(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4328533号
(P4328533)

(45)発行日　平成21年9月9日(2009.9.9)　(24)登録日　平成21年6月19日(2009.6.19)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
A61L 27/00	(2006.01)	A61L	27/00	V
C12M 1/00	(2006.01)	C12M	1/00	A

請求項の数 39　(全 18 頁)

(21)出願番号	特願2002-576602 (P2002-576602)
(86)(22)出願日	平成14年2月4日 (2002.2.4)
(65)公表番号	特表2004-524038 (P2004-524038A)
(43)公表日	平成16年8月12日 (2004.8.12)
(86)国際出願番号	PCT/US2002/003341
(87)国際公開番号	WO2002/077159
(87)国際公開日	平成14年10月3日 (2002.10.3)
審査請求日	平成17年1月19日 (2005.1.19)
(31)優先権主張番号	60/266,081
(32)優先日	平成13年2月2日 (2001.2.2)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　503280477
オールヴィヴォ　インコーポレイテッド
ＡＬＬＶＩＶＯ，ＩＮＣ．
アメリカ合衆国　９２６３０　カリフォルニア州　レイク　フォレスト　ベイク　パークウェイ　２０９１４　スイート　１１２
(74)代理人　100068755
弁理士　恩田　博宣
(74)代理人　100105957
弁理士　恩田　誠
(72)発明者　カルドウェル、カリン
スウェーデン国　Ｓ－１８２５５　ユーッシュホルム　トレバッカベーゲン　ナンバーワン

最終頁に続く

(54)【発明の名称】複数の生体分子を規定の比率にて表面に共に固定化する方法及び同方法により形成された表面

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

Ｎ種のタイプの生体分子を基材上に規定の比率で共に固定化する方法であって、前記Ｎは２以上の整数であり、前記方法は、

（ａ）Ｎ種のタイプのオリゴヌクレオチドのうちの１つを、活性化された末端基を有する１つ以上の親水性部分と組み合わされた少なくとも１つの疎水性部分を含むトリブロックまたはジブロック共重合体に結合し、Ｎ種のタイプの共重合体結合オリゴヌクレオチドを形成させるステップと；

（ｂ）前記Ｎ種のタイプの共重合体結合オリゴヌクレオチドを溶液中で混合して、共重合体結合オリゴヌクレオチドの混合物を形成するステップであって、各タイプの共重合体結合オリゴヌクレオチドの分子の量がその他のタイプの共重合体結合オリゴヌクレオチドの各々の分子の量と比較して規定の比率に相当するように、各タイプの共重合体結合オリゴヌクレオチドがＮ種の生体分子の１つに対応するステップと；

（ｃ）基材を、前記共重合体が基材に吸着されるために十分な時間だけ同共重合体結合オリゴヌクレオチドの混合物に接触させて、それにより前記基材に吸着される各タイプの共重合体結合オリゴヌクレオチドの分子の量が前記基材に吸着されるその他のタイプの共重合体結合オリゴヌクレオチドの各々の分子の量と比較して規定の比率に相当するようになるステップと；

（ｄ）Ｎ種のタイプの生体分子をＮ種のタイプの相補的オリゴヌクレオチドに結合させてＮ種のタイプの生体分子結合オリゴヌクレオチドを形成させるステップであって、各タイ

プの生体分子が対応する共重合体結合オリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドに結合されるステップと；
（ｅ）Ｎ種のタイプの生体分子結合オリゴヌクレオチドを共重合体結合オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成させて、前記基材上に共に固定化されたＮ種のタイプの生体分子を規定の比率にて形成するステップと；
からなり、
前記共重合体は、ＰＥＯ－およびＰＰＯ－含有トリブロック共重合体である、方法。
【請求項２】
１つ又はそれ以上の生体分子がタンパク質または糖タンパク質である請求項１に記載の方法。
【請求項３】
１つまたはそれ以上の生体分子がペプチドである請求項１に記載の方法。
【請求項４】
１つ又はそれ以上の生体分子が成長因子である請求項１に記載の方法。
【請求項５】
１つ又はそれ以上の生体分子が付着因子である請求項１に記載の方法。
【請求項６】
１つ又はそれ以上の生体分子が細胞外マトリクス因子である請求項１に記載の方法。
【請求項７】
１つ又はそれ以上の生体分子が接着分子である請求項１に記載の方法。
【請求項８】
１つ又はそれ以上の生体分子がサイトカインである請求項１に記載の方法。
【請求項９】
１つ又はそれ以上の生体分子がレクチンである請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記トリブロック共重合体の活性化された末端基が２－ピリジルジスルフィドを含む請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
１つ又はそれ以上の生体分子が抗体である請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
Ｎ種のタイプの生体分子を規定の比率で備えた表面であって、細胞の接着、増殖、細胞の挙動の方向付け、または細胞の解析のための表面において、前記生体分子が、１つ以上の親水性部分と組み合わされた少なくとも１つの疎水性部分を含むトリブロックまたはジブロック共重合体であって該表面に吸着されるトリブロックまたはジブロック共重合体に結合される相補的オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドに結合され、かつ前記Ｎは２以上の整数であり、
前記共重合体は、ＰＥＯ－およびＰＰＯ－含有トリブロック共重合体である、表面。
【請求項１３】
１つまたはそれ以上の生体分子が、タンパク質、糖タンパク質、細胞外マトリクス因子、ペプチド、細胞接着分子、サイトカイン、多糖、またはレクチンから選択される請求項１２に記載の表面。
【請求項１４】
Ｎ種のタイプの生体分子を規定の比率で備えた基材表面であって、細胞の付着、増殖、細胞の挙動の方向付け、または細胞の解析のための基材表面を作製する方法において、前記Ｎは２以上の整数であり、前記方法は、
（ａ）Ｎ種のタイプのオリゴヌクレオチドのうちの１つを、活性化された末端基を有する１つ以上の親水性部分と組み合わされた少なくとも１つの疎水性部分を含むトリブロックまたはジブロック共重合体に結合し、Ｎ種のタイプの共重合体結合オリゴヌクレオチドを形成させるステップと；
（ｂ）前記Ｎ種のタイプの共重合体結合オリゴヌクレオチドを溶液中で混合して、共重合

