

【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6部門第1区分

【発行日】平成18年1月5日(2006.1.5)

【公表番号】特表2005-506527(P2005-506527A)

【公表日】平成17年3月3日(2005.3.3)

【年通号数】公開・登録公報2005-009

【出願番号】特願2003-534911(P2003-534911)

【国際特許分類】

G 0 1 N	33/543	(2006.01)
C 1 2 M	1/00	(2006.01)
C 1 2 M	1/34	(2006.01)
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)
G 0 1 N	33/53	(2006.01)
G 0 1 N	37/00	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)

【F I】

G 0 1 N	33/543	5 2 5 U
G 0 1 N	33/543	5 4 1 A
G 0 1 N	33/543	5 4 1 B
G 0 1 N	33/543	5 7 5
C 1 2 M	1/00	A
C 1 2 M	1/34	Z
C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	33/53	M
G 0 1 N	33/53	U
G 0 1 N	37/00	1 0 2
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	15/00	F

【手続補正書】

【提出日】平成17年9月29日(2005.9.29)

【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】

サンプル中のターゲットの検出方法であって、以下のステップ：

a) (i) 支持体；及び

(ii) 固定化材料を介して上記支持体上にランダムに固定化された複数の微粒子(ここで、各微粒子は、その微粒子に結合した自己コーディング・マーカーとプローブを含み、各自己コーディング・マーカーとプローブは、ユニークな自己コーディング・マーカー/プローブ対を含み、そして当該プローブは、上記ターゲットに特異的に結合するよう形状化され、かつ、配置されている)を含むアレイを用意し；

b) 上記ターゲットを含むと疑われるサンプルを上記アレイに適用し；

c) 上記ターゲットが上記プローブに結合しうる条件下に上記サンプルと上記アレイを維持し；そして

d) 上記微粒子に結合した自己コーディング・マーカーと、当該微粒子に会合したタ-

ゲット・マーカーとを検出する
を含む前記方法。

【請求項 2】

前記固定化材料が反応性ポリマーを含み、当該反応性ポリマーが上記支持体に結合され、そして前記微粒子が上記反応性ポリマーを介して上記支持体上に固定化される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記反応性ポリマーが少なくとも1つの光反応基を有する光反応性ポリマーを含み、かつ、当該光反応性基が、アリール・ケトン、アリールアジド、アシル・アジド、スルホニル・アジド、ホスホリル・アジド、ジアゾアルカン、ジアゾケトン、ジアゾアセテート、及びケテンから成る群から選ばれる、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記反応性ポリマーが、官能性ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリエチレン・グリコール、ポリビニル・アルコール、ポリ(HEMA)、これらのコポリマー、及びこれらの組み合わせから成る群から選ばれるポリマーを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 5】

前記反応性ポリマーが、ビニルピロリドンとN-[3-(4-ベンゾイルベンズアミド)プロピル]メタクリルアミド(BBA-APMA)；及びアクリルアミドとBBA-APMAから成る光反応性コポリマーの群から選ばれる、請求項2に記載の方法。

【請求項 6】

前記反応性ポリマーが、官能性多糖、グリコサミノグリカン、ポリペプチド、及びこれらの組み合わせから成る群から選ばれるポリマーを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 7】

前記固定化材料を上記支持体上でパターン形成して上記固定化材料のパッチを形成し、前記微粒子を固定化材料の当該パッチ上に固定化する、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

前記複数の微粒子が、ユニークな自己コーディング・マーカー／プローブ対を有する微粒子のサブセットを2つ以上含み、かつ、当該微粒子のサブセットを、前記支持体上の固定化材料の別々のパッチ上に別個に配置する、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

前記検出ステップが前記サブセットの位置を決定する操作をさらに含み、上記自己コーディング・マーカーを検出する操作と組み合わせることにより、前記プローブの同定を少なくとも可能にする、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

前記固定化材料が結合ペアを含み、ここで、上記結合ペアの一方は支持体に結合し、及び当該結合ペアの他方は微粒子に結合し、そして上記結合ペアのメンバー同士の相互作用によって上記支持体上に上記微粒子が固定化される、請求項1に記載の方法。

