

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5859172号
(P5859172)

(45) 発行日 平成28年2月10日 (2016. 2. 10)

(24) 登録日 平成27年12月25日 (2015. 12. 25)

(51) Int. Cl.

F I

B 3 2 B 27/30 (2006. 01)

C 0 9 D 133/26 (2006. 01)

C 0 8 F 220/56 (2006. 01)

C 0 8 F 220/60 (2006. 01)

C 0 3 C 17/32 (2006. 01)

B 3 2 B 27/30

C 0 9 D 133/26

C 0 8 F 220/56

C 0 8 F 220/60

C 0 3 C 17/32

A

A

請求項の数 37 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-516170 (P2015-516170)
 (86) (22) 出願日 平成25年6月5日 (2013. 6. 5)
 (65) 公表番号 特表2015-529576 (P2015-529576A)
 (43) 公表日 平成27年10月8日 (2015. 10. 8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/044305
 (87) 国際公開番号 W02013/184796
 (87) 国際公開日 平成25年12月12日 (2013. 12. 12)
 審査請求日 平成27年1月20日 (2015. 1. 20)
 (31) 優先権主張番号 61/657, 508
 (32) 優先日 平成24年6月8日 (2012. 6. 8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/753, 833
 (32) 優先日 平成25年1月17日 (2013. 1. 17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500358711
 イルミナ インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92
 122 サンディエゴ イルミナ ウェイ
 5200
 (74) 代理人 100107489
 弁理士 大塩 竹志
 (72) 発明者 ジョージ, ウェイン エヌ.
 イギリス国 シービー10 1エックスエ
 ル エセックス, エヌアール. サフラ
 ン ウェルデン, リトル チェスターフ
 ォード, チェスターフォード リサーチ
 パーク

最終頁に続く

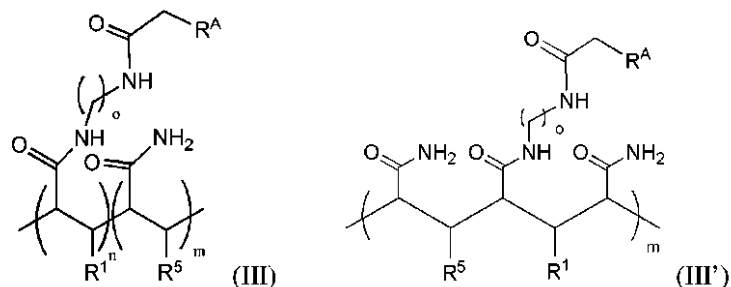
(54) 【発明の名称】 ポリマーコーティング

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

表面に共有結合したポリマーコーティングを含む表面を有する基材であって、該ポリマーコーティングが、式 (III) または (III') :

【化 27】

(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、塩化シアニル、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、R¹ と R⁵ 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、

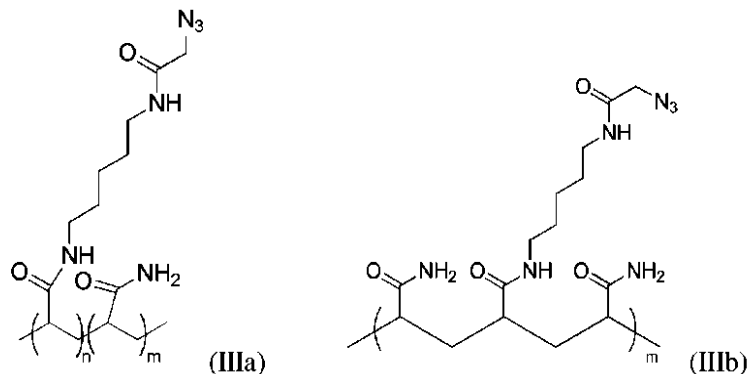
ここで、該ポリマーコーティングは、該表面に結合している一連の官能基に共有結合しており、該官能基が、アクリルアミド、アルケン、アルキン、ナイトレン、アルデヒド、ヒドラジン、活性型エステル、グリシジルエーテル、アミン、マレイミド、およびオルト位にシュタウディンガーライゼーションのためのホスフィン置換基を有するベンゾイルエステルからなる群より選択される、基材。

10

【請求項 2】

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 28】



20

(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 に記載の基材。

30

【請求項 3】

前記表面にポリマーコート領域と不活性領域の両方が含まれている、請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載の基材。

【請求項 4】

前記不活性領域が、ガラス領域、金属領域、マスク領域および格子間領域からなる群より選択される、請求項 3 に記載の基材。

【請求項 5】

前記不活性領域がガラスを含む、請求項 3 または 4 に記載の基材。

【請求項 6】

前記基材の表面に開口ウェルを備える、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の基材。

40

【請求項 7】

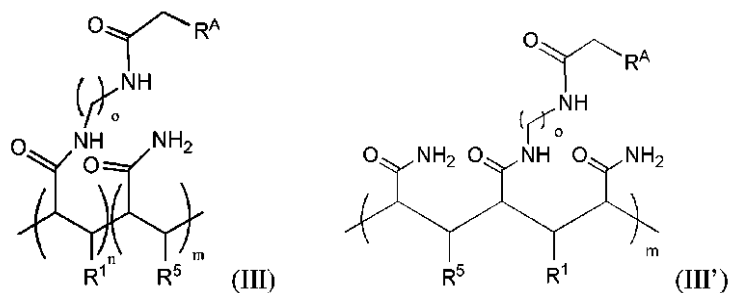
前記基材は、ビーズである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の基材。

【請求項 8】

基材の表面に固定化されたポリマーコーティングの調製方法であって、該方法は、ポリマーを基材の表面と接触させることにより該表面上のポリマーコーティングの層を形成することを含み、ここで、該表面は複数の官能基を備えており、該ポリマーコーティングは該表面上の該官能基に共有結合され、

該ポリマーコーティングが、式 (III) または (III')：

【化 3 2】



10

(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、R¹ と R⁵ 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)

のポリマーを含み、

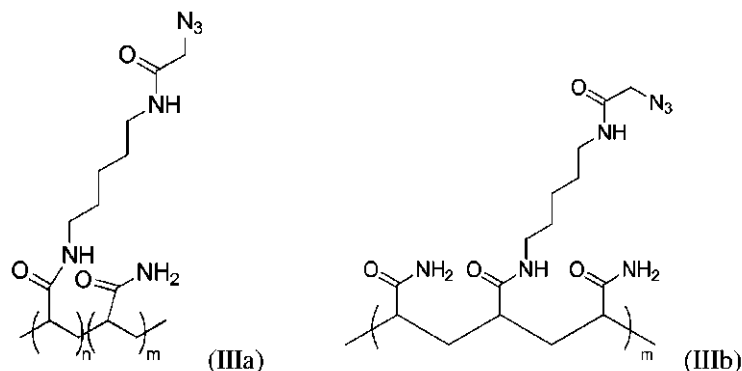
ここで、該ポリマーコーティングが、該表面に結合している一連の官能基に共有結合しており、前記官能基が、アクリルアミド、アルケン、アルキン、ナイトレン、アルデヒド、ヒドラジン、活性型エステル、グリシジルエーテル、アミン、マレイミド、およびオルト位にシュタウディンガーライゼーションのためのホスフィン置換基を有するベンゾイルエステルからなる群より選択される、方法。

20

【請求項 9】

式 (III) または (III') のポリマーが、式 (IIIa) または (IIIb)：

【化 3 3】



30

40

(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 に記載の方法。

【請求項 10】

前記基材の表面上の ナイトレン官能基が光活性化性アジドから生成される、請求項 8 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

50

前記基材の表面上のナイトレン官能基が任意選択的に置換されているフェニルアジドから生成される、請求項8～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

前記フェニルアジドが、前記基材の表面上のアミン基をN-ヒドロキシルホスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート(スルホ-HSAB)と反応させることにより調製される、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記ポリマーを前記基材の表面と接触させる前にフェニルアジドを光活性化させる、請求項11に記載の方法。

【請求項14】

前記ポリマーコーティングが前記官能基に光活性化によって共有結合される、請求項10に記載の方法。

【請求項15】

前記基材の表面上の官能基がアルキン基を含む、請求項8～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

前記ポリマーコーティングを前記官能基に銅触媒の存在下で共有結合させる、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記基材の表面上の官能基がアルケンまたはアクリルアミド基を含む、請求項8～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

前記アクリルアミド基が、該アミン官能化表面を、活性型アクリル酸エステルまたは塩化アクリルから選択されるアクリロイル基と反応させることにより調製される、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記アミン官能化表面が、前記表面を3-アミノプロピルトリメトキシシラン(APTMS)で処理することにより調製される、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記活性型アクリル酸エステルがアクリル酸N-ヒドロキシルスクシンイミド(NHS)エステルである、請求項18に記載の方法。

【請求項21】

前記複数の官能基が前記基材の表面上に、前記ポリマーの層で前記表面をコーティングした後に複数のポリマーコート領域と複数の不活性領域が形成されるように配列される、請求項8～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

前記不活性領域が、ガラス領域、金属領域、マスク領域および格子間領域からなる群より選択される、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記不活性領域がガラスを含む、請求項21または22に記載の方法。

【請求項24】

前記複数のポリマーコート領域と前記複数の不活性領域が該表面上に、パターンが形成されるように配列される、請求項17～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

前記基材がビーズである、請求項8～24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

ビーズのアレイの調製方法であって：

該方法は、

1個または1個より多くのビーズの表面上に複数の官能基を形成すること；および
ポリマーコーティングを該ビーズと接触させ、ポリマーコーティング層を該ビーズの表

10

20

30

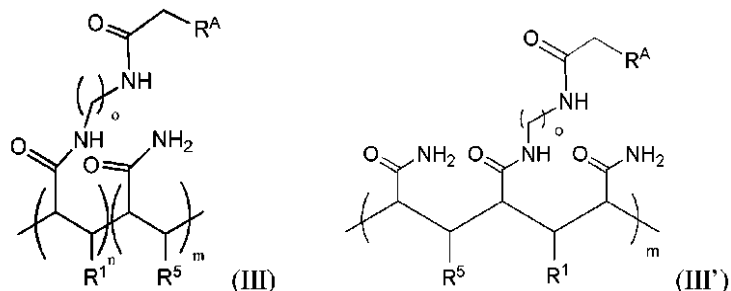
40

50

面上に形成すること
を含み、

ここで、該ポリマーコーティングは該ビーズの表面上の該官能基に共有結合され、
該ポリマーコーティングが、式 (I I I) または (I I I ') :

【化 3 5】



10

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

20

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)

のポリマーを含み、

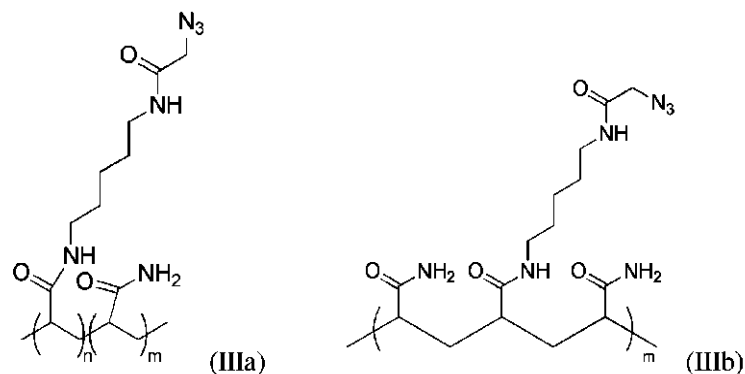
ここで、該ポリマーコーティングが、該ビーズに結合している一連の官能基に共有結合しており、該官能基が、アクリルアミド、アルケン、アルキン、ナイトレン、アルデヒド、ヒドラジン、活性型エステル、グリシジリエーテル、アミン、マレイミド、およびオルト位にシュタウディンガーライゲーションのためのホスフィン置換基を有するベンゾイルエステルからなる群より選択される、方法。

30

【請求項 2 7】

式 (I I I) または (I I I ') のポリマーが、式 (I I I a) または (I I I b) :

【化 3 6】



40

(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 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

50

前記ビーズの表面上の官能基がアルケンまたはアクリルアミドを含む、請求項 2 6 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記アルケンまたはアクリルアミド基が、前記ビーズの表面を官能化シランと直接接触させることにより調製される、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前処理したビーズを、前記ポリマーコーティングと接触させる前に重合抑制剤を含む溶液に曝露する、請求項 2 6 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記ビーズの表面上の ナイトレン 官能基が任意選択的に置換されているフェニルアジド基から生成される、請求項 2 6 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 3 2】

前記フェニルアジドが、前記ビーズの表面上のアミン基を N - ヒドロキシスルホスクシンイミジル - 4 - アジドベンゾエート (スルホ - H S A B) と反応させることにより調製される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記ポリマーコーティングが前記ビーズの表面上の官能基に光活性化によって共有結合される、請求項 2 6 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記ポリマーコーティングが前記ビーズの表面上の官能基に高温で共有結合される、請求項 2 6 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 3 5】

前記ビーズの表面上の官能基がアルキン基を含む、請求項 2 6 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記 ポリマーコーティング を前記官能基に銅触媒の存在下で共有結合させる、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

さらに、ポリマーコートされたビーズを前記基材の表面に固着させることを含む、請求項 2 6 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連出願に対する相互参照)

本願は、2012年6月8日に出願された米国特許出願第61/657,508号明細書、2013年1月17日に提出された米国特許出願第61/753,833号明細書および2013年3月4日に提出された米国特許出願第13/784,368号明細書の利益を主張し、これらのすべてが本明細書により参考としてその全体が組み込まれる。

【0 0 0 2】

(分野)

40

一般に、本発明は化学、生物学および材料科学の分野に関する。より詳しくは、本発明は、核酸およびタンパク質などの分子の検出および/または解析に使用される、基材の表面に共有結合させたポリマーコーティングに関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

(背景)

ポリマーコート基材は多くの技術的用途に使用されている。例えば、埋め込み型医療用デバイスは、生物学的に不活性なポリマーでコートされ得る。別の例では、ポリマーコート基材は、生物学的分子の調製および/または解析に使用される。分子解析、例えば特定の核酸の配列決定法は、基材のポリマーコート表面への核酸鎖の結合に依存している。次

50

いで、結合された核酸鎖の配列が、当該技術分野でよく知られた多くの異なる方法によって決定され得る。

【0004】

特定の合成時解読 (sequencing-by-synthesis) プロセスでは、フローセルの1つまたは1つより多くの表面を、核酸が結合するポリマーでコートする。フローセルをコートするために使用されている現行の手順は、重合性ミックスをフローセル上のチャンネル内に移し、一定時間インキュベートすることを伴うものである。この手順は単純であり、ブリッジ増幅および配列決定を含む下流のすべての化学的処理工程が一貫して補助され得る信頼性のあるコーティングが得られる。

【0005】

しかしながら、現在使用されている表面ポリマーコーティングの多くには、いくつかの制限がある。例えば、(i) 一部の現行のアプローチでは、空気感受性のポリマーミックスが必要とされるため、表面をコートするために使用できる方法が制限される；(ii) 形成される一部のコーティングは、「湿性」状態、例えば水溶液で保存しなければならない；および(iii) グラフト化条件は、多くの場合、強度勾配を回避するために最適化する必要がある。

【0006】

また、一定の間隔をあけて規定の特徴を有するパターン形成されたフローセルが創出される必要性も存在している。パターン形成されたフローセルを創出する方法の一例は、ビーズを化学修飾し、次いで、ビーズを、事前にアレイ状にした表面に適用することであり、該表面は、該ビーズを収容できる開口ウェルを含む。ビーズは、ウェル内に負荷する前に、クラスター成長ベース配列決定が補助され得るポリマーでコートされ得る。平坦なアレイ表面に有用なポリマーコーティングは、コーティングによって引き起こされる凝集およびコーティング後、水性バッファー中にビーズを保存するという要件のため、ビーズのコーティングが簡便でない場合があり得る。このため商業的用途において、一部、制限が生じている。したがって、ビーズをコートするために使用される場合の現在のポリマーコーティングの不都合点の1つまたは1つより多くが解消される新たなポリマーコーティングの必要性が存在している。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

(概要)

本明細書に記載の組成物の一部の実施形態は、改善されたポリマーコーティングを含む1つまたは1つより多くの表面を有する基材に関するものである。一部の実施形態では、基材がフローセルであり、ポリマーコーティングが該フローセルの1つまたは1つより多くのレーンの1つまたは1つより多くの表面に適用される。

【0008】

本明細書に記載の組成物の一部の実施形態は、表面を含む基材であって、ポリマーコーティングが該表面に共有結合している基材に関するものである。本明細書に記載の組成物の他の実施形態は、官能化表面を含む基材であって、ポリマーコーティングが該表面上の一連の官能基に共有結合しており、該官能基が、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基材に関する。さらに他の実施形態により、式(I)および(II)の反復単位を含むポリマーコーティングを有する表面を含む基材を提供する。特定の実施形態では、式(I)の反復単位が式(Ia)で表されるものでもある。他の実施形態では、式(I)の反復単位が式(Ib)で表されるものでもある。一部の実施形態では、ポリマーコーティングが式(III)または(III')のポリマーを含む。一実施形態では、ポリマーコーティングが式(IIIa)のポリマーを含む。一実施形態では、ポリマーコーティングが式(IIIb)のポリマーを含む。別の実施形態では

10

20

30

40

50

、ポリマーコーティングが式(IV)のポリマーを含む。

【0009】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態は、基材の表面に固定化されたポリマーコーティングの調製に関するものである。一部の実施形態では、該方法は、ポリマーを基材の表面と接触させ、ここで、該表面は複数の官能基を備えており、それにより該表面上にポリマーコーティングの層を形成することを含む。一部の実施形態では、ポリマーコーティングが基材の表面上の官能基に共有結合される。一部の実施形態では、該ポリマーは、重合性物質を基材の表面上で重合させることにより、該基材の表面上にインサイチュで形成される。他の一部の実施形態では、基材の表面と接触させる前にポリマーを予備形成させる。特定の実施形態では、該官能基がアルケン、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。特定の実施形態では、基材の表面上の官能基が任意選択的に置換されているフェニルアジド基を含む。他の実施形態では、基材の表面上の官能基がアルキン基を含む。さらに他の実施形態では、基材の表面上の官能基がアルケン基を含む。特定の実施形態では、ポリマーコーティングが式(I)および(II)の反復単位を含む。特定の実施形態では、式(I)の反復単位が式(Ia)で表されるものでもある。特定の実施形態では、式(I)の反復単位が式(Ib)で表されるものでもある。一部の実施形態では、ポリマーコーティングが式(III)または(III')のポリマーを含む。一実施形態では、ポリマーコーティングが式(IIIa)のポリマーを含む。一実施形態では、式(III')のポリマーが式(IIIb)で表されるものでもある。別の実施形態では、ポリマーコーティングが式(IV)のポリマーを含む。一部の実施形態では、該表面の官能基に共有結合させる前に、ポリマーコーティングを水溶液に溶解させる。

【0010】

本明細書に記載の方法の他の実施形態は、ポリヌクレオチドのアレイの調製に関する。かかる実施形態では、該方法は、複数のオリゴヌクレオチドを、本明細書に記載のいずれかの組成物のポリマーコーティングまたは本明細書に記載のいずれかの方法によって調製されるポリマーコーティング内に存在する反応性部位と反応させる工程；該ポリマーコーティングに結合された該複数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、該鋳型の各々は、該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；および該鋳型を該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含み得る。一部の実施形態では、2種類のプライマーが使用され得、その一方または両方がポリマーコーティングに結合され得る。例えば、該方法は、複数の第1のオリゴヌクレオチドを本明細書に記載のいずれかの組成物のポリマーコーティングまたは本明細書に記載のいずれかの方法によって調製されるポリマーコーティング内に存在する反応性部位と反応させる工程；該ポリマーコーティングに結合された該複数の第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、該鋳型の各々は、3'末端に、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；ならびに該鋳型を、第1のオリゴヌクレオチドと第2のオリゴヌクレオチドを用いて増幅させ、ここで、第2のオリゴヌクレオチドは任意選択で該ポリマーコーティングに結合されたものであり、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含み得る。かかる方法の一部の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングのアジド基と反応するアルキン基を含む。かかる方法の他の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティング内に存在する塩化シアヌルと反応するアミン基を含む。かかる方法のさらに他の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングの活性型アミン基(ヒドラジニルまたはヒドラゾニル基など)と反応するアルデヒド基を含む。かかる方法のまた他の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングのチオシアネートまたはカ

ルボン酸基と反応するアミン基を含む。かかる方法のさらなる実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングのグリシジル基と反応するアミン基を含む。かかる方法のなおさらなる実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングのアミン基とジ-アルデヒドリンカーによって反応するアミン基を含む。かかる方法のまた他の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティング内に存在する活性型エステルまたはエポキシ基と反応するアミン基を含む。かかる方法のまた他の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティング内に存在するオキソ-アミン基と反応するアルデヒド基を含む。かかる方法の一部の実施形態では、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と反応させる前に、ポリマーコーティングを水または水性バッファーで洗浄する。一実施形態では、ポリマーコーティングが式(I I I)のポリマーを含む。別の実施形態では、ポリマーコーティングが式(I I I ')のポリマーを含む。

10

【0011】

本明細書に記載の組成物の一部の実施形態は、本明細書に記載の基材組成物のいずれか1つを備えたフローセルに関する。一部のかかる実施形態は、さらに、基材の表面にポリマーコーティングによって結合されたポリヌクレオチドを備える。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドはポリヌクレオチドクラスターで存在している。一部のかかる実施形態では、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。クラスター内の個々のポリヌクレオチドは、ポリマーコーティングの一端または両端に結合されたものであり得る。結合(単数または複数)は、ポリヌクレオチド鎖の5'および/または3'末端によるものであり得る。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は一般的には異なるヌクレオチド配列を有するが、これはすべての実施形態で必要なことではない。

20

【0012】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態は、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列の決定に関する。一部のかかる実施形態は、(a)ポリヌクレオチドポリメラーゼを、本明細書に記載のいずれか1種類の組成物の表面にポリマーコーティングによって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)基材の表面にヌクレオチドを、該ヌクレオチドの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む。一部のかかる実施形態では、基材の表面がフローセル内に存在するものである。一部のかかる実施形態では、1回のフロー工程中、単一の型のヌクレオチドのみをフローセル内に存在させる。かかる実施形態では、ヌクレオチドは、dATP、dCTP、dGTP、dTTPおよびその類似体から選択され得る。ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列の決定方法の他の実施形態では、1回のフロー工程中、複数の異なる型のヌクレオチドをフローセル内に存在させる。かかる実施形態では、ヌクレオチドは、dATP、dCTP、dGTP、dTTPおよびその類似体から選択され得る。該ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列の決定方法のさらなる実施形態では、検出可能なシグナルが光学的シグナルを含む。他の実施形態では、検出可能なシグナルが非光学的シグナルを含む。かかる実施形態では、非光学的シグナルはpHの変化またはピロホスフェートの濃度の変化であり得る。

30

40

【0013】

本明細書に記載の一部の実施形態は、ビーズのアレイの調製方法に関する。一部の実施形態では、該方法は、1個または1個より多くのビーズの表面上に複数の官能基を形成すること；本明細書に記載のポリマーコーティングを該ビーズと接触させ、ポリマーコーティング層を該ビーズの表面上に形成することを含み、ここで、該ポリマーコーティングは該ビーズの表面上の該官能基に共有結合される。ポリマーコートされるビーズは、基材の

50

表面上に、コートされる前または後に負荷され得る。一部の実施形態では、該表面は開口ウェルを含み得、各ウェルは、1個または1個より多くのビーズが収容される寸法を有するものであり得る（すなわち、一部の実施形態では、ウェルには1個以下のビーズが収容される場合があり得る）。一部の実施形態では、ビーズの表面上の官能基がアクリルアミド基を含む。一部の実施形態では、ビーズの表面上の官能基が任意選択的に置換されているフェニルアジド基を含む。一部の実施形態（embodiment）では、ビーズの表面上の官能基がアルキン基を含む。特定の実施形態では、ポリマーコーティングが式（I）および（II）の反復単位を含む。特定の実施形態では、式（I）の反復単位が式（Ia）で表されるものでもある。特定の実施形態では、式（I）の反復単位が式（Ib）で表されるものでもある。一部の実施形態では、ポリマーコーティングが式（III）または（III'）のポリマーを含む。一実施形態では、式（III）のポリマーが式（IIIa）で表されるものでもある。一実施形態では、式（III'）のポリマーが式（IIIb）で表されるものでもある。別の実施形態では、ポリマーコーティングが式（IV）のポリマーを含む。特定の実施形態では、ビーズが本明細書に記載のポリマーコーティングで完全にコートされている。他の実施形態では、ビーズが本明細書に記載のポリマーコーティングで一部コートされている。一部の実施形態では、ポリマーコーティングがビーズの表面に高温で共有結合される。他の一部の実施形態では、ポリマーコーティングがビーズの表面に光活性化によって共有結合される。他の一部の実施形態では、ビーズをウェル内で事前にアレイ状にし、次いで、ポリマーコーティングをアレイ状ビーズに共有結合させる。

【0014】

ビーズは基材の表面（例えば、フローセルまたはウェル）に、化学的、物理吸着的または両方の力によって固着され得る。一部の実施形態では、ポリマーコートビーズは基材の表面に、該基材の表面上の開口ウェル内に負荷することにより固着される。あるいはまたさらに、ポリマーコートビーズは基材の表面に、該基材の表面上の官能基に共有結合させることにより固着される。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、さらに、ポリマーコートビーズを、該ビーズを基材の表面に負荷する前に洗浄して過剰の未結合ポリマーコーティングを除去することを含む。特定の実施形態では、ポリマーコーティングを、前処理したビーズと接触させる前に溶液に溶解させる。一部の実施形態では、ポリマーコーティングを水溶液に溶解させる。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、さらに、本明細書に記載のものと同様の方法を用いてアレイ状ポリヌクレオチドを形成するためのさらなる工程を含む。一部の実施形態では、基材の表面をウェル、パッドまたは他の特徴でパターン形成する。

【0015】

本明細書に記載の一部の好ましい実施形態は、共有結合された状態でポリマーコーティングを含む表面を有する基材であって、ポリマーコーティングが式（III）または（III'）のポリマーを含む基材に関する。一実施形態では、式（III）のポリマーが式（IIIa）で表されるものでもある。一実施形態では、式（III'）のポリマーが式（IIIb）で表されるものでもある。一実施形態では、基材がビーズである。

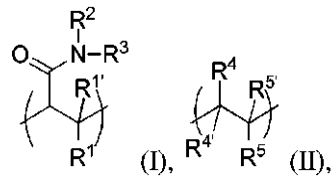
【0016】

本明細書に記載の一部の好ましい実施形態は、基材の表面上に複数の官能基を形成すること、式（III）または（III'）のポリマーを該基材の表面と接触させ、ポリマーコーティング層を該基材の表面上に形成することを含み、該ポリマーコーティングが基材の表面上の官能基に共有結合される、基材の表面の調製方法に関する。一実施形態では、式（III）のポリマーが式（IIIa）で表されるものでもある。一実施形態では、式（III'）のポリマーが式（IIIb）で表されるものでもある。一部の実施形態では、基材の表面上の官能基が、アルケン、アルキン、または任意選択的に置換されているフェニルアジドから選択される。一部の実施形態では、ポリマーコーティングがアルケン基に高温で共有結合される。一実施形態では、該アルケン基がアクリルアミド基である。一実施形態では、基材がビーズである。

