

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成20年3月13日(2008.3.13)

【公開番号】特開2006-208012(P2006-208012A)

【公開日】平成18年8月10日(2006.8.10)

【年通号数】公開・登録公報2006-031

【出願番号】特願2005-16406(P2005-16406)

【国際特許分類】

G 01 N 33/543 (2006.01)

C 12 M 1/00 (2006.01)

G 01 N 33/53 (2006.01)

G 01 N 33/547 (2006.01)

C 12 N 15/09 (2006.01)

【F I】

G 01 N 33/543 5 2 5 U

C 12 M 1/00 A

G 01 N 33/53 M

G 01 N 33/547

C 12 N 15/00 Z N A F

【手続補正書】

【提出日】平成20年1月24日(2008.1.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

固体表面に選択結合性物質を固定化した選択結合性物質固定化担体であって、該固体表面にペプチドまたはペプチド誘導体由来のものが共有結合で結合しており、該ペプチドまたはペプチド誘導体由来のものに結合している官能基と選択結合性物質が共有結合にて固定化されていることを特徴とする選択結合性物質固定化担体。

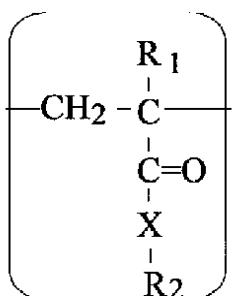
【請求項2】

該固体表面が樹脂からなる請求項1に記載の選択結合性物質固定化担体。

【請求項3】

該固体表面が下記一般式(1)を構造単位として有する請求項1に記載の選択結合性物質固定化担体。

【化1】



(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>はそれぞれ炭素数1から20のアルキル基、炭素数6から

18のアリール基、又は水素原子を表す。また、Xは、O、NR<sup>3</sup>またはCH<sub>2</sub>を表す。  
)

【請求項4】

該ペプチドまたはペプチド誘導体由来のものに結合している官能基がアシル基である請求項1から3のいずれかに記載の選択結合性物質固定化担体。

【請求項5】

選択結合性物質が核酸である請求項1から4のいずれかに記載の選択結合性物質固定化担体。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

(1) 固体表面に選択結合性物質を固定化した選択結合性物質固定化担体であって、該固体表面にペプチドまたはペプチド誘導体由来のものが共有結合で結合しており、該ペプチドまたはペプチド誘導体由来のものに結合している官能基と選択結合性物質が共有結合にて固定化されていることを特徴とする選択結合性物質固定化担体。

(2) 該固体表面が樹脂からなる(1)に記載の選択結合性物質固定化担体

(3) 該固体表面が下記一般式(1)を構造単位として有する(1)に記載の選択結合性物質固定化担体。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>はそれぞれ炭素数1から20のアルキル基、炭素数6から18のアリール基、又は水素原子を表す。また、Xは、O、NR<sup>3</sup>またはCH<sub>2</sub>を表す。)

(4) 該重合体に結合している官能基がアシル基である(1)から(3)のいずれかに記載の選択結合性物質固定化担体。

(5) 選択結合性物質が核酸である(1)から(4)のいずれかに記載の選択結合性物質固定化担体。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

本発明により、固体表面に結合したペプチドまたはペプチド誘導体由来のものを介して選択結合性物質を固定化された選択結合性物質固定化担体を提供でき、選択結合性物質の選択的結合シグナルを増幅させることが可能となる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