【請求項 11】

前記結合ペアが、ストレプトアビジン：ビオチン、プロテインA/G：IgG及び抗原：抗抗原抗体、レクチン：炭水化物、並びに化学的-親和性結合ペアから成る群から選ばれる、請求項8に記載の方法。

【請求項 12】

前記微粒子を反応性化合物を用いて官能化し、そして当該反応性化合物を用いて上記微粒子を前記固定化材料、前記自己コーディング・マーカー、前記プローブ、あるいはこれらの任意の組み合わせに結合させる、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

前記反応性化合物が、カルボン酸、スルホン酸、リン酸、ホスホン酸、アルデヒド基、アミン基、血オール基、チオール反応基、及びエポキシド基から成る群から選ばれる反応基を含む、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

前記サンプルを処理して、前記ターゲット・マーカーを前記ターゲットに結合させる、請求項1に記載の方法。

【請求項 15】

前記プローブが核酸プローブであり、かつ、前記ターゲットが、サンプル中に存在していて当該核酸プローブと特異的にハイブリダイズする核酸ターゲットである、請求項1に記載の方法。

【請求項 16】

前記プローブが抗体プローブであり、かつ、前記ターゲットが、サンプル中に存在していて当該抗体によって特異的に認識される分子である、請求項1に記載の方法。

【請求項 17】

前記自己コーディング・マーカーが、少なくとも1つの検出可能な粒子を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 18】

前記少なくとも1つの検出可能な粒子が、発蛍光団、量子ドット、放射性同位体、及び磁性粒子から成る群から選ばれる、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

前記自己コーディング・マーカーが、検出可能な粒子の組み合わせを含む、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

アレイの製造方法であって、以下のステップ：

a) 複数の微粒子（ここで、各微粒子は、その微粒子に結合した自己コーディング・マーカーとプローブを含み、各自己コーディング・マーカーとプローブは、ユニークな自己コーディング・マーカー／プローブ対を含み、そして当該プローブは、サンプル中に存在するターゲットに特異的に結合するように形状化され、かつ配置されている）を含む混合物を調製し；

b) 支持体と、場合によっては上記微粒子を固定化材料でコーティングし；そして

c) 複数の微粒子を含む上記混合物を、当該微粒子が上記固定化材料を介して上記支持体上にランダムなパターンで固定化されるように当該支持体上に配置する

を含む前記方法。

【請求項 21】

前記固定化材料が反応性ポリマーを含み、当該反応性ポリマーが上記支持体に結合され、そして前記微粒子が上記反応性ポリマーを介して上記支持体上に固定化される、請求項20に記載の方法。

【請求項 22】

前記反応性ポリマーが少なくとも1つの光反応基を有する光反応性ポリマーを含み、かつ、当該光反応性基が、アリール・ケトン、アリールアジド、アシル・アジド、スルホニル・アジド、ホスホリル・アジド、ジアゾアルカン、ジアゾケトン、ジアゾアセテート、及びケテンから成る群から選ばれる、請求項21に記載の方法。

【請求項 23】

前記反応性ポリマーが、官能性ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリエチレン・グリコール、ポリビニル・アルコール、ポリ(HEMA)、これらのコポリマー、及びこれらの組み合わせから成る群から選ばれるポリマーを含む、請求項21に記載の方法。

【請求項 24】

前記反応性ポリマーが、ビニルピロリドンとN-[3-(4-ベンゾイルベンズアミド)プロピル]メタクリルアミド(BBA-APMA)；及びアクリルアミドとBBA-APMAから成る光反応性コポリマーの群から選ばれる、請求項21に記載の方法。

【請求項 25】

前記反応性ポリマーが、官能性多糖、グリコサミノグリカン、ポリペプチド、及びこれ

らの組み合わせからなる群から選ばれるポリマーを含む、請求項21に記載の方法。

【請求項 26】

前記コーティング・ステップが、固定化材料を前記支持体上でパターン形成して上記固定化材料のパッチを形成する操作を含む、請求項20に記載の方法。

【請求項 27】

前記配置ステップが、前記の固定化材料のパッチを介して微粒子を前記支持体上に固定化する操作を含む、請求項26に記載の方法。

【請求項 28】

前記調製ステップが、ユニークな自己コーディング・マーカー／プローブ対を有する微粒子のサブセットを2つ以上調製する操作を含み、かつ、前記配置ステップが、前記支持体上の固定化材料の別々のパッチ上に微粒子のサブセットを別個に配置する操作を含む、請求項26に記載の方法。