一実施形態において、たとえば、以下の項目が提供される。

(項目1) 共有結合された状態でポリマーコーティングを含む表面を有する基材であって、該ポリマーコーティングが式(I)の反復単位と式(II)の反復単位：

【化25】



10

(式中：

R^1 および $R^{1'}$ は各々、独立して、水素、ハロ、アルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、またはその任意選択的に置換されている変形型から選択され；

R^2 および R^3 は各々、独立して、水素、アルキル、アルキルアミノ、アルキルアミド、アルキルチオ、アリール、またはその任意選択的に置換されている変形型から選択され；

R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 および $R^{5'}$ は各々、独立して、 H 、 R^6 、 OR^6 、 $-C(O)OR^6$ 、 $-C(O)R^6$ 、 $-OC(O)R^6$ 、 $-C(O)NR^7R^8$ 、または $-NR^7R^8$ から選択され；

20

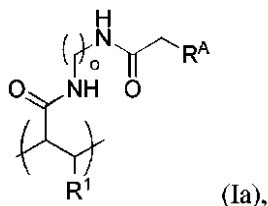
R^6 は独立して、 H 、 OH 、アルキル、シクロアルキル、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、またはその任意選択的に置換されている変形型から選択され；

R^7 および R^8 は各々、独立して H またはアルキルから選択されるか、あるいは R^7 と R^8 が、これらが結合している原子(1個または複数)と一体に連接されて複素環を形成している)

を含む基材。

(項目2) 式(I)の反復単位が式(Ia)：

【化26】



30

(式中、 R^1 は H またはアルキルであり；

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、エボキシ、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；

40

各 $-(CH_2)_o-$ は任意選択的に置換されていてもよく；

o は 1 ~ 50 の整数である、

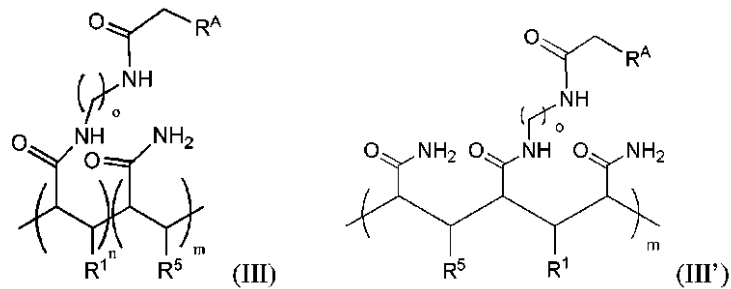
ただし、 R^1 が H であり、 o が 5 であり、 R^A がハロである場合、 R^A はプロモ基になり得ないものとする)

で表されるものでもある、項目1に記載の基材。

(項目3) R^A がアジドであり、 R^1 が水素であり、 o が 5 である、項目2に記載の基材。

(項目4) 前記ポリマーコーティングが、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、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 $-(CH_2)_o-$ 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；

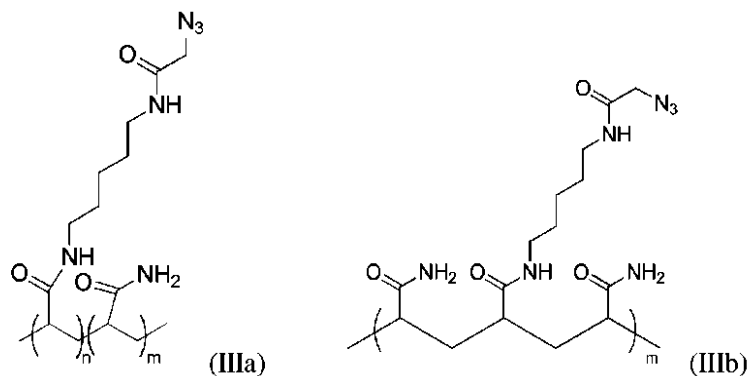
m は、1 ~ 100, 000 の範囲の整数である；

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)

のポリマーを含む、項目 1 に記載の基材。

(項目 5) 式 (III) または (III') のポリマーが、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、項目 4 に記載の基材。

(項目 6) ポリマーコーティングが、前記表面に結合している一連の官能基に共有結合しており、前記官能基が、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、項目 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の基材。

(項目 7) 前記官能基がアルキンを含み、式 (I) の反復単位が式 (Ia) で表されるものでもあり、式中の R^A がアジドである、項目 6 に記載の基材。

(項目 8) 前記官能基がナイトレンを含み、式 (I) の反復単位が式 (Ia) で表されるものでもあり、式中の R^A がアジドである、項目 6 に記載の基材。

(項目 9) 前記官能基が活性型エステルを含み、式 (I) の反復単位が式 (Ia) で表されるものでもあり、式中の R^A がアミンである、項目 6 に記載の基材。

(項目 10) 式 (I) の反復単位が、式 (Ib)：

10

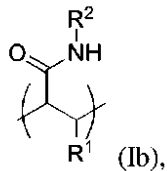
20

30

40

50

【化 2 9】

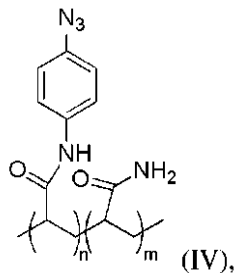


(式中、 R^2 は、任意選択的に置換されているアリールである)
で表されるものでもある、項目 1 に記載の基材。

(項目 1 1) R^2 が、1 個または 1 個より多くのハロゲンで任意選択的に置換されているフェニルアジドである、項目 1 0 に記載の基材。

(項目 1 2) 前記ポリマーコーティングが、式 (I V) :

【化 3 0】



(式中、 n は 1 ~ 5 0 , 0 0 0 の範囲の整数であり、 m は 1 ~ 1 0 0 , 0 0 0 の範囲の整数である)

のポリマーを含む、項目 1 0 に記載の基材。

(項目 1 3) 式 (I V) のフェニル基が 1 つまたは 1 つより多くのフルオロ基で置換されている、項目 1 2 に記載の基材。

(項目 1 4) 前記表面にポリマーコート領域と不活性領域の両方が含まれている、項目 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の基材。

(項目 1 5) 前記不活性領域が、ガラス領域、金属領域、マスク領域および格子間領域からなる群より選択される、項目 1 4 に記載の基材。

(項目 1 6) 前記不活性領域がガラスを含む、項目 1 4 または 1 5 に記載の基材。

(項目 1 7) 前記基材の表面に開口ウェルを備える、項目 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の基材。

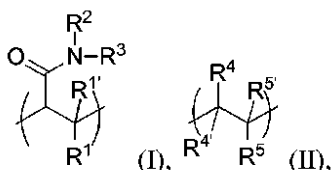
(項目 1 8) 前記基材は、ビーズである、項目 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の基材。

(項目 1 9) 基材の表面に固定化されたポリマーコーティングの調製方法であって、該方法は、

ポリマーを基材の表面と接触させ、ここで、該表面は複数の官能基を備えており、それにより該表面上のポリマーコーティングの層を形成することを含み、ここで、該ポリマーコーティングは該表面上の該官能基に共有結合され、

該ポリマーコーティングが式 (I) の反復単位と式 (I I) の反復単位 :

【化 3 1】



(式中 :

R^1 および R^1' は各々、独立して、水素、ハロ、アルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、またはそ

の任意選択的に置換されている変形型から選択され；

R^2 および R^3 は各々、独立して、水素、アルキル、アルキルアミノ、アルキルアミド、アルキルチオール、アリール、またはその任意選択的に置換されている変形型から選択され；

R^4 、 R^4' 、 R^5 および R^5' は各々、独立して、H、OH、 OR^6 、 $-C(O)OR^6$ 、 $-C(O)R^6$ 、 $-OC(O)R^6$ 、 $-C(O)NR^7R^8$ 、または $-NR^7R^8$ から選択され；

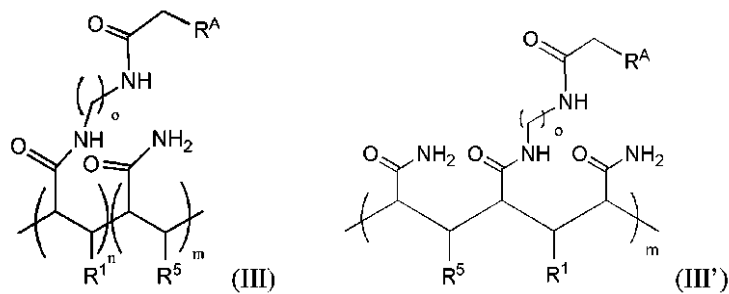
R^6 は独立して、H、OH、アルキル、シクロアルキル、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、またはその任意選択的に置換されている変形型から選択され；

R^7 および R^8 は各々、独立してHまたはアルキルから選択されるか、あるいは R^7 と R^8 が、これらが結合している原子（1個または複数）と一体に接続されて複素環を形成している）

を含む方法。

（項目20） 前記ポリマーコーティングが、式（III）または（III'）：

【化32】



（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 $-(CH_2)_o-$ 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）

のポリマーを含む、項目19に記載の方法。

（項目21） 式（III）または（III'）のポリマーが、式（IIIa）または（IIIb）：

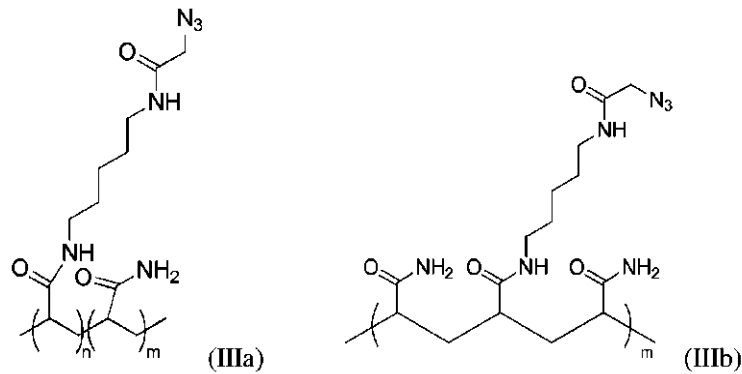
10

20

30

40

【化 3 3】



10

(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、項目20に記載の方法。

(項目22) 前記基材の表面上の官能基が光活性化性アジドを含む、項目19～21のいずれか1項に記載の方法。

(項目23) 前記基材の表面上の官能基が任意選択的に置換されているフェニルアジドを含む、項目19～22のいずれか1項に記載の方法。

(項目24) 前記フェニルアジドが、前記基材の表面上のアミン基をN-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート(スルホ-HSAB)と反応させることにより調製される、項目23に記載の方法。

20

(項目25) 前記ポリマーを前記基材の表面と接触させる前にフェニルアジドを光活性化させる、項目23に記載の方法。

(項目26) 前記ポリマーコーティングが前記官能基に光活性化によって共有結合される、項目22に記載の方法。

(項目27) 前記基材の表面上の官能基がアルキン基を含む、項目19～21のいずれか1項に記載の方法。

(項目28) 重合性物質を前記官能基に銅触媒の存在下で共有結合させる、項目27に記載の方法。

(項目29) 前記基材の表面上の官能基がアルケンまたはアクリルアミド基を含む、項目19～21のいずれか1項に記載の方法。

30

(項目30) 前記アクリルアミド基が、該アミン官能化表面を、活性型アクリル酸エステルまたは塩化アクリルから選択されるアクリロイル基と反応させることにより調製される、項目29に記載の方法。

(項目31) 前記アミン官能化表面が、前記表面を3-アミノプロピルトリメトキシシラン(APTMS)で処理することにより調製される、項目30に記載の方法。

(項目32) 前記活性型アクリル酸エステルがアクリル酸N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルである、項目30に記載の方法。

(項目33) 前記複数の官能基が前記基材の表面上に、前記重合性物質を重合させた後に複数のポリマーコート領域と複数の不活性領域が形成されるように配列される、項目19～32のいずれか1項に記載の方法。

40

(項目34) 前記不活性領域が、ガラス領域、金属領域、マスク領域および格子間領域からなる群より選択される、項目33に記載の方法。

(項目35) 前記不活性領域がガラスを含む、項目33または34に記載の方法。

(項目36) 前記複数のポリマーコート領域と前記複数の不活性領域が該表面上に、パターンが形成されるように配列される、項目33～35のいずれか1項に記載の方法。

(項目37) 前記基材がビーズである、項目19～36のいずれか1項に記載の方法。

(項目38) ビーズのアレイの調製方法であって：

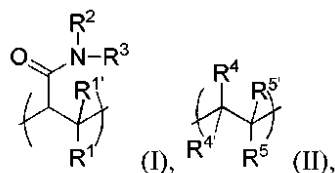
1個または1個より多くのビーズの表面上に複数の官能基を形成すること；および
ポリマーコーティングを前記ビーズと接触させ、ポリマーコーティング層を前記ビーズ

50

の表面上に形成すること
を含み、

ここで、前記ポリマーコーティングは該ビーズの表面上の該官能基に共有結合され、該ポリマーコーティングが式 (I) の反復単位と式 (II) の反復単位：

【化 3 4】



10

(式中：

R^1 および $R^{1'}$ は各々、独立して、水素、ハロ、アルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、またはその任意選択的に置換されている変形型から選択され；

R^2 および R^3 は各々、独立して、水素、アルキル、アルキルアミノ、アルキルアミド、アルキルチオ、アリール、またはその任意選択的に置換されている変形型から選択され；

R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 および $R^{5'}$ は各々、独立して、H、 R^6 、 OR^6 、 $-C(O)OR^6$ 、 $-C(O)R^6$ 、 $-OC(O)R^6$ 、 $-C(O)NR^7R^8$ 、または $-NR^7R^8$ から選択され；

20

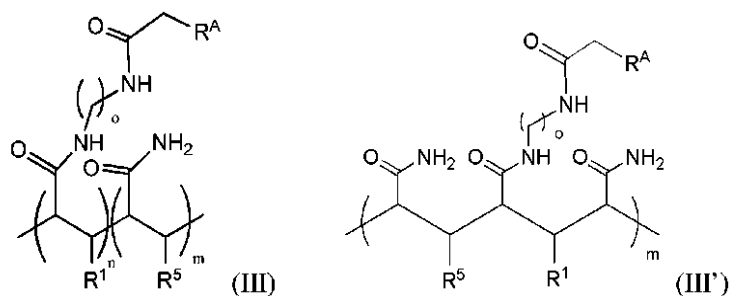
R^6 は独立して、H、OH、アルキル、シクロアルキル、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、またはその任意選択的に置換されている変形型から選択され；

R^7 および R^8 は各々、独立してHまたはアルキルから選択されるか、あるいは R^7 と R^8 が、これらが結合している原子 (1 個または複数) と一体に連接されて複素環を形成している)

を含む方法。

(項目 3 9) 前記ポリマーコーティングが、式 (III) または (III')：

【化 3 5】



30

(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；

40

各 $-(CH_2)_o-$ 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；

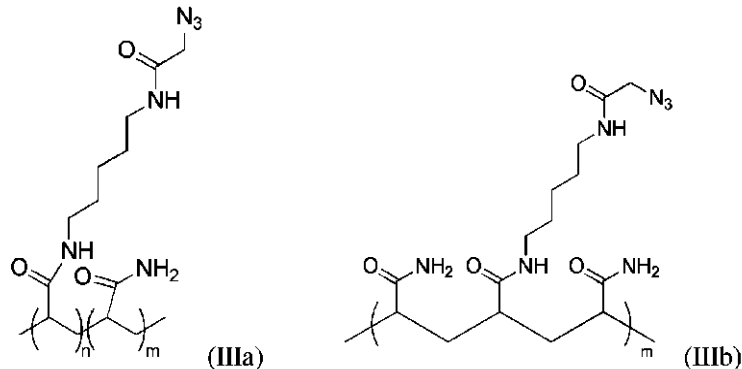
ただし、 R^1 と R^5 が H であり、 o が 5 である場合、 R^A はプロモ基になり得ないものとする)

50

のポリマーを含む、項目 38 に記載の方法。

(項目 40) 式 (III) または (III') のポリマーが、式 (IIIa) または (IIIb) :

【化 36】



10

(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、項目 39 に記載の方法。

(項目 41) 前記ビーズの表面上の官能基がアルケンまたはアクリルアミドを含む、項目 38 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 42) 前記アルケンまたはアクリルアミド基が、前記ビーズの表面を官能化シランと直接接触させることにより調製される、項目 41 に記載の方法。

20

(項目 43) 前処理したビーズを、前記ポリマーコーティングと接触させる前に重合抑制剤を含む溶液に曝露する、項目 38 ~ 42 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 44) 前記ビーズの表面上の官能基が任意選択的に置換されているフェニルアジド基を含む、項目 38 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 45) 前記フェニルアジドが、前記ビーズの表面上のアミン基を N - ヒドロキシスルホスクシンイミジル - 4 - アジドベンゾエート (スルホ - H S A B) と反応させることにより調製される、項目 44 に記載の方法。

(項目 46) 前記ポリマーコーティングが前記ビーズの表面上の官能基に光活性化によって共有結合される、項目 38 ~ 45 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

(項目 47) 前記ポリマーコーティングが前記ビーズの表面上の官能基に高温で共有結合される、項目 38 ~ 45 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 48) 前記ビーズの表面上の官能基がアルキン基を含む、項目 38 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 49) 前記重合性物質を前記官能基に銅触媒の存在下で共有結合させる、項目 48 に記載の方法。

(項目 50) さらに、ポリマーコートされたビーズを前記基材の表面に固着させることを含む、項目 38 ~ 49 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図 1 A】図 1 A は、ポリ (N - (5 - アジドアセトアミジルペンチル) アクリルアミド - コ - アクリルアミド) (P A Z A M) の ^1H NMR スペクトルを示す。

【0018】

【図 1 B】図 1 B は、コンピュータによる P A Z A M の分子量分布を示す。

【0019】

【図 1 C】図 1 C は、軽度に架橋させた P A Z A M の ^1H NMR スペクトルを示す。

【0020】

【図 2 A】図 2 A および 2 B は、P A Z A M を用いてコートした典型的なガラスフローセ

50

ルのTyphoonスキャン(図2B)およびTyphoon強度の中央値(図2A)をフローセルの8つのレーンに沿って示す。

【図2B】図2Aおよび2Bは、PAZAMを用いてコートした典型的なガラスフローセルのTyphoonスキャン(図2B)およびTyphoon強度の中央値(図2A)をフローセルの8つのレーンに沿って示す。

【0021】

【図3A】図3Aおよび3Bは、PAZAMを用いてコートしたHiSeqガラスフローセルのTyphoonスキャンを示す。図3Aは、相補的な色素含有オリゴヌクレオチド配列とハイブリダイズさせたグラフト化表面のTyphoon蛍光画像を示す。図3Bは、インサイチューPAZAMのTyphoon強度の中央値の図表を示す。

10

【図3B】図3Aおよび3Bは、PAZAMを用いてコートしたHiSeqガラスフローセルのTyphoonスキャンを示す。図3Aは、相補的な色素含有オリゴヌクレオチド配列とハイブリダイズさせたグラフト化表面のTyphoon蛍光画像を示す。図3Bは、インサイチューPAZAMのTyphoon強度の中央値の図表を示す。

【0022】

【図4A】図4Aおよび4Bは、PAZAMを用いてスピンコートしたガラス基材のTyphoonスキャンを示す。図4Aは、相補的な色素含有オリゴヌクレオチド配列とハイブリダイズさせたグラフト化表面のTyphoon蛍光画像を示す。図4Bは、スピンコートしたPAZAMのTyphoon強度の中央値の図表を示す。

【図4B】図4Aおよび4Bは、PAZAMを用いてスピンコートしたガラス基材のTyphoonスキャンを示す。図4Aは、相補的な色素含有オリゴヌクレオチド配列とハイブリダイズさせたグラフト化表面のTyphoon蛍光画像を示す。図4Bは、スピンコートしたPAZAMのTyphoon強度の中央値の図表を示す。

20

【0023】

【図5-1】図5A~Cは、フローコートしたPAZAM表面上のクラスターを示す。図5Aは、チャンネルのUV照射領域の拡大版である。図5Bおよび図5Cは、チャンネルのクラスターの数およびクラスターのフィルター処理強度を示す。

【図5-2】図5A~Cは、フローコートしたPAZAM表面上のクラスターを示す。図5Aは、チャンネルのUV照射領域の拡大版である。図5Bおよび図5Cは、チャンネルのクラスターの数およびクラスターのフィルター処理強度を示す。

30

【0024】

【図6】図6A~Cは、スピンコートしたPAZAM表面上のクラスターを示す。図6Aは、HiSeqフローセル上のスピンコートしたPAZAMのtyphoon強度の中央値の図表を示す。図6Bは、相補的な色素含有オリゴヌクレオチド配列とハイブリダイズさせたグラフト化表面のTyphoon蛍光画像を示す。図6Cは、レーン3と5のクラスターの拡大画像を示す。

【0025】

【図7A】図7Aおよび7Bは、典型的なフローセルの画像(図7B)および強度の中央値(図7A)をフローセルの8つのレーンに沿って示す。

【図7B】図7Aおよび7Bは、典型的なフローセルの画像(図7B)および強度の中央値(図7A)をフローセルの8つのレーンに沿って示す。

40

【0026】

【図8-1】図8A~Iは、フローコートしたPAZAM混合物上のポリヌクレオチドのクラスターおよび配列決定ならびに取得されたデータを示す。

【図8-2】図8A~Iは、フローコートしたPAZAM混合物上のポリヌクレオチドのクラスターおよび配列決定ならびに取得されたデータを示す。

【0027】

【図9】図9は、相補的な蛍光オリゴヌクレオチドがハイブリダイズしているアルキンオリゴ体で官能化したスピンコート基材を示す。

【0028】

50

【図 10 A】図 10 A および 10 B は、択一的な光活性橋かけ剤のスクリーニング結果を示す。図 10 A は、Photo XL に対する Typhoon 強度の中央値の図表を示す。図 10 B は、異なる架橋剤の Photo XL に対する UV 時間の図表を示す。

【図 10 B】図 10 A および 10 B は、択一的な光活性橋かけ剤のスクリーニング結果を示す。図 10 A は、Photo XL に対する Typhoon 強度の中央値の図表を示す。図 10 B は、異なる架橋剤の Photo XL に対する UV 時間の図表を示す。

【0029】

【図 11 A】図 11 A ~ 11 B は、光活性なパターン形成表面およびポリマーロッキングを示す。

【図 11 B】図 11 A ~ 11 B は、光活性なパターン形成表面およびポリマーロッキングを示す。

【0030】

【図 12】図 12 は、室温で 10 % 未満の湿度にて 6 日間保存後の熱的架橋 PAZAM 層上の残留表面割合を示す。

【0031】

【図 13 A】図 13 A は、5 種類の Phi X 鋳型を用いて熱的架橋 PAZAM 表面上で成長させたクラスターを示す。

【0032】

【図 13 B】図 13 B は、熱的架橋フローセル上での 2 × 26 サイクル実行後の配列決定メトリックスを示す。

【0033】

【図 14】図 14 は、PAZAM をパターン形成シランパッチに熱的架橋させることにより作製したパターン形成アレイ上で成長させたクラスターを示す。

【0034】

【図 15】図 15 は、PAZAM コートビーズによって調製したパターン形成 PAZAM アレイを示す。

【0035】

【図 16】図 16 は、光活性ポリマーを用いた分割 / 併合アプローチを示す。

【発明を実施するための形態】

【0036】

(詳細な説明)

本開示は、ポリマーでコートされた表面を含む基材であって該表面に共有結合している基材に関する。かかる基材の好ましい一実施形態は、ポリ (N - (5 - アジドアセトアミジルペンチル) アクリルアミド - コ - アクリルアミド) (別名 PAZAM または DASF A) コーティングを含む。これらのポリマーコーティングは、基材、例えば、フローセルの表面または分子アレイの表面の官能化表面に共有結合される。また、本開示は、かかるポリマーコート表面の調製方法およびかかるポリマーコート表面を含む基材の使用方法に関する。好ましい一実施形態では、PAZAM コート表面を有する基材を用いてポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定する。

【0037】

この新しいポリマーコーティングおよびアプローチにより、現在知られているポリマーコーティングの制限の多くが解消される空气中で安定な材料が作製される。

【0038】

(定義)

特に定義していない限り、本明細書で用いる科学技術用語はすべて、当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有する。用語 “ including (~ を含む) ” ならびに他の形態、例えば、 “ include ” 、 “ includes ” 、および “ included ” の使用は限定的でない。用語 “ having (~ を有する) ” ならびに他の形態、例えば、 “ have ” 、 “ has ” 、および “ had ” の使用は限定的でない。本明細書で用いる場合、移行句中であれ、請求項の主文中であれ、用語 “ compris

10

20

30

40

50

e (s) (~ を含む) ” および “ c o m p r i s i n g ” は非限定的な意味を有すると解釈されたい。すなわち、上記の用語は、語句 “ h a v i n g a t l e a s t (少なくとも ~ を有する) ” または “ i n c l u d i n g a t l e a s t (少なくとも ~ を含む) ” と同義的に解釈されたい。例えば、方法の状況において用いている場合、用語 “ c o m p r i s i n g ” は、該方法が少なくとも記載の工程を含むが、さらなる工程を含んでいてもよいことを意味する。化合物、組成物またはデバイスの状況において用いている場合、用語 “ c o m p r i s i n g ” は、該化合物、組成物またはデバイスが少なくとも記載の特徴または成分を含むが、さらなる特徴または成分もまた含んでいてもよいことを意味する。

【 0 0 3 9 】

10

本明細書で用いる場合、一般的な有機物質の略号を以下のとおりに規定する。

A c	アセチル	
A c ₂ O	無水酢酸	
A P T S	アミノプロピルシラン	
A P T E S	(3 - アミノプロピル) トリエトキシシラン	
A P T M S	(3 - アミノプロピル) トリメトキシシラン	
a q .	水性	
A z a p a	N - (5 - アジドアセトアミジルペンチル) アクリルアミド	
A P T M S	3 - アミノプロピルトリメトキシシラン	
B H T	ブチル化ヒドロキシトルエン	20
B n	ベンジル	
B r a p a または B R A P A	N - (5 - ブロモアセトアミジルペンチル) アクリルアミド	
B z	ベンゾイル	
B O C または B o c	t e r t - ブトキシカルボニル	
B u	n - ブチル	
c a t .	触媒の	
C b z	カルボベンジルオキシ	
C y C l	塩化シアヌル	
	セ氏の度数の温度	30
d A T P	デオキシアデノシン三リン酸	
d C T P	デオキシチジン三リン酸	
d G T P	デオキシグアノシン三リン酸	
d T T P	デオキシチミジン三リン酸	
D B U	1 , 8 - ジアザビシクロ [5 . 4 . 0] ウンデカ - 7 - エン	
D C A	ジクロロ酢酸	
D C E	1 , 2 - ジクロロエタン	
D C M	塩化メチレン	
D I E A	ジイソプロピルエチルアミン	
D M A	ジメチルアセトアミド	40
D M E	ジメトキシエタン	
D M F	N , N ' - ジメチルホルムアミド	
D M S O	ジメチルスルホキシド	
D P P A	ジフェニルホスホリルアジド	
E t	エチル	
E t O A c	酢酸エチル	
g	グラム (単数または複数)	
G P C	ゲル浸透クロマトグラフィー	
H または h r	時間 (単数または複数)	
i P r	イソプロピル	50

