

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-526972

(P2005-526972A)

(43) 公表日 平成17年9月8日(2005.9.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/64	GO 1 N 27/64	2 GO 4 5
GO 1 N 27/62	GO 1 N 27/62	
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543	5 2 5 U
// GO 1 N 33/68	GO 1 N 33/543	5 2 5 W
	GO 1 N 33/68	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁)	

(21) 出願番号 特願2004-501901 (P2004-501901)
 (86) (22) 出願日 平成15年4月14日 (2003.4.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年12月24日 (2004.12.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/011391
 (87) 国際公開番号 W02003/093785
 (87) 国際公開日 平成15年11月13日 (2003.11.13)
 (31) 優先権主張番号 60/376,837
 (32) 優先日 平成14年5月2日 (2002.5.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501438670
 シファージェン バイオシステムズ, イン
 コーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 945
 55, フレモント, ダンバートン サ
 ークル 6611
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多糖系ヒドロゲルをコーティングした表面を有するバイオチップ

(57) 【要約】

本発明は、重合した多糖系ヒドロゲルが表面に結合されている基体を提供する。ヒドロゲルはサンプル由来のアナライトと結合する結合性官能基で誘導体化することができる。本発明はさらに、サンプル由来の1種以上のアナライトと選択的に結合することができる装置およびゲルの使用方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 第1の重合性部分を含むアンカー試薬が表面に共有結合されている、該表面を有する基体、および

(b) 複数のヒドロキシル基において第2の重合性部分により誘導体化された可溶性非イオン性多糖を含むヒドロゲル、

を含む装置であって、前記多糖が互いと結合しており、また、第1の重合性部分と第2の重合性部分との重合から生じる結合を介してアンカー試薬と結合している、上記装置。

【請求項 2】

前記多糖が結合性官能基をさらに含む、請求項1に記載の装置。

10

【請求項 3】

結合性官能基により官能基化された重合性モノマーと架橋剤との共重合混合物をさらに含み、前記混合物が前記ヒドロゲルとの相互浸透網目構造を形成している、請求項1に記載の装置。

【請求項 4】

前記多糖が結合性官能基と第3の重合性部分を含む重合性モノマーによりさらに誘導体化されており、前記重合性モノマーが第2の重合性部分と第3の重合性部分との重合から生じる結合を介して該多糖に結合されている、請求項1に記載の装置。

【請求項 5】

前記表面が金属酸化物または鉱物酸化物のコーティングを含む、請求項1に記載の装置

20

【請求項 6】

金属酸化物または鉱物酸化物が酸化ケイ素、酸化チタン、酸化ジルコニウム、および酸化アルミニウムからなる群より選択される、請求項5に記載の装置。

【請求項 7】

前記基体が金属から構成されている、請求項1に記載の装置。

【請求項 8】

アンカー試薬がアクリル基、アリル基、またはビニル基を含む、請求項1に記載の装置

【請求項 9】

前記多糖がデキストランである、請求項1に記載の装置。

30

【請求項 10】

前記多糖がヒドロキシエチルセルロース、デンプン、アミロース、およびアガロースからなる群より選択される、請求項1に記載の装置。

【請求項 11】

前記多糖が糖単位あたり約1個から1000の糖単位あたり約1個までの二重結合で飽和されている、請求項1に記載の装置。

【請求項 12】

前記結合性官能基が、疎水性基、親水性基、反応性基（例えば、アルデヒド、エポキシ、カーボネートなど）、カルボキシル、チオール、スルホネート、スルフェート、アミノ、置換アミノ、ホスフェート、金属キレート化基、チオエーテル、ビオチン、ボロネート、および染料のような複合構造体からなる群より選択される、請求項1に記載の装置。

40

【請求項 13】

重合性モノマーが官能基化されたアクリルモノマーである、請求項3または4に記載の装置。

【請求項 14】

重合性モノマーがグリシジルメタクリレート、N-メチル-N-グリシジル-メチルアクリルアミド、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、およびグリセロールモノメタクリレートからなる群より選択される、請求項4に記載の装置。

【請求項 15】

50

多糖を、第3の重合性部分を含むスパーサーモノマーと接触させることをさらに含む、請求項4に記載の装置。

【請求項16】

前記表面がアドレス指定可能な異なる位置に複数のアンカー試薬を含み、前記ヒドロゲルが複数の前記位置でアンカー試薬と重合している、請求項1、2、3または4に記載の装置。

【請求項17】

アンカー試薬が、(3-アクリロキシプロピル)トリメトキシシラン、(3-アクリロキシプロピル)メチルジメトキシシラン、(3-アクリロキシプロピル)ジメチルメトキシシラン、(3-アクリロキシプロピル)トリクロロシラン、(3-アクリロキシプロピル)メチルジクロロシラン、(3-アクリロキシプロピル)ジメチルクロロシラン、(3-メタクリロキシプロピル)トリメトキシシラン、(3-メタクリロキシプロピル)メチルジメトキシシラン、(3-メタクリロキシプロピル)ジメチルメトキシシラン、(3-メタクリロキシプロピル)トリクロロシラン、(3-メタクリロキシプロピル)メチルジクロロシラン、(3-メタクリロキシプロピル)ジメチルクロロシラン、ビニロキシトリメチルシラン、ビニルトリクロロシラン、ビニルトリメトキシシラン、アリルクロロメチルジメチルシラン、アリルクロロジメチルシラン、アリルプロモジメチルシラン、アリルジクロロメチルシラン、アリルジイソプロピルアミノジメチルシラン、アリルオキシ-tert-ブチルジメチルシラン、アリルトリメトキシシラン、およびこれらの組合せから選択されるシランを含む、請求項1に記載の装置。

10

【請求項18】

デキストランが約1kDa~約2000kDaの平均分子量を有する、請求項9に記載の装置。

20

【請求項19】

デキストランが約500kDaの平均分子量を有する、請求項9に記載の装置。

【請求項20】

デキストランがアクリロキシデキストランまたはメタクリロキシデキストランであり、前記表面がアクリロキシまたはメタクリロキシ部分を含む、請求項9に記載の装置。

【請求項21】

デキストランがビス-エポキシド架橋剤により架橋されている、請求項9に記載の装置。

【請求項22】

架橋剤がN,N'-メチレン-ビス-アクリルアミド、N,N'-メチレン-ビス-メタクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)ジメタクリレート、およびジアリルタータルジアミドからなる群より選択される、請求項3または4に記載の装置。