【請求項 29】

前記固定化材料が結合ペアを含み、ここで、前記コーティング・ステップが、上記結合ペアの一方のメンバーを支持体と結合させ、及び当該結合ペアの他方のメンバーを微粒子と結合させる操作を含み、そして前記配置ステップが、上記結合ペアのメンバー同士を相互作用させて上記支持体上に上記微粒子を固定化する操作を含む、請求項20に記載の方法。

【請求項 30】

前記結合ペアが、ストレプトアビジン：ビオチン、プロテインA/G：IgG及び抗原：抗抗原抗体、レクチン：炭水化物、並びに化学的-親和性結合ペアから成る群から選ばれる、請求項29に記載の方法。

【請求項 31】

前記調製ステップが、前記微粒子を反応性化合物でコーティングする操作であって、当該反応性化合物を用いて上記微粒子を前記固定化材料、前記自己コーディング・マーカー、前記プローブ、あるいはこれらの組み合わせに結合させる操作をさらに含む、請求項20に記載の方法。

【請求項 32】

前記反応性化合物が、カルボン酸、スルホン酸、リン酸、ホスホン酸、アルデヒド基、アミン基、チオール基、チオール反応基、及びエポキシド基から成る群から選ばれる反応基を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項 33】

前記プローブが核酸プローブである、請求項20に記載の方法。

【請求項 34】

前記プローブが抗体プローブである、請求項20に記載の方法。

【請求項 35】

前記自己コーディング・マーカーが、少なくとも1つの検出可能な粒子を含み、かつ、前記調製ステップが、前記微粒子を当該少なくとも1つの検出可能な粒子に結合させる操作を含む、請求項20に記載の方法。

【請求項 36】

前記検出可能な粒子が、発蛍光団、量子ドット、放射性同位体、及び磁性粒子から成る群から選ばれる、請求項35に記載の方法。

【請求項 37】

前記自己コーディング・マーカーが、検出可能な粒子の組み合わせを含み、かつ、前記調製ステップが、前記微粒子を当該検出可能な粒子の組み合わせに結合させる操作を含む、請求項36に記載の方法。

【請求項 38】

以下の：

a) 支持体；

b) 上記支持体上にランダムに固定化された複数の微粒子（ここで、各微粒子は、その

微粒子に結合した自己コーディング・マーカーとプローブを含み、それぞれの自己コーディング・マーカーとプローブは、独自の自己コーディング・マーカー／プローブ対を含み、そして上記プローブは、サンプル中に存在するターゲットに特異的に結合するように形状化され、かつ、配置されている) ; 及び

c) 上記微粒子を上記支持体上に固定化する固定化材料を含むアレイ。

【請求項 39】

前記固定化材料が反応性ポリマーを含み、当該反応性ポリマーが上記支持体に結合され、そして前記微粒子が上記反応性ポリマーを介して上記支持体上に固定化される、請求項38に記載のアレイ。

【請求項 40】

前記反応性ポリマーが少なくとも1つの光反応基を有する光反応性ポリマーを含み、かつ当該光反応基が、アリール・ケトン、アリールアジド、アシル・アジド、スルホニル・アジド、ホスホリル・アジド、ジアゾアルカン、ジアゾケトン、ジアゾアセテート、及びケテンから成る群から選ばれる、請求項39に記載のアレイ。

【請求項 41】

前記反応性ポリマーが、官能性ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリエチレン・グリコール、ポリビニル・アルコール、ポリ(HEMA)、これらのコポリマー、及びこれらの組み合わせから成る群から選ばれるポリマーを含む、請求項39に記載のアレイ。

【請求項 42】

前記反応性ポリマーが、ビニルピロリドンとN-[3-(4-ベンゾイルベンズアミド)プロピル]メタクリルアミド(BBA-APMA)；及びアクリルアミドとBBA-APMAから成る光反応性コポリマーの群から選ばれる、請求項39に記載のアレイ。