K P i	p H 7 . 0 の 1 0 m M リン酸カリウムバッファー	
K P S	過硫酸カリウム	
I P A	イソプロピルアルコール	
I P H A , H C l	N - イソプロピルヒドロキシルアミン塩酸塩	
L C M S	液体クロマトグラフィー - 質量分析	
L D A	リチウムジイソプロピルアミド	
m または m i n	分 (単数または複数)	
m C P B A	メタ - クロロペルオキシ安息香酸	
M e O H	メタノール	
M e C N	アセトニトリル	10
m L	ミリリットル (単数または複数)	
M T B E	メチルターシャリー - ブチルエーテル	
N a N ₃	アジ化ナトリウム	
N H S	N - ヒドロキシスクシンイミド	
P A Z A M	任意のアクリルアミド対 A z a p a 比のポリ (N - (5 - アジドアセトアミジルペンチル) アクリルアミド - コ - アクリルアミド)	
P G	保護基	
P h	フェニル	
p p t	沈殿物	
r t	室温	20
S F A	米国特許出願公開公報第 2 0 1 1 / 0 0 5 9 8 6 5 号に定義された無シランアクリルアミド	
スルホ - H S A B または S H S A B	N - ヒドロキシスルホスクシンイミジル - 4 - アジドベンゾエート (a z i d o b e n o a t e)	
T E A	トリエチルアミン	
T E M P O	(2 , 2 , 6 , 6 - テトラメチルピペリジン - 1 - イル) オキシル	
T C D I	1 , 1 ' - チオカルボニルジイミダゾール	
T e r t , t	ターシャリー	
T F A	トリフルオロ酢酸	
T H F	テトラヒドロフラン	30
T E M E D	テトラメチルエチレンジアミン	
μ L	マイクロリットル (単数または複数)	
【 0 0 4 0 】		

本明細書で用いる場合、用語「アレイ」は、1つまたは1つより多くの基材に結合させた異なるプローブ分子の集団であって、該異なるプローブ分子が相対位置に従って互いに識別され得るようになっているものをいう。アレイは、各々が基材上の異なるアドレス指定可能な位置に存在している異なるプローブ分子を含み得る。あるいはまたさらに、アレイは、各々が異なるプローブ分子を有する別個の基材を含み得るものであって、該基材が取り付けられた表面上の該基材の位置に従って、あるいは液状物中の基材の位置に従って該異なるプローブ分子が特定され得るものであってもよい。表面上に別個の基材を存在させる例示的なアレイとしては、限定されないが、例えば、米国特許第 6 , 3 5 5 , 4 3 1 B 1 号、U S 2 0 0 2 / 0 1 0 2 5 7 8 および P C T 出願公開公報番号 W O 0 0 / 6 3 4 3 7 に記載のような、ウェル内にビーズを含めたものが挙げられる。例えば、マイクロ流体デバイス (蛍光標示細胞分取 (F A C S) など) を用いて液状アレイ内のビーズを識別するための本発明に使用され得る例示的な形式は、例えば米国特許第 6 , 5 2 4 , 7 9 3 号に記載されている。本発明に使用され得るアレイのさらなる例としては、限定されないが、米国特許第 5 , 4 2 9 , 8 0 7 号 ; 同第 5 , 4 3 6 , 3 2 7 号 ; 同第 5 , 5 6 1 , 0 7 1 号 ; 同第 5 , 5 8 3 , 2 1 1 号 ; 同第 5 , 6 5 8 , 7 3 4 号 ; 同第 5 , 8 3 7 , 8 5 8 号 ; 同第 5 , 8 7 4 , 2 1 9 号 ; 同第 5 , 9 1 9 , 5 2 3 号 ; 同第 6 , 1 3 6 , 2 6 9 号 ; 同第 6 , 2 8 7 , 7 6 8 号 ; 同第 6 , 2 8 7 , 7 7 6 号 ; 同第 6 , 2 8 8 , 2 2 0 号

10

20

30

40

50

；同第6，297，006号；同第6，291，193号；同第6，346，413号；同第6，416，949号；同第6，482，591号；同第6，514，751号および同第6，610，482号；ならびにWO93/17126；WO95/11995；WO95/35505；EP742287；およびEP799897に記載されたものが挙げられる。

【0041】

本明細書で用いる場合、用語「共有結合された (“ attached ” または “ bonded ”) 」とは、原子間での電子対の共有を特徴とする化学結合の形成をいう。例えば、共有結合されたポリマーコーティングとは、基材の官能化表面との結合が他の手段、例えば付着または静電相互作用によるものに対して、該表面と化学結合を形成しているポリマーコーティングをいう。表面に共有結合されたポリマーが共有結合に加え、ある手段によっても結合されていてもよいことは認識される。

10

【0042】

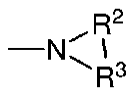
本明細書で用いる場合、用語「ポリマーロッキング」は、基材の表面上の官能基をポリマーコーティングと、該ポリマーコーティングが該表面に共有結合されるように反応させるプロセスをいう。

【0043】

本明細書で用いる場合、任意の「R」基（単数または複数）、例えば限定されないが、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、および R^8 は、指示原子に結合され得る置換基を表す。R基は置換されていても非置換であってもよい。2つの「R」基が「一体となって」と記載している場合、該R基とこれらが結合している原子により、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、または複素環が形成され得る。例えば、限定されないが、 R^2 と R^3 、または R^2 、 R^3 もしくは R^4 とこれらが結合している原子が「一体となって」または「一体に連接されて」と表示している場合、これらが互いに共有結合して環を形成していることを意味し、その一例を以下に示す。

20

【化1】



【0044】

ある基が「任意選択的に置換されている」と記載している場合はいつでも、基が非置換であってもよく、表示した置換基のうちの1つまたは1つより多くで置換されていてもよい。同様に、ある基が「非置換または置換型」とであると記載している場合、置換されている場合は、置換基が表示した置換基のうちの1つまたは1つより多くから選択され得る。置換基を表示していない場合、これは、表示した「任意選択的に置換されている」または「置換された」基が、個々に独立して、限定されないが、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアリシクリル、アラルキル、ヘテロアラルキル、（ヘテロアリシクリル）アルキル、ヒドロキシ、保護ヒドロキシ、アルコキシ、アリールオキシ、アシル、メルカプト、アルキルチオ、アリールチオ、シアノ、ハロゲン、チオカルボニル、O-カルバミル、N-カルバミル、O-チオカルバミル、N-チオカルバミル、C-アミド、N-アミド、S-スルホンアミド、N-スルホンアミド、C-カルボキシ、保護C-カルボキシ、O-カルボキシ、イソシアナト、チオシアナト、イソチオシアナト、ニトロ、シリル、スルフェニル、スルフィニル、スルホニル、ハロアルキル、ハロアルコキシ、トリハロメタン、スルホニル、トリハロメタン、スルホンアミド、アミノ、一置換アミノ基、二置換アミノ基、およびその保護誘導体を含む官能部の基から個々に独立して選択される1つまたは1つより多くの基で置換され得ることを意味する。

30

40

【0045】

本明細書で用いる場合、「アルキル」は、完全飽和（二重結合または三重結合なし）の炭化水素基を含む直鎖または分枝鎖の炭化水素鎖をいう。一部の実施形態では、アルキル

50

基は1～20個の炭素原子を有するものであり得る（例えば「1～20」という数値範囲は、本明細書で示している場合はいつでも、示した範囲（両端を含む）内の各整数をいう；例えば、「1～20個の炭素原子」とは、アルキル基が1個の炭素原子、2個の炭素原子、3個の炭素原子など、20個を含むまでの炭素原子からなるものであり得ることを意味するが、本定義は、数値範囲を表示していない場合の用語「アルキル」の存在も包含している）。また、アルキル基は、約7～約10個の炭素原子を有する中くらいのサイズのアルキルであってもよい。また、アルキル基は、1～6個の炭素原子を有する低級アルキルであってもよい。化合物のアルキル基は「C₁～C₄アルキル」または同様の表示で表示され得る。ほんの一例として、「C₁～C₄アルキル」は、アルキル鎖内に1～4個の炭素原子が存在すること、すなわち、アルキル鎖がメチル、エチル、プロピル、イソ-プロピル、n-ブチル、イソ-ブチル、sec-ブチルおよびt-ブチルから選択されることを示す。典型的なアルキル基としては、限定されないが、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ターシャリーブチル、ペンチル、およびヘキシルが挙げられる。アルキル基は置換されていても非置換であってもよい。

10

【0046】

本明細書で用いる場合、「アルケニル」は、直鎖または分枝鎖の炭化水素鎖内に1つまたは1つより多くの二重結合を含むアルキル基をいう。アルケニル基は非置換であっても置換型であってもよい。

【0047】

本明細書で用いる場合、「アルキニル」は、直鎖または分枝鎖の炭化水素鎖内に1つまたは1つより多くの三重結合を含むアルキル基をいう。アルキニル基は非置換であっても置換型であってもよい。

20

【0048】

本明細書で用いる場合、「シクロアルキル」は、完全飽和（二重結合または三重結合なし）の単環式または多環式の炭化水素環系をいう。2つまたは2つより多くの環で構成されている場合、該環は、縮合された様式で一体に接続されたものであり得る。シクロアルキル基は環（単数または複数）内に3～10個の原子を含み得る。一部の実施形態では、シクロアルキル基は環（単数または複数）内に3～8個の原子を含み得る。シクロアルキル基は非置換であっても置換型であってもよい。典型的なシクロアルキル基としては、限定されないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルが挙げられる。

30

【0049】

本明細書で用いる場合、「シクロアルケニル」は、少なくとも1つの環内に1つまたは1つより多くの二重結合を含む単環式または多環式の炭化水素環系をいう；が、1つより多く存在する場合、二重結合によりすべての環全体において十分に非局在化したパイ電子系が形成され得ない（あるいは、該基は、本明細書で定義する「アリール」となり得る）。2つまたは2つより多くの環で構成されている場合、該環は、縮合された様式で一体に連結されたものであり得る。シクロアルケニル基は非置換であっても置換型であってもよい。

【0050】

40

本明細書で用いる場合、「シクロアルキニル」は、少なくとも1つの環内に1つまたは1つより多くの三重結合を含む単環式または多環式の炭化水素環系をいう。三重結合が1つより多く存在する場合、三重結合によりすべての環全体において十分に非局在化したパイ電子系が形成され得ない。2つまたは2つより多くの環で構成されている場合、該環は、縮合された様式で一体に接続されたものであり得る。シクロアルキニル基は非置換であっても置換型であってもよい。

【0051】

本明細書で用いる場合、「アリール」は、炭素環式（すべて炭素）の単環式または多環式の芳香族環系（例えば、縮合、橋絡またはスピロ環系（2つの炭素環式の環、例えば、1つまたは1つより多くのアリール環と1つまたは1つより多くのアリールまたは非アリ

50

ール環が化学結合を共有しているもの)など)であって、少なくとも1つの環全体において十分に非局在化したパイ電子系を有するものをいう。アリール基の炭素原子の数は種々であり得る。例えば、一部の実施形態では、アリール基は $C_6 \sim C_{14}$ アリール基、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール基、または C_6 アリール基であり得る。アリール基の例としては、限定されないが、ベンゼン、ナフタレン、およびアズレンが挙げられる。アリール基は置換されていても非置換であってもよい。

【0052】

本明細書で用いる場合、「ヘテロシクリル」は、少なくとも1個のヘテロ原子(例えば、O、N、S)を含む環系をいう。かかる系は不飽和であってもよく、いくつかの不飽和を含むものであってもよく、いくつかの芳香族部分を含むものであってもよく、すべて芳香族であってもよい。ヘテロシクリル基は非置換であっても置換型であってもよい。

10

【0053】

本明細書で用いる場合、「ヘテロアリール」は、単環式または多環式の芳香族環系(十分に非局在化したパイ電子系を有する少なくとも(a l e a s t)1つの環を有する環系)であって、1個または1個より多くのヘテロ原子、すなわち、炭素以外の元素、例えば限定されないが、窒素、酸素および硫黄と、少なくとも1つの芳香族環とを含むものをいう。ヘテロアリール基の環(単数または複数)内の原子の数は種々であり得る。例えば、一部の実施形態では、ヘテロアリール基は、環(1つもしくは複数)内に4~14個の原子、環(1つもしくは複数)内に5~10個の原子、または環(1つもしくは複数)内に5~6個の原子を含み得る。さらに、用語「ヘテロアリール」は、2つの環、例えば、少なくとも1つのアリール環と少なくとも1つのヘテロアリール環、または少なくとも2つのヘテロアリール環が少なくとも1つの化学結合を共有している縮合環系を包含する。ヘテロアリール環の例としては、限定されないが、フラン、フラザン、チオフエン、ベンゾチオフエン、フタラジン、ピロール、オキサゾール、ベンゾオキサゾール、1,2,3-オキサジアゾール、1,2,4-オキサジアゾール、チアゾール、1,2,3-チアジアゾール、1,2,4-チアジアゾール、ベンゾチアゾール、イミダゾール、ベンズイミダゾール、インドール、インダゾール、ピラゾール、ベンゾピラゾール、イソオキサゾール、ベンゾイソオキサゾール、イソチアゾール、トリアゾール、ベンゾトリアゾール、チアジアゾール、テトラゾール、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、プリン、プテリジン、キノリン、イソキノリン、キナゾリン、キノキサリン、シンノリン、およびトリアジンが挙げられる。ヘテロアリール基は置換されていても非置換であってもよい。

20

30

【0054】

本明細書で用いる場合、「ヘテロ脂環式」または「ヘテロアリシクリル」は、3-、4-、5-、6-、7-、8-、9-、10-、18員までの単環式、二環式、および三環式の環系であって、炭素原子1~5個のヘテロ原子と一体になって前記環系を構成しているものをいう。複素環は、任意選択で1つまたは1つより多くの不飽和結合を含むものであってもよいが、すべての環全体において十分に非局在化したパイ電子系が存在しないような様式で存在させる。ヘテロ原子は、酸素、硫黄および窒素から独立して選択される。複素環は、さらに、その定義にオキソ系およびチオ系(ラクタム、ラクトン、環状イミド、環状チオイミド、および環状カルバメートなど)が含まれるように1つまたは1つより多くのカルボニルまたはチオカルボニル官能部を含むものであってもよい。2つまたは2つより多くの環で構成されている場合、該環は、縮合された様式で一体に接続されたものであり得る。さらに、ヘテロ脂環式の窒素(あれば)は第4級化されていてもよい。ヘテロアリシクリルまたはヘテロ脂環式基は非置換であっても置換型であってもよい。かかる「ヘテロ脂環式」または「ヘテロアリシクリル」基の例としては、限定されないが、1,3-ジオキシン、1,3-ジオキサン、1,4-ジオキサン、1,2-ジオキソラン、1,3-ジオキソラン、1,4-ジオキソラン、1,3-オキサチアン、1,4-オキサチイン、1,3-オキサチオラン、1,3-ジチオール、1,3-ジチオラン、1,4-オキサチアン、テトラヒドロ-1,4-チアジン、2H-1,2-オキサジン、マレイミド、スクシンイミド、バルビツール酸、チオバルビツール酸、ジオキソピペラジン、ヒダン

40

50

トイン、ジヒドロウラシル、トリオキサン、ヘキサヒドロ - 1 , 3 , 5 - トリアジン、イミダゾリン、イミダゾリジン、イソオキサゾリン、イソオキサゾリジン、オキサゾリン、オキサゾリジン、オキサゾリジノン、チアゾリン、チアゾリジン、モルホリン、オキシラン、ピペリジン N - オキシド、ピペリジン、ピペラジン、ピロリジン、ピロリドン、ピロリジオン、4 - ピペリドン、ピラゾリン、ピラゾリジン、2 - オキソピロリジン、テトラヒドロピラン、4 H - ピラン、テトラヒドロチオピラン、チアモルホリン、チアモルホリンスルホキシド、チアモルホリンスルホン、およびそのベンゾ縮合類縁体（例えば、ベンズイミダゾリジノン、テトラヒドロキノリン、3 , 4 - メチレンジオキシフェニル）が挙げられる。

【 0 0 5 5 】

本明細書で用いる場合、「アラルキル」および「アリール（アルキル）」は、置換基として低級アルキレン基を介して連結されるアリール基をいう。アラルキルの低級アルキレンおよびアリール基は置換されていても非置換であってもよい。例としては、限定されないが、ベンジル、2 - フェニルアルキル、3 - フェニルアルキル、およびナフチルアルキルが挙げられる。

【 0 0 5 6 】

本明細書で用いる場合、「ヘテロアラルキル」および「ヘテロアリール（アルキル）」は、置換基として低級アルキレン基を介して連結されるヘテロアリール基をいう。ヘテロアラルキルの低級アルキレンおよびヘテロアリール基は置換されていても非置換であってもよい。例としては、限定されないが、2 - チエニルアルキル、3 - チエニルアルキル、フリルアルキル、チエニルアルキル、ピロリルアルキル、ピリジルアルキル、イソオキサゾリルアルキル、およびイミダゾリルアルキル、ならびにそのベンゾ縮合類縁体が挙げられる。

【 0 0 5 7 】

「（ヘテロアリシクリル）アルキル」は、置換基として低級アルキレン基を介して連結される複素環式またはヘテロアリシクリル基である。（ヘテロアリシクリル）アルキルの低級アルキレンおよび複素環式またはヘテロシクリルは置換されていても非置換であってもよい。例としては、限定されないが、テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イル）メチル、（ピペリジン - 4 - イル）エチル、（ピペリジン - 4 - イル）プロピル、（テトラヒドロ - 2 H - チオピラン - 4 - イル）メチル、および（1 , 3 - チアジナン - 4 - イル）メチルが挙げられる。

【 0 0 5 8 】

本明細書で用いる場合、「アルコキシ」は式 - OR をいい、式中、R は、上記に定義した（is defined as above）アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニルまたはシクロアルキニルである。アルコキシの非限定的な列挙はメトキシ、エトキシ、n - プロポキシ、1 - メチルエトキシ（イソプロポキシ）、n - ブトキシ、イソ - ブトキシ、sec - ブトキシ、および tert - ブトキシである。アルコキシは置換されていても非置換であってもよい。

【 0 0 5 9 】

本明細書で用いる場合、「ヒドロキシアルキル」は、1 個または 1 個より多くの水素原子がヒドロキシ基で置き換えられているアルキル基をいう。例示的なヒドロキシアルキル基としては、限定されないが、2 - ヒドロキシエチル、3 - ヒドロキシプロピル、2 - ヒドロキシプロピル、および 2 , 2 - ジヒドロキシエチルが挙げられる。ヒドロキシアルキルは置換されていても非置換であってもよい。

【 0 0 6 0 】

本明細書で用いる場合、「アルキルアミノ」は、1 個または 1 個より多くの水素原子がアミノ基で置き換えられているアルキル基をいう。例示的なアルキルアミノ基としては、限定されないが、アミノメチル、2 - アミノエチル、3 - アミノエチルが挙げられる。アルキルアミノは置換されていても非置換であってもよい。

【 0 0 6 1 】

本明細書で用いる場合、「アルキルアミド」は、1個または1個より多くの水素原子がC - アミド基またはN - アミド基で置き換えられているアルキル基をいう。アルキルアミドは置換されていても非置換であってもよい。

【0062】

本明細書で用いる場合、「アルキルチオ」はRS - をいい、式中、Rはアルキルである。アルキルチオは置換されていても非置換であってもよい。

【0063】

本明細書で用いる場合、「C - アミド」基は「 $-C(=O)N(R_aR_b)$ 」基をいい、式中、 R_a および R_b は独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアリシクリル、アラルキル、または(ヘテロアリシクリル)アルキルであり得る。C - アミドは置換されていても非置換であってもよい。

10

【0064】

本明細書で用いる場合、「N - アミド」基は「 $RC(=O)N(R_a)-$ 」基をいい、式中、Rおよび R_a は独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアリシクリル、アラルキル、または(ヘテロアリシクリル)アルキルであり得る。N - アミドは置換されていても非置換であってもよい。

【0065】

用語「ハロゲン原子」、「ハロゲン」または「ハロ」は、本明細書で用いる場合、元素の周期表の第7列の放射安定性の原子のいずれか1つ、例えば、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素を意味する。

20

【0066】

用語「アミン」は、本明細書で用いる場合、 $-NH_2$ 基をいい、ここで、1個または1個より多くの水素がR基で任意選択的に置換されていてもよい。Rは独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアリシクリル、アラルキル、または(ヘテロアリシクリル)アルキルであり得る。

【0067】

用語「アルデヒド」は、本明細書で用いる場合、 $-R_c-C(O)H$ 基をいい、式中、 R_c は存在していなくてもよく、またはアルキレン、アルケニレン、アルキニレン、シクロアルキレン、シクロアルケニレン、シクロアルキニレン、アリーレン、ヘテロアリーレン、ヘテロアリシクリレン、アラルキレン、または(ヘテロアリシクリル)アルキレンから独立して選択され得る。

30

【0068】

用語「活性型エステル」は、本明細書で用いる場合、求核試薬と自発的に反応するエステル、例えば、NHSエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、またはニトロフェニルエステルをいう。

【0069】

用語「ナイトレン」は、本明細書で用いる場合、カルベンの窒素類縁体であって、該窒素原子が6個の価電子により非荷電になっているものをいう。

40

【0070】

用語「アミノ」は、本明細書で用いる場合、 $-NH_2$ 基をいう。

【0071】

用語「ヒドロキシ」は、本明細書で用いる場合、 $-OH$ 基をいう。

【0072】

用語「シアノ」基は、本明細書で用いる場合、「 $-CN$ 」基をいう。

【0073】

用語「アジド」は、本明細書で用いる場合、 $-N_3$ 基をいう。

【0074】

50

用語「チオール」は、本明細書で用いる場合、 $-SH$ 基をいう。

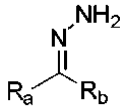
【0075】

用語「ヒドラジニル」は、本明細書で用いる場合、 $-NHNH_2$ 基をいう。

【0076】

用語「ヒドラゾニル」は、本明細書で用いる場合、

【化2】



10

の基をいう。

【0077】

用語「ホルミル」は、本明細書で用いる場合、 $-C(O)H$ 基をいう。

【0078】

用語「グリシジル」または「グリシジルエーテル」は、本明細書で用いる場合、

【化3】



をいう。

20

【0079】

用語「エポキシ」は、本明細書で用いる場合、

【化4】



をいう。

【0080】

用語「カルボン酸」は、本明細書で用いる場合、 $-C(O)OH$ をいう。

【0081】

用語「チオシアネート」は、本明細書で用いる場合、 $-S-C\equiv N$ 基をいう。

【0082】

用語「オキシ-アミン」は、本明細書で用いる場合、 $-O-NH_2$ 基をいい、ここで、 $-NH_2$ の1個または1個より多くの水素がR基で任意選択的に置換されていてもよい。Rは独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロアリシクリル、アラルキル、または(ヘテロアリシクリル)アルキルであり得る。

【0083】

本明細書で用いる場合、接頭辞「光」または「光-」は、光または電磁放射線に関することを意味する。この用語には、電磁スペクトルの全部または一部、例えば限定されないが、該スペクトルの電波、マイクロ波、赤外、可視、紫外、X-線またはγ線部分として一般的に知られている範囲の1つまたは1つより多くが包含され得る。該スペクトルの該部分は、表面の金属領域(本明細書に示した金属など)によって遮断されるものであってもよい。あるいはまたさらに、該スペクトルの該部分は、表面の格子間領域、例えば、ガラス、プラスチック、シリカ、または本明細書に示した他の材料製の領域を透過するものであってもよい。特定の実施形態では、金属を透過し得る放射線が使用され得る。あるいはまたさらに、ガラス、プラスチック、シリカ、または本明細書に示した他の材料によってマスクされる放射線が使用され得る。

40

【0084】

本明細書で用いる場合、用語「反応性部位」は、本明細書に記載のポリマーコーティン

50

グ上の、化学反応または分子相互作用による１個または１個より多くの分子との結合に使用され得る部位を意味する。かかる結合は、共有結合によるものであってもよく、他の結合または相互作用によるものであってもよい。

【００８５】

本明細書で用いる場合、用語「残留表面割合」は、P5/P7表面プライマーを染色するためにTET-qcを用いて測定された強度を示すものであり得る。P5およびP7プライマーは、Illumina Inc.により販売されている市販のフローセルの表面に、HiSeq、MiSeqおよびGenome Analyzerの基本型での配列決定のために使用されている。そのプライマー配列は米国特許出願公開公報第2011/0059865号A1（これは引用により本明細書に組み込まれる）に記載されている。TETは、P5/P7プライマーに対する相補配列を有する色素標識オリゴヌクレオチドである。TETは、表面上のP5/P7プライマーにハイブリダイズされ（hybridize）得；過剰のTETは洗い流すことができ、結合された色素の濃度は、Typhoon Scanner（General Electric）などのスキャン装置を用いて蛍光検出によって測定され得る。

10

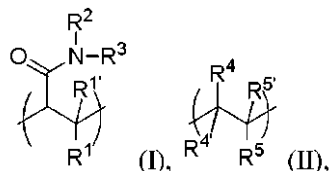
ポリマーコート表面を有する基材組成物

【００８６】

本明細書に記載の組成物の第１の態様は、共有結合された状態でポリマーコーティングを有する表面を含む基材に関する。好ましい一実施形態では、ポリマーがPAZAMを含む。一部の実施形態では、ポリマーコーティングが式（I）の反復単位と式（II）の反復単位：

20

【化５】



（式中：R¹およびR^{1'}は各々、独立して、水素、ハロ、アルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、またはその任意選択的に置換されている変形型から選択され；

30

R²およびR³は各々、独立して、水素、アルキル、アルキルアミノ、アルキルアミド、アルキルチオール、アリール、またはその任意選択的に置換されている変形型から選択され；R⁴、R^{4'}、R⁵およびR^{5'}は各々、独立して、H、R⁶、OR⁶、-C(OR⁶)OR⁶、-C(OR⁶)R⁶、-OC(OR⁶)R⁶、-C(OR⁶)NR⁷R⁸、または-NR⁷R⁸から選択され；

R⁶は独立して、H、OH、アルキル、シクロアルキル、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、またはその任意選択的に置換されている変形型から選択され；

R⁷およびR⁸は各々、独立してHまたはアルキルから選択されるか、あるいはR⁷とR⁸が、これらが結合している原子（１個または複数）と一体に連接されて複素環を形成している）

40

を含む。

【００８７】

かかる組成物の一部の実施形態では、R²がHであり、R³が、任意選択的に置換されているアルキルである。

【００８８】

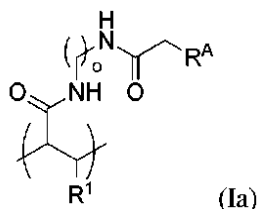
かかる組成物のなおさらなる実施形態では、R³が、N-アミド基で置換されているアルキルである。

【００８９】

本明細書に記載の組成物の一部の実施形態では、式（I）の反復単位が式（Ia）：

50

【化 6】



(Ia)

