

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-61511

(P2004-61511A)

(43) 公開日 平成16年2月26日(2004.2.26)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/53

GO 1 N 37/00

// C 1 2 N 15/09

F I

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/53

GO 1 N 37/00 1 O 2

C 1 2 N 15/00

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2003-278334 (P2003-278334)

(22) 出願日 平成15年7月23日 (2003.7.23)

(31) 優先権主張番号 206877

(32) 優先日 平成14年7月25日 (2002.7.25)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 399117121

アジレント・テクノロジーズ・インク

AGILENT TECHNOLOGIES,

INC.

アメリカ合衆国カリフォルニア州パロアル

ト ページ・ミル・ロード 395

395 Page Mill Road

Palo Alto, California

U. S. A.

(74) 代理人 100105913

弁理士 加藤 公久

(72) 発明者 ジョン・エス・ハーグレイブス

アメリカ合衆国カリフォルニア州マウンテ

ン・ビュー タイラー・パーク・ウェイ 1

467

(54) 【発明の名称】 リガンドアレイを生成するための方法

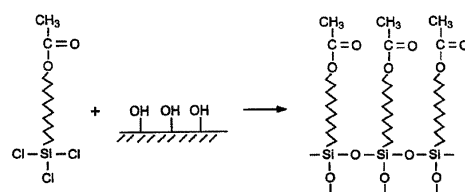
(57) 【要約】

【課題】リガンドを堆積させるため、安定した付着が可能であるような新規の方法を提供する。

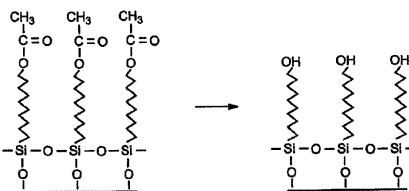
【解決手段】基質の表面に共有結合する少なくとも2つの異なるリガンドからなるアレイを生成する方法であって、(a) 酢酸基を含むシラン化剤に基質表面を接触させて、酢酸基の性質を示す表面を生じさせるステップと、(b) 前記表面における前記酢酸基をヒドロキシル基に置換するステップと、(c) ヒドロキシル基の性質を示す前記表面を少なくとも2つの異なるリガンドに接触させて、前記アレイが生成されるようにするステップを有する方法が提供される。当該方法は、ヒドロキシル基が接触時にリガンドと共有結合しない場合には、ヒドロキシル基をリガンド反応性官能基に置換するステップを更に含む。

【選択図】図1

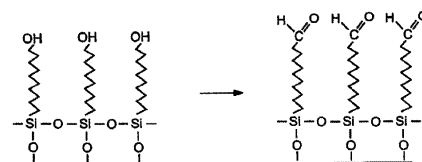
ステップ1: シラン化剤処理



ステップ2: 酸/アルカリ加水分解



ステップ3: Dess-Martin 試薬による反応



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

基質の表面に共有結合する少なくとも 2 つの異なるリガンドからなるアレイを生成する方法であって、

(a) 酢酸基を含むシラン化剤に基質表面を接触させて、酢酸基の性質を示す表面を生じさせるステップと、

(b) 前記表面における前記酢酸基をヒドロキシル基に置換するステップと、

(c) ヒドロキシル基の性質を示す前記表面を少なくとも 2 つの異なるリガンドに接触させて、前記アレイが生成されるようにするステップを有し、前記ヒドロキシル基が接触時に前記リガンドと共有結合しない場合には、前記ヒドロキシル基をリガンド反応性官能基に置換するステップを更に含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

前記シラン化剤に、アルキル鎖によって分離される末端シリル基と酢酸基が含まれることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記酢酸基が、加水分解によって前記ヒドロキシル基に置換されることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

基質の表面に共有結合する少なくとも 2 つの異なるリガンドからなるアレイを生成する方法であって、

20

(a) アルケン基を含む第 1 のシラン化剤に基質表面を接触させて、アルケン基の性質を示す表面を生じさせるステップと、

(b) 前記表面における前記アルケン基をカルボキシル基に置換するステップと、

(c) カルボキシル基の性質を示す前記表面をリガンドに接触させて、前記アレイが生成されるようにするステップを有し、前記カルボキシル基が接触時に前記リガンドと共有結合しない場合には、前記カルボキシル基をリガンド反応性官能基に置換するステップを更に含むことを特徴とする方法。

【請求項 5】

前記第 1 のシラン化剤に、アルキル鎖によって分離された末端シリル基とアルケニル基が含まれることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

30

【請求項 6】

前記アルケン基が、酸化によって前記カルボキシル基に置換されることを特徴とする、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記方法に、前記ヒドロキシルまたはカルボキシル基をリガンド反応性官能基に置換するステップを有することを特徴とする、先行請求項の任意の 1 つに記載の方法。

【請求項 8】

前記アルキル鎖が、長さが約 6 ないし約 20 の炭素原子であることを特徴とする、先行請求項の任意の 1 つに記載の方法。

【請求項 9】

40

前記基質がガラスであることを特徴とする、先行請求項の任意の 1 つに記載の方法。

【請求項 10】

先行請求項の任意の 1 つに記載の方法に従って生成されたりガンドアレイ。

【請求項 11】

試料中における検体の存在を検出する方法であって、

(a) 前記検体を含むと思われる試料と請求項 10 に記載のリガンドアレイを接触させるステップと、

(b) 前記アレイの表面において結合錯体を検出して、結合錯体データを取得するステップと、

(c) 前記結合錯体データを利用して、前記試料中における前記検体の存在を確認する

50

ステップを有することを特徴とする方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 1 に記載の方法によって得られる読み取り結果を表わしたデータを受信する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛋白質と核酸アレイを含む、リガンドアレイに関するものである。

【背景技術】

10

【0002】

核酸及びポリペプチドのような結合剤（リガンド）のアレイは、バイオテクノロジー産業及び関連分野においてますます重要なツールになってきた。複数の結合剤が、アレイまたはパターンの形をなすように固体支持表面に配置された、これらの結合剤またはリガンドアレイには、遺伝子発現解析、薬物スクリーニング、核酸アレイ決定、変異分析等を含む、さまざまな用途にその使い道がある。

【0003】

開発された多くのアレイのフィーチャは、アレイの各高分子化合物が、アレイ表面上の離散的な位置にしっかりと付着するので、アレイを利用する間中、その位置は一定のままであり、認識できるという点である。安定した付着は、重合体と支持表面の共有結合及び重合体と表面の非共有相互作用を含む、いくつかの異なる方法で実現可能である。

20

【0004】

例えば、核酸及びポリペプチドアレイの場合のように、アレイをなすリガンドが重合体である場合、こうしたアレイを生成する方法が2つ存在する。すなわち、基質表面に重合体リガンドを逐次成長させる原位置合成によるものと、例えば、アレイ表面にあらかじめ合成された核酸／ポリペプチド、cDNA断片等のような、完全なリガンドの堆積によるものである。所望の重合体リガンドが長い多くの状況では、基質表面上に完全なリガンドを堆積させる後者のプロトコルが望ましい。

【0005】

完全なリガンドがアレイ表面に堆積させられる、いくつかの異なるプロトコルが開発されているが、こうした方法には、ポリリシンがガラス支持体の表面に吸収されるもの、ガラス支持体の表面が、シリル化によって、さまざまな官能基の性質を示すように修飾されるもの等が含まれる。

30

【0006】

しかしながら、アレイ表面に完全なリガンドを堆積させることによってアレイを生成するための新規のプロトコルを開発することは、依然として問題のままである。

【0007】

【特許文献1】米国特許第6,319,674号明細書

【特許文献2】米国特許第6,258,454号明細書

【特許文献3】米国特許第6,387,631B1号明細書

40

【非特許文献1】Pomerantz他、「Thin Solid Films」、1985年、132号、p.153-162

【非特許文献2】Sudholter他、「Langmuir」、1998年、14号、p.1759-1768

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、リガンドを堆積させるための、安定した付着が可能であるような新規の方法を提供することをその目的とする。

【課題を解決するための手段】

50

【 0 0 0 9 】

ペプチド及び核酸アレイのようなリガンドアレイを生成するための方法、並びに、それによって生成されるアレイ、アレイの利用方法、及び、前述のものを含むキットが得られる。本発明の実施形態の1つの方法では、最初に、加水分解時に表面結合ヒドロキシル基を生成する酢酸基の性質を示す表面を備えた基質が、用意されるが、次に、酢酸基は、ヒドロキシル基に加水分解される。本方法のもう1つの実施態様では、最初に、アルケニル基の性質を示す表面を備えた基質が、用意されるが、次に、アルケニル基は、カルボキシル基に置換又は変換される。次に、オプションにより、さらなる官能化ステップの後、例えば、異なる各リガンドを表面の異なる領域に堆積させることによって、結果得られる基質とリガンドと接触させると、その表面に対する接触させたりガンドの共有結合性付着が生じる。本方法には、さまざまな異なるタイプのアレイの調製に使い道があるが、生成されたアレイには、ゲノム及びプロテオーム用途の両方を含む多種多様な用途に使い道がある。

10

【 0 0 1 0 】

即ち本発明は、基質の表面に共有結合する少なくとも2つの異なるリガンドからなるアレイを生成する方法であって、(a)酢酸基を含むシラン化剤に基質表面を接触させて、酢酸基の性質を示す表面を生じさせるステップと、(b)前記表面における前記酢酸基をヒドロキシル基に置換(又は変換)するステップと、(c)ヒドロキシル基の性質を示す前記表面を少なくとも2つの異なるリガンドに接触させて、前記アレイが生成されるようにするステップを有し、前記ヒドロキシル基が接触時に前記リガンドと共有結合しない場合には、前記ヒドロキシル基をリガンド反応性官能基に置換(又は変換)するステップを更に含むことを特徴とする方法を提供する。

20

【 0 0 1 1 】

好ましくは、前記シラン化剤に、アルキル鎖によって分離される末端シリル基と酢酸基が含まれる。

【 0 0 1 2 】

好ましくは、前記酢酸基は、加水分解によって前記ヒドロキシル基に置換される。

【 0 0 1 3 】

更に本発明は、基質の表面に共有結合する少なくとも2つの異なるリガンドからなるアレイを生成する方法であって、(a)アルケン基を含む第1のシラン化剤に基質表面を接触させて、アルケン基の性質を示す表面を生じさせるステップと、(b)前記表面における前記アルケン基をカルボキシル基に置換(又は変換)するステップと、(c)カルボキシル基の性質を示す前記表面をリガンドに接触させて、前記アレイが生成されるようにするステップを有し、前記カルボキシル基が接触時に前記リガンドと共有結合しない場合には、前記カルボキシル基をリガンド反応性官能基に置換(又は変換)するステップを更に含むことを特徴とする方法を提供する。