体結合オリゴヌクレオチドの混合物を形成するステップであって、各タイプの共重合体結合オリゴヌクレオチドの分子の量がその他のタイプの共重合体結合オリゴヌクレオチドの各々の分子の量と比較して規定の比率に相当するように、各タイプの共重合体結合オリゴヌクレオチドがＮ種の生体分子の１つに対応するステップと；
（ｃ）基材表面を、前記共重合体が基材表面に吸着されるために十分な時間だけ共重合体結合オリゴヌクレオチドの混合物に接触させて、それにより前記表面に吸着される各タイプの共重合体結合オリゴヌクレオチドの分子の量が前記表面に吸着されるその他のタイプの共重合体結合オリゴヌクレオチドの各々の分子の量と比較して規定の比率に相当するようになるステップと；
（ｄ）Ｎ種のタイプの生体分子をＮ種のタイプの相補的オリゴヌクレオチドに結合させてＮ種のタイプの生体分子結合オリゴヌクレオチドを形成させるステップであって、各タイプの生体分子が対応する共重合体結合オリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドに結合されるステップと；
（ｅ）Ｎ種のタイプの生体分子結合オリゴヌクレオチドを共重合体結合オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成させて、前記基材表面上に共に固定化されたＮ種のタイプの生体分子を規定の比率にて形成するステップと、
からなり、
前記共重合体は、ＰＥＯ－およびＰＰＯ－含有トリブロック共重合体である、方法。
【請求項１５】
１つまたはそれ以上の生体分子がタンパク質または糖タンパク質である請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
１つまたはそれ以上の生体分子がペプチドである請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
１つまたはそれ以上の生体分子が成長因子である請求項１４に記載の方法。
【請求項１８】
１つまたはそれ以上の生体分子が細胞付着因子である請求項１４に記載の方法。
【請求項１９】
１つまたはそれ以上の生体分子が付着阻害因子である請求項１４に記載の方法。
【請求項２０】
１つまたはそれ以上の生体分子が細胞外マトリクス因子である請求項１４に記載の方法。
【請求項２１】
前記トリブロック共重合体の活性化された末端基が２－ピリジルジスルフィドを含む請求項１４に記載の方法。
【請求項２２】
生体分子は抗体、細胞接着分子、サイトカイン、多糖、およびレクチンから選択される請求項１４に記載の方法。
【請求項２３】
Ｎ種のタイプの生体分子を有する表面であって、同Ｎ種のタイプの生体分子が規定の比率にて同表面に共に固定化された表面において、前記Ｎは２以上の整数であり、かつ前記表面は、
（ａ）基材と；
（ｂ）１つ以上の親水性部分と組み合わされた少なくとも１つの疎水性部分を含むトリブロックまたはジブロック共重合体であって、前記基材に吸着されるトリブロックまたはジブロック共重合体と；
（ｃ）前記共重合体に結合される第１組のＮ種のオリゴヌクレオチドと；
（ｄ）前記第１組のＮ種のオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成する第２組のＮ種のオリゴヌクレオチドとを有し、
前記第２組のＮ種の相補的なオリゴヌクレオチドが規定の比率にて前記Ｎ種の生体分子

に結合され、
前記共重合体は、ＰＥＯ－およびＰＰＯ－含有トリブロック共重合体である、表面。
【請求項２４】
１つまたはそれ以上の生体分子はタンパク質、糖タンパク質、抗体、細胞外マトリクス因子、ペプチド、細胞接着分子、サイトカイン、多糖、またはレクチンである請求項２３に記載の表面。
【請求項２５】
基材は生体医用デバイスまたはインプラントである請求項２３に記載の表面。
【請求項２６】
１つまたはそれ以上の生体分子が細胞付着因子である請求項２５に記載の表面。
【請求項２７】
１つまたはそれ以上の生体分子が付着阻害因子である請求項２５に記載の表面。
【請求項２８】
１つまたはそれ以上の生体分子が細胞外マトリクス因子である請求項２５に記載の表面。
【請求項２９】
タンパク質相互作用を解析するための表面であって、２つまたはそれ以上のタイプのタンパク質が、１つ以上の親水性部分と組み合わされた少なくとも１つの疎水性部分を含むトリブロックまたはジブロック共重合体であって該表面に吸着されるトリブロックまたはジブロック共重合体に結合される相補的オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドに結合され、前記２つまたはそれ以上のタイプのタンパク質が規定の比率にて前記表面に存在しており、
前記共重合体は、ＰＥＯ－およびＰＰＯ－含有トリブロック共重合体である、表面。
【請求項３０】
前記親水性部分はポリエチレンオキサイドを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３１】
前記疎水性部分はポリプロピレンオキサイド（ＰＰＯ）を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３２】
前記親水性部分はポリエチレンオキサイドを含む、請求項１２に記載の表面。
【請求項３３】
前記疎水性部分はポリプロピレンオキサイド（ＰＰＯ）を含む、請求項１２に記載の表面。
【請求項３４】
前記親水性部分はポリエチレンオキサイドを含む、請求項１４に記載の方法。
【請求項３５】
前記疎水性部分はポリプロピレンオキサイド（ＰＰＯ）を含む、請求項１４に記載の方法。
【請求項３６】
前記親水性部分はポリエチレンオキサイドを含む、請求項２３に記載の表面。
【請求項３７】
前記疎水性部分はポリプロピレンオキサイド（ＰＰＯ）を含む、請求項２３に記載の表面。
【請求項３８】
前記親水性部分はポリエチレンオキサイドを含む、請求項２９に記載の表面。
【請求項３９】
前記疎水性部分はポリプロピレンオキサイド（ＰＰＯ）を含む、請求項２９に記載の表面。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】

【０００１】
本発明は、細胞応答の制御、および細胞の培養と解析のために材料の表面を修飾する方法に関する。より具体的には、本発明は、細胞培養、医療用デバイスおよび細胞の解析において使用するための基材上に規定の比率で複数の生体分子を固定化する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
生物における正常な発生と機能には、細胞とその周囲の環境との間の相互作用が必要である。細胞が相互作用する１つの方法は、膜貫通タンパク質と呼ばれる細胞膜に存在する分子を介することである。膜貫通タンパク質の細胞の外側にある部分が周囲の環境の特定の分子に遭遇すると、その膜貫通タンパク質は細胞内部の生物学的相互作用を誘発する構成上および立体構造上の変化を起こす。
【０００３】
生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）の細胞は、最終的に組織および器官を形成する複雑な多層構造を形成する。しかしながら、組織および器官の形成には細胞とその周囲の環境との間の特異的な接触が必要である。正確に発生するために周囲の環境との接触を必要とする細胞は、他の細胞、細胞外マトリクス（ＥＣＭ）、またはその他の面に固定されなければ仮に生育しても正しくは生育しないため、「足場依存性」と称される。
【０００４】
ＥＣＭは、コラーゲン、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、および糖タンパク質のような、細胞により分泌される複雑かつ様々な分子群である。これらの細胞の生成物は共に、組織と器官とにその形状と強度とを付与する基底層、骨および軟骨を形成する。実際、多くの事例における足場依存性の細胞とＥＣＭとの接触は、細胞の形状、位置、代謝、分化および増殖を決定付ける非常に大きな役割を果たしている。
【０００５】
細胞の接触は、免疫応答の活性化などのその他の生物学的機能においても重要である。免疫系は、ウイルス、細菌および寄生生物のような外来物質を認識して体から除去する機能を有する複雑な細胞ネットワークである。外来物質を除去するために免疫系が用いる１つの機構は、液性応答である。液性応答は、Ｂ細胞リンパ球と呼ばれる特定の細胞の活性化を伴う。Ｂ細胞は、その表面にある膜貫通タンパク質が抗原と呼ばれる外来物質に結合すると活性化される。具体的には、Ｂ細胞の抗原への結合によりＢ細胞が刺激されて増殖し、免疫グロブリンまたは抗体を産生するプラズマ細胞に分化する。
【０００６】
プラズマ細胞により産生された抗体は病原体や外来物質に結合しつつ体中を移動する。抗体の外来物質への結合により「補体」経路を含む他のいくつかの免疫学的経路が活性化される。補体経路は、外来物質を破壊し生物に炎症反応を起こさせるように定められている。
【０００７】
細胞が他の細胞および環境と接触することは生物の総体的な健康および生物学的機能にとって重要であるが、一方でこのことは生物科学における独特の問題を生んでいる。組織または細胞の培養物は、植物または動物由来の、元の生物の外側で生育された細胞から成る。これらの細胞は、例えばペトリディッシュ内で特定の環境条件下で培養されることが多い。細胞培養物は、成長因子、抗体、ウイルスなどの生物学的生成物を大量に生産可能な生物学的「工場」に相当するので、非常に重要である。次いでこれらの産物は細胞培養物から単離され、治療目的で、さらなる探索のため、またはその他の用途に使用可能である。
【０００８】
細胞培養物は、生物への移植に使用可能な組織の供給源にもなりうる。例えば、細胞培養された皮膚の細胞を病変または損傷した皮膚と交換する皮膚移植において使用可能かもしれない。細胞培養物は通常わずか１種もしくは数種の組織または器官に由来する細胞から成る。その結果、細胞培養物は、科学者達が生物体全体について取り組むという複雑な