(式中、R¹はHまたはアルキルであり；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の整数である；ただし、R¹がHであり、R^Aがハロである場合、R^Aはブロモ基になり得ないものとする)

で表されるものでもある。

10

【0090】

一部のかかる実施形態では、oが5であり、R^Aがアジドである。

【0091】

さらなる実施形態では、R¹が水素である。

20

【0092】

なおさらなる実施形態では、R⁴が-C(O)NR⁷R⁸であり、式中のR⁷およびR⁸が各々、独立して、水素、アルキルまたはヒドロキシアルキルから選択される。

【0093】

かかるポリマー組成物の一部の実施形態では、R⁴が-C(O)NH₂、-C(O)NHCH₃または-C(O)N(CH₃)₂である。

【0094】

他の実施形態では、R⁴が-C(O)NH(CH₂)₂OHまたは-C(O)N(CH₃)(CH₂)₂OHである。

【0095】

さらに他の実施形態では、R⁴がNR⁷R⁸であり、式中のR⁷とR⁸が、これらが結合している原子と一体に接続されて、5員の複素環を形成している。

30

【0096】

5員の複素環を含む好ましい(proffered)実施形態では、該5員の複素環が、任意選択的に置換されているピロリジンである。

【0097】

また他の実施形態では、R⁴が-C(O)OR⁶であり、式中のR⁶が水素、アルキルまたはヒドロキシアルキルから選択される。

【0098】

好ましい一実施形態では、R⁶が水素である。

40

【0099】

別の好ましい実施形態では、R⁶がメチルである。

【0100】

また別の好ましい実施形態では、R⁶がヒドロキシエチルである。

【0101】

他の好ましい実施形態では、R⁴が水素である。

【0102】

さらに他の好ましい実施形態では、R⁴がアルキルである。

【0103】

また他の好ましい実施形態では、R⁴がメチルである。

50

【 0 1 0 4 】

一部の好ましい実施形態では、 $R^{5'}$ が水素である。

【 0 1 0 5 】

好ましいさらなる実施形態では、 $R^{5'}$ がアルキルである。

【 0 1 0 6 】

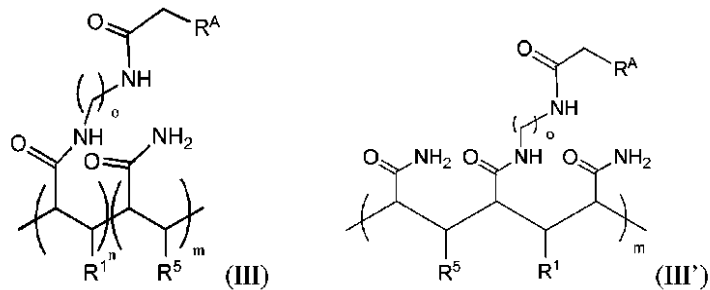
さらに好ましい実施形態では、 $R^{5'}$ がメチルである。

【 0 1 0 7 】

本明細書に記載のポリマーコート表面を含む基材のまた別の実施形態では、ポリマーコーティングが、式 (I I I) または (I I I ') :

【 化 7 】

10



(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 - (CH_2) - は任意選択的に置換されていてよく； 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 ~ 50 , 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)

20

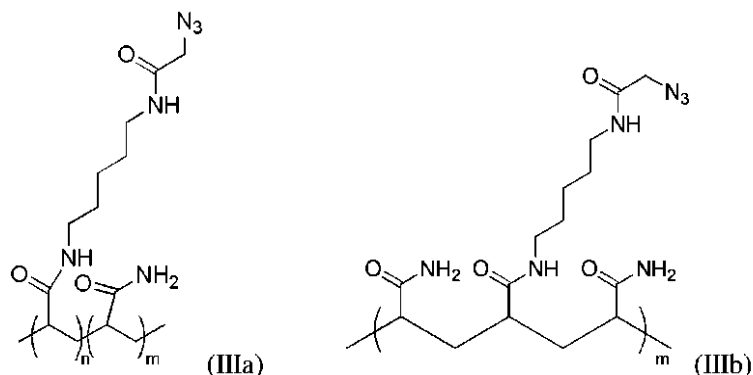
のポリマーを含む。一部の実施形態では、 o が 5 である。

【 0 1 0 8 】

一実施形態では、式 (I I I) または (I I I ') のポリマーが、式 (I I I a) または (I I I b) :

30

【 化 8 】



40

(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。

【 0 1 0 9 】

一部のかかる実施形態では、ポリマーコーティングが該表面に結合された一連の官能基に共有結合され、該官能基が、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、グリシジリエーテル、アミン、マレイミドまたはオルト位にホスフィン置換基を有するベンゾイルエステルから選択される。

50

【 0 1 1 0 】

かかる組成物の好ましい一実施形態では、該官能基がアルキンを含み、式 (I) の反復単位が式 (I a) で表されるものでもあり、式中の R^A がアジドである。

【 0 1 1 1 】

かかる組成物の別の好ましい実施形態では、該官能基がナイトレンを含み、式 (I) の反復単位が式 (I a) で表されるものでもあり、式中の R^A がアジドである。

【 0 1 1 2 】

かかる組成物のまた別の好ましい実施形態では、該官能基が活性型エステルを含み、式 (I) の反復単位が式 (I a) で表されるものでもあり、式中の R^A がアミンである。

【 0 1 1 3 】

かかる組成物のさらに別の好ましい実施形態では、該官能基がヒドラジンを含み、式 (I) の反復単位が式 (I a) で表されるものでもあり、式中の R^A がホルミルである。

【 0 1 1 4 】

かかる組成物のまた別の好ましい実施形態では、該官能基がアルデヒド基を含み、式 (I) の反復単位が式 (I a) で表されるものでもあり、式中の R^A がアミン、オキシ - アミン、またはヒドロジニルである。

【 0 1 1 5 】

かかる組成物のさらに別の好ましい実施形態では、該官能基がグリシジルエーテルを含み、式 (I) の反復単位が式 (I a) で表されるものでもあり、式中の R^A がアミンである。

【 0 1 1 6 】

かかる組成物のまた別の好ましい実施形態では、該官能基がアミンを含み、式 (I) の反復単位が式 (I a) で表されるものでもあり、式中の R^A がアジドである。

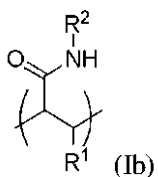
【 0 1 1 7 】

かかる組成物のまた別の好ましい実施形態では、該官能基がマレイミドを含み、式 (I) の反復単位が式 (I a) で表されるものでもあり、式中の R^A がチオールである。

【 0 1 1 8 】

本明細書に記載のポリマーコート表面を含む基材のまた別の実施形態では、式 (I) の反復単位が、式 (I b) :

【 化 9 】



(式中、 R^2 は、任意選択的に置換されているアリールである)
で表されるものでもある。

【 0 1 1 9 】

一部のかかる実施形態では、式 (I b) の R^2 が、1 個または1 個より多くのハロゲンで任意選択的に置換されているフェニルアジドである。具体的な一実施形態では、 R^2 がパーフルオロフェニルアジドである。

【 0 1 2 0 】

一部の実施形態では、式 (I b) の R^1 が水素である。

【 0 1 2 1 】

さらなる実施形態では、式 (I b) の R^4 が $-C(O)NR^7R^8$ である。具体的な一実施形態では、 R^4 が $-C(O)NH_2$ である。

【 0 1 2 2 】

一部の実施形態では、式 (I b) の $R^{4'}$ が水素である。

【 0 1 2 3 】

一部の実施形態では、式 (I b) の R^5 がアルキルである。

【0124】

他の実施形態では、式 (I b) の R^5 が水素である。

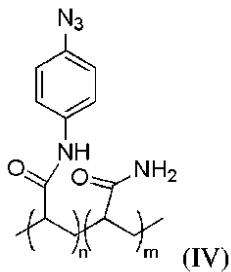
【0125】

一部の実施形態では、式 (I b) の $R^{5'}$ が水素である。

【0126】

本明細書に記載のポリマーコート表面を含む基材の別の実施形態では、ポリマーコーティングが、式 (I V) :

【化10】



10

(式中、 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)

のポリマーを含む。具体的な一実施形態では、式 (I V) のフェニル基が、1 つまたは 1 つより多くのフルオロ基で任意選択的に置換されている。

20

【0127】

本明細書に記載のポリマーコーティングは、さまざまな基材に共有結合され得る。反応性基、例えば限定されないが、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、マレイミドで官能化され得る本質的に任意の基材材料が使用され得る。また、アクリルアミド、エノンまたはアクリレートも基材材料として使用され得る。基材は 1 種類の材料を含んでいてもよく、複数の異なる材料を含んでいてもよい。基材は複合材または積層体であってもよい。一部の実施形態では、基材は、ガラスを含む少なくとも 1 つの表面を有する。他の実施形態では、基材は、金属を含む少なくとも 1 つの表面を有する。一部のかかる実施形態では、金属が金である。一部の実施形態では、基材は、金属酸化物を含む少なくとも 1 つの表面を有する。一実施形態では、該表面は、酸化タンタルを含む。他の基材材料としては、限定されないが、プラスチック、シリコン、二酸化ケイ素、窒化ケイ素、熔融シリカ、ヒ化ガリウム、リン化インジウム、アルミニウム、セラミック、ポリイミド、水晶、樹脂、ポリマーおよびコポリマーが挙げられ得る。基剤は平坦、円形、またはでこぼこ状であり得る。

30

【0128】

本明細書に記載の組成物の一部の実施形態では、基材の表面が、ポリマーコート領域およびポリマーでコートされていない不活性領域の両方を含む。ポリマーコート領域は反応性部位を含み得、したがって、化学結合または他の分子相互作用による分子との結合に使用され得る。一部の実施形態では、ポリマーコート領域と不活性領域が、パターンまたは格子が形成されるように交互であり得る。かかるパターンは、一次元であっても二次元であってもよい。一部の実施形態では、不活性領域が、ガラス領域、金属領域、マスク領域および格子間領域からなる群より選択され得る。好ましい一実施形態では、該表面がガラス領域を含む。別の好ましい実施形態では、該表面が金属領域を含む。さらに別の好ましい実施形態では、該表面がマスク領域を含む。また別の好ましい実施形態では、該表面が格子間領域を含む。本明細書に記載の組成物の一部の実施形態では、基材はビーズであってもよい。好ましい一実施形態では、ビーズの表面が官能化される。官能化は、ビーズをウェル内に導入する前に行なっても後に行なってもよい。一実施形態では、ウェルはフローセル表面内に予め画定されている。本開示のポリマーでコートされ得る、または本明細書に示した組成物もしくは方法に別の様式で使用され得る例示的な基材材料は、米国特許

40

50

出願第 13 / 492 , 661 号および同第 13 / 661 , 524 号（これらは各々、引用により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0129】

本明細書に記載の組成物の第 2 の態様は、そこに共有結合されたポリマーコーティングを有する表面を含む 1 つまたは 1 つより多くの基材を備えたフローセルに関する。一部の実施形態では、本明細書に記載のフローセルは、上記の基材を 1 つまたは 1 つより多く備えたものである。好ましい一実施形態では、ポリマーが P A Z A M を含む。

【0130】

一部の実施形態では、フローセルが、さらに、基材の表面にポリマーコーティングによって結合されたポリヌクレオチドを備える。好ましい実施形態では、ポリヌクレオチドがフローセル内にポリヌクレオチドクラスターで存在しており、該ポリヌクレオチドクラスターのポリヌクレオチドがフローセルの表面にポリマーコーティングによって結合されている。かかる実施形態では、ポリヌクレオチドが結合しているフローセル本体の表面を基材とみなす。他の実施形態では、ポリマーコート表面を有する別個の基材をフローセルの本体に挿入する。好ましい実施形態では、フローセルは、複数のレーンまたは複数のセクターに分かれたフローチャンバであり、該複数のレーンまたは該複数のセクターの 1 つまたは 1 つより多くが、共有結合された本明細書に記載のポリマーコーティングでコートされた表面を含んでいる。本明細書に記載のフローセルの一部の実施形態では、単一のポリヌクレオチドクラスター内の結合されたポリヌクレオチドが同じまたは同様のヌクレオチド配列を有する。本明細書に記載のフローセルの一部の実施形態では、異なるポリヌクレオチドクラスターの結合されたポリヌクレオチドが異なるまたは非類似のヌクレオチド配列を有する。本明細書に示した方法または組成物に使用され得る例示的なフローセルおよびフローセルの製造のための基材としては、限定されないが、I l l u m i n a , I n c . (S a n D i e g o , C A) から市販されているもの、または U S 2010 / 0111768 A1 もしくは U S 2012 / 0270305（これらは各々、引用により本明細書に組み込まれる）に記載されたものが挙げられる。

共有結合されたポリマーを有する基材のコーティング方法

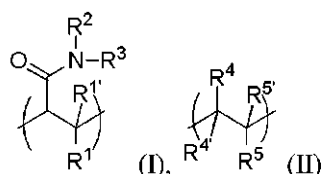
【0131】

本明細書に開示する本発明の方法の第 1 の態様は、基材の表面に固定化されたポリマーコーティングの調製方法に関する。一部の実施形態では、該方法は、ポリマーを基材の表面と接触させること、ここで、該表面は複数の官能基を備えており、それにより該表面上にポリマーコーティングの層を形成することを含み、ここで、該ポリマーコーティングは該表面上の該官能基に共有結合される。一部の実施形態では、該ポリマーは、重合性物質を基材の表面上で重合させることにより、該基材の表面上にインサイチューで形成される。他の一部の実施形態では、基材の表面と接触させる前にポリマーを予備形成させる。好ましい一実施形態では、ポリマーが P A Z A M を含む。

【0132】

ポリマーコーティングを基材表面に固定化する方法の一部の実施形態では、ポリマーコーティングが式 (I) の反復単位と式 (I I) の反復単位：

【化 11】



（式中： R^1 および $R^{1'}$ は各々、独立して、水素、ハロ、アルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、またはその任意選択的に置換されている変形型から選択され；

R^2 および R^3 は各々、独立して、水素、アルキル、アルキルアミノ、アルキルアミド、アルキルチオール、アリール、またはその任意選択的に置換されている変形型から選択

され； R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 および $R^{5'}$ は各々、独立して、 H 、 R^6 、 OR^6 、 $-C(O)OR^6$ 、 $-C(O)R^6$ 、 $-OC(O)R^6$ 、 $-C(O)NR^7R^8$ 、または $-NR^7R^8$ から選択され；

R^6 は独立して、 H 、 OH 、アルキル、シクロアルキル、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、またはその任意選択的に置換されている変形型から選択され；

R^7 および R^8 は各々、独立して H またはアルキルから選択されるか、あるいは R^7 と R^8 が、これらが結合している原子（１個または複数）と一体に連接されて複素環を形成している）

を含む。

10

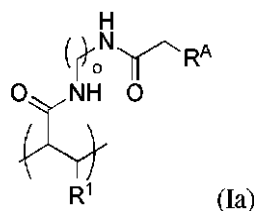
【0133】

一部の実施形態では、 R^2 が H であり、 R^3 が任意選択的に置換されているアルキルである。一実施形態では、 R^3 が N -アミド基で置換されているアルキルである。

【0134】

基材表面をポリマーでコーティングする方法の他の実施形態では、式（Ⅰ）の反復単位が式（Ⅰa）：

【化12】



20

（式中、 R^1 は H またはアルキルであり； 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、アジリジン、トリアゾリン、エポキシ、およびチオールからなる群より選択され；各 $-(CH_2)-$ は任意選択的に置換されていてもよく； o は1～50の整数である；ただし、 R^1 が H であり、 R^A がハロである場合、 R^A はプロモ基になり得ないものとする）

30

で表されるものでもある。

【0135】

かかる方法の一実施形態では、 o が5であり、 R^A がアジドである。

【0136】

かかる方法の別の実施形態では、 R^1 が水素である。

【0137】

かかる方法のさらに別の実施形態では、 R^4 が $-C(O)NR^7R^8$ であり、式中の R^7 および R^8 が各々、独立して、水素、アルキルまたはヒドロキシアルキルから選択される。かかる方法の具体的な一実施形態では、 R^4 が $-C(O)NH_2$ である。

40

【0138】

かかる方法の別の実施形態では、 $R^{4'}$ が水素である。

【0139】

かかる方法のさらなる一実施形態では、 $R^{4'}$ と $R^{5'}$ の両方が水素である。

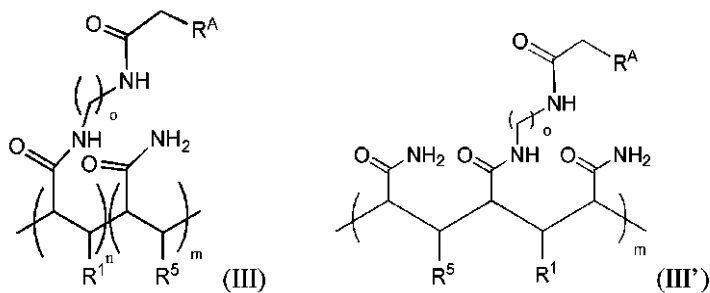
【0140】

かかる方法のまた別の実施形態では、 $R^{4'}$ と $R^{5'}$ の少なくとも一方がアルキル、例えばメチル基である。

【0141】

一部の実施形態では、ポリマーコーティングが、式（ⅠⅠⅠ）または（ⅠⅠⅠ'）：

【化 1 3】

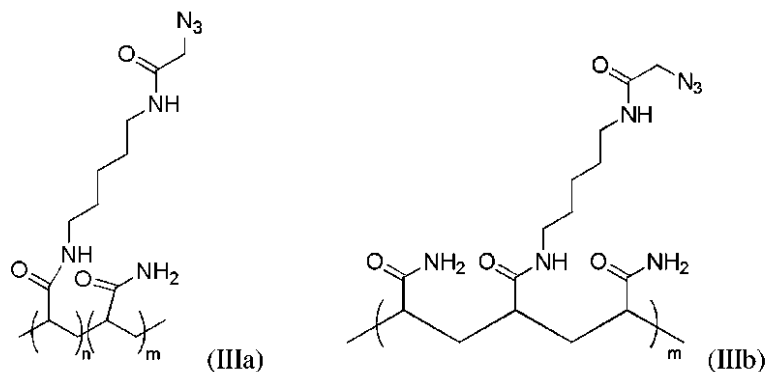


(式中、 R^1 は、H またはアルキルから選択され； R^A は、水素、アミン、任意選択的に置換されているアルケン、任意選択的に置換されているアルキン、オキソ - アミン、アジド、ホルミル、ハロ、ヒドロキシ、ヒドラジニル、ヒドラゾニル、塩化シアヌル、チオシアネート、カルボン酸、グリシジル、活性型エステル、アジリジン、トリアゾリン、エポキシ、およびチオールからなる群より選択され；各 $-(CH_2)_o$ は任意選択的に置換されていてよく； o は、1 ~ 50 の範囲の整数であり； R^5 は、H またはアルキルから選択され； n は、1 ~ 50, 000 の範囲の整数であり； m は、1 ~ 50, 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) のポリマーを含む。一部の実施形態では、 o が 5 である。

【0142】

一実施形態では、式 (III) または (III') のポリマーが、式 (IIIa) または (IIIb) :

【化 1 4】



(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。

【0143】

かかる方法の一部の実施形態では、基材の表面上の官能基が光活性化性アジドを含む。一部の実施形態では、光活性化性アジドが、任意選択的に置換されているフェニルアジド基である。このような実施形態の一部のものでは、フェニルアジドが、基材の表面上のアミン基を N - ヒドロキシスルホスクシンイミジル - 4 - アジドベンゾエート (スルホ - H S A B) と反応させることにより調製される。

【0144】

上記の方法の一部の実施形態では、フェニルアジドを、ポリマーを基材の表面と接触させる前に光活性化させる。かかる方法の好ましい一実施形態では、官能基の光活性化によりナイトレンが生じる。かかる方法の別の好ましい実施形態では、ポリマーコーティングがナイトレン基に光活性化によって共有結合される。

【0145】

ポリマーコーティングを基材の表面に共有結合させる上記の方法の一部の実施形態では、基材の表面上の官能基がアルキン基を含む。

【 0 1 4 6 】

ポリマーコーティングを基材の表面に共有結合させる上記の方法の一部の実施形態では、ポリマーコーティングが該官能基に触媒の存在下で共有結合される。具体的な一実施形態では、触媒が銅触媒である。一部の実施形態では、ポリマーコーティングがアルキン基に銅触媒の使用なしで共有結合される。

【 0 1 4 7 】

ポリマーコーティングを基材の表面に共有結合させる上記の方法の一部の実施形態では、基材の表面上の官能基がアルケン基を含む。一部の実施形態では、アルケン基が、該アミン官能化表面をアクリロイル基と反応させることにより調製される。一部の好ましい実施形態では、該アミン官能化表面が、表面を 3 - アミノプロピルトリメトキシシラン (A P T M S) で処理することにより調製される。さらに好ましい一部の実施形態では、アクリロイル基が、活性型アクリル酸エステル、アクリル酸、塩化アクリルまたは C O M U (C A S 番号 1 0 7 5 1 9 8 - 3 0 - 9) から選択され得る。一実施形態では、活性型アクリル酸エステルがアクリル酸 N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) エステルである。他の一部の実施形態では、アルケン基が、基材の表面を官能化シランと直接接触させることにより調製される。一部のさらなる実施形態では、官能化シランが、3 - アクリルアミドトリメトキシシランまたはメタクリルオキシプロピルトリメトキシシランから選択され得る。

10

【 0 1 4 8 】

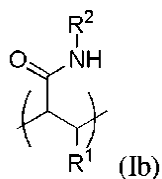
ポリマーコーティングを基材の表面に共有結合させる上記の方法の一部の実施形態では、ポリマーコーティングが該官能基に高温で共有結合される。好ましい一実施形態では、該高温が 6 0 ~ 9 0 の範囲の任意の温度である。

20

【 0 1 4 9 】

ポリマーコーティングを基材表面に固定化する方法の他の実施形態では、式 (I) の反復単位が、式 (I b) :

【 化 1 5 】



30

(式中、 R^2 は、任意選択的に置換されているアリールである)
で表されるものでもある。

【 0 1 5 0 】

かかる方法の一実施形態では、式 (I b) の R^2 が、1 個または 1 個より多くのハロゲンで任意選択的に置換されているフェニルアジドである。具体的な一実施形態では、 R^2 がパーフルオロフェニルアジドである。

【 0 1 5 1 】

基材表面をポリマーでコーティングする方法の別の実施形態では、式 (I b) の R^1 が水素である。

40

【 0 1 5 2 】

かかる方法の一部の実施形態では、式 (I b) の R^4 が $-C(O)NR^7R^8$ である。具体的な一実施形態では、 R^4 が $-C(O)NH_2$ である。

【 0 1 5 3 】

かかる方法の他の実施形態では、式 (I b) の R^5 が水素である。

【 0 1 5 4 】

かかる方法のさらに他の実施形態では、式 (I b) の R^4 ' と R^5 ' の両方が水素である。

【 0 1 5 5 】

50

かかる方法の一部の実施形態では、重合性物質が液状形態で適用される。

【0156】

ポリマーコーティングを基材表面に固定化する方法の一部の実施形態では、該複数の官能基が基材の表面上に、高分子材料の重合後に複数のポリマーコート領域と複数の不活性領域が形成されるように配列される。一部の実施形態では、不活性領域が、ガラス領域、金属領域、マスク領域および格子間領域からなる群より選択される。好ましい実施形態では、不活性領域がガラスを含む。一部の実施形態では、該複数のポリマーコート領域と該複数の不活性領域が該表面上に、パターンまたは格子が形成されるように配列される。かかるパターンまたは格子は基材の表面に対して一次元であっても二次元であってもよい。使用され得る例示的なパターン形成表面は米国特許出願第13/492,661号および同第13/661,524号（これらは各々、引用により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

10

【0157】

基材の表面に固定化されたポリマーコーティングを調製する上記の方法の一部の実施形態では、該表面の官能基に共有結合させる前に、ポリマーコーティングを水溶液に溶解させる。一部の実施形態では、基材がビーズである。

【0158】

本明細書に開示する本発明の方法の第2の態様は、ポリヌクレオチドのアレイの調製方法に関する。かかる実施形態では、該方法は、(a)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、本明細書に記載の基材のいずれか1つの表面上に存在するポリマーコーティング上の反応性部位、またはポリマーコーティングを基材の表面に固定化する方法のいずれか1つによって調製されるポリマーコーティング上の反応性部位と反応させる工程；(b)該ポリマーコーティングに結合された該複数の第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；および(c)該鋳型を第1のオリゴヌクレオチドと第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含み得る。一部の実施形態では、各鋳型が、3'末端に、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。上記の方法において、第2のオリゴヌクレオチドは任意選択的である。したがって、第2のオリゴヌクレオチドは、一部の実施形態では存在させる必要がない。存在させる場合、第2のオリゴヌクレオチドは、ポリマーコーティングに結合させてもよく、増幅工程中(surrounding)に溶液状で供給してもよい。

20

30

【0159】

ポリヌクレオチドのアレイを調製する上記の方法の一部の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングのアジド基と反応するアルキン基を含む。好ましい実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドと第2のオリゴヌクレオチドの両方がかかる基を含む。

【0160】

ポリヌクレオチドのアレイを調製する上記の方法の他の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングの塩化シアヌルと反応するアミン基を含む。好ましい実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドと第2のオリゴヌクレオチドの両方がかかる基を含む。

40

【0161】

ポリヌクレオチドのアレイを調製する上記の方法のさらに他の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングの活性型アミン基、例えば、ヒドラジニルまたはヒドラゾニル基と反応するアルデヒド基を含む。好ましい実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドと第2のオリゴヌクレオチドの両方がかかる基を含む。

【0162】

ポリヌクレオチドのアレイを調製する上記の方法のまた他の実施形態では、第1のオリ

50

ゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングのチオシアネートまたはカルボン酸基と反応するアミン基を含む。好ましい一実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドと第2のオリゴヌクレオチドの両方がかかる基を含む。

【0163】

ポリヌクレオチドのアレイを調製する上記の方法のさらなる実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングのグリシジル基と反応するアミン基を含む。好ましい一実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドと第2のオリゴヌクレオチドの両方がかかる基を含む。

【0164】

ポリヌクレオチドのアレイを調製する上記の方法のさらなる実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングのアミン基とジ-アルデヒドリンカーによって反応するアミン基を含む。好ましい一実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドと第2のオリゴヌクレオチドの両方がかかる基を含む。

【0165】

ポリヌクレオチドのアレイを調製する上記の方法のさらに他の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングの活性型エステルまたはエポキシ基と反応するアミン基を含む。好ましい一実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドと第2のオリゴヌクレオチドの両方がかかる基を含む。

【0166】

ポリヌクレオチドのアレイを調製する上記の方法のさらに他の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングのオキソ-アミン基と反応するアルデヒド基を含む。好ましい一実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドと第2のオリゴヌクレオチドの両方がかかる基を含む。

【0167】

ポリヌクレオチドのアレイを調製する上記の方法の好ましい一実施形態では、基材の表面上のポリマーコーティングが式(I I I a)または(I I I b)のポリマーを含む。