30

【 0 0 1 4 】

好ましくは、前記第1のシラン化剤に、アルキル鎖によって分離された末端シリル基とアルケニル基が含まれる。

【 0 0 1 5 】

好ましくは、前記アルケン基が、酸化によって前記カルボキシル基に置換される。

40

【 0 0 1 6 】

好ましくは、前記方法は、前記ヒドロキシルまたはカルボキシル基をリガンド反応性官能基に置換するステップを有する。

【 0 0 1 7 】

好ましくは、前記アルキル鎖が、長さが約6ないし約20の炭素原子とされる。

【 0 0 1 8 】

更に本発明は、試料中における検体の存在を検出する方法であって、(a)前記検体を含むと思われる試料と請求項10に記載のリガンドアレイを接触させるステップと、(b)前記アレイの表面において結合錯体を検出して、結合錯体データを取得するステップと

50

、(c)前記結合錯体データを利用して、前記試料中における前記検体の存在を確認するステップを有する方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

[定義]

まずは以下に本発明の説明に使用される各用語について説明する。

「重合体」という用語は、互いに共有結合した2つ以上の単量体単位から構成された任意の化合物を表わしており、単量体単位は、同じものでも、あるいは、異なるものでもかまわないので、重合体は、同種重合体または異種重合体とすることが可能である。典型的な重合体には、ペプチド、多糖類、核酸等があり、重合体は、自然発生のものであれば、合成のものもある。 10

【0020】

本明細書において用いられる「ペプチド」という用語は、あるアミノ酸の α カルボキシル基と別のアミノ酸の α アミノ基との間におけるアミド形成によって得られる任意の高分子化合物を表わしている。

【0021】

本明細書において用いられる「オリゴペプチド」という用語は、約10～約20未満の残基、すなわち、アミノ酸単量体単位を有するペプチドを表わしている。

【0022】

本明細書において用いられる「ポリペプチド」という用語は、10～20を超える残基を有するペプチドを表わしている。 20

【0023】

本明細書において用いられる「蛋白質」という用語は、特定のアレイをなす約50を超える残基からなるポリペプチドを表わしている。

【0024】

本明細書において用いられる「核酸」という用語は、例えば、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドといった、ヌクレオチド、または、例えば、ワトソン・クリック塩基対合相互作用に関与することが可能な、2つの自然発生核酸の場合に類似した特定のアレイ方法で、自然発生核酸と対合することが可能な、合成によって得られる化合物(例えば、米国特許第5,948,902号および引用される参考文献に記載のあるPNA)から構成される重合体を表わしている。 30

【0025】

本明細書において用いられる「リボ核酸」及び「RNA」という用語は、リボヌクレオチドから構成される重合体を表わしている。

【0026】

本明細書において用いられる「デオキシリボ核酸」及び「DNA」という用語は、デオキシリボヌクレオチドから構成される重合体を表わしている。

【0027】

本明細書において用いられる「オリゴヌクレオチド」という用語は、長さが約10～100から約200までのヌクレオチドからなる一本鎖のヌクレオチド多量体を表わしている。 40

【0028】

本明細書において用いられる「ポリヌクレオチド」という用語は、一般に、長さが100を超えるヌクレオチドのヌクレオチド単量体から構成される一本鎖または二本鎖重合体を表わしている。

【0029】

本明細書において用いられる「官能化」という用語は、基質表面に複数の官能基を生じさせる固体基質の修飾に関するものである。本明細書において用いられる「官能化表面」の意味するところは、複数の官能基が生じるように修飾された基質表面である。

【0030】

「アレイ」という用語は、「マイクロアレイ」という用語を包含しており、重合体、ポリヌクレオチド、ペプチド核酸等のようなリガンドとの結合のために提示された定序配列を表わしている。

【0031】

「反応部位」、「反応性官能基」、または、「反応基」という用語は、有機的合成プロセスにおける開始点として用いることが可能な、単量体、重合体、または、基質表面における部分を表わしている。これは、例えば、ポリエチレン・グリコール、ポリアミド等に関連した親水部位のような、基質表面上に生じる可能性のある「不活性」親水基と対照的である。

【0032】

「オリゴマ」という用語は、本明細書において、複数の単量体を含む化学物質を表わすために用いられている。本明細書で用いられる限りにおいて、「オリゴマ」及び「重合体」という用語は、一般に、必ずしもそうである必要はないが、とりわけ、コンビナトリアル・ケミストリ技法に関連して、本発明の官能化基質を用いて調製されるより小さい「重合体」であるので、交換可能に用いられる。オリゴマ及び重合体の例には、ポリデオキシリボヌクレオチド(DNA)、ポリリボヌクレオチド(RNA)、プリンまたはピリミジン塩基、ポリペプチド(蛋白質)、多糖類(デンプン、または、多糖)、及び、同様の化学構造の反復単位を含む他の化学物質のCグリコシドである他のポリヌクレオチドがある。本発明の実施において、オリゴマは、一般に、約2~50の単量体、できれば、約2~20、さらに望ましい場合には、3~10の単量体を含んでいる。

【0033】

本明細書において用いられる「リガンド」という用語は、問題となる化合物と共有結合または別様に化学結合することが可能な成分を表わしている。本方法において得られる個体支持リガンドのアレイは、スクリーニングまたは分離プロセスに用いられて、試料中の問題となる成分と結合することが可能である。本発明に関連した用語「リガンド」は、上に定義の「オリゴマ」の場合もあれば、そうでない場合もあり得る。ただし、本明細書で用いられる用語「リガンド」は、「あらかじめ合成された」または市販のものであって、後で、基質に付着させられた化合物をあらわす場合もあり得る。

【0034】

本明細書において用いられる「試料」という用語は、一般に、必ずしもそうである必要はないが、問題となる1つ以上の成分を含む流体の形態をなす材料または材料の混合物に関するものである。

【0035】

「ヌクレオシド」及び「ヌクレオチド」という用語は、既知のプリン及びピリミジン塩基だけではなく、修飾された他の複素環塩基も含有する成分を含むように意図されている。こうした修飾複素環塩基には、メチル化プリンまたはピリミジン、アシル化プリンまたはピリミジン、アルキル化リボース、または、他の複素環塩基が含まれる。さらに、「ヌクレオシド」及び「ヌクレオチド」という用語には、従来のリボース及びデオキシリボース糖だけではなく、他の糖類も含有する成分が含まれる。修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドには、例えば、1つ以上のヒドロキシル基がハロゲン原子または脂肪族基に置換される、または、エーテル、アミン糖等として官能化される、糖成分の修飾されたものも含まれる。

【0036】

本明細書において用いられる限りにおいて、「アミノ酸」という用語は、L、D、及び、非キラル形状の自然発生アミノ酸(アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グルシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン)だけではなく、例えば、4-ニトロフェニルアラニン、イソグルタミン酸、イソグルタミン、 ϵ -ニコチノイル・リジン、イソニペクチン酸、テトラヒドロイソキノリン酸、 α -アミノイソ酪酸、サルコシン、シトルリン、システイ

10

20

30

40

50

ン酸、t - ブチルグリシン、t - ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、β - アラニン、4 - アミノ酪酸等の、従来のオリゴペプチド合成に組み込むことが可能な他の化合物も含まれることを意図したものである。

【0037】

本明細書において用いられる「酢酸塩」という用語は、化学式 $O - (CO) - R'$ の多くの実施態様において酢酸基をあらわしているが、ここで、 R'' は、ヒドロキシル基を生成する官能基の酸加水分解を容認できないほど妨害しない任意の基とすることが可能である。実施態様によっては、酢酸基の化学式が次のようなものもある：



ここで：

【0038】

$R^1 R^2 R^3$ は、同じまたは異なるものとすることが可能であり、個別に、Hとするか、または、制限するわけではないが、ハロゲン、アルキオキシ、アリーロキシ、アルキル、アリール、ヘテロアルキル、ヘテロアリール等を含むいくつかの置換基から選択される。

【0039】

本明細書において用いられる限りにおいて、「アルキル」という用語は、1 ~ 24 の炭素原子による、置換または非置換、環状または線状、分枝または非分枝の飽和炭化水素基を表わしている。例を挙げると、メチル、エチル、n - プロピル、イソプロピル、n - ブチル、イソブチル、t - ブチル、オクチル、デシル、テトラデシル、ヘキサデシル、エイ

10

20

【0040】

本明細書において用いられる限りにおいて、「アルケニル」という用語は、1 ~ 24 の炭素原子による、置換または非置換、環状または線状、分枝または非分枝の非飽和炭化水素基を表わしている。例を挙げると、オクテニル、ノネニル、デセニル、ウンデセニル等、イソプロペニル、イソブテニル、イソペンテニル、オクテニル、イソプレニル等がある。

【0041】

本明細書において用いられる限りにおいて、「アルコキシ」という用語は、上述のように、Rがアルキルである、置換基 - O - Rを表わしている。アルコキシ基の例には、メトキシ、エトキシ、n - プロポキシ、イソプロポキシ、第2ブトキシ、第3ブトキシ等がある。

30

【0042】

「ハロゲン」または「ハロ」という用語は、クロロ、ブロモ、フルオロ、または、ヨード置換基、または、ジクロロ、クロロブロモ、ジクロロブロモ等のようなその組み合わせを表わすために用いられている。

【0043】

「シラン」または「シラン化剤」は、中心シリコン原子が4つの置換基に結合した化合物または試薬を表わしており、置換基は同じとすることも、異なるものとすることも可能である。

40

【0044】

「保護基」という用語は、反応条件に対して安定しているが、反応基を遮蔽する、または、反応基が化学反応に関与しないようにする化学成分を表わしている。保護基は、化合物の可溶性のような物理的特性を変更し、化合物が化学反応に関与できるようにすることも可能である。保護基の例については、Greene他、「Protective Groups in Organic Synthesis」、第2版、米国、John Wiley & Sons、1991年に記載がある。

【0045】

50

「オプションの」または「オプションにより」は、引き続き解説する状況が生じる場合もあれば、生じない場合もあり、従って、その説明には、その状況が生じる事例と、生じない事例が含まれるということを表わしている。例えば、「オプションにより置換される」という表現は、非水素置換基が、存在する場合もあれば、存在しない場合もあり、従って、解説には、非水素置換基が存在する構造、及び、非水素置換基が存在しない構造が含まれる。

【0046】

「加水分解」は、水、または、酸またはアルカリの水溶液との接触によって生じる反応を表わしており、反応の結果として、水または水溶液の求核原子による結合開裂及び置換が生じることになる。本発明の実施態様では、酢酸基が、加水分解を受けて、すなわち、加水分解されて、ヒドロキシル基を生じることになる。