30

【請求項23】

前記基体が質量分析計に適合するプローブであり、前記位置がレーザービームによりアドレス指定可能である、請求項16に記載の装置。

【請求項24】

ビス-エポキシド架橋剤がBDDGE、EDGE、およびポリ(エチレングリコール)ジメタクリレートからなる群より選択される、請求項21に記載の装置。

【請求項25】

アクリルモノマーが、アクリルアミド-グリコール酸、アクリルアミド-メチル-プロパン-スルホン酸、アクリルアミド-エチル-ホスフェート、ジエチル-アミノエチル-アクリルアミド、トリメチル-アミノ-プロピル-メタクリルアミド、N-オクチル-アクリルアミド、N-フェニル-アクリルアミド、およびtert-ブチル-アクリルアミドからなる群より選択される、請求項13に記載の装置。

40

【請求項26】

(a) 第1の官能基を含むアンカー試薬が表面に共有結合されている、該表面を有する基体、および

(b) 複数のヒドロキシル基において、第1の官能基と相互作用するための第2の官能基により誘導体化された非イオン性多糖、

を含む装置であって、前記第1の官能基と第2の官能基が相互作用して共有結合を形成して

50

いる、上記装置。

【請求項 27】

第1の官能基がカルボキシル基であり、第2の官能基が一級アミノ基である、請求項22に記載の装置。

【請求項 28】

第1の官能基がピオチンであり、第2の官能基がアビジンである、請求項22に記載の装置。

【請求項 29】

ヒドロゲルが複数のアドレス指定可能な位置で前記表面に結合されている、請求項1に記載の装置。

10

【請求項 30】

質量分析計のプロブインターフェースにかみ合わせるための手段を含む、請求項1、2、3または4に記載の装置。

【請求項 31】

(a) 第1の重合性部分を含むアンカー試薬が表面に共有結合されている、該表面を有する基体を用意すること、

(b) 複数のヒドロキシル基において第2の重合性部分により誘導体化された可溶性の非イオン性多糖をアンカー試薬に接触させること、および

(c) 前記多糖とアンカー試薬を共重合させ、これにより第1および第2の重合性部分を介して前記表面に共有結合されたヒドロゲルを生成させること、

20

を含んでなる、装置の製造方法。

【請求項 32】

前記多糖が結合性官能基でさらに誘導体化されており、これにより前記ヒドロゲルがアナライトと結合することができる、請求項31に記載の方法。

【請求項 33】

結合性官能基で官能基化された重合性モノマーをアンカー試薬に接触させることをさらに含み、前記共重合がアンカー試薬と多糖と官能基化重合性モノマーとを共重合させて重合ポリマーを形成させることを含む、請求項31に記載の方法。

【請求項 34】

(d) (c)で得られた材料に、結合性官能基で官能基化された重合性モノマーと架橋剤の混合物を接触させること、および

30

(e)重合性モノマーと架橋剤を共重合させて相互浸透網目構造を形成させること、をさらに含む、請求項31に記載の方法。

【請求項 35】

(c)で得られた材料を結合性官能基で誘導体化することをさらに含む、請求項31に記載の方法。

【請求項 36】

前記表面が金属酸化物または鉱物酸化物のコーティングを含む、請求項31に記載の方法。

【請求項 37】

重合性モノマーがグリシジルメタクリレート、N-メチル-N-グリシジル-メチルアクリルアミド、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、およびグリセロールモノメタクリレートからなる群より選択される、請求項33に記載の方法。

40

【請求項 38】

多糖を、第3の重合性部分を含むスペーサーモノマーと接触させることをさらに含む、請求項33に記載の方法。

【請求項 39】

金属酸化物または鉱物酸化物が酸化ケイ素、酸化チタン、酸化ジルコニウム、および酸化アルミニウムからなる群より選択される、請求項36に記載の方法。

【請求項 40】

50

前記基体が金属から構成されている、請求項31に記載の方法。

【請求項41】

アンカー試薬がアクリル基、アリル基、またはビニル基を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項42】

前記多糖がデキストランである、請求項31に記載の方法。

【請求項43】

前記多糖がヒドロキシエチルセルロース、デンプン、アミロース、およびアガロースからなる群より選択される、請求項31に記載の方法。

【請求項44】

前記共重合が光感受性触媒、温度感受性触媒、またはアミンの存在下での過酸化物により開始される、請求項31に記載の方法。

【請求項45】

前記多糖が糖単位あたり約1個から1000の糖単位あたり約1個までの二重結合で飽和されている、請求項31に記載の方法。

【請求項46】

前記結合性官能基が、カルボキシル基、疎水性基、親水性基、反応性基（例えば、アルデヒド、エポキシ、カーボネートなど）、カルボキシル、チオール、スルホネート、スルフェート、アミノ、置換アミノ、ホスフェート、金属キレート化基、チオエーテル、ビオチン、ボロネート、および染料のような複合構造体からなる群より選択される、請求項31

10

20

【請求項47】

前記多糖がその場で結合性官能基により誘導体化される、請求項32に記載の方法。

【請求項48】

官能基化された重合性モノマーが官能基化されたアクリルモノマーである、請求項33または34に記載の方法。

【請求項49】

前記表面がアドレス指定可能な異なる位置に複数のアンカー試薬を含み、前記ヒドロゲルが複数の前記位置でアンカー試薬と重合している、請求項31、32、33または34に記載の方法。

30

【請求項50】

アンカー試薬が、(3-アクリロキシプロピル)トリメトキシシラン、(3-アクリロキシプロピル)メチルジメトキシシラン、(3-アクリロキシプロピル)ジメチルメトキシシラン、(3-アクリロキシプロピル)トリクロロシラン、(3-アクリロキシプロピル)メチルジクロロシラン、(3-アクリロキシプロピル)ジメチルクロロシラン、(3-メタクリロキシプロピル)トリメトキシシラン、(3-メタクリロキシプロピル)メチルジメトキシシラン、(3-メタクリロキシプロピル)ジメチルメトキシシラン、(3-メタクリロキシプロピル)トリクロロシラン、(3-メタクリロキシプロピル)メチルジクロロシラン、(3-メタクリロキシプロピル)ジメチルクロロシラン、ビニロキシトリメチルシラン、ビニルトリクロロシラン、ビニルトリメトキシシラン、アリルクロロメチルジメチルシラン、アリルクロロジメチルシラン、アリルプロモジメチルシラン、アリルジクロロメチルシラン、アリルジイソプロピルアミノジメチルシラン、アリルオキシ-tert-ブチルジメチルシラン、アリルトリメトキシシラン、およびこれらの組合せから選択されるシランを含む、請求項31に記載の方法。