【0168】

本明細書に開示する本発明の方法の第3の態様は、1個または1個より多くのビーズの表面上に複数の官能基を形成すること；本明細書に記載のポリマーコーティングを該ビーズと接触させ、ポリマーコーティング層を該ビーズの表面上に形成すること、ここで、該ポリマーコーティングは該ビーズの表面上の該官能基に共有結合される；およびポリマーコートされた該ビーズを基材の表面に固着させることを含む、基材の表面の調製方法に関する。一実施形態では、基材がフローセルである。一実施形態では、ポリマーコーティングがP A Z A Mを含む。ポリマーコーティング層はビーズの全体を被覆しているか一部を被覆しているかのいずれかであり得る。一実施形態では、ビーズの表面上のポリマーコーティング層は約20 nmの厚さを有する。一部の実施形態では、ビーズは約1.2ミクロンまたは約1.2ミクロンより小さい直径を有する。他の一部の実施形態では、ビーズは約0.5ミクロンまたは約0.5ミクロンより小さい直径を有する。好ましい一実施形態では、基材の表面がパターン形成されている。しかしながら、大型のビーズ、例えば限定されないが、約10ミクロンもしくは約10ミクロンより小さい、5ミクロンもしくは5ミクロンより小さい、3ミクロンもしくは3ミクロンより小さい、または2ミクロンもしくは2ミクロンより小さい直径を有するものを使用してもよい。

【0169】

本明細書に記載の基材の表面を調製する方法の一部の実施形態では、ビーズの表面上の官能基がアルケンを含む。一部の実施形態では、アルケン基が、ビーズの該アミン官能化表面をアクリロイル基と反応させることにより調製される。一部の好ましい実施形態では、該アミン官能化表面は、表面を3-アミノプロピルトリメトキシシラン(A P T M S)で処理することにより調製される。さらに好ましい一部の実施形態では、アクリロイル基が、活性型アクリル酸エステルまたは塩化アクリルから選択され得る。一実施形態では、活性型アクリル酸エステルがアクリル酸N-ヒドロキシスクシンイミド(N H S)エステ

10

20

30

40

50

ルである。他の有用なカップリング剤としては、アクリル酸、COMU (CAS 番号 1075198-30-9)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)またはN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)が挙げられる。他の一部の実施形態では、アルケン基が、基材の表面を官能化シランと直接接触させることにより調製される。一部のさらなる実施形態では、官能化シランが、3-アクリルアミドトリメトキシシランまたはメタクリルオキシプロピルトリメトキシシランから選択され得る。一部の実施形態では、前処理したビーズを、ポリマーコーティングと接触させる前に重合抑制剤を含む溶液に曝露する。一部の実施形態では、重合抑制剤が、ブチル化ヒドロキシルトルエン(BHT)、ジエチルヒドロキシルアミン、または(2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-イル)オキシル(TEMPO)から選択される。一部の(som) 10
好ましい実施では、ポリマーコーティングがビーズの表面上のアルケン基に高温で共有結合される。好ましい一実施形態では、該高温が60 ~ 90 の範囲の任意の温度である。

【0170】

本明細書に記載の基材の表面を調製する方法の一部の実施形態では、ビーズの表面上の官能基が光活性化性アジドを含む。一部の実施形態では、光活性化性アジドが、任意選択的に置換されているフェニルアジド基である。このような実施形態の一部のものでは、フェニルアジドが、基材の表面上のアミン基をN-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート(スルホ-HSAB)と反応させることにより調製される。一部の 20
実施形態では、フェニルアジドを、ポリマーを基材の表面と接触させる前に光活性化させる。かかる方法の好ましい一実施形態では、官能基の光活性化によりナイトレンが生じる。かかる方法の別の好ましい実施形態では、ポリマーコーティングが該官能基に光活性化によって共有結合される。

【0171】

本明細書に記載の基材の表面を調製する方法の一部の実施形態では、ビーズの表面上の官能基がアルキン基を含む。一部の実施形態では、ポリマーコーティングが該官能基に触媒の存在下で共有結合される。具体的な一実施形態では、触媒が銅触媒である。一部の 30
実施形態では、ポリマーコーティングがアルキン基に銅触媒の使用なしで共有結合される。

【0172】

本明細書に記載の基材の表面を調製する方法の一部の実施形態では、ポリマーコートビーズは基材の表面に、該基材の表面上の開口ウェル内に負荷することにより固着される。ビーズおよびウェルは、各ウェル内に存在するビーズがわずか1個になる寸法を有するものであり得る。あるいはまた、相対寸法は、ウェル1つあたりのビーズが多数になるものであってもよい。一部の好ましい実施形態では、ポリマーコートビーズは基材の表面に、該ポリマーコーティングの官能基を該基材の表面上の官能基と反応させることにより固着 30
される。該表面の官能基は、表面の特定の特徴、例えば、ウェルまたはパッドに存在させてもよい。あるいはまた、基材の官能基が平坦な表面全域に広がるようにしてもよい。本明細書に示した方法および組成物を用いてコートされ得るかかる表面を調製するための例示的な方法は、米国特許出願第13/492,661号および同第13/661,524号(これらは各々、引用により本明細書に組み込まれる)に記載されている。一実施形態 40
では、ポリマーコーティングの官能基がアミンを含み、基材の表面上の官能基がN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルを含む。別の実施形態では、ポリマーコーティングの官能基がアジドを含み、基材の表面上の官能基がアルキンを含む。また別の実施形態では、ポリマーコーティングの官能基がチオールを含み、基材の表面上の官能基がマレイミドを含む。

【0173】

本明細書に記載の基材の表面を調製する方法の一部の実施形態では、該方法は、さらに、ポリマーコートビーズを、該ビーズを基材の表面に負荷する前に洗浄して過剰の未結合ポリマーコーティングを除去することを含む。一部の実施形態では、ビーズと接触させる前にポリマーコーティングを溶液に溶解させる。一実施形態では、該溶液が水溶液である 50

。

【 0 1 7 4 】

本明細書に記載の基材の表面を調製する方法の一部の実施形態では、該方法は、さらに、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、ビーズのポリマーコーティング上の反応性部位と反応させること；該ポリマーコーティングに結合された該複数の第 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こと、鋳型の各々は、3' 末端に、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；ならびに該鋳型を第 1 のオリゴヌクレオチドと第 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ことを含む。

10

【 0 1 7 5 】

上記の方法の一部の実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチドまたは第 2 のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングのアジド基と反応するアルキン基を含む。好ましい一実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチドと第 2 のオリゴヌクレオチドの両方がかかる基を含む。

【 0 1 7 6 】

上記の方法の他の実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチドまたは第 2 のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングの塩化シアヌルと反応するアミン基を含む。好ましい一実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチドと第 2 のオリゴヌクレオチドの両方がかかる基を含む。

20

【 0 1 7 7 】

上記の方法のさらに他の実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチドまたは第 2 のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングの活性型アミン基、例えば、ヒドラジニルまたはヒドラゾニル基と反応するアルデヒド基を含む。好ましい一実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチドと第 2 のオリゴヌクレオチドの両方がかかる基を含む。

【 0 1 7 8 】

上記の方法のまた他の実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチドまたは第 2 のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングのチオシアネートまたはカルボン酸基と反応するアミン基を含む。好ましい一実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチドと第 2 のオリゴヌクレオチドの両方がかかる基を含む。

30

【 0 1 7 9 】

上記の方法のさらなる実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチドまたは第 2 のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングのグリシジル基と反応するアミン基を含む。好ましい一実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチドと第 2 のオリゴヌクレオチドの両方がかかる基を含む。

【 0 1 8 0 】

上記の方法のさらなる実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチドまたは第 2 のオリゴヌクレオチドが、ジ - アルデヒドリンカーによって反応するポリマーコーティングのアミン基を含む。好ましい一実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチドと第 2 のオリゴヌクレオチドの両方がかかる基を含む。

40

【 0 1 8 1 】

上記の方法のさらに他の実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチドまたは第 2 のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングの活性型エステルまたはエポキシ基と反応するアミン基を含む。好ましい一実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチドと第 2 のオリゴヌクレオチドの両方がかかる基を含む。

【 0 1 8 2 】

上記の方法のさらに他の実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチドまたは第 2 のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングのチオール基と反応するマレイミド基を含む。好ましい一実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチドと第 2 のオリゴヌクレオチドの両方がかかる基を含む。

50

【0183】

上記の方法のさらに他の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングのアルケン基とオレフィンのクロスメタセシスによって反応するアルケン基を含む。好ましい一実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドと第2のオリゴヌクレオチドの両方がかかる基を含む。

【0184】

上記の方法のさらに他の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドが、ポリマーコーティングのオキシ-アミン基と反応するアルデヒド基を含む。好ましい一実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドと第2のオリゴヌクレオチドの両方がかかる基を含む。

10

【0185】

本明細書に記載の基材の表面を調製する方法の一部の実施形態では、該方法は、さらに、ポリマーコートピースを光学画像形成剤で染色する工程を含む。一部の実施形態では、光学画像形成剤が、DyLight 488ホスフィン、DyLight 550ホスフィン(phosphine)、DyLight 650ホスフィン(どちらもThermoFisher Scientific製)、ならびに歪みアルキン色素(Click Chemistry Tools, Inc.製のDBCO系色素)例えば: DBCO-Fluor 488、DBCO-Fluor 525、DBCO-Fluor 545、DBCO-Fluor 568、DBCO-Fluor 585、およびDBCO-SETA 650からなる群より選択される。一実施形態では、光学画像形成剤がDyLight 488ホスフィンである。

20

【0186】

本明細書に記載の基材の表面を調製する方法の一部の実施形態では、基材が、シリコン基材、プラスチック基材、または添加剤を含浸させたプラスチック基材から選択され得る。一部のさらなる実施形態では、プラスチック基材にSiO₂、TiO₂、またはカーボンブラックが含浸され得る。

【0187】

本明細書に示す方法には、任意のさまざまな増幅手法が使用され得る。使用され得る例示的な手法としては、限定されないが、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)、ローリングサークル増幅(RCA)、多置換増幅(MDA)、またはランダムプライム増幅(RPA)が挙げられる。特定の実施形態では、増幅に使用されるプライマーの1種類または1種類より多くがポリマーコーティングに結合され得る。PCRの実施形態では、増幅に使用されるプライマーの一方または両方がポリマーコーティングに結合され得る。2種類の種の結合プライマーを用いる形式は、二本鎖アンプリコンが、コピーされた鋳型配列にフランキンクする2種類の結合プライマー間に橋様構造を形成するため、多くの場合、ブリッジ増幅と称される。ブリッジ増幅に使用され得る例示的な試薬および条件は、例えば、米国特許第5,641,658号;米国特許出願公開公報第2002/0055100号;米国特許第7,115,400号;米国特許出願公開公報第2004/0096853号;米国特許出願公開公報第2004/0002090号;米国特許出願公開公報第2007/0128624号;および米国特許出願公開公報第2008/0009420号(これらは各々、引用により本明細書に組み込まれる)に記載されている。また、PCR増幅を、増幅プライマーの一方をポリマーコーティングに結合させ、第2のプライマーを溶液状にして行なってもよい。一方が結合プライマーと可溶性プライマーの組合せを使用する例示的な形式は、例えば、Dressmanら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100: 8817-8822 (2003)、WO 05/010145、または米国特許出願公開公報第2005/0130173号もしくは同第2005/0064460号(これらは各々、引用により本明細書に組み込まれる)に記載のエマルジョンPCRである。エマルジョンPCRは該形式の例示であり、本明細書に示す方法の目的には、エマルジョンの使用は任意選択であることは理解されよう。実際、いくつかの実施形態ではエマルジョンは使用されない。さらに、ePCRの参考文献に示されているようにプライマ

30

40

50

ーを直接、固相支持体に結合させる必要はなく、代わりに本明細書に示すポリマーコーティングに結合され得る。

【0188】

RCA手法は、本開示の方法における使用のために変形され得る。RCA反応に使用され得る例示的な成分およびRCAによりアンブリコンが生成される原理は、例えば、Lizardiら, Nat. Genet. 19: 225 - 232 (1998) およびUS 2007/0099208 A1 (これらは各々、引用により本明細書に組み込まれる)に記載されている。RCAに使用されるプライマーは溶液状であっても、ポリマーコーティングに結合させてもよい。

【0189】

MDA手法は、本開示の方法における使用のために変形され得る。MDAの一部の基本原則および有用な条件は、例えば、Deanら, Proc Natl. Acad. Sci. USA 99: 5261 - 66 (2002); Lageら, Genome Research 13: 294 - 307 (2003); Walkerら, Molecular Methods for Virus Detection, Academic Press, Inc., 1995; Walkerら, Nucl. Acids Res. 20: 1691 - 96 (1992); US 5,455,166; US 5,130,238; およびUS 6,214,587 (これらは各々、引用により本明細書に組み込まれる)に記載されている。MDAに使用されるプライマーは溶液状であっても、ポリマーコーティングに結合させてもよい。

【0190】

特定の実施形態では、上記に例示した増幅手法の組合せが使用され得る。例えば、RCAおよびMDAは、溶液状のコンカテマーアンブリコンを生成させるためにRCAを使用する(例えば、液相プライマーを使用する)組合せで使用され得る。次いで、アンブリコンは、ポリマーコーティングに結合されたプライマーを用いるMDAのための鋳型として使用され得る。この例では、RCA工程とMDA工程の併用後に生成されるアンブリコンがポリマーコーティングに結合される。

【0191】

本明細書に開示する本発明の方法の第3の態様は、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列の決定方法に関する。かかる実施形態では、該方法は、(a)ポリヌクレオチドポリメラーゼを、基材の表面に本明細書に記載のいずれか1種類のポリマーコーティングによって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)該基材のポリマーコート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;および(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得る。

【0192】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、フローセル内に存在する基材の表面に結合されたポリヌクレオチドに対してヌクレオチド配列が決定される。一部の実施形態では、ポリマーコート表面がフローセルの一体部分である。他の実施形態では、ポリマーコート表面が、フローセル内に配置された別個の基材である。さらなる実施形態では、該別個の基材がフローセルの表面または他の部分にカップリング、結合または別の様式で固定されたものであり得る。

【0193】

核酸の配列決定は、当該技術分野で知られた異なる方法によってポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定するために使用され得る。好ましい方法の一例では、合成時解読(SBS)を使用し、基材の表面に本明細書に記載のいずれか1種類のポリマーコーティングによって結合されたポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定する。かかる方法では

、1個または1個より多くのヌクレオチドを、ポリヌクレオチドポリメラーゼに付随する鋳型ポリヌクレオチドに供給する。ポリヌクレオチドポリメラーゼにより、1個または1個より多くのヌクレオチドが、ポリヌクレオチド鋳型に相補的な新たに合成された核酸鎖内に組み込まれる。合成は、鋳型ポリヌクレオチドの一部分または鋳型ポリヌクレオチドの一端に共有結合させたユニバーサル核酸もしくは非可変核酸の一部分に相補的なオリゴヌクレオチドプライマーにより開始される。ヌクレオチドが鋳型ポリヌクレオチドに対して組み込まれるにつれて検出可能なシグナルが発生し、これにより該配列決定プロセスの各工程中にどのヌクレオチドが組み込まれたかを調べることが可能になる。このようにして、鋳型ポリヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的な核酸の配列が得られ得、それにより、鋳型ポリヌクレオチドの少なくとも一部分のヌクレオチド配列の決定が可能になる。フローセルは、本開示の方法によって作製され、また、合成時解読 (SBS) またはサイクル中に試薬の反復送達を伴う他の検出手法に供されるアレイを収容するための簡便な形式をもたらす。例えば、第1のSBSサイクルを開始するため、1個または1個より多くの標識ヌクレオチド、DNAポリメラーゼなどが、本明細書に示す方法によって作製された核酸アレイを収容したフローセル内/セル中に流され得る。プライマー伸長によって標識ヌクレオチドの組み込みがもたらされたアレイ内の部位が検出され得る。任意選択で、該ヌクレオチドに、さらに、ヌクレオチドがプライマーに付加したらさらなるプライマー伸長を終止させる可逆的終止特性を含めてもよい。例えば、可逆的ターミネータ部分を有するヌクレオチド類似体がプライマーに、該部分を除去するためのブロック解除剤が送達されるまで、その後伸長が起こり得ないように付加され得る。したがって、可逆的終止を使用する実施形態では、ブロック解除試薬がフローセルに送達され得る (検出が行なわれる前または後)。この異なる送達工程間の合間に洗浄を行なってもよい。次いで、プライマーがn個のヌクレオチド分、伸長されるまでサイクルがn回反復され得、それにより配列の長さnが検出され得る。本開示の方法によって作製されるアレイでの使用に容易に適合され得る例示的なSBS手順、流体系および検出基本型は、例えば、Bentleyら, Nature 456: 53-59 (2008)、WO 04/018497; US 7,057,026; WO 91/06678; WO 07/123744; US 7,329,492; US 7,211,414; US 7,315,019; US 7,405,281、およびUS 2008/0108082 (これらは各々、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる) に記載されている。

【0194】

サイクル反応を使用する他の配列決定手順、例えば、ピロシーケンスも使用され得る。ピロシーケンスでは、生成中の核酸鎖に特定のヌクレオチドが組み込まれる際の無機ピロホスフェート (PPi) の放出を検出する (Ronaghiら, Analytical Biochemistry 242 (1), 84-9 (1996); Ronaghi, Genome Res. 11 (1), 3-11 (2001); Ronaghiら Science 281 (5375), 363 (1998); US 6,210,891; US 6,258,568 およびUS 6,274,320 (これらは各々、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる))。ピロシーケンスでは、放出されたPPiが、ATPスルフィラーゼによってアデノシン三リン酸 (ATP) に即座に変換されることにより検出され得、生成したATPのレベルがルシフェラーゼによる生成光子によって検出され得る。したがって、配列決定反応を発光検出システムによってモニタリングすることができる。蛍光系検出システムに使用される励起放射線源はピロシーケンス手順には必要でない。ピロシーケンスを本開示のアレイに適用するために使用され得る有用な流体系、検出器および手順は、例えば、WO 12/058096 A1、US 2005/0191698 A1、US 7,595,883、およびUS 7,244,559 (これらは各々、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる) に記載されている。

【0195】

また、ライゲーション時解読 (sequencing-by-ligation) 反応、例えば、Shendureら Science 309: 1728-1732 (200

10

20

30

40

50

5) ; US 5,599,675 ; および US 5,750,341 (これらは各々、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されたものなども有用である。一部の実施形態は、例えば、Bainsら, Journal of Theoretical Biology 135(3), 303-7(1988) ; Drmanacら, Nature Biotechnology 16, 54-58(1998) ; Fodorら, Science 251(4995), 767-773(1995) ; および WO1989/10977 (これらは各々、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載のハイブリダイゼーション時解読 (sequencing-by-hybridization) 手順を含み得る。ライゲーション時解読およびハイブリダイゼーション時解読のどちらの手順においても、アレイ内の部位に存在する核酸がオリゴヌクレオチドの送達と検出の反復サイクルに供される。本明細書または本明細書に挙げた参考文献に示された SBS 法のための流体系は、ライゲーション時解読またはハイブリダイゼーション時解読手順のための試薬の送達に容易に適合され得る。典型的には、オリゴヌクレオチドは蛍光標識され、SBS 手順に関して本明細書または本明細書に挙げた参考文献に記載のものと同様の蛍光検出器を用いて検出され得る。

10

【0196】

一部の実施形態では、DNAポリメラーゼ活性のリアルタイムモニタリングを伴う方法が使用され得る。例えば、ヌクレオチドの組込みは、フルオロフォア担持ポリメラーゼと γ -ホスフェート-標識ヌクレオチド間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 相互作用によって、またはゼロモード導波管 (ZMW) を用いて検出され得る。FRET系配列決定のための手法および試薬は、例えば、Leveneら Science 299, 682-686(2003) ; Lundquistら Opt. Lett. 33, 1026-1028(2008) ; Korlachら Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 1176-1181(2008) (その開示内容は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されている。

20

【0197】

一部のSBSの実施形態は、伸長産物へのヌクレオチドの組込み時に放出されるプロトンの検出を含む。例えば、放出プロトンの検出に基づいた配列決定には、Ion Torrent (Guilford, CT, Life Technologiesの子会社) から市販されている電気的検出器および関連手法または US 2009/0026082 A1 ; US 2009/0127589 A1 ; US 2010/0137143 A1 ; もしくは US 2010/0282617 A1 (これらは各々、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載の配列決定法およびシステムが使用され得る。

30

【0198】

例えば本明細書に示す方法によって作製された本開示のアレイのための別の有用な適用は遺伝子発現解析である。遺伝子発現は、RNA配列決定手法、例えば、デジタルRNA配列決定法と称されるものを用いて検出または定量され得る。RNA配列決定手法は、上記に示したものなどの当該技術分野で知られた配列決定方法論を用いて行なわれ得る。また、遺伝子発現は、アレイへの直接ハイブリダイゼーションまたはマルチプレックスアッセイ (産物はアレイ上で検出される) の使用によって行なわれるハイブリダイゼーション手法によっても検出または定量され得る。また、例えば本明細書に示す方法によって作製された本開示のアレイは、1例または1例より多くの個体由来のゲノムDNA試料の遺伝子型を決定するためにも使用され得る。本開示のアレイにおいて行なわれ得るアレイ系発現および遺伝子型判定解析のための例示的な方法は、米国特許第7,582,420号 ; 同第6,890,741号 ; 同第6,913,884号もしくは同第6,355,431号または米国特許出願公開公報第2005/0053980 A1号 ; 同第2009/0186349 A1もしくはUS 2005/0181440 A1 (これらは各々、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されている。

40

【0199】

フローセルを使用する上記の方法の一部の実施形態では、1回のフロー工程中、単一の

50

型のヌクレオチドのみをフローセル内に存在させる。かかる実施形態では、ヌクレオチドは、 $dATP$ 、 $dCTP$ 、 $dGTP$ 、 $dTTP$ およびその類似体からなる群より選択され得る。フローセルを使用する上記の方法の他の実施形態では、1回のフロー工程中、複数の異なる型のヌクレオチドをフローセル内に存在させる。かかる方法では、ヌクレオチドは、 $dATP$ 、 $dCTP$ 、 $dGTP$ 、 $dTTP$ およびその類似体から選択され得る。

【0200】

フローセル内に存在する基材の表面上のポリマーコーティングに結合された1つまたは1つより多くのポリヌクレオチドに対して各フロー工程中に組み込まれたヌクレオチド(1個または複数)の測定は、ポリヌクレオチド鑄型において、または該鑄型付近で生成されるシグナルを検出することにより行なわれる。上記の方法の一部の実施形態では、検出可能なシグナルが光学的シグナルを含む。他の実施形態では、検出可能なシグナルが非光学的シグナルを含む。かかる実施形態では、非光学的シグナルは、1つまたは1つより多くのポリヌクレオチド鑄型における、または該鑄型付近での pH の変化を含む。

10

【実施例】

【0201】

実施例

実施例 1

P A Z A M の調製

総則

特に記載のない限り、反応はすべて、窒素雰囲気またはアルゴン雰囲気下で行ない、出発物質は市販の供給元(Aldrich Chemical Company, Fisher Scientific, Dow)から入手し、さらに精製せずに受け取ったままの状態で使用した。記録した反応温度はすべて、反応槽と接している浴/空気の温度を示す。無水溶媒は必要でなかった。

20

【0202】

1H -NMRおよび ^{13}C -NMRスペクトルは、重水(LC NMRで99.9at. %D)中で、Bruker Avance 400 MHzの計器にて記録した。化学シフトは、テトラメチルシラン(TMS)の低磁場側に100万分の1分率(ppm, δ)で表示しており、表示した溶媒を内部標準として参照したものである。

【0203】

GPC解析は、Smithers Rapra Technology Limitedにおいて、以下のクロマトグラフィー条件:

30

計器: Malvern/Viscotek Triple Detector Array TDA301 (ポンプおよびオートサンプラーが付属)

カラム: Agilent 1×PLaquagel-OH 40+1×PLaquagel-OH 60, 30cm, 13 μ mまたはAgilent PLaquagel-OH Guard+2×PLaquagel-OH Mixed, 30cm, 8 μ m

溶離剤: 0.2M $NaNO_3$; 0.01M NaH_2PO_4 ($pH=7.0$ に調整)

流速: 1.0mL/分(公称)

温度: 30 (公称)

40

検出器: 圧力差および直角光散乱を伴う屈折率を用いて行なわれた。

データは、Malvern/Viscotek「OminSec」ソフトウェアを用いて収集し、解析した。

フォトルミネセンス分光法

【0204】

蛍光の測定はTyphoon Trio Variable Mode Imager (GE)で行ない、ImageQuant TLソフトウェアを用いてデータを処理した。

【0205】

50

薄膜を、解析のために適切に調製した清浄 Si またはガラス基材を、いずれかのスピンコーティングフロー法を用いたコーティングによる分析について調製した。蛍光性の相補オリゴ体とハイブリダイズした乾燥グラフト化膜のフォトルミネセンススペクトルを Typhoon Trio (GE) にて収集した。

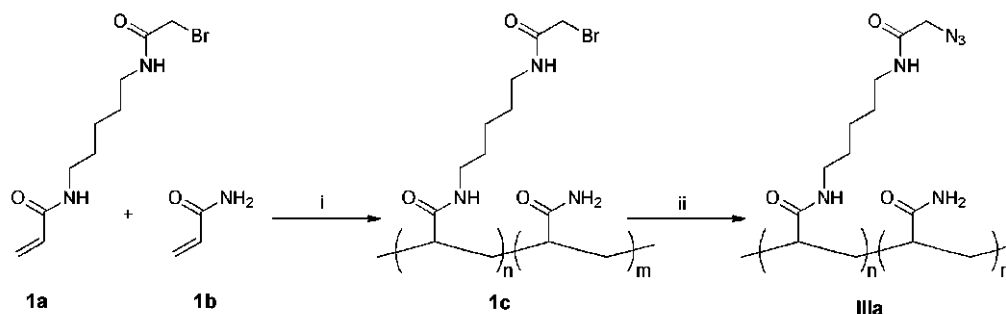
合成

【0206】

本明細書に記載のポリマーコーティングは異なる様式で調製され得る。式 (IIIa) のポリマーの合成方法の一例をスキーム 1A に示す。

【化16】

スキーム1A. 溶液状態のPAZAM混合物の合成



(i) $\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$, KPS, TEMED, $35\text{ }^\circ\text{C}$, 1.5 h

(ii) H_2O , NaN_3 , $65\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h.