10

【0047】

「アレイ」には、そのアドレス指定可能領域に関連した特定の化学成分（例えば、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドアレイ（核酸）、ポリペプチド（例えば、蛋白質）、炭水化物、脂質のような生体高分子）を有する前記領域の任意の2次元またはほぼ2次元（並びに3次元）構成が含まれる。最も広い意味において、望ましいアレイは、高分子結合剤のアレイであり、ここで、高分子結合剤は、ポリペプチド、蛋白質、核酸、多糖類、こうした生体高分子結合剤の合成模造物等の任意の1つとすることが可能である。問題となる多くの実施態様において、アレイは、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、cDNA、mRNA、その合成模造物等を含む、核酸のアレイである。アレイが核酸アレイである場合、核酸は、核酸鎖に沿った任意のポイントにおいてアレイに共有結合的に付着させることが可能であるが、一般には、それらの末端の1つ（例えば、3'または5'末端）に付着させられる。時には、アレイが、例えば、蛋白質またはその断片のようなポリペプチドのアレイといった場合もある。

20

【0048】

任意の特定の基質が、その表の面に配置された1つ、2つ、または、それ以上のアレイを備えることも可能である。用途に応じて、アレイのうち任意のものまたは全てが、互いに同じかまたは異なるものとすることが可能であり、各アレイには、複数のスポットまたはフィーチャを含むことが可能である。典型的なアレイは、 20 cm^2 未満の面積、あるいは、 10 cm^2 未満の面積内にさえ、10、100、1000、または、1万を超えるフィーチャ、あるいは、10万を超えるフィーチャさえ含むことが可能である。例えば、フィーチャの幅（すなわち、円形スポットの場合、直径）は、 $10\text{ }\mu\text{m}$ ～ 1.0 cm の範囲内とすることが可能である。他の実施態様では、各フィーチャの幅は、 $1.0\text{ }\mu\text{m}$ ～ 1.0 mm 、通常は、 $5.0\text{ }\mu\text{m}$ ～ $500\text{ }\mu\text{m}$ 、より一般的には、 $10\text{ }\mu\text{m}$ ～ $200\text{ }\mu\text{m}$ の範囲内とすることが可能である。非円形フィーチャは、前述の幅（直径）範囲を備えた円形フィーチャと同等の領域範囲を備えることが可能である。フィーチャの少なくとも一部または全ての組成が、異なっている（例えば、各フィーチャの組成の反復を除外すると、残りのフィーチャは、フィーチャの総数の少なくとも5%、10%、または、20%を占める可能性がある）。一般に（ただし、ほとんどというわけではないが）、ポリヌクレオチド（または、フィーチャを構成する他の生体高分子またはあるタイプの化学成分）のないフィーチャ間領域が生じることになる。こうしたフィーチャ間領域は、一般に、試薬の小滴付着を含むプロセスによって形成される場合に生じることになるが、例えば、フォトリソグラフィによるアレイ製作プロセスが用いられる場合には、生じない可能性がある。ただし、フィーチャ間領域は、生じる場合、さまざまなサイズ及び構成になる可能性があるのは明らかである。

30

40

【0049】

各アレイの占める面積は、 100 cm^2 未満、あるいは、 50 cm^2 未満、 10 cm^2 未満、または、 1 cm^2 未満の場合さえあり得る。多くの実施態様では、1つ以上のアレイを備える基質は、一般に、縦が 4 mm を超え、 1 m 未満、通常は、 4 mm を超え、 600 mm 未満、より一般的には、 400 mm 未満であり、横が、 4 mm を超え、 1 m 未満、

50

通常は、500mm未満、より一般的には400mm未満であり、厚さが、0.01mmを超え、5.0mm未満、通常は、0.1mmを超え、2mm未満、より一般的には、0.2mmを超え、1mm未満である、矩形の立体として整形されることになる（他の形状も可能であるが）。蛍光を検出することによって読み取られるアレイの場合、基質は、励起光の照射を受けると、弱い蛍光を放出する材料とすることが可能である。さらに、この状況において、ある領域に対する集束レーザ・ビームの移動があまりにも遅い場合には、入射する照射レーザ光の吸収を低減し、後続の加熱を抑えるため、基質は、比較的透明にすることが可能である。例えば、基質10が、表面に入射する照射光の積分スペクトル全体にわたって、あるいはまた、532nmまたは633nmにおいて測定可能な、こうした照射光の少なくとも20%または50%を（あるいは、少なくとも70%、90%、または、95%でさえ）透過することが可能である。 10

【0050】

アレイは、原位置製作の場合のポリヌクレオチド前駆体単位（単量体のような）、または、あらかじめ調達したポリヌクレオチドのパルス・ジェットによる小滴付着を利用して製作可能である。こうした方法については、例えば、本明細書において引用されている、米国特許第6,242,266号、米国特許第6,232,072号、米国特許第6,180,351号、米国特許第6,171,797号、米国特許第6,323,043号、Carén等によって1999年4月30日に出願された米国特許出願第09/302,898号および引用された参考文献にさらに詳細な記述がある。既述のように、これらの参考文献は、参考までに本明細書において援用されている。本明細書において既述のように、他の小滴付着法を利用して、製作することも可能である。また、米国特許第5,599,695号、米国特許第5,753,788号、米国特許第6,329,143号に記載のあるように、小滴付着法の代わりに、フォトリソグラフィによるアレイ製法を用いることも可能である。とりわけ、アレイが、前記特許に記載のフォトリソグラフィ法によって製作される場合には、フィーチャ間領域が存在する必要がない。 20

【0051】

アレイは、成分の異なる（例えば、ポリヌクレオチドアレイの異なる）複数領域を備えていて、そのアレイの特定の所定位置（すなわち、「アドレス」）にある領域（すなわち、アレイの「フィーチャ」または「スポット」）において、特定の標的または標的クラスが検出されることになる（あるフィーチャにおいて、そのフィーチャの非標的が偶然検出される可能性があるが）場合に、「アドレス指定可能」である。アレイのフィーチャは、一般に、そうである必要はないが、介在スペースによって分離される。あるアレイの場合、「標的」は、基質のさまざまな領域に結合されたプローブ（「標的プローブ」）によって検出される、移動相の成分（一般には流体）と規定される。しかし、「標的」または「標的プローブ」は、もう一方によって評価される一方とすることが可能である（従って、一方は、もう一方に結合することによって評価される未知のポリヌクレオチド混合物とすることが可能である）。「走査領域」は、上に定義の問題となるアレイスロットまたはフィーチャが見つかる、連続した（矩形が望ましい）領域を表わしている。走査領域は、結果生じる蛍光が検出され、記録されることになる、全照射領域の一部である。本発明の目的からして、問題となるフィーチャのない介在領域が存在する場合でも、走査領域には、問題となる最初のフィーチャと問題となる最後のフィーチャとの間における、レンズの各パス毎に走査される全スライド領域が含まれる。「アレイレイアウト」は、基質上におけるフィーチャの位置、1つ以上のフィーチャ寸法、及び、ある特定位置におけるある成分の指標といった、フィーチャの1つ以上の特性を表している。ポリヌクレオチドに関する「対合」及び「結合」は、交換可能に用いられる。 30 40

【0052】

「遠隔場所」の意味するところは、アレイが存在し、対合が生じる場所以外の場所ということである。例えば、遠隔場所は、同じ市内の別の場所（例えば、オフィス、実験室等）、異なる市内の別の場所、異なる州内の別の場所、異なる国内の別の場所等とすることが可能である。従って、ある物が、別の物から「遠隔」であると表わされる場合、その意 50

味するところは、２つの物が、少なくとも、異なる室内または異なる建物内にあり、少なくとも、１マイル、１０マイル、または、少なくとも、１００マイル離れている可能性があるということである。情報を「伝達する」は、適合する通信チャネル（例えば、プライベート・ネットワークまたは公衆通信回線）を介して、電気信号としてその情報を表わしたデータを伝送することを表わしている。物を「送る」は、その物を物理的に運ぶか、別様に運ぶか（それが可能な場合）はともかくとして、ある場所から次の場所へその物を運ぶことを表わしており、少なくとも、データの場合、データを納めた媒体を物理的に運ぶか、あるいは、データを伝達することが含まれる。アレイ「パッケージ」は、アレイに、アレイが配置される基質だけを加えたものとするのが可能であるが、パッケージには、他の構成（室を備えたハウジング）を含むことも可能である。「室」は、閉鎖された空間を表わしている（１つ以上のポートを通じて室に進入可能であるが）。また、本発明の説明全体を通じて、「上部」、「上方」、及び、「下方」といった語は、相対的に意味においてのみ利用される。

10

【００５３】

例えば、ペプチド及び核酸アレイといったリガンドアレイの生成方法、並びに、それによって生成されるアレイ、アレイの利用法、及び、それらを含むキットが得られる。本方法の実施態様の１つでは、加水分解時に表面結合したヒドロキシル基を生じる、酢酸基の性質を示す表面を備えた基質が最初に用意され、酢酸基は、次に、加水分解されて、ヒドロキシル基になる。本方法のもう１つの実施態様では、アルケニル基の性質を示す表面を備えた基質が最初に用意され、次に、アルケニル基は、カルボキシル基に置換される。次に、オプシオンにより、追加官能化ステップの後、例えば、異なる各リガンドを表面の異なる領域に堆積させることによって、結果得られる基質とリガンドと接触させると、その表面に対する接触させたリガンドの共有結合性付着が生じる。本方法には、さまざまな異なるタイプのアレイの調製に使い道があるが、生成されたアレイには、ゲノム及びプロテオーム用途の両方を含む多種多様な用途に使い道がある。

20

【００５４】

本発明についてさらに説明を行う前に、言うまでもないことではあるが、本発明は、後述する本発明の特定の実施態様に制限されるものではない。というのも、特定の実施態様に変更を加えることが可能であり、それでも、付属の請求の範囲内に含まれるからである。やはり言うまでもないが、用いられる用語は、特定の実施態様の解説を目的としたものであって、制限を意図したものではない。代わりに、本発明の範囲は、付属の請求項によって設定される。

30

【００５５】

この明細書及び付属の請求項において、「１つの」及び「その」といった単数形は、文脈において別段の明確な指示がない限り、複数のものへの言及も含まれている。別段の規定がない限り、本明細書において用いられる全ての技術及び科学用語は、本発明が属する当業者に一般に理解されているのと同じ意味を有するものである。