40

【請求項51】

デキストランが約1kDa～約2000kDaの平均分子量を有する、請求項43に記載の方法。

【請求項52】

デキストランが約500kDaの平均分子量を有する、請求項43に記載の方法。

【請求項53】

デキストランがアクリロイルデキストランまたはメタクリロイルデキストランであり、前記表面がアクリロイルまたはメタクリロイル部分を含む、請求項43に記載の方法。

50

【請求項54】

デキストランを、アルカリ性条件下で、グリシジルメタクリレート、グリシジルアクリレート、塩化アクリロイル、塩化メタクリロイル、またはアリル-グリシジルエーテルと反応させる、請求項43に記載の方法。

【請求項55】

デキストランがビス-エポキシド架橋剤により架橋されている、請求項43に記載の方法。

【請求項56】

前記多糖が、

a) 前記多糖を、カルボニルジイミダゾール、塩化トシル、トリクロロトリアジン、およびクロロホルメートからなる群より選択される分子により活性化すること、および

b) 活性化した多糖を、前記結合性官能基を含む結合試薬と反応させること、により誘導体化される、請求項32に記載の方法。

【請求項57】

前記結合性官能基がカルボキシル基であり、前記多糖が該多糖をクロロ酢酸と反応させることにより官能基化される、請求項32に記載の方法。

【請求項58】

架橋剤がN,N'-メチレン-ビス-アクリルアミド、N,N'-メチレン-ビス-メタクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)ジメタクリレート、およびジアリルタータルジアミドからなる群より選択される、請求項33または34に記載の方法。

【請求項59】

一連の反応においてデキストランを2種以上の化学薬品と反応させる、請求項43に記載の方法。

【請求項60】

前記基体が質量分析計に適合するプローブであり、前記位置がレーザービームによりアドレス指定可能である、請求項49に記載の方法。

【請求項61】

ビス-エポキシド架橋剤がBDDGE、EGDGE、およびポリ(エチレングリコール)ジメタクリレートからなる群より選択される、請求項55に記載の方法。

【請求項62】

アクリルモノマーが、アクリルアミド-グリコール酸、アクリルアミド-メチル-プロパン-スルホン酸、アクリルアミド-エチル-ホスフェート、ジエチル-アミノエチル-アクリルアミド、トリメチル-アミノ-プロピル-メタクリルアミド、N-オクチル-アクリルアミド、N-フェニル-アクリルアミド、およびtert-ブチル-アクリルアミドからなる群より選択される、請求項48に記載の方法。

【請求項63】

(a) 第1の官能基を有する部分を含む1以上のアンカー試薬が表面に共有結合されている、該表面を有する基体を用意すること、および

(b) 第1の官能基と相互作用するための第2の官能基により複数のヒドロキシル基において誘導体化された可溶性の非イオン性多糖をアンカー試薬に接触させること、を含んでなる、装置の製造方法。

【請求項64】

第1の官能基がカルボキシル基であり、第2の官能基が一級アミノ基である、請求項63に記載の方法。

【請求項65】

第1の官能基がビオチンであり、第2の官能基がアビジンである、請求項63に記載の方法。

【請求項66】

(a) 請求項1、2、3または4に記載の装置のヒドロゲルに、アドレス指定可能な位置でアナライトを接触させること、

10

20

30

40

50

(b) 該装置をレーザー脱離質量分析計のプロブインターフェースに導入し、これによりアドレス指定可能な位置を質量分析計のレーザービームと問合せ可能な関係で位置づけること、

(c) ヒドロゲルにアドレス指定可能な位置でレーザーパルスを加え、アナライトを脱離およびイオン化すること、および

(d) 脱離およびイオン化したアナライトを質量分析計で検出すること、
を含んでなる、アナライトの検出方法。

【請求項67】

アナライトがタンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物、および脂質からなる群より選択された生体分子である、請求項66に記載の方法。

10

【請求項68】

アナライトが小さい有機分子である、請求項66に記載の方法。

【請求項69】

a) ヒドロゲル、および

b) 結合性官能基により官能基化された重合性モノマーと架橋剤との共重合混合物、の相互浸透網目構造を含んでなるゲル。

【請求項70】

前記ヒドロゲルが結合性官能基により誘導体化されている、請求項69に記載のゲル。

【請求項71】

a) 第1の重合性部分により複数のヒドロキシル基において誘導体化された非イオン性多糖、および

20

b) 結合性官能基および第2の重合性部分により官能基化された重合性モノマー、を含んでなるゲルであって、前記重合性モノマーが第1の重合性部分と第2の重合性部分の重合から生じる結合を介して多糖に結合されている、上記ゲル。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、バイオチップおよび特に質量分析を用いた分離科学および分析生化学の分野に関する。

【背景技術】

30

【0002】

一般的に、質量分析による生体サンプルの分析には、レーザーのようなイオン化源を用いた小さい物質サンプルの脱離およびイオン化が必要である。物質をイオン化源によって気相または蒸気相に脱離させ、この過程で個々の分子のいくつかをイオン化させる。その後、イオン化分子を質量分析計によって分散させ、検出器で検出することができる。例えば、飛行時間型質量分析計では、正に荷電したイオン化分子が短い高電圧場を通過して加速され、高真空チャンパーへ飛行またはドリフトして、該チャンパーの遠端で高感度検出面に衝突する。飛行時間はイオン化された分子の質量の関数であるため、イオン化から衝突までの経過時間を用いて特定質量の分子の有無を確認することができる。

【0003】

40

脱離質量分析は久しく使用されてきた。しかしながら、タンパク質や核酸といった大きいインタクトなバイオポリマーの分子量を決定することは、脱離の際にバイオポリマーが断片化つまり破壊されるという理由で、困難であった。この問題は化学マトリックスを使用することにより解決された。マトリックス支援レーザー脱離/イオン化(MALDI)では、アナライト溶液を、レーザー光線を吸収して脱離を促進する分子を含有するマトリックス溶液と混合する。典型的なマトリックス分子はシナピン酸とシアノヒドロキシケイ皮酸である。この混合物を、不活性なプロブ表面に沈着させた後で、結晶内部にアナライトを捕捉させながら結晶化させる。マトリックスは、レーザーエネルギーを吸収して、明らかにそのエネルギーをアナライトに付与し、結果的に脱離とイオン化をもたらすように選択する。米国特許第5,118,937号(Hillenkampら)および米国特許第5,045,694号(Beavis & Ch