問題とリスクとを伴わずに個々の細胞タイプの性質を研究するためのシステムを提供している。例えば、ある種の細胞に対する医薬の効果を、その薬物による健康上のリスクを評価するための臨床試験に先立って細胞培養物について試験することができる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００９】

生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）におけるほとんどの細胞と同じように、培養により生育した細胞はＥＣＭまたは別の細胞のいずれかに固着される。循環系の細胞（例えばリンパ球および赤血球）だけが試験管内（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）で付着せずに溶液中に浮遊した状態で生育する。多くの足場依存性細胞は、ガラス表面またはポリスチレンのようなプラスチック表面上で生育可能である。しかしながら、これらの細胞は本来の構造を失っていることが多く正常に機能しない。培養された細胞はしばしば分化能やホルモンへの応答能を失う。従って、培養された細胞は生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）における細胞の生物学的機能を正確には模倣せず、よって潜在能力にも限界がある。

【００１０】

このような理由から、ガラスまたはプラスチック製の細胞培養用ディッシュは、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどのＥＣＭタンパク質でコーティングされることが多い。これらのタンパク質は吸着として知られるプロセスにより、ポリスチレンなどの表面に結合する。ＥＣＭでコーティングされた細胞培養用の表面は培養条件を向上させているが、理想からはほど遠い。

【００１１】

第１に、タンパク質のような生体分子は疎水性の表面に吸着すると不活性化することが多い。タンパク質の生物学的活性は、その独特の構造と、物質への結合またはその他の生理学的な事象の際に立体構造上の変化を起こす能力とにより与えられる。ある研究では、タンパク質の構造がマイクロカロリメトリーと呼ばれる技術を用いて測定された。マイクロカロリメトリーによる研究から、疎水性表面に結合したタンパク質は溶液中の同じタンパク質に比べて、協調的に折りたたまれた構造を事実上全て失っているということが示された。タンパク質の構造とタンパク質が立体構造上の変化を起こす能力とは生物学的活性と強く相関しているので、上記のデータは疎水性表面に吸着されたタンパク質のほとんどが生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）における生物学的活性を失うということを示唆している。

【００１２】

第２に、固定化されたタンパク質の立体構造と配向とは、タンパク質が細胞と相互作用するという性質に重大な影響を与える。ディ　ジェイ　ジュリアーノ（Ｄ．Ｊ．Ｊｕｌｉａｎｏ）、エス　エス　サードラ（Ｓ．Ｓ．Ｓａａｅｄｒａ）およびジー　エー　トラスキー（Ｇ．Ａ．Ｔｒｕｓｋｅｙ）、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｍａｔｅｒｉａｌｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、第２７巻、１１０３－１１１３ページ、１９９３年。両方とも、その下にある基材の化学的性質および物理的性質ならびに固定化の方法により影響を受ける。ケイ　レワンドウスカ（Ｋ．Ｌｅｗａｎｄｏｗｓｋａ）、イー　ペルガメント（Ｅ．Ｐｅｒｇａｍｅｎｔ）、エヌ　スケニク（Ｎ．Ｓｕｋｅｎｉｋ）およびエルエー　カルプ（Ｌ．Ａ．Ｃｕｌｐ）、Ｔｈｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｍａｔｅｒｉａｌｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、第２１巻、１３４３－１３６３ページ、１９９２年。

【００１３】

第３に、生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）における細胞と同じように、培養物中の細胞は血清タンパク質や成長因子のような分子を培地中に放出する。上述のように、培地中におけるこれらの分子の分泌と集積とは、隣り合う細胞が正しく生物学的に機能するために必要である。現在の細胞培養の条件下では、分泌された分子が細胞培養容器の表面に吸着されるので、分泌された分子の綿密なバランスと濃度とが乱される。従って、現在の細胞培養技術のもとで培養された細胞のコミュニケーション機能および生物学的機能は生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）の環境を模倣するものではない。

【００１４】
最後に、表面におけるＥＣＭ構成成分の濃度は細胞の挙動を制御する要因である。表面における生体分子の濃度を調節し変化させる能力は、固定化の方法および一部の場合においては土台となる材料の物理的性質によって変わる。細胞培養用の基材に単にＥＣＭを吸着させるだけではこれらの要件を満たさない。
【００１５】
さらに、タンパク質、ホルモンなどの複雑な種々の生体分子が細胞の正常な増殖と発生とに必要である。生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）においてこれらの分子は特定の濃度と比率とで存在している。生体分子の比率が変化すると、細胞の増殖、代謝、および機能が変化する可能性がある。１つの基材上に２つ以上の生体分子を規定の比率で共に固定化できることは、生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）の環境をより適切に模倣するために有用であろう。生体外（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）における細胞の増殖、高速大量（ハイスループット）スクリーニング、生体分子の探索と開発、診断学、医療用デバイスまたはバイオリアクタのために材料の表面に生体分子を固定化するべく現在使用されている方法には、直接的な吸着および共有結合がある。これらの方法では、１つの基材上に２つ以上の生体分子を容易に変更可能な規定の比率で共に固定化することは不可能である。
【００１６】
以上のことに照らせば、細胞の生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）の環境をより適切に模倣する、生体外（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）で細胞を培養するシステムを提供することは、当業界における重大な進歩であろう。生体分子の生物学的活性を破壊せず、生体分子で組織培養容器の表面をコーティングする方法を提供することは、当業界におけるさらなる進歩であろう。周囲の環境に由来するタンパク質が非特異的に吸着するのを防止する、組織培養容器の表面をコーティングする方法を提供することも、当業界における進歩であろう。２つ以上の生体分子を表面へ規定の比率で固定する方法を提供することは、当業界におけるまた別の進歩であろう。生体分子でコーティングされた表面が原核細胞および真核細胞、ウイルス、ならびに生物学的アッセイのための分子を接着させるために使用することができれば、そのことは当業界におけるさらなる進歩であろう。生体分子でコーティングされた材料により細胞の挙動を方向付けられれば、そのことは当業界におけるなお一層の進歩であろう。
【課題を解決するための手段】
【００１７】
本発明の方法及び装置は、当業界の現在の状況に応じて、特に、細胞および生体分子を表面に付着させるために現在使用可能な方法およびシステムでは未だ十分に解決されていない、当業界における問題点とニーズとに応じて開発された。現在の方法およびシステムの欠点を克服するために、本発明は生体分子を規定の比率で表面に結合可能な方法とシステムとを示す。これは、細胞の培養と解析、医療用デバイスに対する細胞応答の制御、および組織工学的な用途における細胞の挙動の制御において有用である。
【００１８】
本発明は、複数（Ｎ種）のタイプの生体分子を基材上に規定の比率で共に固定化する方法に関する。基材は例えばポリマー粒子、磁性粒子、ペトリディッシュ、マルチウェルプレート、ティーフラスコ、ローラーボトル、アレイチップ、試料採取用コンテナ、アッセイ用チューブ、繊維、膜、支持材、医療用デバイスなどでありうる。基材を、タンパク質を修飾し結合するためのペンダント基を提供する１つ以上の親水性部分と結合された少なくとも１つの疎水性部分を有する共重合体に接触させることができる。ＰＥＯ－およびＰＰＯ－含有トリブロックまたはジブロック共重合体が現在好ましいが、他の多くの共重合体を本発明に従って使用してもよい。種々の異なるＰＥＯ－およびＰＰＯ－含有共重合体を本発明の方法により使用してもよい。例えば、ポリブタジエンとＰＥＯ、ポリイミドとＰＥＯ、ポリメチルメタクリレートとＰＥＯ、ポリスチレンとＰＥＯ、ポリブチレンオキサイドとＰＥＯ、ポリ－Ｌ－リシン（ｌｙｓｉｎｅ）とＰＥＯ、ポリジメチルシロキサンとＰＥＯ、ポリ（ｔ－ブチルメタクリレート）とＰＥＯ、およびＰＥＯを含んだ炭化水素