【００５６】

値域が示される場合、文脈において別段の明確な指示がない限り、下限の単位の１／１０までの、その値域の上限と下限の間の各介在値、及び、その規定範囲の他の任意の規定値または介在値は、本発明内に包含される。より小さい値域内に、これらより小さい値域の上限及び下限を別個に含むことが可能であり、やはり、規定の値域内において特に除外された任意の限界まで、本発明内に包含される。規定の値域に、上限及び下限の一方または両方が含まれる場合、含まれている上限及び下限の一方または両方を除外する値域も、本発明に包含される。

40

【００５７】

別段の規定がない限りにおいて、本明細書において用いられる全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者に一般に理解されているのと同じ意味を有するものである。本発明の実施またはテストには、本明細書に記載のものと同様またはそれらに相当する任意の方法、装置、及び、材料を利用することが可能であるが、次に、望ましい方法、装

50

置、及び、材料について述べることにする。

【0058】

本明細書で言及する全ての刊行物は、現在解説している発明に関連して用いることが可能な、前記刊行物に記載されている発明構成要素の説明及び開示のために、参考までに本明細書において援用されている。

【0059】

上記で要約のように、本発明によれば、基質の表面に共有結合された少なくとも2つの異なるリガンドからなるアレイを生成するための方法が得られる。実施態様の1つでは、本方法には、酢酸基の性質を示す表面を備える基質を用意するステップが含まれるが、他の1つの実施態様では、アルケニル基の性質を示す基質が用意される。用意された官能化基質の酢酸基及びアルケニル基は、次に、それぞれ、ヒドロキシル基及びカルボキシル基に置換される。置換ステップ（及び、オプションにより、さらなる官能化ステップ）の後、基質表面とリガンドを接触させると、結果として、リガンドと表面の共有結合が生じ、リガンドアレイが生成される。次に、以下では、これらのステップのそれぞれについて、さらに詳述することにする。

10

【0060】

[基質]

本方法では、固体基質表面が、まず、1つ以上のタイプのシランを含有する誘導体成分と接触させられるが、実施態様の1つでは、表面は酢酸官能シランと接触させられ、シランには、単一タイプのシラン化剤が含まれている。もう1つの実施態様では、表面は、少なくとも2つの異なるシランの混合物と接触させられるが、これらのシランの一方は、アルケニル・シランである。固体基質の表面は、基質表面に存在する反応性親水性成分を介して、シランを基質表面に結合させるのに有効な反応条件下において、1つ以上のシランと接触させられる。基質表面の反応性親水成分には、置換または非置換ヒドロキシル、カルボキシル、アルデヒド、チオール、アミノ基、または、親水成分の組み合わせ、すなわち、反応性親水成分が得られるようにするため、取り除くことが可能な保護基によって遮蔽された親水基が含まれている。

20

【0061】

基質には、その表面に複数の反応性親水部位を備える、または、その表面に複数のこうした部位を設けるため、処理またはコーティングを施すことが可能な、任意の材料を含むことが可能である。適合する材料には、制限するわけではないが、ガラス（とりわけ、制御ポア・ガラスすなわち「CPG」）、石英、シリコンまたは二酸化珪素で覆われたシリコン、セラミック、一般に、例えば、架橋重合体材料（例えば、ジビニルベンゼン・スチレン・ベースの重合体）、アガロース（例えば、SEPHAROSE（商標））、デキストラン（例えば、SEPHADEX（商標））、セルロース重合体、ポリアクリルアミドといった固相化学合成に用いられる支持材等が含まれる。これらの支持材は、市販されており、そのまま利用することもできるし、あるいは、官能化の前に、処理またはコーティングを施すことも可能である。基質表面は、一般に平面であるが、平面性が必要とされるわけではなく、表面は、アレイの形成に用いられるシラン化剤との接触に適した任意の幾何学形状とすることが可能である。

30

40

【0062】

実施態様によっては、基質表面が、1つ以上のシランのシラン化剤との接触前に、「クリーニング/ブライミング」を施されるものもある。これらの実施態様の一部には、表面が、シラン化剤との接触前に、溶剤と接触させられるものもある。表面との接触前に用意される溶剤は、少量の水でトルエン、ベンゼン等のような疎水性溶剤を溶解させることによって生成することが可能である。まず、表面を溶剤に接触させ、その後、シラン化剤を加えることが可能である。

【0063】

基質表面をシラン化剤との接触で誘導体化させることによって、官能化表面が得られる。さまざまなシラン化剤を用いることが可能である。シラン材料において既知のように、

50

基質表面におけるシランと親水成分との結合を容易にする、シランに関する入手しやすい離脱基である置換基が問題である。シランに関する離脱基である置換基の例には、制限するわけではないが、ハロゲン原子、アルコキシ基、アリアルオキシ基等がある。例えば、ヒドロキシシル基のような親水成分は、シランと反応し、シランの離脱基を置換して、基質表面とのシロキシ結合を形成する。十分な量の水が存在する中で、シラン化剤と基質表面が接触すると、例えば、約 100 ~ 約 300 $\mu\text{g/ml}$ のシリル化反応を生じることになる。

【0064】

本方法を用いて、より詳細に後述するように、利用されるシラン化剤及び誘導体化化学反応に応じて、重合体アレイに用いられるさまざまな官能化表面を形成することが可能である。本方法の実施態様の 1 つでは、第 1 のステップで、酢酸官能化基質表面が設けられる。もう 1 つの実施態様では、第 1 のステップで、修飾されたカルボン酸基質表面が設けられる。

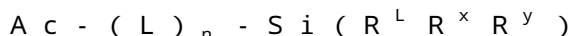
10

【0065】

[官能化酢酸気質表面の製法]

これらの実施態様では、誘導体化組成物に、単一タイプのシランが含有されており、シランには、例えば、さらに詳細に後述する、酸またはアルカリ加水分解条件のような、加水分解条件にさらされると、ヒドロキシシル基を生成する、例えば、酸またはアルカリ加水分解可能官能基のような、酢酸加水分解可能官能基が含まれる。誘導体化組成物には、単一タイプのシラン化剤が含まれており、この試薬は、一般に、リンカによって分離されたシリル及び酢酸末端基から構成されており、リンカは、長さが、約 6 ~ 約 20 で、約 8 ~ 約 18 の場合が多い、炭素原子による炭素鎖であることが多い。実施態様によっては、シラン化剤が下記の化学式によって表わされるものもある：

20



【0066】

上記化学式において、同じか、または、異なるものとするのが可能な、 R^{L} は、離脱基であり、同じか、または、異なるものとするのが可能な、 R^{X} 及び R^{Y} は、 R^{L} のような低アルキル基または離脱基である。すなわち、離脱基である R^{L} 成分によって、表面に対するシランの結合が可能になる。一般に、離脱基は、加水分解して、表面ヒドロキシシル基とのシロキシ結合を形成することが可能である。適合する離脱基の例には、制限するわけではないが、ハロゲン原子、とりわけ、クロロ、及び、アルコキシ成分、とりわけ、低アルコキシ成分が含まれる。 R^{X} 及び R^{Y} は、例えば、メチル、エチル、イソプロピル、*n*-プロピル、*t*-ブチル等のような低アルキル、または、 R^{L} に関連して述べたばかりの離脱基である。従って、各タイプのシランは、一般に、トリクロロシリル基、トリアルコキシシリル基性を含んでおり、ここで、アルコキシシリルは、トリメトキシシリルのような低アルコキシシリル基、または、ジイソプロピルクロロシリル、ジメチルクロロシリル、エチジクロロシリル、メチルエチルクロロシリル等のような混合官能基等である。

30

【0067】

基質表面と誘導体化組成物との反応は、シランと表面親水性成分の結合に有効な反応条件下において実施され、その結果、基質表面に $-\text{Si}-(\text{L})_n-\text{Ac}$ 基が得られる。シランは、結合すると、表面に $-\text{Si}-(\text{L})_n-\text{Ac}$ 基を生じるが、ここで、Ac は酢酸基である。

40

【0068】

Ac は、酸またはアルカリ加水分解条件にさらされると、ヒドロキシシル基 ($-\text{OH}$) を生じる任意の加水分解可能な酢酸基である、すなわち、Ac は、任意の酸またはアルカリ加水分解可能な酢酸基である。多くの実施態様において、酸またはアルカリ加水分解可能な酢酸基は、加水分解時に自由カルボン酸と、所望の表面結合ヒドロキシシル成分を生じる基である。

【0069】

上記実施態様の多くにおいて、Ac の化学式は次の通りである： $\text{O}-(\text{CO})-\text{R}'$ 。

50

ここで、 R' は、多くの実施態様において、上述のアルカリ基である。しかし、 R' は、さらに詳細に後述するように、ヒドロキシル基を生じる官能基の酸加水分解を容認できないほど妨げるもののない、任意の基とすることが可能である。実施態様によっては、酢酸基の化学式が次のようなものもある：



ここで：

R^1 、 R^2 、及び、 R^3 は、H 及びハロゲン、アルキオキシ、アリールオキシ、アルキル、アリール、ヘテロアルキル、ヘテロアリールから個別に選択される。

【0070】

L は、リンカを表わしており、n は 0 または 1 であるため、リンカが存在する場合もある。存在しない場合もある。リンカが存在する場合、それは、一般に、 C_{1-24} 炭化水素結合基になる。実施態様の 1 つでは、L は、 C_{10-18} アルキルのような、 C_{8-18} アルキルを含む、 C_{1-24} アルキルである。

【0071】

[酢酸基からヒドロキシル基への置換]

本方法の次のステップは、上述の基質表面上の加水分解可能な官能基をヒドロキシル基に置換することである。加水分解可能な官能基は、任意の都合の良いプロトコルを用いて、ヒドロキシル基に置換される。酸及びアルカリ加水分解プロトコルには、両方とも、本発明において使い道がある。