本発明者らは、鋭意実験を重ねた結果、図1に示すようにペプチドまたはペプチド誘導

体由来のものを固体表面に形成させ、そのペプチドまたはペプチド誘導体由来のものに結合しているアシル基と核酸を共有結合により固定化し、ハイブリダイゼーションのシグナルを増幅させることを見いだした。これらの中でも特に固体表面への導入の容易さやコスト面からアミノ酸から形成されるオリゴペプチドまたはポリペプチドがより好ましく用いることができる。また、ペプチドはペプチド結合関与部位以外が、ホルミルメトキシカルボニルや $\text{t}$ -ブトキシカルボニル等で保護されているペプチド誘導体でも良い。本発明でペプチドまたはペプチド誘導体由来のものの重合度は、特に制限はないが、作製の容易さから1~1000が好ましい。このペプチドまたはペプチド誘導体由来のものは次に挙げる反応経路で表面に形成することが可能である。まず、固体表面に足がかりとなる官能基を生成する。ついでこの官能基と結合できる官能基を有するペプチドまたはペプチド誘導体由来のものを結合させる。そしてペプチドまたはペプチド誘導体由来のものに結合している中の官能基と結合できる官能基を有する選択結合性物質と反応させることにより、固体基板上にペプチドまたはペプチド誘導体由来のものを介して選択結合性物質を固定化することができる。ペプチドまたはペプチド誘導体由来のものに結合されている官能基はペプチドまたはペプチド誘導体由来のものの主鎖末端でも良いし、側鎖末端でも良い。分岐構造を持つペプチドまたはペプチド誘導体由来のものの場合は枝分かれ端でも良い。官能基の種類としては、特にアシル基( $\text{RCO}-$ : Rは炭化水素)が、その作製の容易さや選択結合性物質の固定化の観点から好ましく用いることができる。ここでアシル基を有するアシル化合物としては、アルデヒド基( $\text{RCOH}$ )、カルボキシル基( $\text{RCOOH}$ )カルボシキル基の水素原子が置換した各種カルボン酸塩( $\text{COOM}$ : MはNaやKなど金属)やエステル( $\text{RCOOR}'$ )があり、またカルボキシル基のヒドロキシ基が置換した酸アミド( $\text{RCOONH}_2$ )、酸アジド( $\text{RCOON}_3$ )、酸塩化物( $\text{RCOCl}$ )酸無水物、ニトリル( $\text{RCN}$ )などが挙げられる。また、アミノ基やチオール基と縮合反応を促進するアシル化合物としてアシル基にマレイミド基やスクシイミド基などが挙げられる。この固体基板上へのペプチドまたはペプチド誘導体由来のものの固定化方法は、具体的には以下のようになる。すなわち、カルボキシル基を固体の表面に生成し、エステル活性化剤などでカルボキシル基を活性化し、その後、アミノ基およびカルボキシル基を持つアミノ酸のアミノ基を、表面の活性化カルボキシル基と反応させることにより、固体表面にカルボキシル基を生成させることができる。ここでエステル活性化剤の例としてはスクシンイミジル4-[マレイミドフェニル]ブチレート(SMPB)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、スクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、N-(マレイミドブチロキシ)スクシンイミドエステル(GMBS)、m-マレイミドプロピオニックアシド-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MPS)及びN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)、N-ヒドロキシスルフォツクシイミド(Sulf-NHS)、N-ヒドロキシクシイミド(NHS)などが挙げられる。一般的には、これらの結合の反応を助長するため、ジシクロヘキシルカルボジイミド、N-エチル-5-フェニルイソオキサゾリウム-3'-スルホナートなどの様々な縮合剤が用いられている。これらの中でも、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)や4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロライド(DMT-MM)は、毒性が少ないとことや、反応系からの除去が比較的容易なことから、選択結合性物質と固体表面のカルボキシル基との縮合反応にはもっとも有効な縮合剤の1つである。これらEDCなどの縮合剤は、選択結合性物質の溶液と混ぜて使用しても良いし、カルボキシル基が表面に生成された固体表面を予めEDCの溶液に浸漬しておき、ペプチドまたはペプチド誘導体由来のものに結合しているカルボキシル基を活性化しておいても良い。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0022】

前述した方法により、固体表面にペプチドまたはペプチド誘導体由来のものを介して選択結合性物質を固定化することにより、固体表面に直接固定化した場合に比べ、固定化された選択結合性物質の空間的な自由度が高いという推定理由のために、検体と高いハイブリダイゼーション効率を提供する選択結合性物質固定化担体を得ることができる。

## 【手続補正7】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0024

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0024】

比較例1、実施例1

(DNA固定化基板1、2の作製)