50

ait)を参照されたい。

【0004】

最近、表面増強レーザー脱離/イオン化(SELDI)が開発され、これはMALDIと比べて格別の進展である。SELDIでは、プローブ表面が脱離プロセスに関与する活性な表面である。一つのタイプのSELDIは、対象となるアナライトを選択的に捕獲する表面化学を備えたプローブを使用する。例えば、プローブの表面化学は、アナライトを共有結合または非共有結合で固定化する酸素依存的、炭素依存的、硫黄依存的、および/または窒素依存的手段に基づいた結合性官能基を含むことができる。プローブの表面化学によって結合されたアナライトは保持され、未結合の物質を洗い流すことができる。その後、プローブ表面に結合されたアナライトを脱離させて、質量分析を用いて分析することができる。この方法は、サンプルの標識付けや精製といったサンプル調製の間ステップを省いて直接的に、サンプルの脱離および分析を可能にする。したがって、SELDIはアナライトの直接検出のための一体型の操作システムを提供する。SELDIとその改変型は米国特許第5,719,060号(Hutchens & Yip)および米国特許第6,255,047号(Hutchens & Yip)に記載されている。

10

【0005】

上記の脱離方法は分離科学および分析生化学の分野において無限の用途を有している。例えば、リガンドをスクリーニングするために、プローブ表面に細胞表面受容体または細胞内受容体を結合させる。その後、結合したリガンドを脱離およびイオン化により分析する。また、複雑な溶液から生体分子を捕獲するために、核酸分子をプローブ表面に結合させることもできる。その後、核酸に結合された生体分子を捕獲し、脱離およびイオン化により分析する。さらに、プローブ表面に結合させた抗体を用いて、特異的な抗原を捕獲して同定することができる。その後、抗体と特異的に結合した抗原を単離して、脱離およびイオン化により分析する。

20

【0006】

サンプルに含まれるアナライトと結合することができる均質なコーティングを有する装置は、表面増強レーザー脱離/イオン化(SELDI)法におけるプローブとして非常に有用であると考えられる。コーティングの均質性は、有利には、アナライトが表面に均一に結合することを可能にし、また、アナライトの非コーティング領域への非特異的結合を防止するであろう。こうした利点により、本発明の装置は表面増強レーザー脱離/イオン化(SELDI)法においてプローブとして使用するのに十分に適合し、その場合、均一に結合されたアナライトを含むプローブは、アナライトの組成に関する誤った解釈を低減させ、結果の再現性を高めるであろう。

30

【発明の開示】

【0007】

発明の概要

本発明は、サンプル由来の1種以上のアナライトと選択的に結合することができる装置に関する。基本的な装置は基体を含んでなり、その基体の表面に1種以上のアンカー試薬が共有結合で結合されている。このアンカー試薬は第1の重合性部分を含んでいる。基本的な装置はまた、アンカー試薬の重合性部分によって基体の表面に化学的に結合されたヒドロゲルを含んでなる。したがって、表面上の最終構造は、ヒドロゲルが重合部位を介して基体表面にグラフトされているコポリマーになる。ヒドロゲルは、複数のヒドロキシル基において第2の重合性部分により誘導体化された、可溶性の非イオン性多糖を含んでなる。基本的な装置では、多糖が互いに架橋結合しており、また、第1の重合性部分と第2の重合性部分との重合反応から生じる結合を介してアンカー試薬と架橋結合している。架橋剤は、例えば、N,N'-メチレン-ビス-アクリルアミド、N,N'-メチレン-ビス-メタクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)ジメタクリレート、およびジアリルタータルジアミド(diallyltartardiamide)からなる群より選択される。

40

【0008】

いくつかの実施形態においては、多糖が結合性官能基を含み、それによりヒドロゲルがアナライトと結合することができる。結合性官能基の例としては、疎水性基、親水性基、

50

反応性基（例えば、アルデヒド、エポキシ、カーボネートなど）、カルボキシル、チオール、スルホネート、スルフェート、アミノ、置換アミノ、ホスフェート、金属キレート化基、チオエーテル、ピオチン、ポロネート、および染料のような複合構造体がある。

【0009】

他の実施形態において、基本的な装置は、結合性官能基により官能基化された重合性モノマー（以後、「官能基化重合性モノマー」という）と架橋剤との共重合混合物をさらに含む。この実施形態では、共重合混合物がヒドロゲルとの相互浸透網目構造（interpenetrated network）を形成しており、この網目構造が基本的装置の基体上で層をなしている。

【0010】

いくつかの実施形態においては、この装置は、(a)第1の重合性部分を含む複数のアンカー試薬が表面に共有結合されている基体、(b)複数のヒドロキシル基において第2の重合性部分により誘導体化された非イオン性多糖、(c)官能基化重合性モノマー、および(d)架橋剤を含んでいる。これらの物質はすべて、重合反応から生じる結合を介して互いと架橋結合されている。

10

【0011】

いくつかの実施形態においては、ヒドロゲルが複数のアドレス指定可能な位置で表面に結合されている。

【0012】

他の実施形態では、表面がアドレス指定可能な異なる位置に複数のアンカー試薬を含み、ヒドロゲルが複数の前記位置でアンカー試薬に重合されている。ある実施形態では、基体が質量分析計に適合するプローブであり、前記位置がレーザービームによりアドレス指定可能である。ある実施形態では、前記装置がさらに、質量分析計のプローブインターフェースにかみ合わせるための手段を含む。

20

【0013】

いくつかの実施形態では、前記装置の基体が金属を含む。

【0014】

他の実施形態において、前記装置の表面は金属酸化物または鉱物酸化物のコーティングを含む。前記コーティングは、例えば、酸化ケイ素、酸化チタン、酸化ジルコニウム、または酸化アルミニウムを含む。

30

【0015】

いくつかの実施形態において、アンカー試薬は重合部位として機能する二重結合を含む。例えば、アンカー試薬はアクリル基、メタクリル基、アリル基、またはビニル基を含むことができる。いくつかの実施形態において、アンカー試薬は、(3-アクリロキシプロピル)トリメトキシシラン、(3-アクリロキシプロピル)メチルジメトキシシラン、(3-アクリロキシプロピル)ジメチルメトキシシラン、(3-アクリロキシプロピル)トリクロロシラン、(3-アクリロキシプロピル)メチルジクロロシラン、(3-アクリロキシプロピル)ジメチルクロロシラン、(3-メタクリロキシプロピル)トリメトキシシラン、(3-メタクリロキシプロピル)メチルジメトキシシラン、(3-メタクリロキシプロピル)ジメチルメトキシシラン、(3-メタクリロキシプロピル)トリクロロシラン、(3-メタクリロキシプロピル)メチルジクロロシラン、(3-メタクリロキシプロピル)ジメチルクロロシラン、ビニロキシトリメチルシラン、ビニルトリクロロシラン、ビニルトリメトキシシラン、アリルクロロメチルジメチルシラン、アリルクロロジメチルシラン、アリルプロモジメチルシラン、アリルジクロロメチルシラン、アリルジイソプロピルアミノジメチルシラン、アリルオキシ-tert-ブチルジメチルシラン、アリルトリメトキシシラン、およびこれらの組合せからなる群より選択されるシランである。