【請求項 43】

前記反応性ポリマーが、官能性多糖、グリコサミノグリカン、ポリペプチド、及びこれらの組み合わせから成る群から選ばれるポリマーを含む、請求項39に記載のアレイ。

【請求項 44】

前記固定化材料が上記支持体上でパターン形成されることで上記支持体上に固定化材料のパッチを形成している、請求項38に記載のアレイ。

【請求項 45】

前記微粒子が前記固定化材料のパッチを介して前記支持体上に固定化されている、請求項44に記載のアレイ。

【請求項 46】

前記複数の微粒子が、ユニークな自己コーディング・マーカー／プローブ対を有する微粒子のサブセットを2つ以上含み、かつ、当該微粒子のサブセットを、前記支持体上の固定化材料の別々のパッチ上に別個に配置する、請求項45に記載のアレイ。

【請求項 47】

前記固定化材料が結合ペアを含み、ここで上記結合ペアの一方は支持体に結合し、及び当該結合ペアの他方は微粒子に結合し、そして上記結合ペアのメンバー同士の相互作用によって上記支持体上に上記微粒子が固定化される、請求項38に記載のアレイ。

【請求項 48】

前記結合ペアが、ストレプトアビシン：ビオチン、プロテインA/G：IgG及び抗原：抗抗原抗体、レクチン：炭水化物、並びに化学的-親和性結合ペアから成る群から選ばれる、請求項47に記載のアレイ。

【請求項 49】

前記微粒子が、反応性化合物から成るコーティングをさらに含み、ここで、当該反応性化合物を用いて上記微粒子を前記固定化材料、前記自己コーディング・マーカー、前記プローブ、あるいはこれらの組み合わせに結合させる、請求項38に記載のアレイ。

【請求項 50】

前記反応性化合物が、カルボン酸、スルホン酸、リン酸、ホスホン酸、アルデヒド基、アミン基、チオール基、チオール反応基、及びエポキシド基から成る群から選ばれる反応基を含む、請求項49に記載のアレイ。

【請求項 5 1】

前記プローブが核酸プローブである、請求項38に記載のアレイ。

【請求項 5 2】

前記プローブが抗体プローブである、請求項38に記載のアレイ。

【請求項 5 3】

前記自己コーディング・マーカーが、少なくとも1つの検出可能な粒子を含み、その少なくとも1つの検出可能な粒子が前記微粒子に結合している、請求項38に記載のアレイ。

【請求項 5 4】

前記検出可能な粒子が、発蛍光団、量子ドット、放射性同位体、及び磁性粒子から成る群から選ばれる、請求項53に記載のアレイ。

【請求項 5 5】

前記自己コーディング・マーカーが、検出可能な粒子の組み合わせを含む、請求項54に記載のアレイ。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 8】

いくつかの実施態様では、微粒子の表面を官能性し、1つ以上のプローブを微粒子に結合させるための“反応基”、1つ以上の検出可能な部分を微粒子に結合させるための“反応基”、微粒子同士を互いに結合させるための“反応基”、微粒子を固定化材料または支持体に結合させるための“反応基”を設ける。適切な反応基は、微粒子に会合する部分の性質に応じて選択することができる。適切な反応基の具体例として、カルボン酸、スルホン酸、リン酸、ホスホン酸、アルデヒド基、アミン基、チオール基、チオール反応基、エポキシド基などが挙げられるが、これだけに限られるわけではない。例えば、水溶性カルボジイミド試薬を用いてタンパク質やそれ以外のアミン含有分子を共有結合させるのにカルボキシリル官能化微粒子を使用することができる。穏やかな条件下で微粒子をタンパク質やそれ以外のアミンに結合させるのにアルデヒド官能化微粒子を使用することができる。微粒子をさまざまなアミン反応部分（ハプテンや薬剤のスクシンイミジルエステルとイソチオシアナート、タンパク質のカルボン酸）に結合させるのにアミン官能性微粒子を使用することができる。別の実施態様では、ユーザーが受動的にタンパク質（ウシ血清アルブミン（BSA）、IgG、アビジン、ストレプトアビジンなど）を吸収させたい場合に硫酸塩で修飾した微粒子を使用することができる。別の実施態様では、反応基として、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、プロテインAなどの結合基が挙げられる。官能性微粒子は、モレキュラー・プローブズ社（ユージン、オレゴン州）を始めとする多数の供給源から入手することもできる。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 9】