【0207】

N - (5 - ブロモアセトアミジルペンチル) アクリルアミド (BRAPA) (1c) の合成は米国特許出願公開公報第 2011 / 0059865 号に記載されており、その開示内容は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0208】

水溶性アクリルアミドポリマー (PAZAM) を化学的開始型フリーラジカル重合によって調製した。粗製ポリマーを連続析出によって精製し、 $300 \sim 400\text{ kDa}$ の数平均分子量を有する PAZAM を得た。より広範囲、例えば $30 \sim 600\text{ kDa}$ の範囲の平均分子量も得られ得る。

【0209】

アクリルアミド (5.0 g , 70.3 mmol) を脱イオン H_2O (45 mL) に溶解させ、混合物を十分にボルテックスして確実に完全に溶解させた。別のフラスコ内で、BRAPA (1.0 g , 3.61 mmol) を DMF (10 mL , 9.44 g) に添加し、得られた混合物を十分にボルテックスし、溶解を補助した。次いで、この BRAPA 溶液 (9.25 g , または 9.80 mL) 、アクリルアミド水溶液 (47.5 mL) および水 (190 mL) の混合物を合わせ、5 分間撹拌した。次いで、この溶液を $0.2\text{ }\mu\text{m}$ の Whatman フィルターに通して濾過した。

【0210】

過硫酸カリウム (125 mg , 0.46 mmol) を水 (2.5 mL) に添加し、混合物をボルテックスして溶解させた。アジ化ナトリウム (11.5 g , 177 mmol) を脱イオン水 (82.9 mL) に添加し、溶液をボルテックスして溶解させた (NaN_3 の終濃度 (粗製ポリマーミックス中) は 0.53 M であり、これは、利用可能な BRAPA に対して 50 倍過剰の NaN_3 に相当する) 。

【0211】

BRAPA / アクリルアミドプレミックス (約 250 mL) に、プラスチックピペットを用いてアルゴンを 20 分間バージした。このモノマー混合物に、テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) (無希釈 , $273\text{ }\mu\text{L}$) と過硫酸カリウム (50 mg/mL ; $2370\text{ }\mu\text{L}$) を添加した。混合物を撹拌し、35 まで 1.5 時間加熱し、次いで、室温まで放冷した。撹拌を維持しながら、Chainguard I - 15 ($1390\text{ }\mu\text{L}$)

を粗製混合物に添加した後、2.03 M アジ化ナトリウム溶液 (82.9 mL) を添加した。重合中に発生した残留ラジカル (あれば) を確実に完全にクエンチするため、混合物中で空気を10分間、起泡させた。クエンチしたポリマー混合物を65 で2時間撹拌した。次いで混合物を室温まで冷却し、この状態 (4 で) 長期間保存され得た。

【0212】

粗製混合物 (約335 mL) を、穏やかな撹拌を維持しながら大過剰 (約1.5 L) のIPAに滴下した。ポリマーが白色固形物として析出し、これを収集し、ポンプで乾燥させた。部分乾燥ポリマー (約10 g) を、溶解を補助するために混合物を室温で少なくとも1時間撹拌することにより、 H_2O (100 mL) に再溶解させた。次いで、撹拌を維持しながら、ビスコース溶液を1.5 LのIPAに滴下した。固形物を真空濾過し、次いで高真空を用いて乾燥させ、PAZAMを白色固形物として得た (約5.6 g, >95%)。 1H NMRスペクトルを図1Aに示す。

【0213】

GPC (0.2 M $NaNO_3$; 0.01 M NaH_2PO_4 (pH = 7.0に調整); 130,000のピーク分子量を有する狭いプルラン多糖の分布を用いて校正、固有粘度0.511、および0.1 M硝酸ナトリウム中での屈折率の差は0.147 mL/g。屈折率の差 (dn/dc) の値0.191 mL/gを用いて試料の分子量データをコンピュータ計算): $M_n = 3.15 \times 10^5 Da$, $M_w = 1.0 \times 10^6 Da$, $M_w/M_n = 3.2$ (図1B参照)。ポリマーは多モードのMW分布を有するものであった。PAZAM試料は、クロマトグラフィー解析を開始する前にフィルター処理するのは困難であり、広範な重量分布に寄与し、不自然な測定結果をもたらし、解析の複雑度を増大させるものであった。次いで、乾燥PAZAMを水に、所望の濃度、典型的には0.01~12% w/vまで再溶解させ得る。

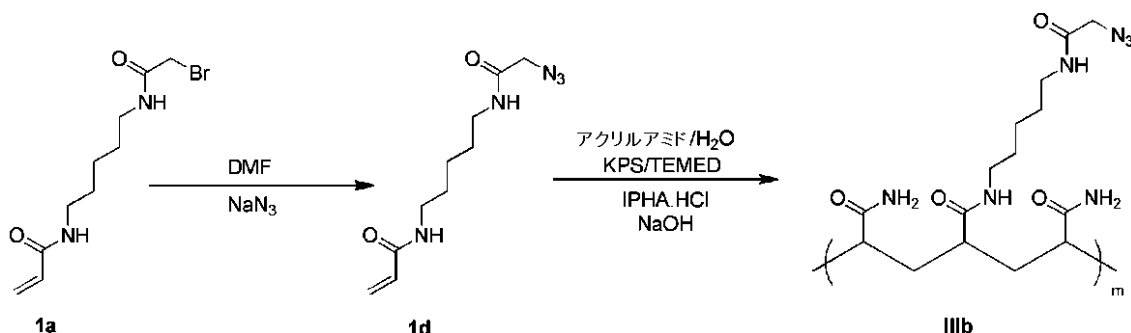
線状PAZAMの調製

【0214】

捩一的に、線状PAZAM (IIIb) の合成をスキーム1Bに示す。

【化17】

スキーム1B. 線状PAZAMの合成



【0215】

1d / アクリルアミドプレミックスの調製: 1a (915 mg)、アジ化ナトリウム (236 mg) およびDMF (9 mL) を、撹拌バーを備えた25 mL容丸底フラスコ内で一緒に混合した。フラスコをDry Syn浴中に入れ、溶液を窒素雰囲気下で撹拌しながら35 (浴温度) で2時間加熱し、1dを形成した。アクリルアミド (4.78 g) を脱イオン水に溶解させ、得られた1d溶液をアクリルアミド溶液に添加し、ぐるぐる回して混合した。反応混合物を0.2 μmフィルターに通して濾過した。

【0216】

1 L容フレンジ付フラスコを、撹拌器/加熱板上の1 L容Dry Syn浴中にセットアップし、フラスコの蓋を閉じた。フラスコに撹拌器のグランドによっていかり形状の撹拌パドルを備え付け、この撹拌パドルをオーバーヘッドスターラーに連結させた。フラスコの蓋のクイックフィット式ジョイントの1つに空気冷却器を取り付け、窒素マニホールド

に連結したチューブアダプタ（この時点ではガス流なし）を空気冷却器上面に取り付けた。濾過した反応混合物溶液をセットアップしたフラスコに移し、窒素マニホールドに取り付けた5 mL容ストリペットを用いて溶液中で窒素を30分間起泡させ、この間、反応混合物を35（浴温度）まで予備加熱した。

【0217】

粗製PAZAMポリマー溶液の調製：アクリルアミド/1dプレミックスの脱気を進行させながら、過硫酸カリウム（119 mg）を脱イオン水（2.4 mL）にボルテックスしながら溶解させた。空気冷却器上面の窒素流のスイッチをオンにし、脱気した反応混合物の上部に確実に窒素が流れるようにした。脱気プロセス後、200 rpmで撹拌しながらTEMED（99 µL）を反応混合物に添加した。次いで、この撹拌反応混合物に過硫酸カリウム溶液を添加し、重合を開始させた。撹拌を200 rpmで、窒素下、35（浴温度）にて1.5時間継続した。

10

【0218】

重合のクエンチ：重合反応を進行させながら、IPHA・HCl溶液を、IPHA・HCl（312 mg）を脱イオン水（2.80 mL）に溶解させることにより調製した。重合反応を1.5時間進行させたら、空気冷却器上面から窒素ラインをはずし、反応槽を大気中に開放した。この撹拌反応混合物中に水酸化ナトリウム溶液（1 M）を添加した後、調製したIPHA・HCl溶液を添加して重合をクエンチした。クエンチした反応混合物を200 rpmで、35（浴温度）にてさらに30分間撹拌した。

【0219】

20

PAZAMポリマー精製：粗製混合物をストリペットによって撹拌2-プロパノール（750 mL）にゆっくり添加し、撹拌をさらに1時間継続した。溶媒をデカンテーションし、アジ化ナトリウム含有廃棄物として廃棄した。析出したポリマーを押し潰して内包溶媒を絞り出した。このポリマーを脱イオン水（150 mL）に再溶解させ、ポリマー溶液をストリペットによって撹拌2-プロパノール（750 mL）にゆっくり添加し、撹拌をさらに1時間維持した。溶媒を再度デカンテーションし、アジ化ナトリウム含有廃棄物として廃棄した。析出したポリマーを押し潰して内包溶媒を絞り出した。得られたポリマーを高真空下、デシケータ内で18時間乾燥させ、次いで、風袋計測したラベル付き容器に移し、暗所で室温にて保存した。

軽度に架橋させたPAZAMの調製

30

【0220】

同様にして、軽度に架橋させたPAZAMを一般合成スキーム1Bに従い、本明細書に記載の変形手順を用いて調製した。

【0221】

1d/アクリルアミドプレミックスの調製：1a（915 mg）、アジ化ナトリウム（106 mg）とDMF（9 mL）を、撹拌バーを備えた25 mL容丸底フラスコ内で一緒に混合した。フラスコをDry Syn浴中に入れ、溶液を窒素雰囲気下で撹拌しながら35（浴温度）で2時間加熱し、1dを形成した。アクリルアミド（4.78 g）を脱イオン水に溶解させ、得られた1d溶液をアクリルアミド溶液に添加し、ぐるぐる回して混合した。反応混合物を0.2 µmフィルターに通して濾過した。

40

【0222】

1 L容フランジ付フラスコを、撹拌器/加熱板上の1 L容Dry Syn浴中にセットアップし、フラスコの蓋を閉じた。フラスコに撹拌器のグランドによっていかり形状の撹拌パドルを備え付け、この撹拌パドルをオーバーヘッドスターラーに連結させた。フラスコの蓋のクイックフィット式ジョイントの1つに空気冷却器を取り付け、窒素マニホールドに連結したチューブアダプタ（この時点ではガス流なし）を空気冷却器上面に取り付けた。濾過した反応混合物溶液をセットアップしたフラスコに移し、窒素マニホールドに取り付けた5 mL容ストリペットを用いて溶液中で窒素を30分間起泡させ、この間、反応混合物を35（浴温度）まで予備加熱した。

【0223】

50

粗製 P A Z A M ポリマー溶液の調製：アクリルアミド / 1 d プレミックスの脱気を進行させながら、過硫酸カリウム（119 mg）を脱イオン水（2.4 mL）にボルテックスしながら溶解させた。空気冷却器上面の窒素流のスイッチをオンにし、脱気した反応混合物の上部に確実に窒素が流れるようにした。脱気プロセス後、200 rpm で撹拌しながら T E M E D（99 μ L）を反応混合物に添加した。次いで、この撹拌反応混合物に過硫酸カリウム溶液を添加し、重合を開始させた。撹拌を 200 rpm で、窒素下、35（浴温度）にて 1.5 時間継続した。

【0224】

重合のクエンチおよびアジド溶解（azide lysis）：重合反応を進行させながら、I P H A . H C l 溶液を、I P H A . H C l（312 mg）を脱イオン水（2.80 mL）に溶解させることにより調製した。また、アジ化ナトリウム溶液を、575 mg のアジ化ナトリウムを 8 mL の脱イオン水に溶解させることにより調製した。重合反応を 1.5 時間進行させたら、空気冷却器上面から窒素ラインをはずし、反応槽を大気中に開放した。蓋からストッパーの 1 つをはずし、この撹拌反応混合物中に水酸化ナトリウム溶液（1 M）を添加した後、調製した I P H A . H C l 溶液を添加して重合をクエンチした。次いで、この撹拌反応混合物にアジ化ナトリウム溶液を添加した。クエンチした反応混合物を 65（浴温度）まで加熱し、温度を維持しながら、撹拌を 200 rpm での撹拌で 2 時間継続した。

【0225】

P A Z A M ポリマー精製：粗製混合物をストリペットによって撹拌 2 - プロパノール（750 mL）にゆっくり添加し、撹拌をさらに 1 時間継続した。溶媒をデカンテーションし、アジ化ナトリウム含有廃棄物として廃棄した。析出したポリマーを押し潰して内包溶媒を絞り出した。このポリマーを脱イオン水（150 mL）に再溶解させ、ポリマー溶液をストリペットによって撹拌 2 - プロパノール（750 mL）にゆっくり添加し、撹拌をさらに 1 時間維持した。溶媒を再度デカンテーションし、アジ化ナトリウム含有廃棄物として廃棄した。析出したポリマーを押し潰して内包溶媒を絞り出した。得られたポリマーを高真空下、デシケータ内で 18 時間乾燥させ、次いで、風袋計測したラベル付き容器に移し、暗所で 4 にて保存した。

【0226】

軽度架橋させた P A Z A M の ^1H NMR は、100 μ L の D_2O と 500 μ L のポリマー水溶液（3%）の混合物で取得した（図 1 C 参照）。

実施例 2

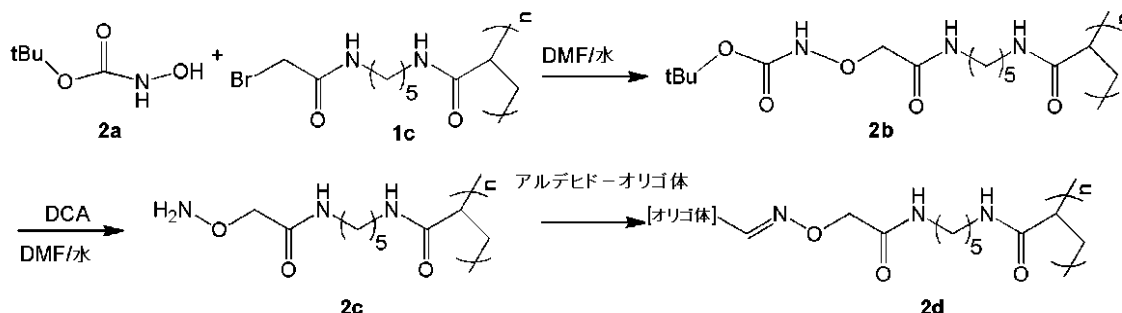
P A Z A M 誘導体の調製

【0227】

P A Z A M の誘導体の合成をスキーム 2 に示す。まず、B R A P A（1 c）を t - B o c 保護ヒドロキシルアミン（2 a）と反応させて中間体（2 b）を形成し、これをジクロロ酢酸で処理し、P A Z A M のオキソ - アミン誘導体（2 c）を形成する。続いて、2 c にアルデヒド官能化オリゴヌクレオチドがグラフト化され、2 d が形成され得る。

【化 18】

スキーム 2. PAZAM のオキソアミン誘導体の合成



10

20

30

40

50

実施例 3

ポリマーコーティング

ガラス基材 / フローセル上の P A Z A M コーティング

【 0 2 2 8 】

P A Z A M 水溶液をガラス、プラスチックまたはシリコン基材上に成膜した。続いて、このコーティングをグラフト化させ（アルキン官能化オリゴヌクレオチドを使用）、このグラフト化表面に相補的な色素をハイブリダイズさせた。図 2 A および 2 B 参照。典型的な蛍光スキャンを図 2 B に示す。次いで、異なる濃度のプライマー（アルキンオリゴヌクレオチド）を用いてポリマーをグラフト化させ、ほぼ標準的なオリゴヌクレオチドプライマー密度（約 15000 プライマー / μm^2 ）の 4 つのレーンと高プライマー密度（約 50000 プライマー / μm^2 ）の 4 つのレーンを含む表面を得た。プライマー密度は、選択されるグラフト化プライマー濃度にもよるが、 $2500 \sim 1 \times 10^6$ プライマー / μm^2 の範囲であり得る（図 2 A）。

10

【 0 2 2 9 】

P A Z A M を用いてコートした H i S e q (I l l u m i n a) ガラスフローセルの T y p h o o n スキャンを図 3 A に示す。ポリマー表面を、この手法を用いて得られ得るプライマー密度（プライマー / μm^2 ）の範囲を示す漸増濃度のプライマー（アルキンオリゴヌクレオチド）を用いてグラフト化した（図 3 B）。

【 0 2 3 0 】

図 4 A は、P A Z A M を用いてスピンコートしたガラス基材の T y p h o o n スキャンを示す。次いで、G e n o m e - A n a l y z e r (I l l u m i n a) 内に適合するサイズのフローセルをウェハを用いて製作した。図 2 A および 2 B に記載のとおり、次いで、ポリマー表面を、このアプローチによってスピンコート表面上で得られ得るプライマー密度（プライマー / μm^2 ）の範囲を示す漸増濃度のプライマー（アルキンオリゴヌクレオチド）を用いてグラフト化した（図 4 B）。

20

【 0 2 3 1 】

フローコートした P A Z A M 表面により種添加 DNA 鋳型の増幅が補助され得た。図 5 A は、標準 S F A チャネル（レーン 1）の鋳型から成長した DNA クラスターが、P A Z A M コートチャネル内のものと同一であったことを示す。クラスターは、c B o t . 2 8 サイクルクラスター増幅（a p p l i f i c a t i o n）（[P h i X] = 1 p M , 短鎖鋳型 , 8 0 b . p .）を用いて成長させ、次いで、S Y B R G r e e n で染色した。結果により、このアプローチにより、ブリッジ増幅が補助され得る頑健な表面が得られることが示された（図 5 B および図 5 C）。

30

【 0 2 3 2 】

図 6 A および 6 B は、スピンコート P A Z A M 表面上の DNA クラスターを示す。この図は、スピンコート P A Z A M 表面により種添加 DNA 鋳型の増幅が補助され、標準 S F A 表面上で観察されたものと同様のクラスターを得ることができたことを示す。クラスターの典型的な画像を M a n t e i a (2 0 × 対物鏡 , 1 m J 露光) を用いて取得し、S Y B R G r e e n で染色した（図 6 C）。

ポリ（N - （5 - アジドアセトアミジルペンチル）アクリルアミド - コ - アクリルアミド）（P A Z A M）成膜

40

材料および設備

【 0 2 3 3 】

（3 - アミノプロピル）トリメトキシシラン（97%）（A P T M S）とイソプロパノール（解析等級試薬）（I P A）、N , N , N ' , N ' , N ' ' - ペンタメチルジエチレントリアミン（P M D E T A）、硫酸銅（C u S O ₄ . 5 H ₂ O、4 % w / v 溶液）およびアスコルビン酸ナトリウム（N a A s c）は S i g m a A l d r i c h から購入した。洗浄液用に 50 % I P A 水溶液を調製した。N - ヒドロキシスルホスクシンイミジル - 4 - アジドベンゾエート（S u l f o - H S A B）は W e b s c i e n t i f i c から購入した。2 % ポリ（N - （5 - アジドアセトアミジルペンチル）アクリルアミド - コ - ア

50

クリルアミド) (P A Z A M) w / v 水溶液は自社で調製した。希釈は、35 にて一晚のハイブリダイゼーションで行なった。リン酸カリウムバッファー (10 mM 水溶液, pH = 7) (K P i) ならびに塩素酸ナトリウムおよびクエン酸ナトリウム溶液 (S S C) は自社で調製した。フローセルの清浄は、E m i t t i e c h K 1 0 5 O X 酸素プラズマアッシャー (p l a s m a a s h e r) を用いて行なった。スルホ - H S A B および P A Z A M の溶液の成膜には M J R e s e a r c h P T C - 2 0 0 T h e r m o C y c l e r (M J) を使用した。スルホ - H S A B と P A Z A M との光化学反応には U V P X X - S e r i e s U V B e n c h L a m p を使用した。光化学反応によってフローセルに伝達された UV 出力のモニタリングには O p h i r P D 3 0 0 - U V 光ダイオードセンサー (20 pW - 300 mW) を使用した。

10

方法

【0234】

そのままのフローセル (I l l u m i n a) をプラズマアッシャー内に 100 W で 10 分間入れた。次いで、清浄なガラス基材を蒸着によってシラン処理した。真空デシケータ内で、フローセルのポートを 100 μ L の無希釈 A P T M S を内包した 2 本の開口ガラスバイアル上面に配置した。デシケータを真空下に配し、60 で一晚インキュベートした。真空デシケータから取り出したら、フローセルを M J 上に設置し、K P i (10 mM) で 75 μ L $\cdot$ 分⁻¹ で 2 分間プライマー処理した。次いで、21.1 mM のスルホ - H S A B 溶液 (10 mM K P i 中) を 100 μ L $\cdot$ 分⁻¹ で 2 分間流した。静的インキュベーションを暗所にて、室温で 1.5 時間行なった。次いで、続けて洗浄を脱イオン水、50 % I P A 溶液および脱イオン水で、それぞれ 100 μ L $\cdot$ 分⁻¹ で 2 分間行ない、確実にフローセルのチャネル内への空隙の導入がないようにした。次いで、2 % P A Z A M 溶液をチャネル内に 100 μ L $\cdot$ 分⁻¹ で 1 分間流し入れ、確実にフローセルのチャネル内への空隙の導入がないようにした。M J から取り出したら、フローセルに UV ランプを用いて UV 照射した。UV 源とフローセルの間隔は 1 cm にした。露光時間を面積 1 平方センチメートルあたり 15 J がフローセルに伝達されるように調整した。次いで、フローセルを、続けて脱イオン水、50 % I P A、脱イオン水および K P i (10 mM) で、それぞれ 100 μ L $\cdot$ 分⁻¹ で 2 分間洗浄した。次いで、フローセルを、アルキンオリゴヌクレオチド (K P i (10 mM) 中) を P M D E T A、硫酸銅および N a A s c (500 mg $\cdot$ mL⁻¹ 水溶液) と 60 で 30 分間反応させることにより官能化した。表面上のアルキンオリゴヌクレオチドの存在を、アルキンプライマーの 5' 末端を蛍光色素で官能化した相補配列オリゴヌクレオチドで染色することにより確認した。

20

30

結果

【0235】

蛍光の検出は、T y p h o o n T r i o 蛍光スキャナー (G E H e a l t h c a r e) で行なった。典型的な画像 (図 7 B) およびチャネルに沿った強度の中央値を示すグラフ (図 7 A) を示す。

【0236】

2 $\times$ 26 サイクルの実行を H i S e q 2.6 mm フローセル (I l l u m i n a) で行なった。最初の基本報告では、クラスターがすべてのレーンで検出されることが示された (図 8 A ~ 図 8 C 参照)。26 サイクル後、P A Z A M でコートしたチャネル内にクラスターはまだ存在していた。また、結果により、P A Z A M クラスターが I l l u m i n a ペアエンドプロトコルで配列決定され得ることも示され、52 サイクル (すなわち、26 サイクルのペア) にデータを返した。図 8 D ~ 図 8 I 参照。

40

固相基材上への P A Z A M のスピンコーティング

【0237】

典型的な実験において、パターン形成ガラス基材をまず、プラズマアッシャー (E m i t t i e c h K 1 0 5 O X) 内で 100 W にて 5 分間アッシング (a s h i n g) することにより清浄にした。清浄後、基材を、真空デシケータ内の 0.5 mL の (3 - アミノプロピル) トリエトキシシラン (A P T E S) を含む開口バイアル内に入れることによりシ

50

10

20

20

【化 1 9】

30



【 0 2 4 0 】

50

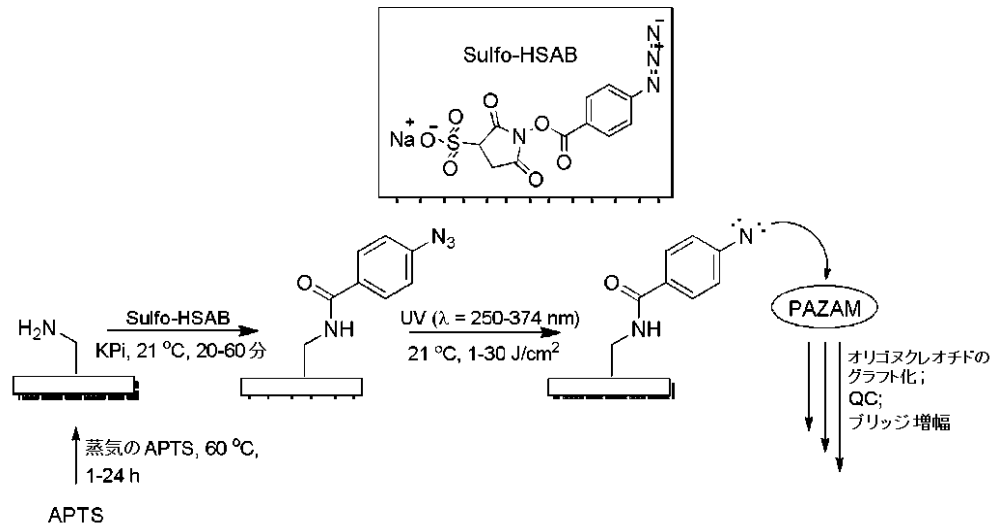
H S A B は、光活性アリールアジドと活性型 N H S 単位で構成された市販の二官能性架橋剤である。U V 光 (約 250 ~ 374 nm) に露光されると、アリールアジドにより窒素の放出を伴ってナイトレンが生成する。この高度に反応性の種によりさまざまな高速挿入反応が行なわれ得る。

実施例 5

光活性表面の調製

【化 20】

スキーム 4. 光活性表面を作製するために使用される経路



【0241】

スキーム 4 は、光活性表面を調製するための経路を示す。表面を A P T S (メトキシまたはエトキシシラン) で前処理し、焼成し、アミン基の単層 (または多層) を形成する。次いで、アミン基をスルホ - H S A B と反応させ、アジド誘導体を形成する。1 ~ 30 J / c m ² のエネルギーを用いた 21 °C での U V 活性化により活性ナイトレン種が生成し、これにより、P A Z A M を用いたさまざまな挿入反応が容易に行なわれ得る。

【0242】

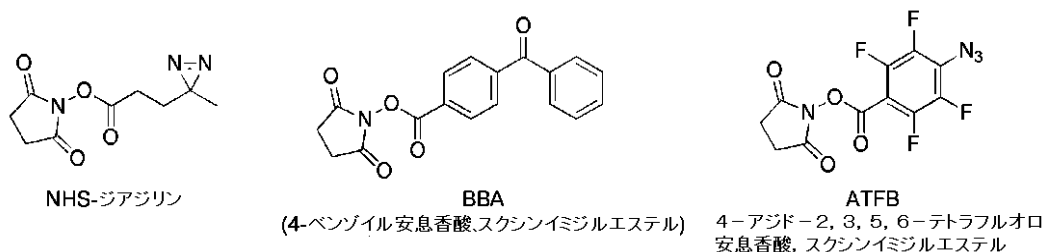
最初の所見では、光活性表面および精製 P A Z A M 混合物の使用を伴うこのアプローチは、標準的な G A フローセル (I l l u m i n a) をコートするために使用され得、得られるコーティングはクラスターの成長に使用され得ることが示されている。さらに、ポリマーは、調製した光活性ウェハ上に同様の結果を伴って成膜され得る (例えば、スピンコーティング、浸漬 (d u n k i n g)、浸漬 (d i p p i n g)、噴霧などにより)。コートされた P A Z A M 混合物 (上記のスキーム 4 に記載のようにして誘導) は配列決定がなされたものであり、実行のまとめを以下に詳述する。