、の共重合体を使用してもよい。使用可能な目下のところ好ましい共重合体の１つは、ＢＡＳＦ社より入手可能なＰｌｕｒｏｎｉｃ（商標登録）Ｆ１０８である。Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（商標登録）ブランドの共重合体と同様に、上記の他の多くの共重合体が疎水性の材料によく吸着することが示されており、また表面に非特異的なタンパク質の吸着を抑制し得る適切なＰＥＯの層を形成することが示されている。ＰＥＯとは別に、使用可能な他の親水性部分はセファロースタイプの素材および他の多糖ならびにポリウレタンである。共重合体を、基材に吸着させるために十分長い時間表面に接触させることができる。例えば、引用により本願に組み込まれる米国特許第６，２８４，５０３号、第５，７２８，５８８号および第５，５１６，７０３号の開示を参照のこと。

【００１９】

共重合体は活性化された末端基を有する。活性化された末端基は、オリゴヌクレオチドを重合体に結合させ得る多数の基から選択可能である。例えば、活性化された末端基は２－ピリジルジスルフィド基を有しても良い。活性化された末端基にＮ種のオリゴヌクレオチドを結合し、共重合体結合オリゴヌクレオチドを形成することが可能である。各タイプの共重合体結合オリゴヌクレオチドがＮ種の生体分子の１つに相当する。すなわち、Ｎ種の共重合体結合オリゴヌクレオチドを、規定の比率を達成するために所定の比率で混合する。

【００２０】

生体分子を、生体分子結合オリゴヌクレオチドを形成するために相補的オリゴヌクレオチドに結合することが可能である。各タイプの生体分子を、対応する共重合体結合オリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドに結合させることが可能である。

【００２１】

生体分子結合オリゴヌクレオチドは共重合体結合オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成することができる。そのようなハイブリッド形成により、複数の生体分子が規定の比率で共に固定化された基材が創られる。共重合体の末端基にオリゴヌクレオチドを結合させるステップ、基材をオリゴヌクレオチド修飾された共重合体に接触させるステップ、および相補的なオリゴヌクレオチドに生体分子を結合させるステップは、任意の順序で実施可能である。

【００２２】

種々の生体分子を、開示の方法により基材に共に固定化することができる。そのような生体分子には、タンパク質、糖タンパク質、ペプチド、成長因子、サイトカイン、付着因子、細胞外マトリクス因子、抗体、抗体フラグメント、分化因子、レクチン、多糖、受容体、受容体フラグメント、膜貫通タンパク質、膜貫通タンパク質のフラグメントなどがありうるがこれらに限定されない。

【００２３】

本発明の方法は、該方法のステップを任意の順序で実施することを可能にする別の実施形態を有しうる。そのような１つの実施形態では、該方法は、Ｎ種の第１のオリゴヌクレオチドを共重合体に結合させるステップ；Ｎ種のオリゴヌクレオチド修飾された共重合体を溶液中で規定の比率で混合するステップ；基材を前記オリゴヌクレオチド修飾された共重合体の溶液に接触させるステップ；Ｎ種の生体分子を第２のオリゴヌクレオチドに結合させるステップ；および第２のオリゴヌクレオチドを第１のオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成させるステップを含む。本発明の方法の他の実施形態のように、共重合体は活性化された末端基を有する。活性化された末端基は２－ピリジルジスルフィド基または他の基を含みうるが、それにより共重合体を第１のオリゴヌクレオチドに結合させることが可能となる。基材を、共重合体が基材表面に吸着されるのに十分な時間だけ共重合体に接触させる。

【００２４】

本発明は、付着、増殖、細胞の挙動の制御、または細胞の解析のための表面の作製にも関する。第１のオリゴヌクレオチドはＰＥＯを含有するトリブロック共重合体またはジブロック共重合体に結合可能である。共重合体は、例えばＰｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｆ

１０８でよい。オリゴヌクレオチド修飾された共重合体を上記の表面に吸着可能である。第２のオリゴヌクレオチドを生体分子に結合することができる。生体分子は、細胞接着を促進し、細胞増殖を促進し、細胞の分化状態を制御し、または細胞の解析において有用な種々の生体分子から選択可能である。第２のオリゴヌクレオチドは、第２のオリゴヌクレオチドを第１のオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成させうるように、通常第１のオリゴヌクレオチドに相補的である。表面を、複数（Ｎ種）のタイプの生体分子を規定の比率で含むように作製することも可能である。これは、ＰＥＯ－およびＰＰＯ－含有トリブロック共重合体またはジブロック共重合体に結合した相補的オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドに生体分子を結合させることにより実施可能である。生体分子は、例えばタンパク質、糖タンパク質、ペプチド、成長因子、サイトカイン、付着因子、細胞外マトリクス因子、抗体、抗体フラグメント、分化因子、レクチン、多糖、受容体、受容体フラグメント、膜貫通タンパク質、膜貫通タンパク質のフラグメントなどがありうる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２５】

本発明を、添付の図面を用いてさらに具体的かつ詳細に記述し説明する。

【００２６】

本発明は、基材に複数（Ｎ種）のタイプの生体分子を規定の比率で共に固定化する方法に関する。基材は例えばポリマー粒子、磁性粒子、ペトリディッシュ、マルチウェルプレート、ティーフラスコ、ローラーボトル、アレイチップ、試料採取用チューブ、アッセイ用チューブ、繊維、膜、支持材、医療用デバイス、医療用インプラントなどでありうる。基材を、タンパク質を修飾し結合するためのペンダント基を提供する１つ以上の親水性部分と組み合わされた少なくとも１つの疎水性部分を有する共重合体に接触させることができる。共重合体は、生体分子を基材の表面に連結させる繋ぎの部分として用いられる。ＰＥＯ－およびＰＰＯ－含有トリブロックまたはジブロック共重合体が現在のところ好ましい。本発明の方法と共に使用可能な共重合体の１つはＰｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｆ１０８であり、これは（ポリエチレンオキサイド）$_{129}$－（ポリプロピレンオキサイド）$_{56}$－（ポリエチレンオキサイド）$_{129}$という構造を有するトリブロック共重合体である。基材を、共重合体が基材に吸着されるのに十分な時間だけ表面に接触させる。

【００２７】

共重合体の末端の水酸基が活性化されて共重合体のオリゴヌクレオチドへの結合が可能となる。本明細書で用いられているように、オリゴヌクレオチドには、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、リボ核酸（ＲＮＡ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）の重合体、および修飾塩基または標準的でない塩基を含む核酸の重合体がある。Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｆ１０８のような共重合体の末端基を、リら（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．）、Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ．第７巻、５９２－５９９ページ、１９９６年の手法を用いて活性化してピリジルジスルフィド部分を組み込むことが可能である。この手法では、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｆ１０８を最初にｐ－ニトロフェノールクロロホルメートで活性化する。次いでｐ－ニトロフェノールで活性化されたＦ１０８を２－（２－ピリジルジチオ）エチルアンモニウムクロライドと反応させてＰｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｆ１０８の２－ピリジルジスルフィド誘導体を生成させる。次にこの活性化されたＰｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）を、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）のピリジルジスルフィド基を介して、末端にチオール基を有するオリゴヌクレオチド配列に結合させる。