40

【0016】

いくつかの実施形態において、多糖はヒドロキシ-エチル-セルロース、デンプン、アミロース、またはアガロースである。他の実施形態では、多糖はデキストランである。ある実施形態では、デキストランが約1kDa～約2000kDaの平均分子量を有する。他の実施形態

50

では、デキストランが約500kDaの平均分子量を有する。ある実施形態では、デキストランがアクリロイルデキストランまたはメタクリロイルデキストランであり、前記表面がアクリロイルまたはメタクリロイル部分を含む。デキストランはビス-エポキシド架橋剤により架橋されていてもよい。ビス-エポキシド架橋剤の例としては、BDDGE (ブタンジオールジグリシジルエーテル)、EDGE (エチレングリコールジグリシジルエーテル)、およびポリ(エチレングリコール)ジメタクリレートがある。

【0017】

いくつかの実施形態において、多糖は、1糖単位あたり約1個から1000糖単位あたり約1個までの二重結合で飽和されており、好ましくは1糖単位あたり10個から100糖単位あたり約1個まで、さらに好ましくは1糖単位あたり1個から100糖単位あたり約1個までの二重結合で飽和されている。

10

【0018】

いくつかの実施形態において、官能基化された重合性モノマーは官能基化されたアクリルモノマーである。アクリルモノマーはアクリルアミド-グリコール酸、アクリルアミド-メチル-プロパン-スルホン酸、アクリルアミド-エチル-ホスフェート、ジエチル-アミノエチル-アクリルアミド、トリメチル-アミノ-プロピル-メタクリルアミド、N-オクチル-アクリルアミド、N-フェニル-アクリルアミド、およびtert-ブチル-アクリルアミドからなる群より選択することができる。

【0019】

前記装置が架橋剤を含む実施形態において、架橋剤の例はN,N'-メチレン-ビス-アクリルアミド、N,N'-メチレン-ビス-メタクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)ジメタクリレート、およびジアリルタータルジアミドである。

20

【0020】

いくつかの実施形態において、アンカー試薬は第1の官能基を含み、非イオン性多糖は複数のヒドロキシル基においてアンカー試薬の第1の官能基と相互作用するための第2の官能基で誘導体化される。この実施形態では、第1および第2の官能基が相互作用して共有結合を形成する。ある実施形態では、第1の官能基がカルボキシル基で、第2の官能基が一級アミンであるか、またはその逆である。他の実施形態では、第1の官能基がピオチンで、第2の官能基がアビジンであるか、またはその逆である。

【0021】

いくつかの実施形態において、多糖は結合性官能基および第3の重合性部分を含む重合性モノマーによりさらに誘導体化される。この場合、該重合性モノマーは第2の重合性部分と第3の重合性部分との重合反応により生じる結合を介して多糖に連結される。前記重合性モノマーは、グリシジルメタクリレート、N-メチル-N-グリシジル-メチルアクリルアミド、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、およびグリセロールモノメタクリレートからなる群より選択される。この装置は、多糖に、第3の重合性部分を含むスペーサーモノマーを接触させることをさらに含んでいてもよい。

30

【0022】

基本的な装置は、第1の官能基を含むアンカー試薬が表面に共有結合されている、該表面を有する基体、および、複数のヒドロキシル基において第1の官能基と相互作用するための第2の官能基により誘導体化された非イオン性多糖を含み、ここにおいて、第1の官能基と第2の官能基は相互作用して共有結合を形成している。ある実施形態では、第1の官能基がカルボキシル基で、第2の官能基が一級アミンである。他の実施形態では、第1の官能基がピオチンで、第2の官能基がアビジンである。

40

【0023】

本発明はまた、本発明の装置の製造方法に関する。いくつかの実施形態において、前記製造方法は、最初に、1以上のアンカー試薬が表面に共有結合されている基体を用意することを含んでなる。アンカー試薬はヒドロゲルと結合するための第1の重合性部分を含む。次に、アンカー試薬に、複数のヒドロキシル基において第2の重合性部分により誘導体化された可溶性の非イオン性多糖を接触させる。その後、多糖とアンカー試薬を共重合さ

50

せると、第1および第2の重合性部分により表面に共有結合されたヒドロゲルが生成する。多糖は結合性官能基で誘導体化することもでき、これによりヒドロゲルにアナライトを結合させることができる。

【0024】

前記方法はさらに、アンカー試薬を、結合性官能基により官能基化された重合性モノマーと接触させることを含んでいてもよく、前記共重合はアンカー試薬と多糖と官能基化重合性モノマーとを共重合させて複合ポリマーを形成させることを含む。

【0025】

重合性モノマーの例としては、グリシジルメタクリレート、N-メチル-N-グリシジル-メチルアクリルアミド、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、およびグリセロールモノメタクリレートがある。

【0026】

前記方法はさらに、多糖を、第3の重合性部分を含むスペーサーモノマーと接触させることを含んでいてよい。

【0027】

他の実施形態においては、前記方法は、前記方法で得られた材料に、官能基化重合性モノマーと架橋剤の混合物を接触させ、その後重合性モノマーと架橋剤を共重合させて相互浸透網目構造を形成させることを含む。

【0028】

いくつかの実施形態において、前記方法は、(a)第1の重合性部分を含む1以上のアンカー試薬が表面に共有結合されている基体、(b)複数のヒドロキシル基において第2の重合性部分により誘導体化された非イオン性多糖、(c)官能基化重合性モノマー、および(d)架橋剤を用意することを含む。次に、アンカー試薬を、多糖、官能基化重合性モノマーおよび架橋剤と接触させる。その後、これらの物質を共重合させて複合ポリマーを形成させる。

【0029】

いくつかの方法では、前記表面がアドレス指定可能な異なる位置に複数のアンカー試薬を含み、前記ヒドロゲルが複数の前記位置でアンカー試薬と重合している。

【0030】

いくつかの実施形態において、共重合は光感受性触媒、温度感受性触媒、またはアミンの存在下での過酸化物により開始される。

【0031】

いくつかの実施形態において、多糖はデキストランであり、デキストランをグリシジルメタクリレート、グリシジルアクリレート、塩化アクリロイル、塩化メタクリロイル、またはアリル-グリシジル-エーテルとアルカリ性条件下で反応させる。