【0072】

実施態様によっては、加水分解可能な基からヒドロキシル基への置換に、酸加水分解が行われる場合がある。これらの実施態様において、基質表面は、酸加水分解可能な官能基をヒドロキシル基に置換する酸加水分解条件にさらされる。基質表面を酸加水分解条件にさらすため、一般に、酸加水分解を生じさせる条件下で、それに十分な時間期間にわたって、基板表面と酸性の水性液が接触させられる。接触は、例えば、酸性溶液を基質表面に配給したり、基質を水性液中に浸したり、ある量の水性液を基板表面に流したりといった、任意の都合の良いプロトコルを利用して実施可能である。接触は、例えば、室温～約 100、通常は、約 40～約 60 にわたる温度、約 10 分～約 6 時間、通常は、約 1 時間～約 2 時間にわたる時間期間といった、適正な条件下において実施される。酸性溶液の意味するところは、pH が約 7 未満、典型的には、1 程度の溶液である。この溶液には、1 つ以上の異なる酸、及び、その誘導体を含むことが可能である。例えば、鉍酸のような炭化水素成分のない適合する酸には、ハロゲン酸、酸素酸、及び、その混合物が含まれているが、ここで、このタイプの問題となる特定の酸には、制限するわけではないが、塩化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸、ホウ化水素酸、臭化水素酸、炭酸、及び、ヨウ化水素酸がある。こうした酸の場合、酸は濃縮酸でも、あるいは、希釈酸でもかまわない。問題となるのは、やはり、例えば、有機酸のような、炭化水素成分を含む酸であり、こうした酸には、制限するわけではないが、長さが 6 (C_{1-6}) の炭素の任意の有機酸が含まれる。このタイプの有機酸には、制限するわけではないが、蟻酸、酢酸、プロピオン酸、マレイン酸、ブタン酸、バレリアン酸、ヘキサン酸、フェノール酸、シクロペンタンカルボン酸、安息香酸、メタンスルフィン酸等が含まれている。有機酸の場合、酸は、濃縮形態でも、あるいは、希釈形態でもかまわない。酸性処理溶液は、一塩基酸または多塩基酸から構成することが可能である。酸は、置換可能な水素原子が 1 つしかなく、1 つの系列の塩（例えば、HCL）だけしか生じない場合、「一塩基酸」である。酸は、アルカリによって中和することが可能な 2 つ以上の水素原子を含有し、有機遊離基によって置換される場合、「多塩基」である。

【0073】

他の実施態様では、加水分解可能な官能基の加水分解は、アルカリ加水分解によって、すなわち、アルカリ加水分解条件を利用して実施される。基質表面をアルカリ加水分解条件にさらすため、一般に、アルカリ加水分解を生じさせる条件下で、それに十分な時間期間にわたって、基板表面とアルカリ性の液が接触させられる。接触は、例えば、ほぼ室温

～約100、通常は、ほぼ室温～約50にわたる温度、通常は、約5分～約2時間、一般には、約5分～約30分にわたる時間期間といった、適正な条件下において実施される。アルカリ溶液の意味するところは、pHが7を超える溶液である。この溶液には、1つ以上の異なるアルカリまたはその誘導体を含むことが可能である。適合するアルカリには、例えば、水に溶解する水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等、または、メタノール、エタノール等のようなアルコールに水酸化物を溶解させることによって形成される対応するアルコキシドが含まれる。アルカリは、重量百分率が1～50%、できれば、1～10%の溶剤中に溶解する。望ましい溶剤は、任意の有機アルコールまたは1つ以上のアルコール混合物によるメタノールまたはエタノールである、アルコールである。例えば、水溶液をなす水酸化ナトリウムといった、水性アルカリ溶液は、極めて容易に(1時間未満で)シロキサン表面(珪素原子が酸素原子を介して基質表面に付着するポイント)を破壊するのは周知のところであるが、これは、アルコール・ベースのアルカリには当てはまらない。実際、基質は、こうした溶剤に対して長い時間期間(それより長くないにしても、せめて3日を超える程度)にわたって安定している。従って、用いられるアルカリ加水分解条件は、一般に、アルコールをベースにしたアルカリ条件である。

10

【0074】

上記加水分解プロトコルの結果、加水分解可能官能基がヒドロキシル基に置換される。得られる特定の結果は、変動する可能性があるが、置換される初期加水分解可能官能基の百分率は、多くの実施態様において、加水分解可能官能基の初期数の少なくとも約5%、通常は、少なくとも約10%、より一般的には、少なくとも約20%の数百分率であるが、ここで、数百分率は、例えば、30、40、50、60、70、80、90、95、99といったより高い値にすることも可能である。結果得られるヒドロキシル基官能化表面は、すぐにリガンド共有結合性付着に用いることもできるし、あるいは、所望の場合には、リガンド付着の前に、さらに官能化することも可能である。例えば、多くの実施態様では、表面に共有結合的に付着させるリガンドは、ヒドロキシル基によって官能化することが可能であり、これによって、リガンド官能基と表面ヒドロキシル基の反応を介して、基質表面に対するリガンドの共有結合性付着が生じることになる。

20

【0075】

あるいはまた、ヒドロキシル基は、問題となるリガンドに反応するいくつかの異なるタイプの官能基、すなわち、リガンド反応性官能基に置換可能である。リガンド反応性官能基の意味するところは、リガンドと基質表面の共有結合を生じるように、標的リガンド(すなわち、表面に付着させ、共有結合させるリガンド)に存在する成分と反応する基である。ヒドロキシル基は、基質表面に共有結合させるリガンドの特定の性質に応じて、多種多様なプロトコルを用いて、多種多様なタイプの反応成分に置換することが可能である。初期ヒドロキシル基を置換することが可能な典型的なリガンド反応性官能基には、アルデヒド、アミン等がある。初期ヒドロキシル基が置換される特定のリガンド反応性官能基は、少なくとも部分的に、制限するわけではないが、リガンド及びそれに存在する可能性のある官能基の性質、置換のしやすさ等を含めた考慮事項に基づいて、選択されることになる。

30

【0076】

用いられる特定の置換プロトコルは、所望のリガンド反応性官能基の性質によって変動し、1つ以上の中間基の生成を伴う場合もあれば、伴わない場合もある。実施態様の1つでは、初期基質表面のヒドロキシル基は、例えば、一次アルコールが、穏やかな条件下において、特に、効率よく対応するアルデヒドに置換される、モファット酸化による、例えば、アルデヒド官能基への制御された酸化によって、アルデヒド官能基に置換される。これについては、P f t i z n e r 及び M o f f a t t、*「Comp. Org. Syn.」*、第7巻、1991年、p. 291、*「J. Amer. Chem. Soc.」*、第87巻、1965年、p. 5670-78に記載がある。さらにもう1つの実施態様では、表面ヒドロキシル基は、ベンズアルデヒド・ホスホラミダイトを利用して、アミン反応性ベンズアルデヒド官能基に置換される。すなわち、ヒドロキシル成分とベンズアルデヒド・ホス

40

50

ホラミダイトを反応させ、その後、ベンズアルデヒド成分の酸保護解除及びリン酸成分の塩基保護解除を施すことが可能である。こうしたプロトコルについては、国際公開第01/09385号、国際公開第09/364,320号に記載がある。

【0077】

上記のように、ヒドロキシ官能基の生成及び後続のヒドロキシ基の官能化の後、結果として得られるヒドロキシ官能化表面は、例えば、1つ以上の重合体リガンドが官能化表面と接触させられる重合体リガンド付着又はすぐ後にさらに詳述される現位置重合体リガンド合成によるアレイの製作に用いることが可能である。

【0078】

[官能化カルボン酸表面の調整]

これらの実施態様において、誘導体化組成物には、少なくとも1つのタイプのシランが含まれており、シランには、アルケニル基が含まれている。多くの実施態様では、誘導体化組成物には、2タイプのシラン、すなわち、 $R^1-Si(R^L R^X R^Y)$ で表わすことが可能な第1のシランと、化学式がアルケニル基- $(L)_n-Si(R^L R^X R^Y)$ の第2のシランを含むことが可能である。これらの化学式において、同じか、または、異なるものとすることが可能な R^L は、離脱基であり、同じか、または、異なるものとすることが可能な R^X 及び R^Y は、 R^L のような低アルキル基または離脱基である。 R^1 は、基質表面に結合すると、その表面エネルギーを低下させる化学的に不活性な成分であり、 n は0または1であり、 L は結合基であり、アルケニル基は、概略について既述の、さらに詳細に後述される、アルケニル基である。表面が単一タイプのシランとだけ接触させられる実施態様の場合、シランは、上述のアルケニル、シランである。基質表面と誘導体化組成物の反応は、シランと表面親水成分の結合に有効な反応条件下において実施され、その結果、基質表面に $-Si-R^1$ 基及び $-Si-(L)_n$ -アルケニル基が生じる。

【0079】

すなわち、離脱基である R^L 成分は、表面に対するシランの結合を可能にするものである。一般に、離脱基は、加水分解可能であり、表面ヒドロキシル基に対するシラノール結合を形成する。適合する離脱基の例には、制限するわけではないが、ハロゲン原子、とりわけ、クロロ成分、及び、アルコキシ成分、それも特に、低アルコキシ成分が含まれる。 R^X 及び R^Y は、例えば、メチル、エチル、イソプロピル、 n -プロピル、 t -ブチル等のような低アルキル、または、 R^L に関連して解説したばかりの離脱基である。従って、各タイプのシランには、一般に、トリクロロシリル官能基、トリアルコキシシリル官能基が含まれており、ここで、アルコキシシリルは、トリメトキシシリルのような低アルコキシシリル基、ジイソプロピルクロロシリル、ジメチルクロロシリル、エチルジクロロシリル、メチルエチルクロロシリルのような混合官能基等である。

【0080】

シランの混合物が誘導体化組成物を構成する実施態様において、第1のシランが、要望通りに表面エネルギーを低減する誘導体化剤であり、一方、第2のシランは、加水分解可能官能基ということになる。従って、第1のシランに関して、基質と結合すると、上述のように表面 $-Si-R^1$ 基が生じるが、ここで、 R^1 は、基質表面に結合すると、表面エネルギーを低下させる化学的に不活性な成分である。「化学的に不活性」の意味するところは、例えば、固相化学合成、ハイブリッド形成検定等といった、その意図する目的のために、官能化基質が用いられても、 R^1 が開裂または修飾されないということである。一般に、 R^1 は、アルキル基であるが、一般に、必ずしも、2~24の範囲内の炭素原子、できれば、10~18の範囲内の炭素原子を含んでいるとは限らない。

【0081】

第2のシランは、結合時に、表面 $-Si-(L)_n$ -アルケニル成分基を生じるが、ここで、 R^2 は加水分解可能官能基である。もちろん、 R^X 及び R^Y が離脱基でなければ、生じる表面成分は、実際には、出願人がより一般的な表現の $-Si-(L)_n$ -アルケニル成分によって網羅しようとする、 $-SiR^X R^Y-(L)_n$ -アルケニル成分基になる。

10

20

30

40

50

【0082】

アルケニル成分は、後述するように、カルボキシル基を生じる修飾に利用しやすい、炭素間二重結合を含む任意の基である。アルケニル成分には、長さが2～10の炭素原子の場合が多く、例えば、長さが2～4の炭素原子といった、長さが2～6の炭素原子の場合もある、炭化水素鎖が含まれるが、ここで、炭化水素鎖には、少なくとも1つの二重結合が含まれており、多いのは、単一二重結合を含む場合である。二重結合の位置は、変動する可能性があるので、鎖の中央に位置したり、あるいは、その末端に位置したりするが、多いのは、末端に位置する場合であり、さらに多いのは、シラン化剤のシリル基から最も遠い末端に位置する場合である。