【００２８】

対象のタンパク質または他の生体分子を相補的なオリゴヌクレオチド配列に結合させる。オリゴヌクレオチド修飾された共重合体は中央のポリプロピレンオキサイドのブロックを介して疎水性表面に結合することになる。修飾共重合体が表面に結合されれば、相補的オリゴヌクレオチド配列に結合させた生体分子を添加することができる。生体分子は、共重合体に結合されたオリゴヌクレオチド配列と対象のタンパク質または他の分子上の相補的オリゴヌクレオチド配列との間の塩基対形成の結果、高い親和力で表面に結合される。

【００２９】
この手法を用いて、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｆ１０８のような共重合体を、自身に相補的な配列にのみ高度で特異的な結合親和力を有する多数の異なるオリゴヌクレオチド配列で修飾することが可能である。同様に、タンパク質および他の分子を多数の異なる相補的ＤＮＡ配列で修飾することが可能である。複数のタイプのＯＬＩＧＯ修飾（オリゴヌクレオチド修飾）共重合体を溶液中で規定の比率で混合し、この溶液を表面のコーティングに使用することにより、複数の異なる化学物質が結合し、各タイプの化学物質の相対量を容易に調節可能かつ体系的に変更可能な表面を生産することができる。

【００３０】
続いて相補的オリゴヌクレオチド配列を有する生体分子を添加することができるが、これらの生体分子は固定化された相補的な配列に選択的に結合することになる。このようにして、表面に共に固定化される各タイプのタンパク質の相対量を厳密に調整することができる。事実上、使用可能なオリゴヌクレオチド対の数は無限である。従って、１つの表面に選ばれた比率で共に固定化可能な異なる因子の数には限界はない。

【００３１】
多様な生体分子を、開示の方法を用いて基材上に共に固定化することができる。そのような生体分子には、タンパク質、糖タンパク質、ペプチド、成長因子、サイトカイン、付着因子、細胞外マトリクス因子、抗体、抗体フラグメント、分化因子、レクチン、多糖、受容体、受容体フラグメント、膜貫通タンパク質、膜貫通タンパク質のフラグメント、ＤＮＡ、ＲＮＡなどがありうるがこれらに限定されない。

【００３２】
図３Ａおよび３Ｂは本発明の範囲内にある実行可能な１つの実施形態を示すが、該実施形態は、Ｎ種のタイプの第１のオリゴヌクレオチドを共重合体に結合させるステップと；Ｎ種のタイプのオリゴヌクレオチドで修飾された共重合体を溶液中で規定の比率で混合するステップと；該オリゴヌクレオチド修飾共重合体の溶液に基材を接触させるステップと；Ｎ種のタイプの生体分子を第２のオリゴヌクレオチドに結合させるステップと；第２のオリゴヌクレオチドを第１のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせるステップとを含む。ステップの順序は変更可能である。

【００３３】
本発明は、細胞選別用に基材に生体分子を固定化するために使用可能である。例えば、ポリマー粒子、磁性粒子、ペトリディッシュ、マルチウェルプレート、ティーフラスコ、ローラーボトル、アレイチップ、試料採取用チューブおよびアッセイ用チューブなどの多数の異なるタイプの基材を修飾可能である。基材を、共重合体結合オリゴヌクレオチドを用いて、対象とする細胞のタイプに高度かつ特異的な親和力を有することが知られている１つ以上のタイプの生体分子が提示されるように修飾する。対象の細胞タイプを含む試料を修飾された基材とともにインキュベートし、標的の細胞を、特異的親和性を有する固定化生体分子に結合させる。基材を洗浄して不要な細胞とタンパク質を除去し、標的の細胞だけを残す。次いで細胞を種々の用途のために培養しても、基材上で解析してもよく、または単に還元剤を添加することにより基材からハーベストすることも可能である。還元剤は、固定化された共重合体分子とオリゴヌクレオチドとの間の結合を切断し、その結果生体分子および付着した細胞を解放する。この手法は、マルチウェルプレートの修飾、または異なるタイプの細胞のアレイを提示するチップの生産に有用である。例えば、９６ウェルプレートを、１つの組織試料または患者の試料から１つのタイプの細胞アレイを作製するために使用し、診断用試験に使用することが可能であろう。

【００３４】
本発明の方法を、共に固定化された生体分子を用いて表面を作製するために使用しうる。そのようなコーティング面は、細胞付着用または細胞が付着しないための異なるドメインを備えて作製することができる。従って、基材を、細胞の付着を促進するドメインと細胞の付着を阻害するドメインとを備えて作製可能である。例えば、基材のあるドメインには第１の共重合体結合オリゴヌクレオチドが吸着され、基材の別のドメインには第２の共

重合体結合オリゴヌクレオチドが吸着されてもよい。第１の共重合体結合オリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドは細胞の付着を促進する生体分子に結合し、第２の共重合体結合オリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドは細胞の付着を妨げる生体分子に結合しうる。従って、相補的なオリゴヌクレオチドと細胞とが添加されると、細胞が付着していないドメインができる。

【００３５】

本発明を、２つ以上のタイプのドメインを有し各タイプのドメインが異なる生物学的活性を有する細胞培養用のパターン加工された基材の作製に使用することもできる。各タイプのドメインを、１種の共重合体結合オリゴヌクレオチドまたは複数種の共重合体結合オリゴヌクレオチドの混合物を所望の領域に吸着させ、続いて相補的オリゴヌクレオチドを有する生体分子を添加することにより作製する。そのような基材は、人工的な基材及び支持材（足場）上で組織の構造をより適切に模倣するために有用である。

【００３６】

本発明を、生体医用インプラントおよびデバイスをコーティングしてそれらが細胞や組織とより相互作用しやすくするために使用してもよい。コーティング物は、特定のタイプの細胞がインプラント上に付着して増殖するのを促進したり、またはインプラントに付着する細胞の挙動を制御するために使用可能である。コーティング物を、反応のカスケードを阻害する因子を組み込むことによりインプラントにとって不都合な反応を防止するために使用してもよく、例えば心血管用デバイス上での血栓形成を防止するために、コーティング物を抗血栓因子を組み込むために用いてもよい。コーティング物を、縫合糸または傷の回復を早める熱傷創保護物のような一時的に使用する補助材料の表面に治療用因子を提示するために使用してもよい。

【００３７】

本発明は、試験管内（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）における薬物の開発及び毒性試験のための基材も提供可能である。例えば、小分子薬物を、試験管内（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）における薬物の開発及び毒性試験を容易にするために対象の生体分子と共に固定化してもよい。

【００３８】

細胞をトランスフェクションし、その後細胞のトランスフェクション効率とタンパク質の発現レベルを評価するために細胞の組換えタンパク質発現産物を検出するためのコンテナを本発明の方法により作製可能である。例えば、基材を、細胞が基材に付着するのを促進すると思われる１タイプのタンパク質と、対象の細胞による発現産物を捕捉するであろう第２のタイプのタンパク質とを提示するように修飾すればよい。これは、本明細書に記載のとおりに作製された２つの異なるタイプの共重合体結合オリゴヌクレオチドを用いて実施される。これらのタイプの共重合体結合オリゴヌクレオチドをここではａおよびｂと称する。細胞の付着を促進するために用いられるタンパク質（ここではＡとする）および組換えにより発現されたタンパク質を捕捉するために用いられるタンパク質（ここではＢとする）を、それぞれ共重合体結合オリゴヌクレオチドａ，ｂのオリゴヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチド配列を結合させることにより修飾する。Ａ：Ｂの所望の比率が１：３である場合、共重合体結合オリゴヌクレオチドａ　１に対し共重合体結合オリゴヌクレオチドｂ　３を水中で混合し、生じた溶液をトランスフェクション用コンテナのコーティングに使用する。異なるタイプの共重合体結合オリゴヌクレオチドは同じように同程度に吸着し、その結果表面におけるａ：ｂは１：３となるであろう。コーティング後、コンテナを洗浄し、次いでタンパク質ＡおよびＢとともにインキュベートする。タンパク質は自身に相補的なオリゴヌクレオチド配列のハイブリッド形成により固定化された共重合体結合オリゴヌクレオチドに結合し、その結果生じる表面密度は共重合体結合オリゴヌクレオチドａ，ｂの表面における比率を反映することになる。細胞を修飾された基材上に播き、細胞がタンパク質Ａを介して付着する。細胞は基材上に播く前または後のいずれかの時点でトランスフェクション可能である。細胞をタンパク質発現に十分な時間おき、次いで溶解して組換え発現タンパク質を放出させる。このタンパク質は、タンパク質Ｂを介して表面と結合する。表面を洗浄して細胞片を除去し、その後発現タンパク質を分析す