【0032】

他の実施形態では、多糖がその場で結合性官能基により誘導体化される。

【0033】

いくつかの実施形態では、一連の反応において多糖を2種以上の化学物質と反応させる。ある実施形態では、多糖がデキストランである。

【0034】

いくつかの実施形態では、多糖を基体の表面に結合させた後でそれを誘導体化する。いくつかの実施形態では、多糖を誘導体化する方法は、多糖を、カルボニルジイミダゾール、塩化トシル、トリクロロトリアジン、およびクロロホルメートからなる群より選択される分子により活性化し、その後、活性化した多糖を、結合性官能基を含む結合試薬と反応させることを含む。好ましい試薬は1,1'-カルボニルジイミダゾール(CDI)であり、これを0.0001%~50%、好ましくは0.01%~20%、さらに好ましくは0.1%~5%の量で使用する。この%値は、溶媒(この溶媒に基体が曝される)中のCDIの%を示す。

【0035】

いくつかの実施形態において、前記方法は、1以上のアンカー試薬が表面に共有結合されている基体を用意することを含む。アンカー試薬はヒドロゲルと結合するための第1の

10

20

30

40

50

官能基を含む。次に、アンカー試薬に非イオン性多糖を接触させるが、この多糖はアンカー試薬の第1の官能基と相互作用するための第2の官能基により複数のヒドロキシル基において誘導体化されている。この実施形態では、第1の官能基と第2の官能基が相互作用して共有結合を形成する。例えば、ある実施形態において、第1および第2の官能基は一級または二級アミンとカルボキシルであり、これらは活性化された縮合反応において互いと反応してペプチド結合を形成する。他の実施形態では、第1および第2の官能基はビオチンとアビジンである。

【0036】

また、本発明はゲルに関する。ある実施形態において、ゲルは、ヒドロゲルと、官能基化重合性モノマーと架橋剤との共重合混合物と、の相互浸透網目構造を含む。

10

【0037】

いくつかの実施形態では、ヒドロゲルが結合性官能基により誘導体化される。

【0038】

他の実施形態では、ゲルが、複数のヒドロキシル基において重合性部分により誘導体化された非イオン性多糖、結合性官能基により官能基化された重合性モノマー、および架橋剤を含む。このゲルでは、多糖と官能基化重合性モノマーと架橋剤が重合反応により互いと架橋結合している。

【0039】

前記ゲルは、複数のヒドロキシル基において第1の重合性部分により誘導体化された非イオン性多糖と、結合性官能基および第2の重合性部分により官能基化された重合性モノマーとを含む。この場合には、重合性モノマーが第1の重合性部分と第2の重合性部分との重合反応により生じる結合を介して多糖に結合される。

20

【0040】

さらに、本発明はアナライトの検出方法に関する。いくつかの実施形態において、この方法は、本発明のいずれかの装置のヒドロゲルに、アドレス指定可能な位置でアナライトを接触させ、該装置をレーザー脱離質量分析計のプロブインターフェースに導入し、これによりアドレス指定可能な位置を質量分析計のレーザービームと問合せ可能な関係(interrogatable relationship)で位置づけ、アドレス指定可能な位置のヒドロゲルにレーザーパルスを与えてアナライトを脱離およびイオン化し、そして脱離およびイオン化したアナライトを質量分析計で検出することを含む。

30

【0041】

いくつかの実施形態において、アナライトは生体分子である。生体分子の例は、タンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物および脂質からなる群より選択される。他の実施形態では、アナライトは小さい有機分子である。

【0042】

発明の詳細な説明

I. 序

本発明は、サンプルから1種以上のアナライトを選択的に結合することができる装置、前記装置の製造方法、前記装置の使用法、ならびにサンプルから1種以上のアナライトを選択的に結合することができるゲルを提供する。基本的な装置は、ヒドロゲルでコーティングされた表面を有する基体を含んでなる。好ましい実施形態において、前記装置の表面は、未精製サンプルからアナライトを選択的に結合することができる結合性官能基を含む。コーティングの均質性は、有利には、アナライトを表面に均一に結合させることを可能にし、また、非コーティング領域へのアナライトの非特異的結合を防止する。こうした利点により、本発明の装置は表面増強レーザー脱離/イオン化(SELDI)法においてプロブとして使用するのに十分に適合し、その場合、均一に結合されたアナライトを含むプロブは、アナライトの組成に関して誤った解釈を低減させ、結果の再現性を高めることができる。

40

【0043】

II. 定義

50

特に定義しない限り、本明細書中で用いるすべての技術および科学用語は、本発明が属する分野の当業者が通常理解している意味である。以下の文献は本発明で用いる多くの用語の一般的な定義を当業者に提供するものである： Singletonら, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (第2版、1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker編、1988); The Glossary of Genetics, 第5版, R. Riegerら(編), Springer Verlag (1991); およびHale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書中で用いる以下の用語は、特に指定しない限り、それらに属した意味を有する。

【0044】

「ヒドロゲル」とは、水に不溶性で、水に膨潤性の、架橋されているポリマーであって、それ自体の重さの少なくとも1~10倍、好ましくは少なくとも100倍の液体を吸収することができるポリマーをさす。 10

【0045】

「結合性官能基」(binding functionality)とは、共有または非共有化学結合のいずれかを介して分子と結合する官能基をさす。結合性官能基には、限定するものではないが、標的分子と共有結合で結合することができる反応性基が含まれる。このような反応性基としては、例えば、エポキシ、カルボイミダゾール、アルデヒド、カーボネートなどがある。結合性官能基には、さらに、非共有化学結合(例えば、塩促進相互作用、疎水性相互作用、親水性相互作用、静電相互作用、配位共有結合相互作用、および生物特異的相互作用)を介して標的分子と結合する部分も含まれる。そのような結合性官能基には、例えば、芳香族もしくは脂肪族部分を有する官能基、ヒドロキシル、カルボキシル、チオール、スルホネート、スルフェート、アミノ、置換アミノ、ホスフェート、金属キレート化基、チオエーテル、ポロネート、染料およびクロマトグラフィーで一般的に用いられる他の吸着剤が含まれる。また、結合性官能基には、アビジン/ビオチン、抗体、受容体、酵素、レクチンおよび核酸のような生物特異的な部分も含まれる。混合型の結合性官能基を生成するために、これらの官能基を組み合わせ使用してもよい。 20