【0083】

Lは、リンカを表わし、nは0または1であるので、リンカが存在する場合もあれば、存在しない場合もある。リンカが存在する場合、一般に、 $C_1 - C_{2-4}$ ヒドロカルビレン結合基になる。通常、Lは $C_1 - C_{2-4}$ アルキレンであり、 $C_{10} - C_{18}$ アルキレンが望ましい。

【0084】

誘導体化組成物との反応後の、基質表面におけるアルケニル基の密度は、誘導体化組成物における第1のシランと第2のシランの相対比率によって決まる。すなわち、誘導体化組成物内における第2のシランの比率が高いと、アルケニル基の密度が高くなり、一方、第1のシランの比率が高いと、アルケニル基の密度が低下することになる。最適なのは、第1のシランが、誘導体化組成物の約0wt.%～99.5wt.%の範囲内、できれば、誘導体化組成物の約20wt.%～90wt.%の範囲内で存在し、一方、第2のシランが、相応して、誘導体化組成物の約0.5wt.%～100wt.%の範囲内、できれば、誘導体化組成物の約10wt.%～80wt.%の範囲内で存在する場合であり、ここで、第1のシラン化剤対第2のシラン化剤の比が約1:1の場合が、一部の実施態様で問題になる。

【0085】

多くの実施態様では、官能化基質の結果生じる表面には、表面エネルギーと官能基の密度の両方を決める所定の比率で存在する、 $-Si-R^1$ と $Si-(L)_n-$ の両方のアルケニル基が含まれている。換言すれば、基質の官能表面は、酸またはアルカリ加水分解可能官能基の性質を示す。表面の一般的な誘導体化プロセスについては、米国特許第6,258,454号に記載がある。

【0086】

アルケニル基の性質を示す結果生じる表面は、一般に、さらに誘導体化されて、カルボン酸官能基の性質を示す表面が得られることになる。アルケニル基は、例えば、Whitesides 他による方法（例えば、Whiteside 他、「Langmuir」、第5巻、1989年、p.1074-1087参照）を利用して、遷移金属酸化剤によって（例えば、Carey 及び Sundberg、「Advanced Organic Chemistry」、第B巻、Plenum Press、1983年、p.511参照）、または、当該技術において既知の他の方法によって、カルボン酸基に置換することが可能である。上記ステップの結果、アルケニル基がカルボン酸官能基に置換されることになる。得られる特定の結果は、変動する可能性があるが、置換される初期アルケニル基の百分率は、多くの実施態様において少なくとも約5%、通常は、少なくとも約10%、より一般的には、少なくとも約20%の数百分率であるが、ここで、数百分率は、例えば、30、40、50、60、70、80、90、95、99といったより高い値にすることも可能である。結果得られるカルボキシル基官能化表面は、すぐにリガンド共有結合性付着に用いることもできるし、あるいは、所望の場合には、リガンド付着の前に、さらに官能化することも可能である。例えば、多くの実施態様では、表面に共有結合的に付着させるリガンドは、カルボン酸官能基によって官能化することが可能であり、これによって、リガンド官能基と表面カルボン酸官能基の反応を介して、基質表面に対するリガンドの共有結合性付着が生じることになる。

10

20

30

40

50

【0087】

あるいはまた、カルボキシル基は、問題となるリガンドに反応するいくつかの異なるタイプの官能基、すなわち、リガンド反応性官能基に置換可能である。リガンド反応性官能基の意味するところは、リガンドと基質表面の共有結合を生じるように、標的リガンド（すなわち、表面に付着させ、共有結合させるリガンド）に存在する成分と反応する基である。カルボキシル基は、基質表面に共有結合させるリガンドの特定の性質に応じて、多種多様なプロトコルを用いて、多種多様なタイプの反応成分に置換することが可能である。初期ヒドロキシル基を置換することが可能な典型的なリガンド反応性官能基には、ピリジン、ベンズイミダゾール、インドール、イミダゾール、チオフェン、イソキノリン、キナゾリン等があるが、これらに限定されるものではない。初期ヒドロキシル基が置換される特定のリガンド反応性官能基は、少なくとも部分的に、制限するわけではないが、リガンド及びそれに存在する可能性のある官能基の性質、置換のしやすさ等を含めた考慮事項に基づいて、選択されることになる。

10

【0088】

用いられる特定の置換プロトコルは、所望のリガンド反応性官能基の性質によって変動し、1つ以上の中間基の生成を伴う場合もあれば、伴わない場合もある。実施態様の1つでは、カルボキシル基上のヒドロキシル基は、さらに、ピリジン、ベンズイミダゾール、インドール、イミダゾール、チオフェン、イソキノリン、キナゾリン、アセトハライドを含む基から選択された、例えば、塩化アセチルのような基によるヒドロキシル基の置換によって誘導体化することが可能である。例えば、1,1'-カルボニルジイミダゾールのような、利用に適した、こうした求核性試薬を含む試薬は、当該技術において既知のところである。

20

【0089】

上述のように、カルボキシル基の生成、及び、後続のカルボキシル基の官能化の後、結果得られるヒドロキシル官能化表面は、例えば、1つ以上の重合体リガンドが官能化表面と接触させられる重合体リガンド付着、または、すぐ後にさらに詳述される現位置重合体リガンド合成による、アレイの製作に用いることが可能である。

【0090】

[官能化基質表面の特徴]

本発明によって得られる官能化表面の特徴は、とりわけ、リガンドアレイの製造における基質としての利用に適しているという点である。すなわち、対象となる官能化表面の接触角が、その表面を、例えばパルスジェット付着のような、リガンド液の付着によるアレイ製作に適したものに作る角度である。対象となる官能化表面基質の接触角は、一般に、少なくとも約45°で、多くは、少なくとも約50°であり、時には、少なくとも約60°、例えば、少なくとも約65°、少なくとも約70°、少なくとも約75°、少なくとも約80°、少なくとも約90°、少なくとも約99°等の場合もある。接触角は、後述する実験セクションに記載のプロトコルを利用して求められた、静的接触角度測定値である。

30

【0091】

[アレイ製作における重合体リガンド付着]

多くの実施態様では、上述のように調製される対象表面は、重合体リガンドを表面に付着させるアレイ製作に用いられる。これらの実施態様において、基質表面と接触させられるリガンドは、一般に、高分子結合剤である。高分子結合剤は、極めて多様であるが、唯一の制限は、高分子化合物が単量体のアレイをなすように、高分子結合剤が、2つ以上、通常は、複数の、順番に互いに共有結合的に付着した単量体単位から構成されるという点である。一般に、高分子結合剤には、少なくとも5つの単量体単位、通常は、少なくとも10の単量体単位、より一般的には、少なくとも15の単量体単位が含まれており、多くの実施態様において、重合体における単量体単位数は、5000以上もの多さになる可能性があるが、一般に、2000を超えるほどになることはない。実施態様の中には、高分子結合剤中の単量体の残存数が、少なくとも約50、通常は、少なくとも約100、より一

40

50

般的には、少なくとも約 150 というものもある。

【0092】

特に問題となる高分子結合剤には、ポリペプチド、核酸、多糖類等のような生重合体分子が含まれているが、ここで、ポリペプチド及び核酸、並びに、その合成模造物は、多くの実施態様において特に問題になる。

【0093】

多くの実施態様において、高分子結合剤は、DNA、RNA、1つ以上の合成または天然核酸からなる核酸等を含む、核酸である。核酸は、cDNA、mRNA、ペプチド核酸等を含む、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドとすることが可能である。高分子化合物が核酸の場合、核酸は、一般に、長さが、少なくとも約 5 nt (nucleotide)、通常は、少なくとも約 10 nt、より一般的には、少なくとも約 15 nt であり、ここで、核酸は、5000 nt 以上もの長さにすることも可能であるが、一般には、長さが約 3000 nt を超えることはなく、ほとんどの場合、長さが約 2000 nt を超えることはない。多くの実施態様では、核酸は、長さが、少なくとも約 25 nt であり、通常は、長さが、少なくとも約 50 nt であり、長さが、少なくとも約 100 nt という場合もあり得る。

10

【0094】

重合体は、基質表面に存在するリガンド反応性官能成分と反応して、リガンドと基質表面との間に共有結合を生じる官能成分を備えていることを特徴とする。リガンドは、天然に所望の反応性官能基を含んでいる場合もあるし、あるいは、所望の反応性官能基を含むように修飾することも可能である。問題となる典型的な反応性官能基には、制限するわけではないが、アミン基、ヒドロキシル基、スルフヒドリル、ホスホラミダイト、無水物等が含まれている。

20

【0095】

これらの方法に用いられる重合体は、任意の都合の良い技法を利用して調製することが可能である。当初は存在しない、必要な反応基を含むように重合体を調製する特定の手段は、重合体の性質、及び、重合体に組み込まれることになる反応基の性質によって決まる。

【0096】

上述のように、この方法を実施する場合、少なくとも2つの別個の重合体が、反応性リガンド官能基を生じる基質と接触させられる。別個のが意味するところは、2つの重合体が、単量体単位のアレイに関して互いに相違するということである。基質表面に接触させられる異なる重合体の数は、生成されるアレイの所望の性質、すなわち、重合体構造の所望の密度によって変動する可能性がある。一般に、アレイ表面に接触させられる別個の重合体数は、少なくとも約 5、通常は、少なくとも約 10、より一般的には、少なくとも約 100 であり、1,000,000 以上もの多さになる場合もあるが、多くの実施態様では、約 500,000 以下であり、実施態様によっては、約 100,000 以下の場合もある。

30

【0097】

重合体は、一般に、水性溶剤中で表面と接触させられるので、重合体が共有結合的に付着することになる表面位置に水溶性条件が確立される。接触中の温度は、一般に、約 10 ~ 約 60 の範囲であり、通常は、約 20 ~ 40 の範囲に及ぶ。初期接触後、重合体の水溶液は、一般に、所望の量の反応が生じるのに十分な時間期間にわたって維持されるが、この時間期間は、一般に、少なくとも約 20 秒、通常は、少なくとも約 1 分、さらに一般的には、少なくとも約 10 分であり、今時間期間が、20 分以上もの長さになる場合もある。

40

【0098】

各重合体は、一般に、水溶性組成物の一部として基質表面と接触させられる、すなわち、水性溶剤中の重合体の水溶性組成物が、アレイの表面と接触させられる。水性溶剤は、水単独の場合もあれば、あるいは、有機溶剤等のような補助溶剤と組み合わせた水の場合