る。
【００３９】
本発明は、細胞をトランスフェクションし、その後、発現タンパク質の活性、発現タンパク質の安定性、および発現タンパク質の翻訳後修飾を測定するべく該細胞による組換えタンパク質発現産物を検出するためのコンテナを生産するためにも有用である。そのようなコンテナは、過酷な環境においてより頑強であるかまたはその天然型に比べて高い生物活性を示すタンパク質を産生する突然変異体の発見を容易にするであろう。
【００４０】
基材を、その表面に吸着させた２つのタイプの共重合体結合オリゴヌクレオチド（タイプａ，タイプｂ）を用いて上述のように作製してもよい。細胞を修飾された基材に播き、タンパク質Ａを介して付着させる。細胞は基材上に播く前または後のいずれかの時点でトランスフェクション可能である。細胞をタンパク質発現に十分な時間おき、次いで溶解して組換え発現タンパク質を放出させる。このタンパク質をタンパク質Ｂを介して表面に結合させ、表面を洗浄して細胞片を除去する。ここで、Ｂは（１）タンパク質に結合してその後活性、安定性、もしくは翻訳後修飾の存在を二次的な方法により検出できるようにする、（２）発現タンパク質が何らかの必須な構造もしくは翻訳後修飾を有する場合にのみ該タンパク質に結合する、または（３）切断されると検出可能な産物を生じる、発現タンパク質の基質として作用する、のいずれかの役割を果たす。もう１つの例では、表面上の発現タンパク質の存在をその後イムノアッセイにより検出することも可能であろう。
【００４１】
本発明は、細胞外の生体分子、薬物、またはその組合せの、トランスフェクション細胞における組換えタンパク質の発現効率に対する影響を評価する方法、および細胞バイオリアクタのための最適な環境を作り出す方法も提供する。例えば、基材を本発明の方法により作製するが、その方法は１つの因子または複数の因子の組合せ（Ａとする）を表面に固定して、細胞の組換えタンパク質発現能に影響を及ぼすと考えられるシグナルを発生させる方法である。ここで（１つまたは複数の）因子とは、細胞外マトリクスの接着タンパク質、サイトカイン、成長因子、プロテオグリカン、構造タンパク質、細胞接着分子、抗体、抗原、阻害因子、薬物、またはそれらの任意の組合せでありうる。上記の因子に加えて、組換え発現タンパク質に結合すると考えられる生体分子（Ｂとする）を表面に共に固定化することもできる。細胞を修飾された基材に播き、タンパク質Ａを介して表面に付着させる。細胞は基材上に播く前または後のいずれかの時点でトランスフェクション可能である。細胞をタンパク質発現に十分な時間おき、次いで溶解して組換え発現タンパク質を放出させる。表面がタンパク質Ｂで修飾されているこの例では、発現タンパク質はＢを介して表面に結合し、表面は洗浄されて細胞片を除去される。ここで、Ｂは該タンパク質に結合して活性、安定性、もしくは翻訳後修飾の存在を検出できるようにする役割を果たす。代替例として、組換えタンパク質が細胞により分泌される場合は、組換え発現タンパク質を検出するために溶液を用いたアッセイを使用可能である。
【００４２】
本発明の方法により、細胞のトランスフェクションの結果細胞の生理現象に生じた変化をモニターすることを可能にする基材を作製可能である。従って、細胞の結合を容易にするタンパク質Ａと、組換えタンパク質以外の細胞の産物に結合するタンパク質Ｂとを用いて基材を作製すればよい。この基材は、トランスフェクションの結果細胞の生理現象に生じた変化をモニターすることにより、遺伝子治療の安全性および効果を評価するのに有用であろう。この例では、タンパク質Ａは細胞外マトリクスの接着タンパク質、サイトカイン、成長因子、プロテオグリカン、構造タンパク質、細胞接着分子、抗体、薬物またはそれらの任意の組合せでありうる。細胞を基材に播き、ある一定時間（この間に細胞がタンパク質Ａの作用を受ける）インキュベートする。次いで細胞を溶解すると対象のタンパク質はタンパク質Ｂにより基材に結合する。細胞片を洗浄により除去し、固定化された対象タンパク質の量および／または性質をアッセイする。
【００４３】

基材に複数の生体分子を共に固定化する方法は足場依存性でない細胞の産物を評価するために用いることができる。そのような細胞をトランスフェクションして組換えタンパク質を分泌させることが可能である。これらの細胞を、本発明を用いて、組換え発現タンパク質を解析するためのツールとして役に立つタンパク質を提示するように修飾されたコンテナ内に入れる。このタンパク質は、組換え発現された酵素またはキナーゼの基質、組換え発現タンパク質により活性化もしくは阻害されるタンパク質、または抗体でありうる。これらのコンテナは、試料間で、タンパク質発現レベル、タンパク質の活性、翻訳後修飾、または本来の遺伝子の突然変異によるタンパク質の性質の変化を評価し比較するのに有用であろう。

【００４４】

本発明の方法を、ウイルスによる細胞のトランスフェクションを容易にするために使用してもよい。例えば、細胞のトランスフェクション用のコンテナを、２つ以上のタイプの生体分子を提示するように修飾することができる。生体分子の１つは細胞のトランスフェクションに使用されるウイルスに結合しうる接着配列を含む。別の生体分子はトランスフェクションされる細胞に対する接着配列を有する。このようにして修飾されたコンテナにウイルスを添加すると、ウイルスはウイルス結合生体分子を介して表面に結合する。次いで細胞を添加すると細胞は細胞結合分子に結合する。これにより細胞とウイルスとが互いに非常に近接して固定化され、その結果細胞のトランスフェクション率が増大する。

【００４５】

本発明の方法を、タンパク質、ペプチド、ＤＮＡ、ＲＮＡ、小分子または薬物の生体分子アレイを作製するために使用することもできる。そのようなアレイは、１つの表面またはチップ上に微細パターン化して固定化された多数の異なるタイプのタンパク質、ペプチド、ＤＮＡ、またはＲＮＡを有しうる。そのような生体分子アレイは、組織試料または培養細胞をスクリーニングして差次的なタンパク質発現パターンおよび受容体の活性化などのその他の細胞生理現象における変化を測定する、ゲノム研究、トランスクリプトーム研究、およびプロテオーム研究、並びに診断学および薬物開発研究において、試料の高速大量処理を容易にするであろう。