【0046】

「置換」とは、ある原子または基を別のもので置き換えることを意味する。

【0047】

「架橋剤」とは、所定のポリマーの隣接分子鎖同士を様々な位置で共有結合により化学結合させることができる化合物を意味する。 30

【0048】

「プローブ」とは、分析装置に取り外し可能に挿入することができ、分析装置で分析するためにアナライトを提示する、表面を有する基体をさす。

【0049】

「基体」とは、ヒドロゲル物質を担持することができる材料を意味する。

【0050】

「微孔質」とは、直径が約1000以下である非常に微細な孔をもつことを意味する。

【0051】

「検出する」とは、検出すべき対象物の有無または量を確認することを意味する。 40

【0052】

「複合」とは、2種以上のアナライトの組合せにより形成されるアナライトを意味する。

【0053】

「有機生体分子」とは、生物由来の有機分子、例えば、ペプチド、ポリペプチド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、糖、脂肪酸、複合炭水化物、脂質、またはステロイドをさす。

【0054】

「小さい有機分子」とは、医薬品中で一般的に用いられている有機分子に匹敵する大きさの有機分子をさす。この用語には、有機バイオポリマー、例えば、タンパク質、核酸 50

どは含まれない。好適な小さい有機分子は、約5000 Daまで、約2000 Daまで、または約1000 Daまでの大きさである。

【0055】

「バイオポリマー」とは、生物由来のポリマーまたはオリゴマー、例えば、ポリペプチドまたはオリゴペプチド、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド、多糖類またはオリゴ糖類、ポリグリセリドまたはオリゴグリセリドをさす。

【0056】

「アドレス指定可能」は、所望の作用を達成するためにレーザーのような源によってアドレス指定され得る、既知の位置を意味するために用いられる。例えば、サンプルを、アドレス指定可能な位置でイオン化源からのレーザーによって気相に脱離・イオン化することができる。

10

【0057】

III. 装置

本発明の装置はバイオチップである。「バイオチップ」とは、アナライトのハイブリダイゼーション、捕捉または修飾のためのほぼ平坦な表面を含む固相支持体を一般に有するバイオアッセイ用の装置のことである。バイオチップは様々な測定検出装置と共にプローブとして簡便に使用するように適合される。タンパク質バイオチップは、ペプチドもしくはタンパク質の検出、またはタンパク質により捕捉されたアナライトの検出に用いるために適合させたバイオチップである。バイオチップは一般的に分子の捕捉を可能にするための結合性官能基を含んでいる。「結合性官能基」とは、共有または非共有化学結合を介して分子と結合する官能基をさす。結合性官能基については、上で詳しく説明した。

20

【0058】

基本的な装置はヒドロゲルでコーティングされた基体を含んでなる。基体の表面は、該表面に共有結合で結合された1以上のアンカー試薬を含んでいる。アンカー試薬は第1の重合性部分を含む。基本的な装置はまた、複数のヒドロキシル基において第2の重合性部分により誘導体化された可溶性の非イオン性多糖を含有するヒドロゲルを含んでなる。多糖は互いに架橋しており、また、重合反応から生じる結合を介してアンカー試薬とも架橋している。いくつかの実施形態では、多糖がさらに結合性官能基を含んでいる。他の実施形態では、官能基化された重合性モノマーも多糖およびアンカー試薬に架橋している。

【0059】

30

A. 基体

「基体」という用語は、ヒドロゲル物質を担持することができる材料をさすために用いられる。基体はヒドロゲル物質を担持することができる適切な任意の材料で作ることができる。例えば、基体材料として、限定するものではないが、絶縁材料、半電導性材料、電導性材料、有機ポリマー、バイオポリマー、紙、メンブラン、金属とポリマーの複合材料、またはこれらの任意の組合せが挙げられる。絶縁材料の例は、酸化ケイ素のようなガラス、およびセラミックである。半電導性材料の例はシリコンウェハである。電導性材料の例は、ニッケル、真鍮、鋼、アルミニウム、金などの金属、または電導性ポリマーである。

【0060】

40

基体はいろいろな性質をもちうる。例えば、基体は多孔質であっても非多孔質であってもよい。また、それは実質的に硬質でも軟質でもよい。本発明の一実施形態において、基体は構造安定性を与えるために非多孔質で、実質的に硬いものである。別の実施形態では、基体は微孔質または多孔質である。さらに、基体は絶縁性、電導性、または半電導性でありうる。好ましい実施形態では、基体は表面電荷を減らしかつ質量分解を高めるために電導性である。電導性ポリマーまたは電導性粒状充填剤のような材料を配合することによって、基体を電導性にもできる。電導性ポリマーの例は、炭化ポリエーテル、ケトン、ポリアセチレン、ポリフェニレン、ポリピロール、ポリアニリン、およびポリチオフェンである。電導性粒状充填剤の例は、カーボンブラック、金属粉、および電導性ポリマー粒子である。

50

【0061】

基体はどのような形状のものでよい。一実施形態において、基体は、気相イオン分光計に取り外し可能に挿入できる形状または差し込むことができる形状をしているプローブである。いくつかの実施形態では、基体が質量分析計のプローブインターフェースにかみ合わせるための手段を含む。ある実施形態では、基体を実質的に平坦である。別の実施形態では、基体を実質的に滑らかである。さらに別の実施形態では、基体を実質的に平らで、実質的に硬質である。例えば、図1に示すように、基体はストリップ(101)の形をしていてもよい。また、基体はプレートの形でもよい。さらに、基体の厚さは、約0.1mm~約10cmまたはそれ以上、場合により約0.5mm~約1cmまたはそれ以上、場合により約0.8mm~約0.5cm、または場合により約1mm~約2.5mmでありうる。好ましくは、基体そのものは手で持てるような大きさである。例えば、基体の最長交叉寸法つまり対角線は、少なくとも約1cm以上、好ましくは約2.5cm以上、最も好ましくは少なくとも約5cm以上でありうる。

【0062】

基体が単独では気相イオン分光計に容易に取り外し可能に挿入できない形状のものである場合は、プローブを気相イオン分光計に取り外し可能に挿入できるようにする支持部材を基体がさらに含んでいてもよい。また、支持部材をメンブランのような柔軟性の基体と共に使用することにより、プローブを気相イオン分光計に容易に取り外し可能に挿入して気相イオン分光計のエネルギービームにサンプルを安定した状態で提示できるようにすることも可能である。例えば、支持部材はプレートまたは容器(96または384ウェルを有する市販のマイクロタイター容器など)のような実質的に硬質の材料でありうる。基体と支持部材を固定することが望まれる場合には、それらを、当技術分野で知られている適当な方法、例えば、接着結合、共有結合、静電結合などによって結合させることができる。さらに、支持部材は手で持てるような大きさであることが好ましい。例えば、支持部材の最長交叉寸法つまり対角線は、少なくとも約1cm以上、好ましくは少なくとも約2cm以上、最も好ましくは少なくとも約5cm以上でありうる。この実施形態の一つの利点は、アナライトをある物理的環境で基体に吸着させ、気相イオン分光計によってアナライトの支持部材に移すことができる点である。