択一的架橋剤

【0243】

また、スルホ - H S A B に加え、他の 3 種類の架橋剤の光安定性および効率もスクリーニングし、スルホ - H S A B と比較した。

【化 21】



10

20

30

40

50

【 0 2 4 4 】

択一的架橋剤を、標準的なフロープロセスを使用し、G A フローセル (I l l u m i n a) を用いてスクリーニングした。試験対象 (t e t e d) 架橋剤には、S u l f o - H S A B、ジアジリン、B B A および A T F B を含める。カップリング反応を約 2 0 m M の濃度の D M F 中で 2 0 にて行なった。A P T E S 成膜後、アミノシラン官能化フローセルの交互のレーンを各橋かけ剤の 2 0 m M 水性 / D M F 溶液で処理した。チャンネルをスルホ - H S A B 対照チャンネルと同一時間インキュベートした。連続洗浄、P A Z A M コーティングおよび表面へのポリマーロッキングのための U V 露光後、レーンに本発明者らの標準プライマーオリゴヌクレオチドをグラフト化し、相補的な蛍光オリゴヌクレオチド配列で染色した。テキサスレッドハイブリダイゼーション後の結果を図 1 0 A および 1 0 B にまとめる。

10

【 0 2 4 5 】

3 種類の択一的橋かけ剤の性能を、ハイブリダイズした相補オリゴヌクレオチドの蛍光シグナルを T y p h o o n 画像形成装置を用いて測定することにより評価した。結果は、測定された表面プライマー密度がスルホ - H S A B で記録されたものの半分より低いことが明らかであった。これらの光活性橋かけ剤 (スルホ - H S A B を含む) のいずれかで、コートされたポリマーとの共有結合を形成するための挿入機構がおそらく熱的に誘起され得る。

実施例 6

不飽和表面の調製および P A Z A M の熱架橋

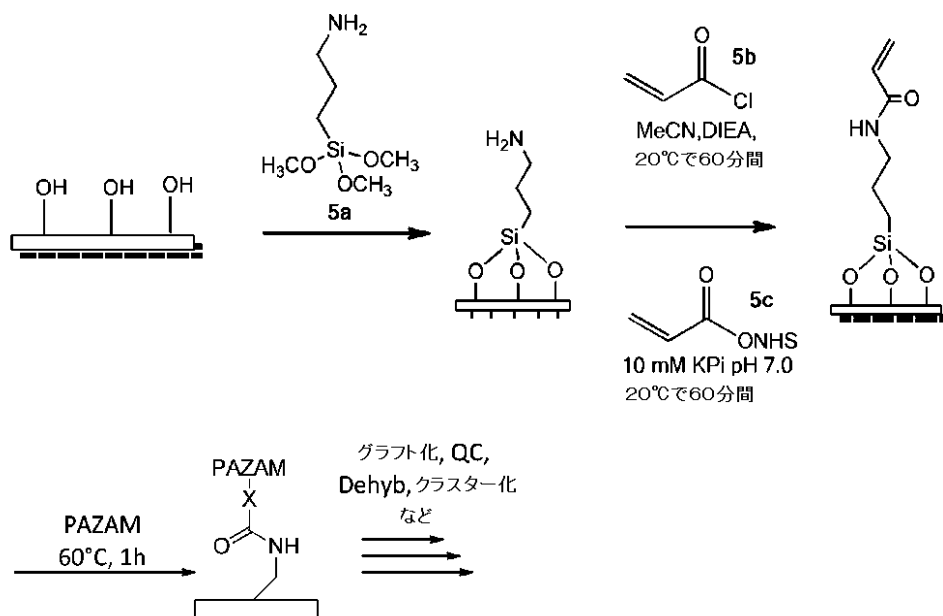
20

【 0 2 4 6 】

ポリマーロッキングのための別の択一的なアプローチは P A Z A M の熱的架橋であり、これは、基材の表面をアルケンなどの不飽和基で官能化することを含む。スキーム 5 は、アルケン官能化表面を作製するためのいくつかの合成経路を示す。

【 化 2 2 】

スキーム5. アクリルアミド官能化表面を作製するために使用される経路



30

40

【 0 2 4 7 】

基材の表面をまず、3 - アミノプロピルトリメトキシシラン (A P T M S) (5 a) で処理し、アミン官能化表面を形成した。次いで、アミン官能基を塩化アクリロイル (5 b) または活性型アクリロイル N H S エステル (5 c) と反応させた。続いて、P A Z A M を不飽和表面に、フローセル内への 1 ~ 2 % P A Z A M 水溶液のポンプ輸送、または開放ガラススライドの上面へのスピンコーティングのいずれかによって導入した。フローセル内にポンプ輸送される水溶液中に存在させる P A Z A M の量は、例えば 0 . 1 ~ 1 0 % で

50

あり得る。基材を高温で、典型的には60 でインキュベートした。このプロセスで、P A Z A Mのアジド基を表面上の不飽和アルケン基と反応させた。このプロセスは、K r u l l eら, T e t r a h e d r o n : A s y m m e t r y (1 9 9 7) , 8 : 3 0 8 7 - 3 8 2 0 (これは引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)に提案されているような異なる機構を伴うものであってもよい。

【0248】

水または水性バッファーで洗浄して過剰の未反応P A Z A Mを除去した後、表面は核酸プライマーにグラフト化され得る。他の下流プロセス、例えばQ Cまたはクラスター成長にはすべて、標準的な手法が使用され得る。該表面は、U V活性化によるポリマーロッキングと同様の性能特性を有する。例えば、該表面には、異なるプライマー密度を得るために異なる濃度のグラフト化プライマーがグラフト化され得る。また、該表面を脱水、保存し、乾燥および再水和し、活性表面の処理能力を維持してもよい(図12参照)。

10

実施例7

クラスター化および配列決定におけるポリマーコーティングの適用

【0249】

図8A~Iにおいて、2×26サイクルの実行をP A Z A MコートH i S e q フローセル(I l l u m i n a)を用いて行なった。最初の基本報告では、クラスターがすべてのレーンで検出されることが示された。また、26サイクル後、P A Z A Mクラスターはまだ存在していた。P A Z A Mクラスターはペアエンド読み値で終了し、完全な52サイクル(すなわち、26サイクルのペア)にデータを返した。

20

【0250】

また、熱的架橋法によって調製されるポリマーコート表面は、本明細書に記載の標準的な方法を用いたクラスター成長および配列決定に対しても活性である。図13Aは、P h i X V3を鋳型として有する熱的架橋表面上で成長させたクラスターを示す(H i - S e q (I l l u m i n a)での画像)。図13Bは、慣用的な配列決定化学反応を用いたH i - S e qでの2×26サイクル実行により得られた配列決定メトリックスを示す。

実施例8

パターン形成におけるポリマーコーティングの適用

【0251】

通常フローセルのコーティングに加え、光活性層の作製は、パターン形成表面を形成するためにも使用され得る。微細加工手法は、不活性または不動態材料の「海」にアミノ官能部の「島」を作出するために一般的に使用され得る。

30

【0252】

スルホ-H S A Bなどのアリアルアジドは、アミノコア上に存在させてパターン形成光活性層が作出され得る。この表面をP A Z A Mなどのポリマー混合物でコーティングした後、U V露光し、続いて洗浄すると、ポリマー-パターン形成アレイが得られる。このプロセスを図11Aに示す。

【0253】

橋かけ剤はパッチ内のみに存在させるため、バックグラウンド領域は光結合したポリマーがないままである。ラジカル挿入反応は表面の単層に限定され、制御不能なラジカルの伝播が最小限になる。また、シランとホスフェート単位で官能化したアリアルアジドも市販の出発物質から容易に入手され得、多種多様なパッチ型に固定することが可能である(図11A参照)。露出ガラス特徴と金格子間領域を有するスライドを用いて、官能化特徴パッチ内で優先的なポリマー成膜が観察された(図11B)。右側はM a n t e i a蛍光画像を示し、左側はスライドのT y p h o o n画像を示し、暗い領域ほどポリマーコーティングが多いことを示す。

40

【0254】

同様に、熱的架橋法により、下層の官能層がパターン形成されている場合での官能性ポリマーのパターン形成パッチの形成も可能である。例えば、パターン形成アミノシランのパッチは、一般液なりソグラフィ手法を用いて調製され得る。典型的には、これは、基

50

材をレジストでコーティングし、次いで、露光してレジストを現像し、基材上に露出パッチを残すことを伴う。次いで、この露出パッチをシランで官能化した後、レジスト塊を除去すると、後に非官能性基材のバルク格子間を有するアミノ官能化基材の小型パッチが残る。次いで、このパッチは、スキーム5に示すようにして不飽和アルケン基で官能化され、次いでPAZAMとともにインキュベートされ得る。得られる表面は予め画定された格子状のPAZAMの小型パッチを含み、次いで、これにより画定パターン形成アレイ上でのクラスター成長が補助され得る。図14において、上記のようにして作製した表面により、パターン形成領域上で選択的にブリッジ増幅補助されることが示される。特徴は直径が450nmであり、ピッチは1.4μmである。クラスターは、1pMのヒトDNA鋳型を有するIllumina V3 PE cBotキットを用いて成長させた。増幅後、表面をSybr greenを用いて画像化した。

10

【0255】

パターン形成表面を作製するための使用され得る他の方法としては、例えば、米国特許出願第13/492,661号および同第13/661,524号（これらは各々、引用により本明細書に組み込まれる）に記載されたものが挙げられる。

実施例9

PAZAMでのビーズのコーティング

【0256】

ビーズへのポリマーコーティングの適用には異なる方法が使用され得る。本明細書に記載のアプローチの一例は、ポリマーロッキングのためにUV活性化性表面の使用を含む。実施例11に記載の択一的なアプローチは、ポリマーの熱的架橋のためにアルケンまたはアクリルアミド官能化表面の使用を含む。熱系アプローチでは、ビーズは、一般的に、アルケンまたはアクリルアミド基での官能化後、重合抑制剤（例えば、BHT、ジエチルヒドロキシルアミン、またはTEMPOなど）を含む洗浄溶液に曝露される。これは、該アルケンまたはアクリルアミド基の早期重合によりビーズが凝集するのを抑制するために行なわれ得る。

20

【0257】

ビーズ上でPAZAMをコーティングした後、ビーズを洗浄して過剰の未結合PAZAMを除去した。洗浄後、PAZAM層は約20nm厚であった。次いで、ビーズを、PAZAM上のアジド基と5'アルキン修飾オリゴヌクレオチドとの反応によってプライマー（P5/P7のミックス）にグラフト化させた。また、択一的な（Alternative）グラフト化化学反応も使用され得、限定されないが：ポリマー内のアミン基と5'-NH₂修飾オリゴヌクレオチドとの反応；ポリマー内のオキソ-アミン基と5'-アルデヒド修飾オリゴヌクレオチドとの反応によるオキシムの形成；ポリマー内のチオール基と5'-マレイミド修飾オリゴヌクレオチドとの反応；オレフィンのクロスメタセシス（メタセシス触媒の存在下でのポリマーと5'修飾オリゴヌクレオチドの両方の末端アルケン基の反応）；ポリマー内のアミン基と5'-塩化シアヌル修飾オリゴヌクレオチドとの反応；などが挙げられる。ビーズ上のPAZAMにグラフト化されなかった過剰のプライマーは、次いで洗い流され、上面にPAZAM-オリゴ体層を有するビーズが得られ得る。

30

40

【0258】

基材の表面に適用する前にポリマーコートビーズに関する品質管理を行なうためには、いくつかの方法が使用され得る。方法の一例は、PAZAMを色素（例えば、DyLight 488 Phosphine）で直接染色することである。別の方法は、グラフト化オリゴヌクレオチドを、PAZAM上のオリゴヌクレオチドの色素標識逆相補鎖で標識することである。標識ビーズは、フローサイトメトリーによって測定され得るか、または表面上に流延し、次いで光学顕微鏡使用（蛍光顕微鏡使用を含む）によって解析され得る。また、ビーズのアリコート破壊試験に使用し、アッセイにおいてビーズがどのように機能を果たすかを評価してもよい。一例は、アリコートを基材上に負荷し、配列決定を行ない、ビーズ塊が多くのアレイ上への負荷のための使用に充分良好であるかどうかを調べる

50

ことである。

【0259】

異なる型のエッチング可能な基材、例えば、シリコン、プラスチック（Zeonor（登録商標））および添加剤（例えば、 SiO_2 またはカーボンブラック）含浸プラスチックがビーズの負荷に使用され得る。図15は、PAZAM被覆ビーズを透明なZeonorスライド上に負荷することにより調製されたパターン形成PAZAMアレイを示す。

【0260】

パターン形成アレイの調製にポリマーコートビーズを使用することには、いくつかの利点がある。まず、ビーズアプローチはコスト効率がよく、時間節約的である。ビーズ負荷アプローチにより、フローセルのコーティングおよびグラフト化の慣用的なアプローチと比べて高密度を有するアレイ表面の調製が可能になる。例示的な慣用アプローチでは、異なる試薬をフローセルに送達し、フローセル温度が制御されるデバイスが使用され、これでは、ポンプ輸送されたプライマーのほんの一部しかグラフト化されず、かなりの無駄が生じる。また、本明細書に記載のビーズ負荷手順の方が、慣用的な手順ずっと速く、大規模な商業的応用が可能である。

実施例10

光活性ポリマー

【0261】

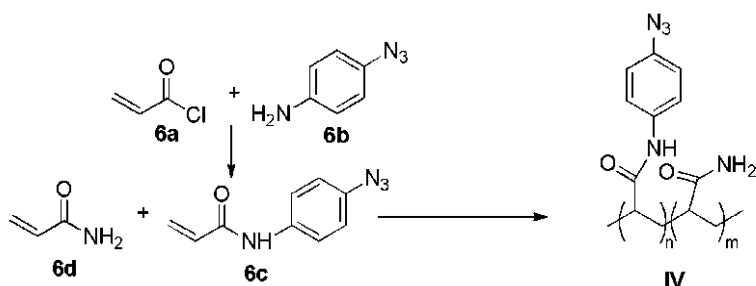
本明細書において、ブリッジ増幅およびその後の合成時解読（SBS）化学を補助し得る択一的な水溶性ポリマーの使用を開示する。また、該ポリマーは、さまざまな異なる手法を用いて表面に容易に適用され得る。特に、表面への適用前に十分に特性評価され得る線状ポリマーの開発は、表面コーティングの品質の潜在的ばらつきを限定的にするために有益である。また、本明細書に記載のアプローチは、ポリマーの択一的なコーティングストラテジー、例えば、浸漬、噴霧およびスピンコーティングの使用可能性を含む。

【0262】

スキーム6は、市販の出発物質を用いて調製され得る線状ポリマーの調製を示す。このポリマーは、制御可能な様式でガラスおよびシリコンウェハをコートするために使用され得、溶液ポリマーおよびフローセルに製作する前のコートウェハの両方について十分な特性評価が可能である。また、この方法では、フローセル表面の一方または両方を適宜官能化することが可能である。

【化23】

スキーム6. 光活性線状ポリマーの合成



【0263】

この重合は、従来の液相手法を用いて大規模で行なわれ得る。アクリルアミドと新しいモノマー6c（単純な1工程手順によって合成）は、PAZAMを調製するための現行の手順と同様のフリーラジカル重合を用いて重合され得る。

【0264】

変形法の一例は、パーフルオロアリールアジドの使用を伴うものである（Keana, J. F. W.; Cai, S. X. New Reagents for Photoaffinity Labeling: Synthesis and Photolysis of Functionalized Perfluorophenyl Azides. J. Org. Chem. 1990, 55, 3640-3647）（その開示内容は引用

10

20

30

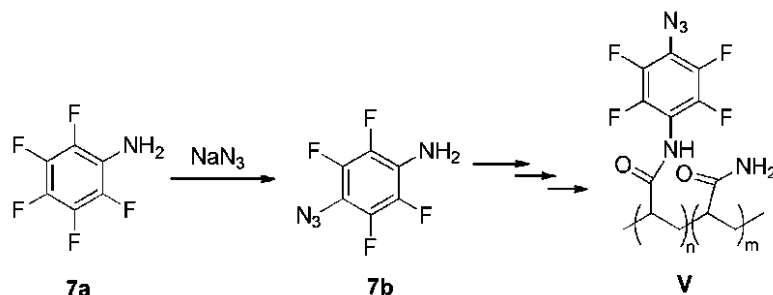
40

50

によりその全体が本明細書に組み込まれる)。これらの種はナイトレンの生成時に環拡大を受けることが少ない傾向を示す。その結果、UV誘起反応は、挿入生成物の排他的形成を伴うよりクリーンな状態になる。

【化24】

スキーム7. 光活性ポリマーを調製するためのパーフルオロアリールアジドモノマーの合成



10

【0265】

アリールアジドを標識剤として使用することは、ずっと以前の1969年に報告されていた(Fleet, G. W. J.; Porter, R. R.; Knowles, J. R. Affinity Labeling of Antibodies with Aryl Nitrene as Reactive Group. Nature 1969, 224, 511-512)(その開示内容は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)。本出願では、この官能基の二重反応性を; 1, 3 - 双極子付加環化(オリゴ体のグラフト化のための)におけるパートナーおよび一重項ナイトレン種のUV誘起生成後の光結合剤として利用するものである。UV活性モノマーを使用する利点は、反応が「クリーン」(挿入生成物のみ)であり、化学選択的であり、莫大な数の挿入可能な結合をもたらすポリマー環境で限局的であることである。

20

【0266】

このアプローチにより、成膜後のなんらかの官能化工程を行なう必要性が排除される。予備グラフト化ポリマーでコートしたら、ウェハはダイスカットされ、カバースリップを取り付け、利用可能な表面プライマーの数を測定/確認するためにQC工程が行なわれ得る。

30

【0267】

精製パッチは、次いで、グラフト化された部分(およそ約80%)が溶液中で、例えば、銅触媒型ヒュスゲン1, 3 - 付加環化を用いて分割される(図16: 経路2)。グラフト化ポリマーは、次いで未反応物質と再併合され、ペアエンドプライマーとウェハ表面および近隣のポリマー鎖の両方にロッキングされ得る遊離光活性基との両方を含むポリマーミックスが得られ得る(図16参照)。

【0268】

この光結合アプローチにより、クラスター成長と配列決定工程の両方を補助するポリマーの頑健性が改善される。以前の研究では、動的シリコン無含有アクリルアミドミックスはSBSを補助し得るが、クラスター化後にかすかに視認可能な望ましくない「しわ」が示され、配列決定中により顕著になることが示されていた。本明細書に開示した光結合アプローチの使用により、ウェハへのポリマーの固定は改善され得るが、過度な柔軟性は低減され、グラフト化プライマーへのアクセスは維持され得る。

40

実施例11

熱的架橋を用いたPAZAMでのビーズのコーティング

【0269】

シリカビーズを10wt%固形分の懸濁液としてFishers, INのBang's Labsから入手した(PN SS04N/9348, しかしながら、多くの他のビーズ組成およびサイズが同様の様式で使用され得ることに注意されたい)。1ml(100

50

mg)のアリコートに1.5ml容エッペンドルフチューブに移した。このチューブをベンチトップ遠心分離機(5000rfu)で30秒間遠心分離し、ビーズをスピンドウンさせた。溶液を吸引除去した。次に、1mlのアセトニトリル(Aldrich PN 34967)をこのチューブに添加し、チューブを30秒間ボルテックスして懸濁液をホモジナイズし、次いで、再度スピンドウンした。このプロセスを5回反復し、溶媒交換した。最後に、最後の溶媒を吸引除去した(遠心分離によるビーズのスピンドウン後)。

【0270】

別の15ml溶チューブ内に、5mlのアセトニトリルと100 μ lの3-アクリルアミドプロピルトリメトキシシラン(Gelbst PN SIA0146.0)を添加した。この溶液を15秒間ボルテックスし、溶液を混合した。次に、この溶液に、早期重合を抑制するための重合抑制剤を添加した: 2 μ lのN,N-ジエチルヒドロキシルアミン(Aldrich PN 471593)を2mlのシラン溶液に添加して抑制剤濃度を1000ppmにした。次に、1mlのシラン溶液を抑制剤溶液とともにビーズに添加した。チューブを30秒間ボルテックスし、シラン溶液中でビーズ懸濁液をホモジナイズした。次いで、ビーズをシランと室温で30分間、回転式混合機にて反応させた。次いで、チューブ内のビーズを遠心分離し、ビーズをスピンドウンさせ、溶液を吸引除去した。次いで、ビーズを、1000ppmのN,N-ジエチルヒドロキシルアミン重合抑制剤を含有するアセトニトリルに、上記のものと同様の様式で溶媒交換した。

【0271】

シラン処理後、ビーズを、1000ppmの重合抑制剤を含有するエタノールに溶媒交換した(5回連続の遠心分離、吸引、および新しい溶媒の添加により)。次に、ビーズを、1000ppmの重合抑制剤を含有するアセトンに溶媒交換した。最後に、残留アセトンを吸引除去し(ビーズの遠心分離後)、チューブ内のビーズを、輪ゴムで固定したキムワイプでキャップし、乾燥ビーズが確実にエバキュエーションチャンバ内に逸出しないようにした。次いで、ビーズを、40 $^{\circ}$ Cまで予備昇温させた真空炉内に入れ、真空内収容(およそ27 Torr)に1時間に供した。次いで、ビーズを真空炉から取り出し、1000ppmの重合抑制剤を含有する1mlのHPLC等級水を添加した。次いで、ビーズ懸濁液を30秒間ボルテックスすることによってホモジナイズした。

【0272】

別の1.5ml容エッペンドルフチューブ内に、10 μ lの先の工程のビーズの水性懸濁液を添加した。次に、PAZAMポリマーの1mlの1.0wt%溶液(HPLC等級水中)を次いでビーズに添加した。この溶液を、ベンチトップボルテックス装置で20秒間ボルテックスすることによりホモジナイズし、次いで7000rfuで90秒間遠心分離し、ビーズを得た。次いで、PAZAMポリマー溶液を吸引除去した。次に、1mlの2.0wt%PAZAM溶液をビーズに添加し、ベンチトップボルテックス装置で20秒間ボルテックスすることにより溶液をホモジナイズした。次に、チューブを60 $^{\circ}$ Cで1時間反応させることにより、PAZAMをシランに熱的にグラフト化させた。ビーズへのPAZAMの熱的グラフト化後、ビーズを5 $\times$ 1mlのHPLC等級水で室温にて(上記の溶媒交換法を使用)、次いで、3 $\times$ 1mlの予備昇温(およそ40 $^{\circ}$ C)HPLC等級水で洗浄した。ビーズを100 μ lのHPLC等級水中で希釈し、10wt%固形分の懸濁液にした。

【0273】

5'アルキニル官能基を有するP%およびP7オリゴヌクレオチドを、標準的なオリゴヌクレオチド合成手順を用いて別々に合成した(あるいはまた、オリゴヌクレオチド合成業者から市販品として入手した)。オリゴヌクレオチド溶液は100 μ M溶液(HPLC水中)として供給した。

【0274】

アジド官能化PAZAMに対するアルキニル官能化オリゴヌクレオチドのグラフト化は以下のようにして行なった。10wt%固形分のPAZAMグラフト化ビーズ溶液の100 μ lのアリコートに、800 μ lの1 $\times$ PBSバッファー(pH7.4)および100

10

20

30

40

50

μlのオリゴヌクレオチド溶液を添加した。この溶液に、穏やかな起泡窒素流速で窒素ガスを10分間スパーキングした。次に、2 μlの無希釈PMDETA (Aldrich PN 369497)を添加した。次に、硫酸銅 (Aldrich PN C2284)の17 μlの160 mM水溶液を次いで添加した。20秒間ボルテックスすることにより混合すると溶液は紫色に変わった。最後に、アスコルビン酸ナトリウム (Aldrich PN A7631) 25 μlの40 mg/ml溶液 (HPLC水中)を添加し、20秒間ボルテックスすることにより混合すると溶液は青色に変わった。この溶液を60で1時間反応させた。次に、ビーズを遠心分離し、反応溶液を吸引除去した。ビーズを1 × PBSバッファー (pH 7.4)中で、先に記載のものと同様の様式で洗浄した (5 × 1 mlのバッファー洗浄液を用いた溶媒交換)。

10

【0275】

次いで、オリゴ官能化ビーズを、空のマイクロアレイスライド (これは、1.2ミクロン孔で官能化)上に負荷した。スライドはUS6,770,441に記載のとおりにして調製した。ビーズは以下のようにして負荷した。ウェルを内包するスライドを、0.1N NaOH中に室温で5分間浸漬し、次いで、HPLC等級水流 (約100 ml)で激しく洗浄することにより事前に清浄にし、窒素流下で乾燥させた。次に、10 μlの200 プルーフのエタノール (Aldrich PN E7023)を100 μlのビーズ溶液に添加した。次いで、ビーズ溶液を顕微鏡スライドにピペットによって適用した。次に、スライドを、40 まで予備昇温させた真空炉内に入れ、スライドを30分間エバポレートした。残留ビーズを顕微鏡スライドの表面から、手作業でやさしくエタノール飽和キムワイプを適用することにより除去した。

20

【0276】

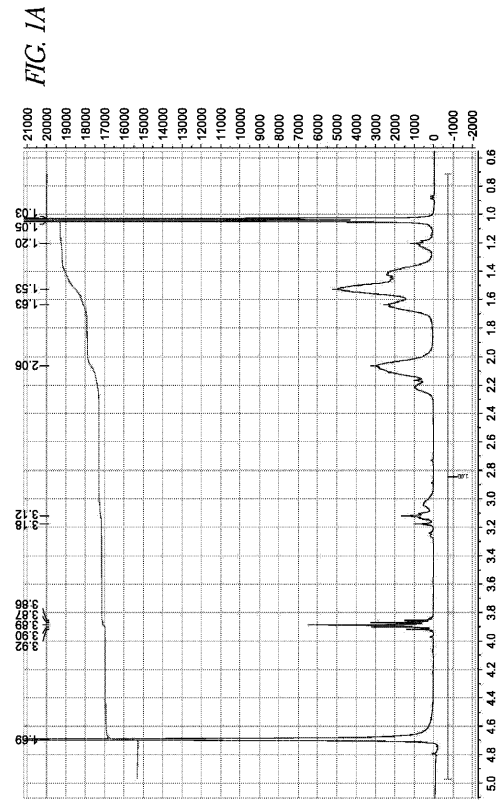
この様式で調製したスライドの1つに、10 μMの5'-色素標識 (好ましくは、Cy5)オリゴヌクレオチド (5 × SSCバッファー (Aldrich PN S6639)中)の溶液を、PAZAMグラフト化ビーズに固定化されたオリゴ体に対する逆相補とともに添加した。次いで、スライドをガラスカバースリップで覆った。スライドを室温で30分間ハイブリダイズさせた。次に、カバースリップをはずし、スライドを多量の5 × SSCバッファー流 (約100 ml)で洗浄した。最後に、このスライドに100 μlの5 × SSCバッファーを添加し、次いで、カバースリップとスライドをGE Typhoon FLA 9500で撮像し、Cy5色素チャンネル設定で500 PMT設定でスキャンした。

30

【0277】

この様式で調製した別のスライドに、ラバーガセットと別の顕微鏡スライド (これは、Illumina HiSeq 配列決定機器からの液体の導入が可能なようにガラス内の適切な位置に事前に孔をあけておいた)を加えた。次いで、DNAクラスターをスライド上で成長させ、クラスターを、HiSeq 2000 (Illumina Inc., San Diego, CA)の製造業者の使用説明書のとおり配列決定した。このスライドでは、クラスター1つあたり150 bpまでの試料DNAが配列決定され得ることが示された。