重合体分子固定化PMMA基板の作製スキームを図2に示す。ポリメチルメタクリレート(PMMA)板((株)クラレ製;コモグラス押し出し板、厚さ1mm、平均分子量3万)を10Nの水酸化ナトリウム水溶液に70で15時間浸漬した。次いで、純水、0.1NHCl水溶液、純水の順で洗浄した。このようにして、基板表面のPMMAの側鎖を加水分解して、カルボキシル基を生成した。次いで(A)N-ヒドロキシスルホツクシイミド(以降Sulfo-NHSと略す)100mg、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)350mgを2-モルホリノエタンスルホン酸・一水和物(MES)バッファー(0.1N水酸化ナトリウムでpH6.0に調整)に溶解させた。これらの混合溶液に上記加水分解後のPMMA基板を浸漬し、マイクロスターラーで攪拌した。(B)1時間攪拌後、上記基板をアミノ酸の一種であるグリシン80mgを含むホウ酸水溶液(1N水酸化ナトリウムでpH8.3に調整)に浸漬し、マイクロスターラーで攪拌した。1時間攪拌後、DNA固定化基板1を作製した(比較例1)。また、上記(A)、(B)の操作をさらに3回繰り返すことにより、PMMA表面にグリシン4分子結合した、DNA固定化基板2を得た(実施例1)。

## 実施例2

(DNA固定化基板3の作製)

重合体分子固定化PMMA基板の作製スキームを図3に示す。

実施例1と同様の方法でPMMA基板表面にカルボキシル基を生成させた。次いで(a)Sulfo-NHS100mg、EDC350mgをMESバッファー(pH6.0)に溶解させた。これらの混合溶液に上記加水分解後のPMMA基板を浸漬し、マイクロスターラーで1時間攪拌した。(b)MES(pH8.3)にグリシン80mgを溶解させ、EDC350mgを加え1時間攪拌し、ポリペプチドであるグリシン重合体を作製した。(c)上記基板を(b)で調整したグリシン重合体溶液に浸漬し、2時間攪拌した後、DNA固定化基板3を得た。

## 【手続補正8】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0030

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0030】

比較例2

(DNA固定化基板7の作製)

比較として、実施例1と同様の操作でPMMA基板上に加水分解によりカルボキシル基を生成させ、DNA固定化基板7とした。

## 【手続補正9】

## 【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0031】

比較例3

(DNA固定化基板8の作製)

実施例4と同様の操作でアミノ基を導入したガラス表面に無水コハク酸を反応させることによりカルボキシル基を生成させDNA固定化基板8とした。

(プローブDNAの固定化)

配列番号1(60塩基、5'末端アミノ化)のDNAを合成した。5'-ACATTTGAGGC ATTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCATCTGGA-3'。この配列番号1のDNAは5'末端がアミノ化されている。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0037】

【表1】

	蛍光シグナル
比較例1 DNA固定化基板1	12000
実施例1 DNA固定化基板2	19500
実施例2 DNA固定化基板3	21000
実施例3 DNA固定化基板4	20500
実施例4 DNA固定化基板5	11500
実施例5 DNA固定化基板6	15000
比較例2 DNA固定化基板7	7500
比較例3 DNA固定化基板8	4700

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0039】

比較例1のDNA固定化基板1、比較例2のDNA固定化基板7と比較して、グリシン4分子やポリグリシンを介してDNA固定化したDNA固定化基板2、3は高効率なハイブリダイゼーションが観察された。また、DNA固定化基板4の結果から、ペプチドまたはペプチド誘導体由来のものの末端がスクシンイミド基で修飾されていてもほぼ同様の効果が確認された。DNA固定化基板5の結果からアミノ酸がアラニンの場合においてもグリシンと同様の効果あることが確認された。さらに、DNA固定化基板6と8を比較して

、ガラス基板を用いた場合でも、重合体を介してDNAを固定化することによりハイブリダイゼーションの高効率化が確認された。これらのことからいずれの基板においても、固体基板上にペプチドまたはペプチド誘導体由来のものを固定化し、ペプチドまたはペプチド誘導体由来のものに結合したアシル基とDNAのアミノ基を縮合させて固定化することにより、ハイブリダイゼーション効率が飛躍的に向上することが示された。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0040

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0040】

【図1】固体基板上でのペプチドまたはペプチド誘導体由来のものを介して選択結合性物質の固定化

【図2】PMMA表面への選択結合性物質(DNA)の固定化反応スキーム1

【図3】PMMA表面への選択結合性物質(DNA)の固定化反応スキーム2

【図4】ガラス表面への選択結合性物質(DNA)の固定化反応スキーム4

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0041】

1 固体基板

2 ペプチドまたはペプチド誘導体由来のもの

3 選択結合性化合物

4 PMMA基板

5 スクシンイミド基

6 グリシンまたはアラニン

7 末端アミノ化DNA

8 グリシン重合体

9 ガラス基板

10 無水コハク酸