグナルが光学的シグナルを含む、請求項25～29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項31】

前記検出可能なシグナルが非光学的シグナルを含む、請求項25～29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項32】

前記非光学的シグナルがpHの変化である、請求項31に記載の方法。