50

もあり得る。水溶性組成物には、酢酸、モノクロロ酢酸、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸、アセトニトリル、例えば、硫酸トリフルオロメチルランタニド(III)、塩化リチウムといった触媒、例えば、燐酸ナトリウム、塩、金属カチオン、界面活性剤、酵素等といった緩衝剤を含む1つ以上の付加作用物質を含有することも可能である。

【0099】

水溶性重合体組成物は、任意の従来のプロトコルを用いて表面と接触させることが可能である。一般に、水溶性重合体組成物は、基質表面に水溶性重合体組成物を付着させることによって表面と接触させられる。例えば、ピペットによって手で、または、自動機械または装置を用いて、ある量の水溶性組成物を付着させることが可能である。支持表面の正確な位置に水溶液を付着させるために、いくつかの装置及びプロトコルが開発されており、本方法において用いることが可能である。こうした装置には、「パルスジェット」印刷装置、機械的付着またはピペット装置等が含まれる。例えば、米国特許第4,877,745号、米国特許第5,338,688号、米国特許第5,474,796号、米国特許第5,449,754号、米国特許第5,658,802号、米国特許第5,700,637号、米国特許第5,807,552号参照。これらは参照により本明細書に組み込まれる。支持表面の離散的な位置にある量の水溶性組成物を正確に付着させるためのロボット装置、すなわち、アレイ装置も、Genetic Microsystems、Cartesian Technologies、Beecher Instrument、Genomic Solutions、及び、BioRoboticsを含むいくつかの専門業者から市販されている。

10

20

【0100】

付着させる液量は、変動する可能性がある。例えば、約1nl~1plの範囲の量、通常は、約60~100nlの範囲の量を基板表面に付着させることが可能である。上述の、ある時間期間にわたる、所望の反応を生じさせるのに十分な条件下における接触及び温置後、結果得られるアレイの表面には、後述するように、用途に合わせてアレイを調製するため、要望に応じたさらなる処理を加えることが可能である。従って、アレイ表面を洗浄して、例えば、非反応重合体等のような非結合試薬を除去することが可能である。例えば、水、メタノール、アセトニトリル等のような洗浄水溶液をアレイ表面に流すといったような、任意の好都合な洗浄溶液及びプロトコルを用いることが可能である。表面は、後続の利用等に備えて、乾燥させて、保管することも可能である。

30

【0101】

アレイ製作に関する上述のプロトコルを実施することが可能な装置については、米国特許第6,242,266号、米国特許第6,232,072号、米国特許第6,180,351号に記載がある。これらは参照により本明細書に組み込まれる。

【0102】

[アレイ製作におけるインサイチュ(in-situ)合成]

上述のように、ヒドロキシル基の性質を示す基質表面は、現位置リガンド合成用途にも用いることが可能である。インサイチュ合成法については、米国特許第5,449,754号(アレイの合成)、国際公開第98/41531号(燐光体アミド等を使用するポリヌクレオチド(すなわちDNA)の合成)に記載がある。こうしたインサイチュ合成法は、(a)基質の所定位置に保護単量体を付着させて、適正に活性化された基質表面(または前に付着させた保護解除単量体)と結合させるステップと、(b)付着した単量体を保護解除して、これにより、引き続き付着させられる保護単量体と反応可能にするステップと、(c)もう1つの保護単量体を付着させて、結合させるステップからなる手順の繰り返しとみなすことが可能である。どの1サイクルにおいても、基質の異なる領域に異なる単量体を付着させて、完成したアレイの異なる領域が、完成したアレイにおいて要望されるところに従って、異なる生重合体アレイを備えるようにすることが可能である。さらに、各繰り返し毎に、酸化及び洗浄ステップといった、1つ以上の中間ステップが必要になる可能性がある。基質表面は、米国特許第6,329,143号に解説のものを含む、周知の光照射による現位置重合体アレイ合成プロトコルに用いることも可能である。

40

50

【0103】

上述のプロトコルによれば、さらに詳細に後述するように、多種多様な用途に用いることが可能なりガンドアレイが得られる。

【0104】

[アレイ]

本発明によれば、上述の方法に従って得られる高分子結合剤のアレイも生成される。これらのアレイには、基質表面の異なる既知の位置に、例えば共有結合によって固定化された単量体アレイが相違する、少なくとも2つの別個の重合体が含まれている。実施態様によっては、アレイの別個の各重合体アレイが、一般に、基質表面上の重合体の複数コピーの組成物として、例えば、基質表面上のスポットして存在するものもある。アレイ上に存在する別個の重合体アレイ、従って、スポットまたは同様の構造の数は、変動する可能性があるが、一般には、少なくとも2、通常は、少なくとも5、より一般的には、少なくとも10であり、アレイ上における異なるスポットの数は、アレイの意図された用途に従って、50、100、500、1000、或いは10,000以上もの多さになる可能性がある。アレイ表面に存在する別個の重合体スポットは、一般にパターンとして存在し、パターンは、例えば、基質表面におけるスポットのグリッドのような、スポットの編成された行列、例えば、一連の同心円または半円をなすスポットのような、基質表面上の一連の曲線状の列といった形をとることが可能である。アレイ表面上に存在するスポットの密度は、変動する可能性があるが、一般には、少なくとも約10スポット/cm²、通常は、少なくとも約100スポット/cm²であり、密度は、10⁶スポット/cm²以上もの高さになる可能性もあるが、一般には、10⁵スポット/cm²以下である。他の実施態様には、重合体アレイは、別個のスポットの形では配列されず、重合体アレイ/フィーチャを互いに分離するスペースがほとんどなくなるように、表面上に配置することが可能なものもある。

10

20

【0105】

最も広い意味において、本発明のアレイは、高分子結合剤のアレイであり、高分子結合剤は、ペプチド、蛋白質、核酸、多糖類、こうした生重合体結合剤の合成模造物等のうちの任意の1つとすることが可能である。問題となる多くの実施態様において、アレイは、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、cDNA、mRNA、及び、その合成模造物等を含む核酸のアレイである。アレイが核酸アレイの場合、核酸は、核酸鎖に沿った任意のポイントにおいてアレイに共有結合的に付着させることが可能であるが、一般に、例えば、3'または5'末端のような末端の1つに付着させられる。他の実施態様には、例えば、蛋白質またはその断片のようなポリペプチドアレイもある。

30

【0106】

[有用性]

アレイには、多種多様な用途に使い道があるが、こうした用途は、一般に、ある特定の試料中における分析物の存在が、定量的にではなくても、少なくとも定性的に検出される、分析物検出用途である。こうした検定を実施するためのプロトコルは、当業者にとって周知のところであり、ここではこれ以上詳述する必要はない。一般に、問題となる分析物を含むのではないかと思われる試料が、分析物がアレイに存在するそれぞれの結合対をなす要素に結合するのに十分な条件下において、本方法に従って生成されたアレイと接触させられる。従って、問題となる分析物が、試料中に存在する場合、その相補性結合要素の部位においてアレイに結合し、アレイ表面に錯体が形成される。次に、アレイ表面上におけるこの結合錯体の存在が、例えば、分析物上に存在する同位体または蛍光標識等のような信号発生システムを用いて検出される。次に、試料中における分析物の存在が、基質表面の結合錯体の検出から推論される。

40

【0107】

問題となる特定の分析物検出には、本発明の核酸アレイが用いられる、ハイブリッド形成検定が含まれる。これらの検定では、まず、標的核酸の試料が調製されるが、この調製には、例えば、信号発生システムの要素である標識による標的核酸の標識付けを含むこと

50

が可能である。試料の調製後、ハイブリッド形成条件下において、試料とアレイが接触させられ、その結果、アレイ表面に付着したプローブアレイと相補性の標的核酸間に、錯体が形成される。次に、ハイブリッド形成された錯体の存在が検出される。アレイを用いて実施可能な、問題となる特定のハイブリッド形成検定には、遺伝子発見検定、差次的遺伝子発現分析検定、核酸アレイ検定等が含まれる。米国特許第5,143,854号、米国特許第5,288,644号、米国特許第5,324,633号、米国特許第5,432,049号、米国特許第5,470,710号、米国特許第5,492,806号、米国特許第5,503,980号、米国特許第5,510,270号、米国特許第5,525,464号、米国特許第5,547,839号、米国特許第5,580,732号、米国特許第5,661,028号、米国特許第5,800,992号には、さまざまな用途にアレイを用いる方法について記載のものがあ

10

【0108】

アレイが、例えば、蛋白質アレイのようなポリペプチド結合剤のアレイである場合、問題となる特定の用途には、分析物検出/プロテオミクス用途が含まれ、米国特許第4,591,570号、米国特許第5,171,695号、米国特許第5,436,170号、米国特許第5,486,452号、米国特許第5,532,128号、米国特許第6,197,599号、国際公開第99/39210号、国際公開第00/04832号、国際公開第00/04389号、国際公開第00/04390号、国際公開第00/54046号、国際公開第00/63701号、国際公開第01/14425号、国際公開第01

20

【0109】

実施態様によっては、方法に、上述の検出ステップ、及び、推論ステップの少なくとも一方によるデータを遠隔場所へ送信するステップが含まれている。「遠隔場所」の意味するところは、アレイが存在し、ハイブリッド形成が生じる場所以外のものである。例えば、遠隔場所は、同じ市内の別の場所（例えば、オフィス、実験室等）、異なる市内の別の場所、異なる州の別の場所、異なる国の別の場所等とすることが可能である。従って、ある物が別の物から「遠隔」であると表わされる場合、その意味するところは、その2つの物が、少なくとも、異なる建物内にあり、少なくとも、1マイル、10マイル、または、少なくとも、100マイル離れている可能性があるということになる。情報を「伝達する」は、適合する通信チャネル（例えば、プライベート・ネットワークまたは公衆通信回線）を介して、電気信号としてその情報を表わしたデータを伝送することを表わしている。物を「送る」は、その物を物理的に運ぶか、別様に運ぶか（それが可能な場合）はともかくとして、ある場所から次の場所へその物を運ぶことを表わしており、少なくとも、データの場合、データを納めた媒体を物理的に運ぶか、あるいは、データを伝達することが含まれる。データは、さらに評価及び/または利用のため、遠隔場所へ伝送することが可能である。データの伝送には、例えば、ファクシミリ、モデム、インターネット等のような、任意の都合の良い遠隔通信手段を用いることが可能である。