いくつかの実施態様では、架橋剤を用いて微粒子を他の部分と結合させることができる。例えばピアース・ケミカル社（ロックフォード、イリノイ州）から入手できる市販の架橋剤を用いると、例えばタンパク質のアミン基を介して微粒子を互いに結合させることができる。有効な架橋剤としては、ホモ二官能架橋剤とヘテロ二官能架橋剤が挙げられる。

コーティングした微粒子で使用できる架橋剤の具体例を2つ挙げると、スペリン酸ジ-スクシンイミジルと1,4-ビス-マレイミドブタンであるが、これだけに限られるわけではない。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0074

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0074】

別の実施態様では、オリゴヌクレオチドを合成し、そのオリゴヌクレオチドの特異的部位（例えば骨格に沿った位置、あるいは3'末端または5'末端）に化学的反応基を組み込むことができる。例えばオリゴヌクレオチドのこれら位置の任意のところにアミン基を組み込むことのできる市販の試薬または固体支持体が利用可能である。次に、熱化学的反応基を有する光反応性化合物とアミン基をこの明細書に記載したようにして反応させると、アミド結合が光反応基とオリゴヌクレオチドの間に形成される。他の求電子種や求核種でも似たような結合法を提供することができる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0120

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0120】

タンパク質サンプルは標識することが好ましい。そのとき、タンパク質ターゲットの検出が可能になるように、また、そのタンパク質ターゲットが、微粒子と結合するプローブと相互作用する能力を保持するように標識する。発蛍光団をタンパク質ターゲット上のアミノ酸残基に結合させうる試薬を利用できる。アミン反応基として、例えばスクシンイミジルエステル（スルホスクシンイミジルエステルを含む）、イソチオシアナート、スルホニルクロリド、ジクロロトリアジン、ハロゲン化アリール、アシル・アジドが発蛍光団プローブとして利用可能であり、タンパク質ターゲットの標識に使用することができる。多彩なこれらのアミン反応性発蛍光団プローブは市販されており、例えばアレクサ・フルオア（登録商標）350カルボン酸、スクシンイミジルエステル；4,4'-ジフルオロ-5-(2-チエニル)-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸、スクシンイミジルエステル（BODIPY（登録商標）558/568、SE）；6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2'-7'-ジメトキシフルオレセイン、スクシンイミジルエステル（6-JOE、SE）（モレキュラー・プローブズ社、ユージン、オレゴン州）などがある。別の状況では、タンパク質ターゲットをチオール反応性蛍光誘導体（例えばN,N'-ジダンシル-L-시스チン（モレキュラー・プローブズ社、ユージン、オレゴン州））で標識すると望ましい可能性がある。別の試薬（例えばヒドラジン基、芳香族ジアゾニウム塩、アミン基のいずれかを含む蛍光染料）を用いてタンパク質サンプルに標識することもできる。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0121

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0121】

タンパク質ターゲットは、市販されている二官能架橋剤（例えばNHS-ASA（ピアース・ケミカル社、ロックフォード、イリノイ州））を用いて蛍光タンパク質（例えば緑蛍光タンパク質（GFP））に結合させることもできる。アミン基、スルフヒドリル基、炭水化物、カルボキシル基、ヒドロキシル基と反応する別の二官能架橋剤が市販されており（例えばピアース・ケミカル社、ロックフォード、イリノイ州）、興味の対照であるタンパク質

をタンパク質ターゲットに結合させるのに使用できる。タンパク質ターゲットを1次試薬に結合させて2次発蛍光団を検出することもできる。いくつかの実施態様では、タンパク質を例えばスルホ-NHS-ビオチンで修飾した後、2次発蛍光団試薬（例えばストレプトアビジン-Cy3）に結合させることができる。