【００４６】

例えば、共重合体結合オリゴヌクレオチドを作製し水溶液中に溶解させる。該溶液の微小な水滴をチップに移して結合アッセイを実施することができる。チップを洗浄し、次いで非修飾共重合体結合オリゴヌクレオチドの溶液に曝露すると、共重合体結合オリゴヌクレオチド部分の周囲の領域がコーティングされ、非特異的な吸着が防止される。チップを洗浄し、次に、相補的なオリゴヌクレオチド配列、または共重合体を介して表面に固定された配列に相補的な配列を一方の末端に含むＤＮＡもしくはＲＮＡ分子を組み込むように修飾された、タンパク質またはペプチドのいずれかとともにインキュベートする。各タイプのタンパク質またはＤＮＡは、相補的な共重合体結合オリゴヌクレオチドを有する部分に結合する。このようにして、生体分子アレイをチップ表面上に作製する。そのようなアレイは、ゲノム研究、トランスクリプトーム研究、およびプロテオーム研究に有用である。タンパク質のアッセイの場合、タンパク質は、抗体、抗原、酵素、レクチン、細胞外マトリクス分子、成長因子、サイトカイン、受容体、リガンド、細胞接着分子、活性化因子または阻害因子でありうる。チップの基材はガラス、疎水処理されたガラス、金属、疎水処理された金属、固体ポリマー、多孔質ポリマー、またはポリマーの薄膜を有するガラスもしくは金属でありうる。

【００４７】

本発明はタンパク質の複合体を提示する表面を作製するのに有用である。細胞内では、多くのタンパク質が他のタンパク質と互いに結合し、シグナル伝達において機能する複合体を形成する。どのタンパク質が相互に作用し、 タンパク質複合体がどのようにしてシグナル伝達機能を為すかを理解することは、正常な細胞生理現象および異常な細胞の挙動を理解するうえで重要である。今日では、多くのタンパク質の機能が未知である。研究者が未知のタンパク質機能について洞察を得ることができる１つの方法は、そのタンパク質

が相互作用する他のタンパク質またはタンパク質複合体が何かを調べることである。タンパク質の複合体を提示する表面はこの目的に有用であろうし、また本発明の方法を用いて作製可能である。この用途については、固定化されるタンパク質が相互作用できるように十分可動的でかつ互いに近接していることが重要である。本発明は、（１）Ｆ１０８のポリエチレンオキサイド鎖のような共重合体の末端が表面に結合されたとき高度な可動性を維持している（リら（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．）上述）、および（２）Ｆ１０８－ＯＬＩＧＯのような共重合体結合オリゴヌクレオチドが十分高い密度で表面に吸着し、相補的なオリゴヌクレオチドのタグを介してタンパク質が近接して密集可能である、という理由で上記の用途にとって理想的である。タンパク質の複合体を提示するように修飾された基材を対象のタンパク質とともにインキュベートし、対象のタンパク質が例えばタンパク質Ｂ，Ｃ，Ｄを含む複合体またはタンパク質Ｂ，Ｅ，Ｇを含む複合体に結合するかどうかを調べることができよう。そのような基材を、リン酸化などのシグナル伝達の事象があるタンパク質複合体内で起きるためにはどのタンパク質または環境因子が必要であるかを調べるために使用することもできる。

【００４８】

本発明の方法を用いて、様々なタイプの生体分子を様々な比率で備えたほぼ無限の種類の基材を作製可能であることが理解されよう。これらの基材は、上述の目的、または他の多くの目的のために使用される基材を作製するために使用可能である。従って、微小粒子上の微小管モータータンパク質などの生体分子とその他の生体分子とを、微量輸送用デバイスおよび微量分離用デバイスとともに使用するために基材上に固定化することができる。本発明は、オリゴヌクレオチド配列とともに固定化された生体分子を有し、該オリゴヌクレオチド配列が粒子のタイプに特有で特定用タグまたはアドレス指定用ツールとして働く微小粒子を作製するために有用であろう。本発明の方法を、共役酵素アッセイ用に酵素を共に固定化するために使用してもよい。

【００４９】

本発明は、本明細書中で広範に記述し請求の範囲において主張したように、本発明の構成、方法、またはその他の必須の特徴から逸脱することなく、他の特定の形式で実施可能である。記載された実施形態は、全てにおいて単なる例示として、かつ限定的なものではないとみなされるべきである。従って本発明の範囲は先の記述ではなく請求項により示される。請求項の意味するものおよび同等の範囲内に入る全ての変更形態は請求項の範囲内に含まれる。本願に引用された全ての刊行物、特許、および特許出願は引用により本願に組み込まれる。

【実施例】

【００５０】

以下の実施例を、本発明の範囲内で作製されたいくつかの実施形態を例示するために記載する。これらの実施例は、本発明により作製可能な多くのタイプの実施形態を包括するものでも網羅するものでもない。

（実施例１－オリゴヌクレオチドのＰｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｆ１０８への結合）

Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｆ１０８の２－ピリジルジスルフィド誘導体（ＥＧＡＰ）を、リら（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．）、上述、の手法に従って合成する（図１）。最初にＦ１０８（６ｇ）を、ベンゼン（３６ｍＬ）中でｐ－ニトロフェニルクロロホルメート（０．５ｇ）を用いて活性化する。エチルエーテル沈殿と真空条件下での乾燥により生成物を回収する。メルカプトエチルアミン塩酸塩（３．４ｇ）を、メタノール（６ｍＬ）と酢酸（２．４ｍＬ）の混合物に溶解する。これをメタノール（９０ｍＬ）中の２，２’－ジチオピリジン（２０ｇ）と反応させて２－（２－ピリジルジチオ）エチルアンモニウムクロライドを得る。エーテル沈殿と真空条件下での乾燥により生成物を回収する。ｐ－ニトロフェニルクロロホルメートにより活性化されたＦ１０８（３ｇ）をメタノール（９ｍＬ）に溶解し、ＴＥＡ（１．２４ｍＬ）を含むメタノール（９ｍＬ）に溶解した２－（２－ピリジルジチオ）エチルアンモニウムクロライド（１．８ｇ）に加え、室温で１５－２０時間反応させる。この反応の終了後にＨＣｌを用いてＴＥＡを中和する。生成物（Ｆ１０８

２－ピリジルジスルフィド誘導体）を透析により精製し、凍結乾燥により回収する。置換率をカールソンら（Ｃａｒｌｓｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．）、Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．第１７３巻、７２３－７３７ページ、１９７８年の方法に従って測定する。この方法には、リン酸緩衝生理食塩水、ｐＨ７．４（ＰＢＳ）に溶解した正確に計量したＥＧＡＰの一部の３４３ｎｍにおけるＵＶ吸光度を、ＰＢＳを対照として測定する。続いて２５ｍＭ　ＤＴＴの０．１ｍＬアリコートを試料と対照のキュベットの両方に添加する。ＤＴＴ添加の１０分後に吸光度を３４３ｎｍについて再測定する。解離した２－チオピリドンの濃度を測定するため、ＤＴＴの添加前後の吸光度の差をとり、モル吸光係数８０６０ｃｍ$^{-1}$Ｍ$^{-1}$を使用する。８個またはそれ以上のヌクレオチドと末端のチオール基とを含むオリゴヌクレオチドをＰＢＳに溶解する。Ｆ１０８－ＰＤＳをＰＢＳに溶解し前記オリゴヌクレオチド溶液とあわせる（図２）。反応混合物を室温で一晩振とう機上に置く。反応の効率を３４３ｎｍにおけるＵＶ吸光度を測定することによりモニターし、解離したピリジル２－チオンの量を測定する。この結果生じたオリゴヌクレオチド活性化Ｆ１０８（Ｆ１０８－ＯＬＩＧＯ）を透析により精製し凍結乾燥により回収する。