30

【0110】

従って、本発明の方法によって製作されるアレイを利用する場合、アレイは、一般に、試料にさらされ（例えば、試料を含む蛋白質のような蛍光標識分析物）、それから、アレイの読み取りが行われる。アレイの読み取りは、アレイに光照射し、アレイの各フィーチャ毎に結果生じる蛍光の位置と強度を読み取って、アレイ表面にある結合錯体を検出することによって実施される。例えば、このために、本願出願人である米国カリフォルニア州パロアルトのアジレント・テクノロジー社から入手可能なAGILENT MICROARRAY SCANNERと同様のスキャナを用いることが可能である。他の適合する装置及び方法については、米国特許出願第09/846125号（Dorsei等、「多目アレイの読み取り」、米国特許出願第09/430214号（Dorsei等、「多目アレイの応答」）に記載がある。前述のように、これらの参考文献は、参考までに本明細書において援用されている。しかし、アレイは、前述のもの以外の方法及び装置によって読み

40

50

取ることが可能であり、他の読み取り方法には、他の光学的技法（例えば、化学発光または電気発光標識）または電氣的技法（各フィーチャに、米国特許第6,221,583号に開示されているように、そのフィーチャのハイブリッド形成を検出するための電極が設けられる）が含まれる。読み取り結果は、生結果の場合もあるし（1つ以上のカラーチャネルにおける各フィーチャに関する蛍光強度読み取り値のような）、あるいは、所定のしきい値未満のフィーチャ読み取り値の排除、及び/または、アレイから読み取ったパターンに基づく結論付け（試料中における特定の標的アレイの有無といった）によって得られるような処理結果の場合もあり得る。読み取り結果（処理されたものか否かはともかく）は、所望であれば、遠隔場所へ送り（例えば通信によって）、そこで受信して、さらに利用する（例えばさらに処理を施す）ことも可能である。

10

【0111】

[キット]

分析物検出の検定に用いられるキットも用意される。キットには、少なくとも、本発明のアレイが含まれる。キットには、さらに、試料調製試薬、緩衝液、標識等のような、分析物検出の検定を実施するのに必要な1つ以上の追加構成成分を含むことも可能である。従って、キットには、それぞれ、検定のための個別構成成分、及び、核酸ハイブリッド形成検定等のようなアレイ検定を実施するための試薬を収容する、バイアルまたは瓶のような1つ以上の容器を含むことが可能である。キットには、分析物を変性するための変性試薬、ハイブリッド形成緩衝液のような緩衝液、洗浄媒質、酵素基質、標識標的核酸試料のような標識標的試料を生成するための試薬、ネガティブ及びポジティブ・コントロール、及び、アレイ検定装置を用いて、アレイに基づく検定を実施するための書き込み命令を含むことも可能である。この命令は、紙またはプラスチック等のような被印刷物に印刷することが可能である。従って、命令は、キット内に、キットまたはその構成要素の容器の標識等（すなわち、パッケージングまたはサブパッケージングに関連した）の形で、パッケージ挿入物として示すことが可能である。他の実施態様には、命令が、例えば、CD-ROM、ディスクのような適合するコンピュータ可読記憶媒体に納められた、電子記憶データ・ファイルとして存在するものもある。

20

【0112】

下記の例は、例証のために示されるものであって、制限のためのものでない。

【実施例1】

30

【0113】

I. アルデヒド官能化基質の生成及び特性説明

A. 生成

4リットルのトルエンに1mlの水を加えて、一晩中、または、水が十分に溶解する時点まで、その混合物を撹拌する。誘導体化される表面は、1000mlの上記トルエン内に浸けられる。次に、約10分の期間にわたって、撹拌された溶剤に8mlのウンデシルトリクロロ酢酸（11-（トリクロロシリル）酢酸としても知られる）がゆっくりと添加される（シリル化反応）。次に、この溶液は、室温でさらに2時間にわたって撹拌され、その後、新しいトルエンで、次に、メタノールで、さらに、水で、表面にすすぎ洗いが施され、最終的に、窒素流内で乾燥させられる。

40

【0114】

酢酸基は、ヒドロキシ基に置換される。これは、上記表面を、30分にわたって50%硫酸の10%水溶液に浸し、その後、水ですすぎ洗いを施され、さらに、乾燥窒素流内で乾燥させることによる。次に、5mgのDess-Martin試薬（1,1-トリアセトキシー-1,1-2-ベンズヨードキソール-3(1H)-1）溶液が、1000mlのデメチルスルホキシドに溶解される。次に、0.2mlの水が加えられ、その後、表面が誘導体化される。このステップによって、ヒドロキシ基がアルデヒド基に置換される。

【0115】

一晩中撹拌した後、表面は、Dess-Martin[デス・マーチン]試薬（溶液）から取り出さ

50

れ、トルエンで、次に、メタノールで、さらに、水ですすぎ洗いが施され、最終的に、室素流内で乾燥させられる。

【0116】

図1には、上述のプロトコルの概略図が示されている。

【0117】

B．接触角の決定

約25 μ lの水が誘導体化表面に滴下された。接触角は、米国Accusoft Corpから得られるソフトウェアを備えたFTA（最初の10オングストローム）200角度計で測定された。

【0118】

100%表面（すなわち、開始材料として酢酸シランだけを用いて製作された表面）に関する接触角の典型的な結果は、最終アルデヒド表面に関して、約76度である。

【実施例2】

【0119】

II．カルボン酸誘導体によるカルボニルイミダゾール官能化表面の生成及び特性解明 A．生成

4リットルのトルエンに1mlの水を加えて、一晩中、または、水が十分に溶解する時点まで、その混合物を撹拌する。1000mlの上記トルエンに、4mlのウンデセニルトリクロロシラン及び4mlのデシルトリクロロシランが添加される（シリル化反応）。上記溶液に、誘導体化されるために表面が加えられる。この溶液が、室温で、2時間にわたって撹拌された後、新しいトルエンで、次に、メタノールで、さらに、水で、表面にすすぎ洗いが施され、最終的に、乾燥室素流内で乾燥させられる。

【0120】

次に、表面のビニル基が、Whitesides他の方法（非特許文献6参照）によって酸化されて、カルボン酸基になる。過マンガン酸カリウム（5mM）、過ヨウ素酸ナトリウム（195mM）、及び、炭酸カリウム（18mM）の原液が調製された。酸化の直前に、100mlのこれらの各原液が700mlの水に加えられた。次に、表面が、この混合液に一晩中浸けられた。

【0121】

表面は、亜硫酸水素ナトリウム、水、0.1N塩酸、及び、最終的に、水ですすぎ洗いを施され、その後、乾燥室素流で乾燥させられた。10gmの1,1'-カルボニルジイミダゾールが、1000mlの無水ジメチルホルムアミド内で撹拌された。溶解後、表面は、その溶液に浸けられ、室温で、2時間にわたって撹拌された。次に、表面は、メタノール、水で、すすぎ洗いが施され、最終的に、乾燥室素流中で乾燥させられた。

【0122】

図2には、上記プロトコルの概要が示されている。

【0123】

B．接触角の決定

接触角は上述のように測定された。50%のカルボニルイミダゾール表面に関する典型的な接触角は、約80度である。

【実施例3】

【0124】

III．アルデヒド官能化表面から生成されるリガンドアレイの生成及び特性解明

アミン末端または非アミン末端の25マー及び60マーのイースト・プローブの溶液である、プローブが表面に点滴された。不動態化後、これらのプローブは、緩衝液内でCY#K562標的及びCY%ヒーラRNA標的の両方とハイブリッド形成された。CY3及びCY5標識からの蛍光信号は、強いことが分り、アミン・プローブと非アミン・プローブとの間の特異性が高いことが明らかになった。

【実施例4】

【0125】

10

20

30

40

50

ⅠⅤ．カルボン酸誘導体によって調製されたカルボニルイミダゾール表面から生成されるリガンドアレイの生成及び特性解明

これらの表面は、アルデヒド表面と同様のやり方でテストされた。やはり、同様の結果が観測された。

【産業上の利用可能性】

【0126】

以上の結果及び論考から明らかなように、本発明によれば、重合体アレイ、とりわけ、核酸アレイの調製に重要な新規のプロトコルが得られる。基質表面の修飾方法は、安全であり、大きい接触角を保つ官能化表面が容易に生成されるので、アレイに対する所望の点滴特性が得られる。さらに、対象となる修飾基質から生成されたアレイは、弱い背景信号

10

【0127】

本明細書において引用された全ての刊行物及び特許出願は、個々の刊行物または特許出願が、それぞれ、参考までに援用されるように特に及び個々に指示されていたかのように、本明細書において参考までに援用されている。どの刊行物の引用も、出願日に先立って、それが開示されたためであり、本発明が、先行発明に鑑みて、こうした刊行物に先行する資格が得られないことを認めるもの解釈してはならない。

【0128】

上述の発明については、明確な理解を得るため、説明図及び実施例を用いてある程度詳

20

【図面の簡単な説明】

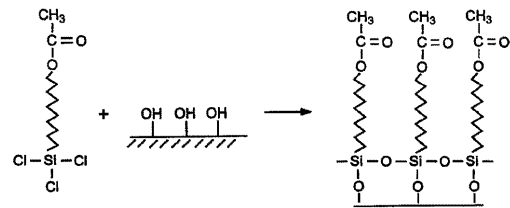
【0129】

【図1】本発明の第1の実施形態による表面修飾方法の概略図である。

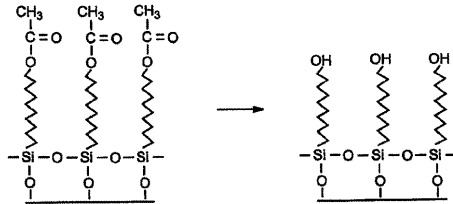
【図2】本発明の第2の実施形態による表面修飾方法の概略図である。

【 図 1 】

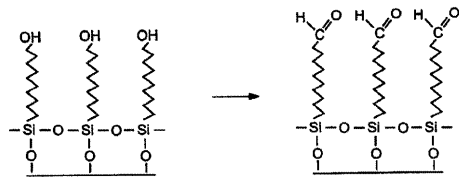
ステップ 1 : シラン化剤処理



ステップ 2 : 酸/アルカリ加水分解

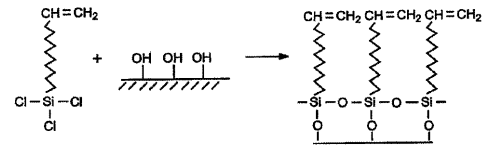


ステップ 3 : Dess-Martin 試薬による反応

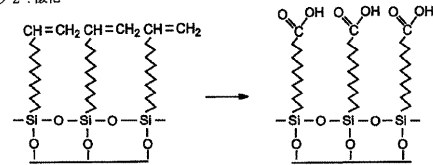


【 図 2 】

ステップ 1 : シラン化剤処理



ステップ 2 : 酸化



ステップ 3 : 1, 1' カルボニルジイミダゾールとの反応