【図 1 A】



【図 1 B】

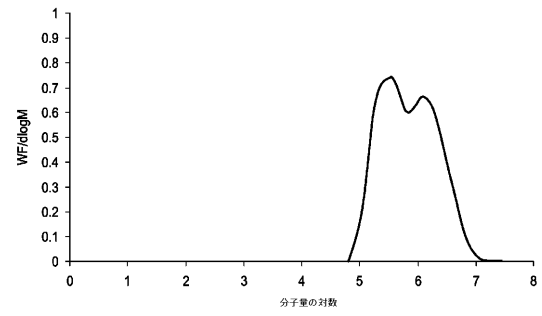
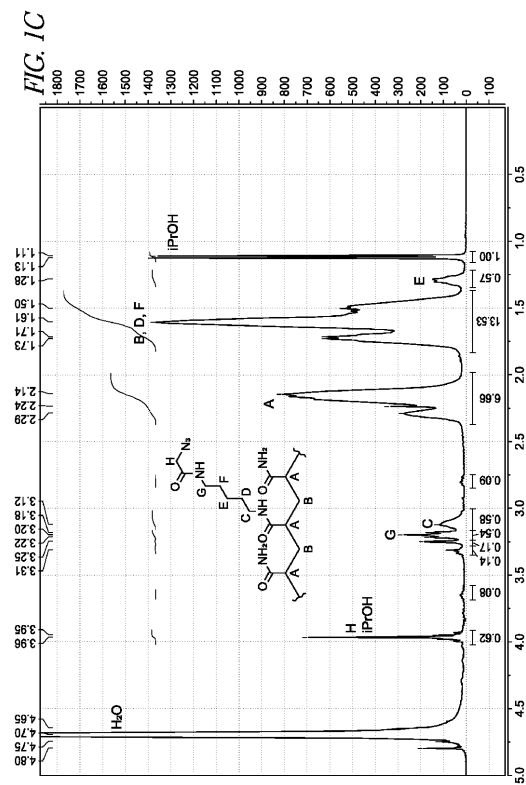


FIG. 1B

【図 1 C】



【図 2 A】

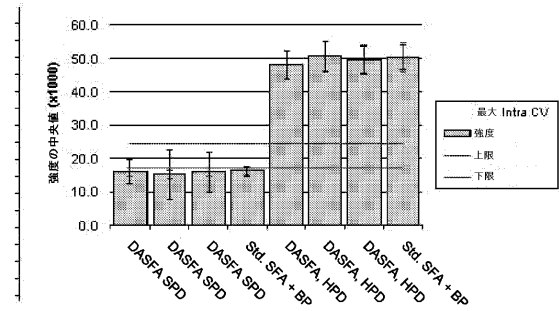


FIG. 2A

【図 2 B】

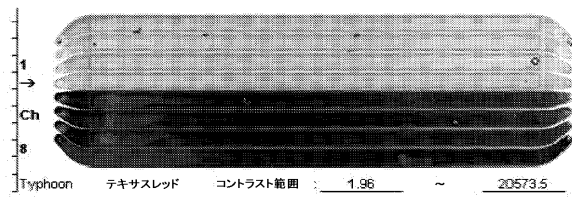


FIG. 2B

【図 3 A】

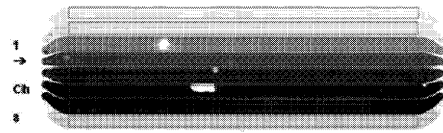


FIG. 3A

【図 3 B】

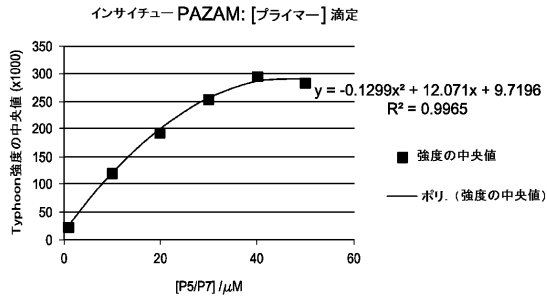


FIG. 3B

【図 4 A】

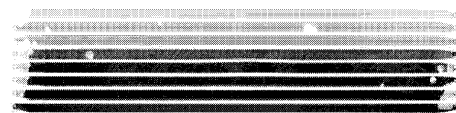


FIG. 4A

【図 7 B】

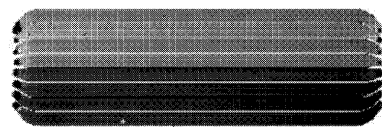


FIG. 7B

【図 4 B】

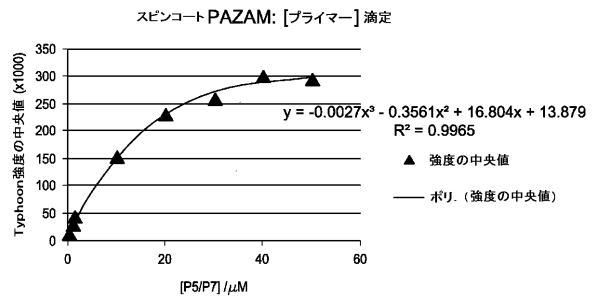


FIG. 4B

【図 7 A】

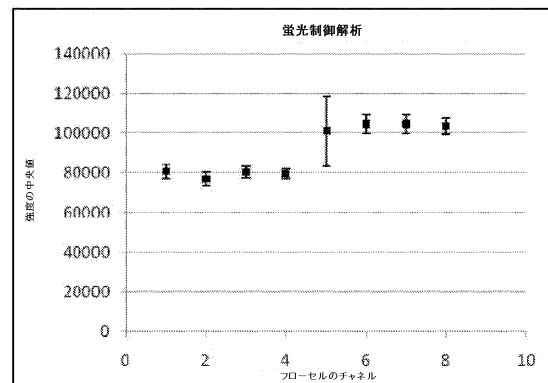
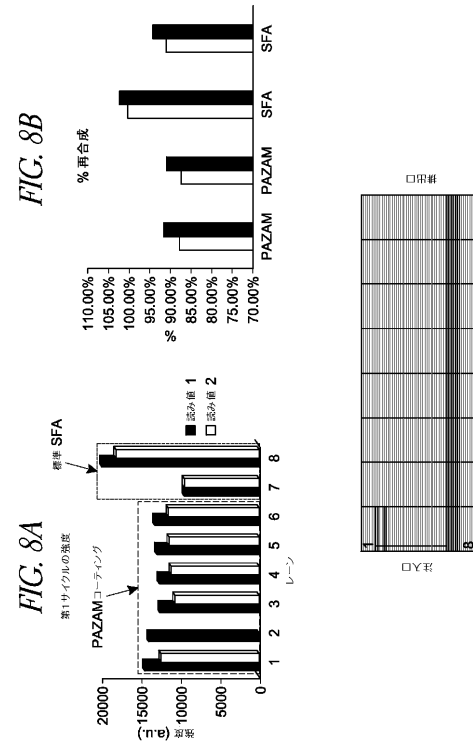
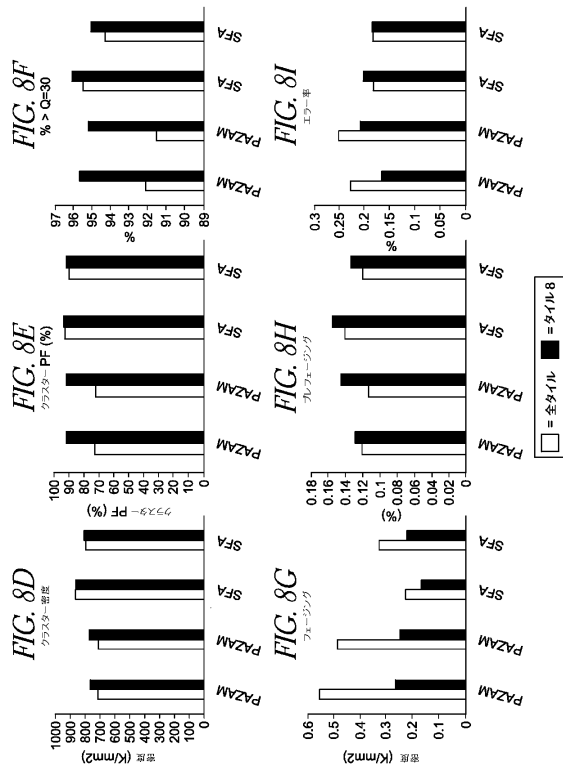


FIG. 7A

【図 8 - 1】



【図 8 - 2】



【図 9】



FIG. 9

【図 10 A】

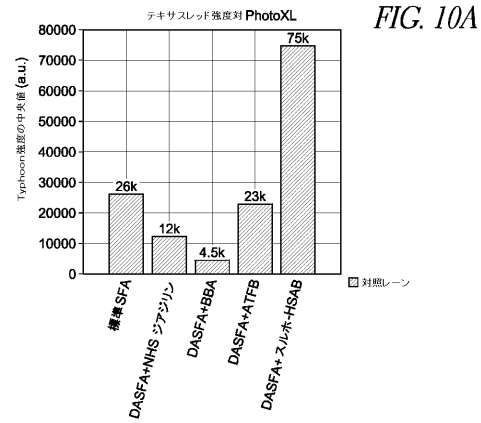


FIG. 10A

【図 10 B】

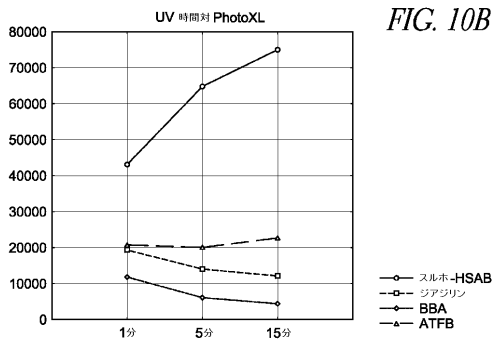


FIG. 10B

【図 11 A】

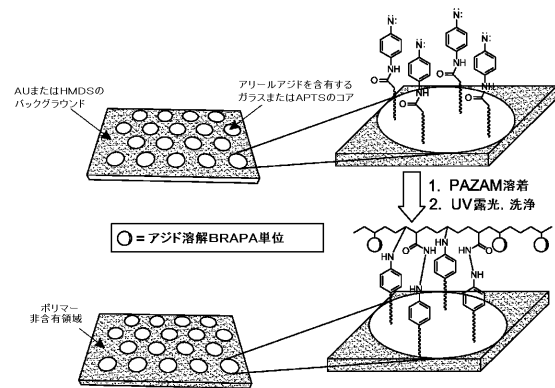


FIG. 11A

【図 11 B】

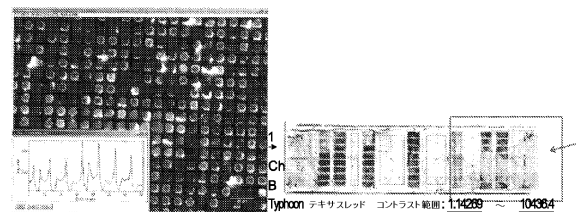


FIG. 11B

【図 1 2】

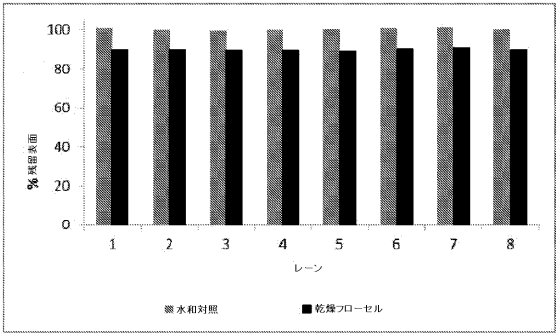


FIG. 12

【図 1 3 A】

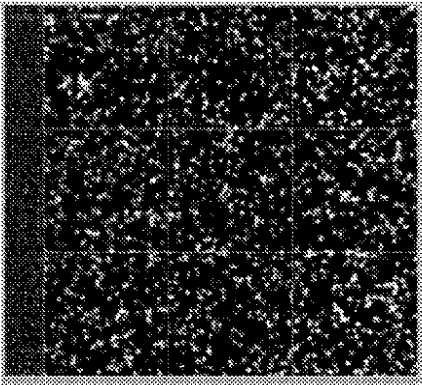


FIG. 13A

【図 1 3 B】

レーン	密度 (kg/m ³)	% PF	Phas/ Prep (%)	強度	20サイクル後の 初期%	% ≥ Q30	再合成%
1	174 ± 13	95.2 ± 6.3	0.233 / 0.251	15159 ± 2627	79.8 ± 3.0	98.8	85
2	178 ± 14	96.5 ± 3.1	0.230 / 0.239	16739 ± 2598	81.3 ± 4.4	98.8	89
3	161 ± 15	96.4 ± 2.9	0.211 / 0.242	13839 ± 1618	80.2 ± 3.6	99	85
4	170 ± 14	94.6 ± 7.8	0.267 / 0.232	16977 ± 2044	79.8 ± 6.4	98.6	88
5	101 ± 43	74.7 ± 31.0	0.250 / 0.257	9749 ± 6047	114.4 ± 97.1	97.3	97
6	136 ± 11	94.9 ± 9.5	0.265 / 0.252	15321 ± 1978	77.6 ± 4.1	98.6	84
7	120 ± 7	89.0 ± 24.4	0.138 / 0.201	14161 ± 1727	80.0 ± 2.3	87.5	42
8	132 ± 21	87.3 ± 20.3	0.221 / 0.258	13156 ± 2959	81.2 ± 13.8	98.7	85

FIG. 13B

【図 1 5】

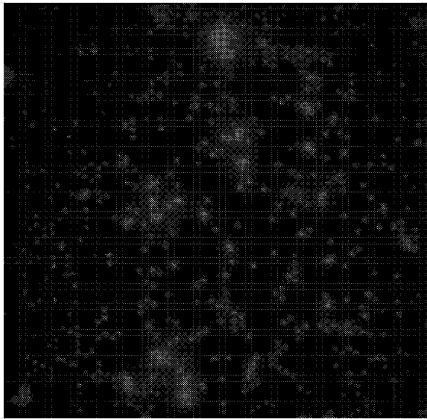


FIG. 15

【図 1 4】

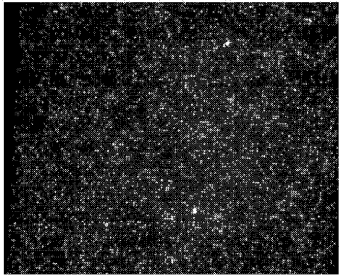


FIG. 14

【図 16】

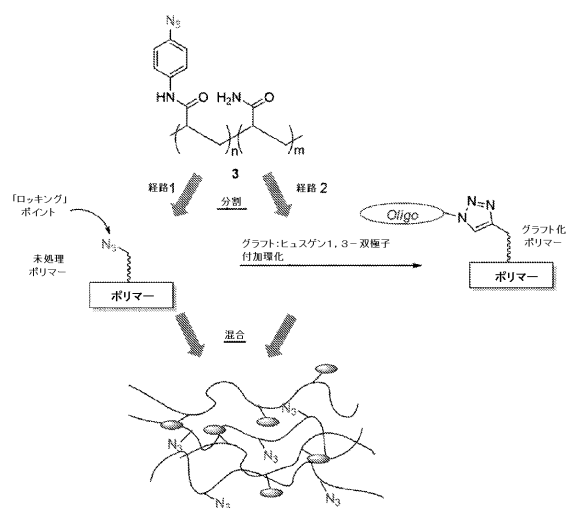


FIG. 16

【図 5 - 1】

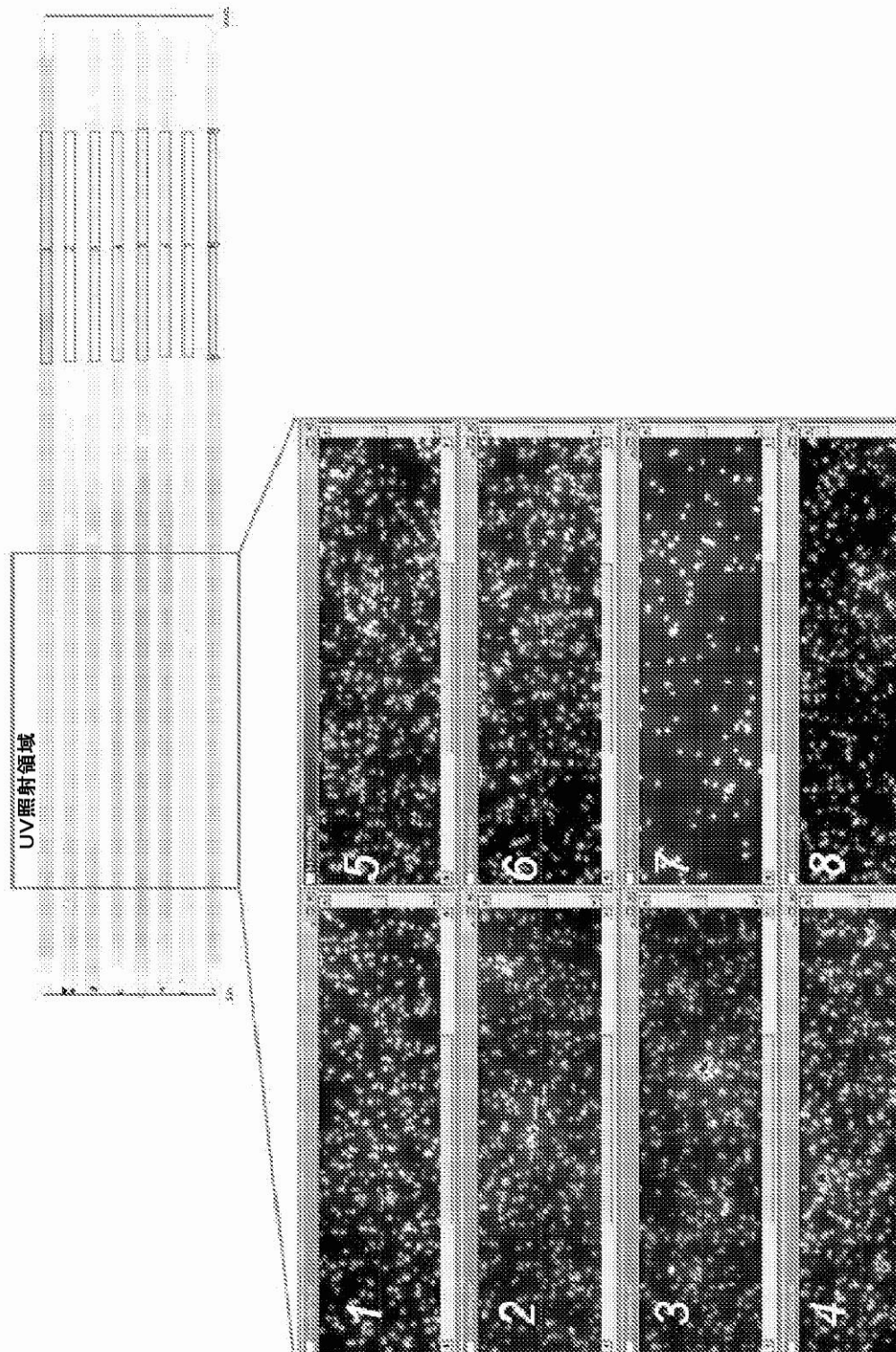
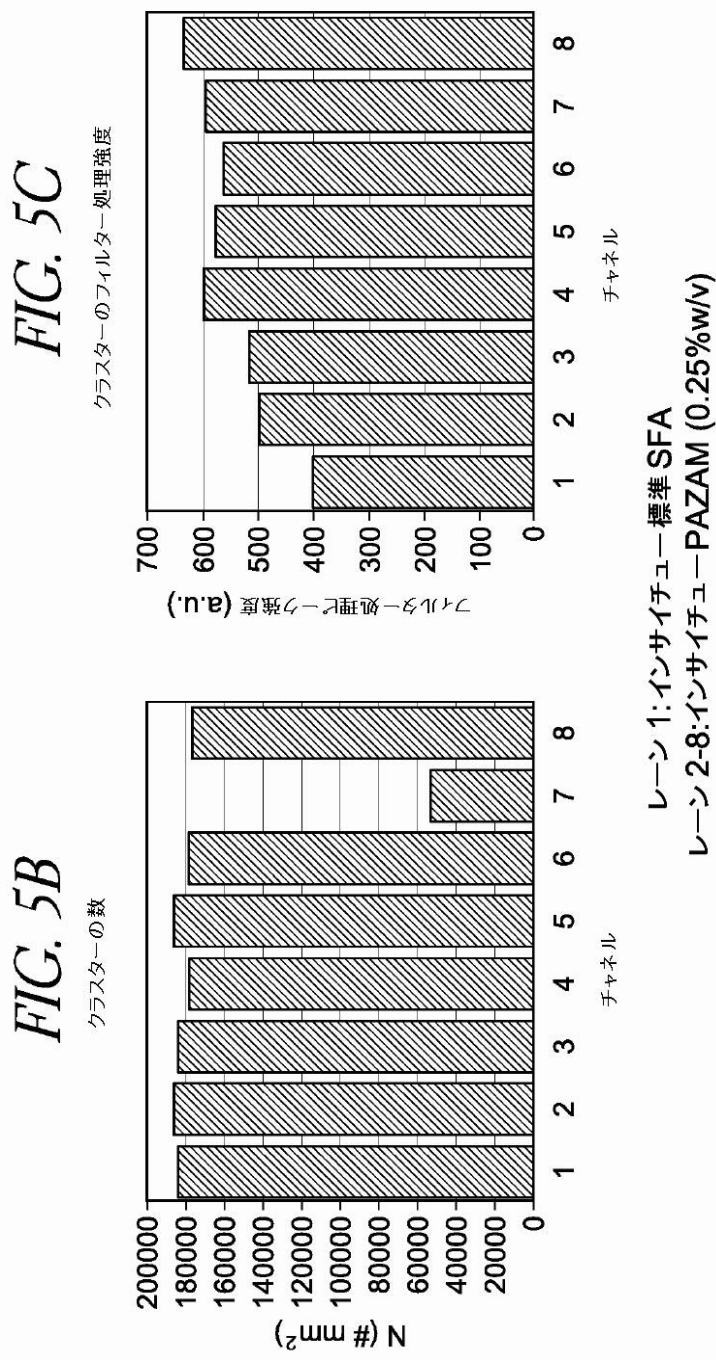
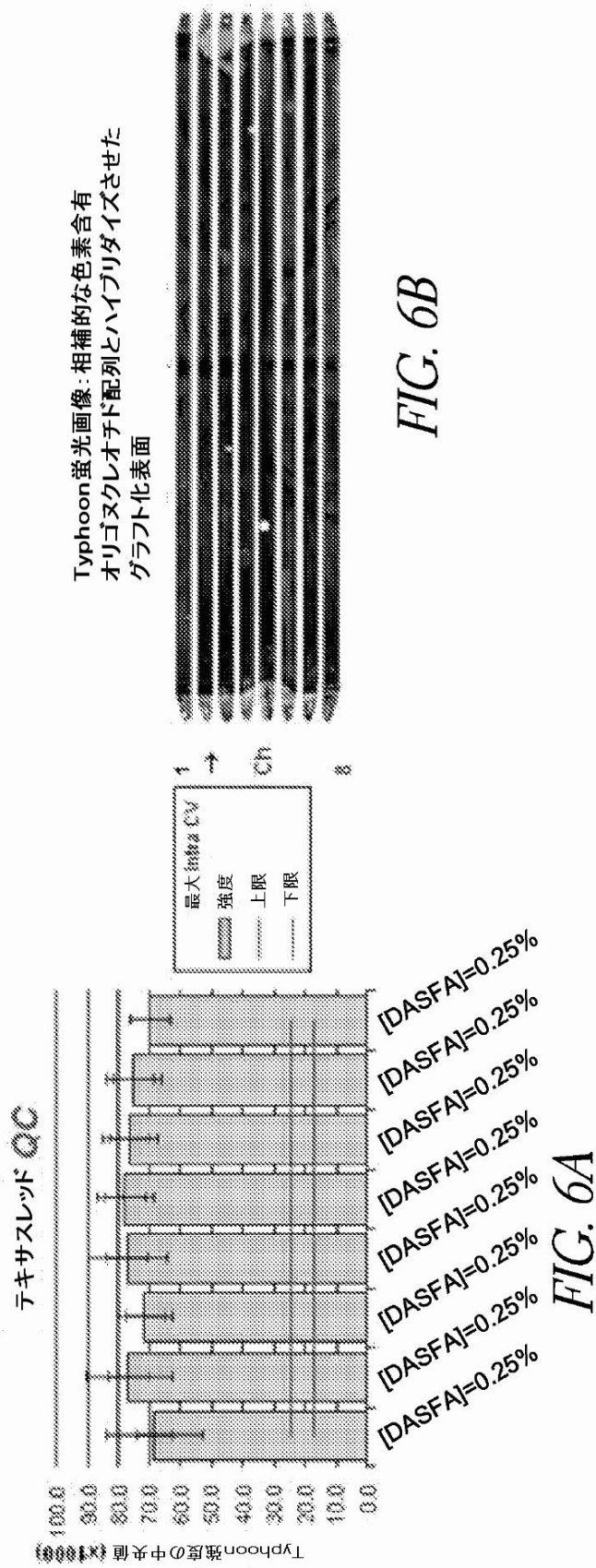


FIG. 5A

【図 5 - 2】



【図 6】



Typoon 蛍光画像: 相補的な色素含有
オリゴヌクレオチド配列とハイブリダイズさせた
グラフト化表面

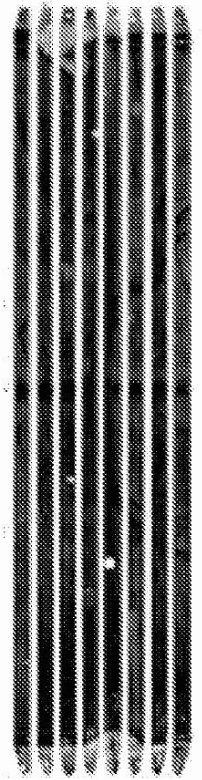


FIG. 6B

FIG. 6C



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 Z

(31)優先権主張番号 13/784,368

(32)優先日 平成25年3月4日(2013.3.4)

(33)優先権主張国 米国(US)

早期審査対象出願

- (72)発明者 ブラットン, ダニエル
イギリス国 シービー10 1エックスエル エセックス, エヌアール. サフラン ウェルデン, リトル チェスターフォード, チェスターフォード リサーチ パーク
- (72)発明者 ブラウン, アンドリュー エー.
イギリス国 シービー10 1エックスエル エセックス, エヌアール. サフラン ウェルデン, リトル チェスターフォード, チェスターフォード リサーチ パーク
- (72)発明者 レン, ホンジ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92122, サンディエゴ, イルミナ ウェイ 5200
- (72)発明者 スミス, ライアン シー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92122, サンディエゴ, イルミナ ウェイ 5200

審査官 ▲吉▼澤 英一

- (56)参考文献 特開2012-201634(JP,A)
国際公開第2009/099126(WO,A1)
特表平11-507105(JP,A)
特開平02-037350(JP,A)
特開昭54-135525(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
B32B 27/30
C03C 17/32
C08F 220/56
C08F 220/60
C09D 133/26
C12Q 1/68