（実施例２－細胞付着のための基材の修飾）

本発明を細胞付着のための人工基材を修飾するために使用してもよい。これらの基材は、様々な生体分子および生体分子の特定の組合せが、胚発生および正常組織と罹患組織の双方の発生においてどのように機能して細胞の増殖と分化とを制御するかを研究するために使用することができる。同基材を、薬物スクリーニング、毒性試験および薬物開発のために試験管内（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）で細胞を増殖させるために使用可能である。同基材を、診断または環境モニタリング用デバイスのために試験管内（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）で細胞を増殖させるために使用可能である。同基材を、バイオリアクタ、喪失した組織もしくは損傷を受けた組織を取り替えるための組織工学的に作製されたデバイス、または構造的支持体として、送達デバイスとして、再建の際、もしくは再生の際に機能する埋め込み（インプラント）可能な材料に使用可能である。細胞の分化状態がその微小環境により制御されることはよく知られている。生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）の細胞の微小環境には多数の生体分子が存在し、存在する生体分子のタイプと濃度の両方ならびにこれらの環境における細胞間相互作用が細胞の挙動の制御に貢献している。所望の増殖パターンまたは分化レベルを維持して生体外（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）で細胞を培養するためには、細胞を適切な微小環境に置かなければならない。多くのタイプの細胞について、それにはさらにある種の生体分子を提示する表面で、かつ各生体分子の表面密度が制御されている表面が必要となる。これは本発明を用いて達成可能である。一例として、本明細書ではＡ，Ｂ，Ｃ，Ｄと称する４つの異なる生体分子（Ａ，Ｂ，Ｃ，Ｄは細胞外マトリクス接着タンパク質、構造タンパク質、プロテオグリカン、サイトカイン、成長因子、レクチン、受容体、リガンド、細胞接着分子、抗体、抗原、阻害因子または治療用物質でありうる）を共に固定化することが可能である。この例を実施するため、本明細書ではａ，ｂ，ｃ，ｄと称する４つの異なるＦ１０８－ＯＬＩＧＯを実施例１に記載されているように作製する。生体分子Ａ，Ｂ，Ｃ，Ｄを修飾してそれぞれＦ１０８－ＯＬＩＧＯａ，ｂ，ｃ，ｄのオリゴヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチド配列を組み込む。これは、最初にＮ－［α－マレイミドアセトキシ］スクシンイミドエステル（ＡＭＡＳ）などの架橋剤を用いて生体分子に反応性のスルフヒドリル部分を組み込み、その後チオール化されたオリゴヌクレオチドと反応させる。最終的な表面におけるＡ：Ｂ：Ｃ：Ｄの比率１：２：３：４を得るためには、ａ１に対しｂを２、ｃを３、ｄを４だけ溶液中であわせることになる。従って表面に吸着されるＦ１０８－ＯＬＩＧＯの全体の濃度はこの溶液に非修飾Ｆ１０８を添加することにより調節される。Ｆ１０８－ＯＬＩＧＯ溶液を対象の材料の基材とともにインキュベートし、トリブロック共重合体を材料の表面に吸着させる。異なるタイプのＦ１０８－ＯＬＩＧＯと非修飾Ｆ１０８は同じように同程度に吸着し、その結果表面における比率ａ：ｂ：ｃ：ｄは１：２：３：４となる。基材は通常ポリスチレンの表面であるが、疎水性表面の性質を示すように修飾された材料を含む、任意の十分に疎水的な材料でありうる。基材を洗浄した後、生体分子Ａ，Ｂ，Ｃ，Ｄとともにインキュベートする。生体分子Ａ，Ｂ，Ｃ

，Ｄに結合したオリゴヌクレオチド配列は、それぞれ固定化Ｆ１０８－ＯＬＩＧＯ　ａ，ｂ，ｃ，ｄ上の自身に相補的な配列にハイブリダイズするであろう。基材を洗浄し、得られた表面における生体分子の濃度は、固定化された様々なＦ１０８－ＯＬＩＧＯの表面濃度を反映することになる。該修飾基材上に細胞を播き、生体分子Ａ，Ｂ，Ｃ，Ｄの性質と濃度とにより生じたシグナルに対して応答させる。グルタチオンやＤＴＴなどの穏やかな還元剤を添加することにより該表面から細胞をハーベストすることが可能である。還元剤は固定化Ｆ１０８とＯＬＩＧＯとの間の結合を切断し、その結果生体分子と付着していた細胞とを解放する。

【図面の簡単な説明】

【００５１】

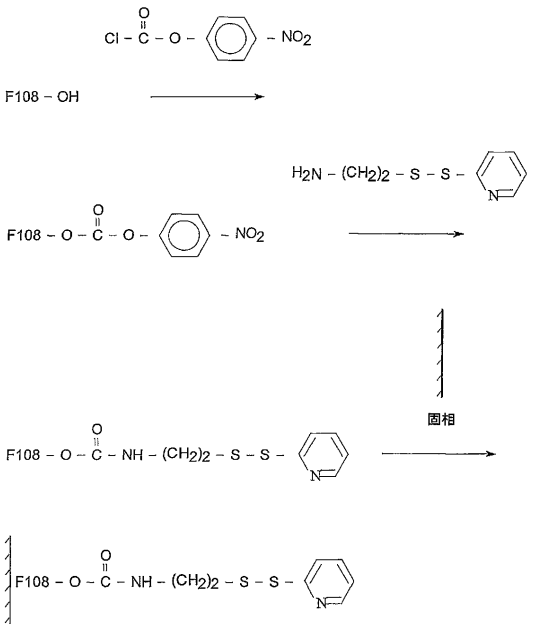
【図１】Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）Ｆ１０８の２－ピリジルジスルフィド誘導体（ＥＧＡＰ）の合成について示す略図。

【図２】本発明の方法とともに使用可能な代表的な共重合体結合オリゴヌクレオチドの合成について示す略図。

【図３Ａ】２種の異なる共重合体結合オリゴヌクレオチドと非修飾共重合体とを用いて２種の異なるタンパク質を所定の量だけ共に固定化するために使用されるステップを示す略図。

【図３Ｂ】２種の異なる共重合体結合オリゴヌクレオチドと非修飾共重合体とを用いて２種の異なるタンパク質を所定の量だけ共に固定化するために使用されるステップを示す略図。

【図１】



【図２】

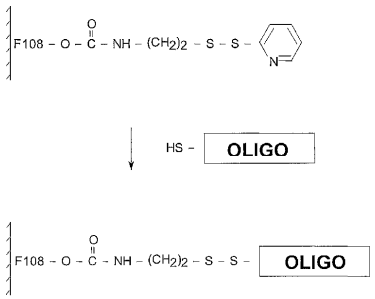
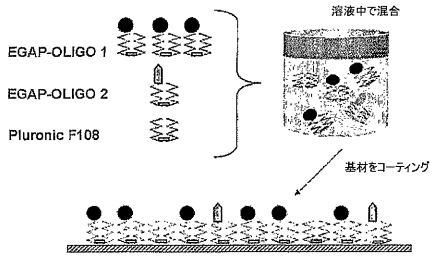
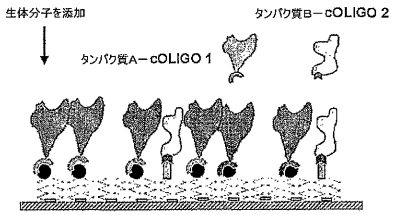


Fig. 2

【図３Ａ】



【図３Ｂ】



フロントページの続き

(72)発明者　ネフ、ジェニファー
アメリカ合衆国　９２６３０　カリフォルニア州　レイク　フォレスト　ベイク　パークウェイ　２０９１４　スイート　１１２

審査官　伊達　利奈

(56)参考文献　国際公開第９９／０１５８９３（WO，Ａ１）
国際公開第９８／０３１７３４（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N　15/00-15/90
C12M　1/00-1/42
PubMed