【0063】

基体はまた、気相イオン分光計の導入部および検出部と共に使用するよう適合させることができる。例えば、手動による基体の位置決めを行う必要性なしに、基体を連続した位置に水平にかつ/または垂直に動かす水平および/または垂直輸送キャリッジに取り付けるように基体を適合させることができる。

【0064】

基体の表面は基体の外面または上部境界である。いくつかの実施形態では、基体の表面が金属酸化物または鉱物酸化物のコーティングを含む。金属酸化物または鉱物酸化物はどのような金属または鉱物酸化物であってもよい。好ましい金属または鉱物酸化物は酸化ケイ素、酸化チタン、酸化ジルコニウム、および酸化アルミニウムである。

【0065】

基体の表面は異なるアドレス指定可能な位置で該表面に結合された1以上のアンカー試薬を含む。「アドレス指定可能な位置」という用語は、所望の作用を達成するためにレーザーのような源によってアドレス指定され得る、既知の位置を意味するために用いられる。

【0066】

「アンカー試薬」という用語は、基体の表面に結合される試薬を意味するために用いられる。アンカー試薬は、第2の部分アンカー試薬に結合させるために第2の部分と相互作用することができる部分(以後「アンカー試薬部分」という)を含んでいる。アンカー試薬は、表面に共有結合で結合されかつ第2の部分アンカー試薬に結合させるために第2の部分と相互作用することができるアンカー試薬部分を含むものであれば、いかなる試薬であってもよい。当業者であれば、適当なアンカー試薬を容易に確認することができよう。いくつかの実施形態では、アンカー試薬は、(3-アクリロキシプロピル)トリメトキシシラ

ン、(3-アクリロキシプロピル)メチルジメトキシシラン、(3-アクリロキシプロピル)ジメチルメトキシシラン、(3-アクリロキシプロピル)トリクロロシラン、(3-アクリロキシプロピル)メチルジクロロシラン、(3-アクリロキシプロピル)ジメチルククロロシラン、(3-メタクリロキシプロピル)トリメトキシシラン、(3-メタクリロキシプロピル)メチルジメトキシシラン、(3-メタクリロキシプロピル)ジメチルメトキシシラン、(3-メタクリロキシプロピル)トリクロロシラン、(3-メタクリロキシプロピル)メチルジクロロシラン、(3-メタクリロキシプロピル)ジメチルククロロシラン、ビニロキシトリメチルシラン、ビニルトリクロロシラン、ビニルトリメトキシシラン、アリルククロロメチルジメチルシラン、アリルククロロジメチルシラン、アシルプロモジメチルシラン、アシルジクロロメチルシラン、アシルジイソプロピルアミノジメチルシラン、アシルオキシ-tert-ブチルジメチルシラン、アシルトリメトキシシラン、およびこれらの組合せから選択されるシランである。

【0067】

アンカー試薬部分は基体の表面へのヒドロゲルの結合を可能にするものであり、ヒドロゲルに結合された分子と相互作用することができる任意の分子でありうる。いくつかの実施形態において、アンカー試薬部分は、ヒドロゲルに結合された第2の重合性部分と架橋結合することができる重合性部分（以後「第1の重合性部分」という）である。第1および第2の重合性部分の例は不飽和結合を含む分子である。好ましい実施形態では、第1および第2の重合性部分がメタクリル、アクリル、アシルおよびビニルからなる群より選択される基を含む。

【0068】

他の実施形態において、アンカー試薬部分は、ヒドロゲルをアンカー試薬に結合させるために、ヒドロゲルに結合された第2の官能基と相互作用することができる官能基（以後「アンカー試薬官能基」という）である。アンカー試薬官能基と第2の官能基は互いに相互作用するどのような基であってもよい。いくつかの実施形態では、アンカー試薬官能基がカルボキシル基で、第2の官能基が一級アミノ基であるか、またはその逆である。他の実施形態では、アンカー試薬官能基がビオチンで、第2の官能基がアビジンであるか、またはその逆である。

【0069】

B. コーティング

ヒドロゲルは架橋された非イオン性多糖を含み、複数のアドレス指定可能な位置で表面に結合させることができる。多糖は重合性部分を含むが、この重合性部分はアンカー試薬の重合性部分と区別するために「第2の重合性部分」と称される。第2の重合性部分はアンカー試薬に結合された重合性部分と架橋結合し、さらに多糖に結合された重合性部分とも架橋結合することができる。

【0070】

多糖はどのような炭水化物のポリマーであってもよい。代表的な多糖は、ヒドロキシエチルセルロース、デンプン、アミロースおよびアガロースからなる群より選択される。好ましい多糖はデキストランである。本発明においては各種サイズのデキストランを利用することができる。例えば、デキストランは約1 kDa～約2000 kDaの平均分子量を有する。好ましくは、デキストランは約500 kDaの平均分子量を有する。

【0071】

多糖は「第2の重合性基」と称される任意の重合性基で誘導体化することができる。この重合性基は不飽和結合を含むことが好ましい。好ましい実施形態において、重合性基はアシル、アクリロイル、メタクリロイル、およびビニルからなる群より選択される。このような誘導体化多糖は、例えば、多糖をグリシジルメタクリレート、グリシジルアクリレート、塩化アクリロイル、塩化メタクリロイル、またはアシル-グリシジルエーテルとアルカリ性条件下で反応させることにより、製造することができる。好ましい実施形態では、多糖は(メタ)アクリロイルデキストランである。

【0072】

多糖に結合される第2の重合性部分の量はさまざまでありうる。いくつかの実施形態に

において、多糖に結合される第2の重合性部分の量は、1糖単位あたり約1個から1000糖単位あたり約1個までである。好ましい実施形態では、重合性部分が1つ以上の二重結合を含む。

【0073】

多糖は重合反応から生じる結合を介して相互に架橋結合することができる。いくつかの実施形態では、架橋剤を用いて隣接している多糖鎖間に化学結合を形成させる。架橋剤は隣接多糖鎖間に化学結合を形成することができるような架橋剤であってもよい。例えば、架橋剤はN,N'-メチレン-ビス-アクリルアミド、N,N'-メチレン-ビス-メタクリルアミド、またはジアリルタータルジアミドである。架橋剤はビス-エポキシ架橋剤、例えばBDDGE、EDGE、またはポリ(エチレングリコール)ジグリシジルエーテル(PEGDGE)であつてもよい。好ましい実施形態では、デキストランがBDDGE、EDGE、およびポリ(エチレングリコール)ジグリシジルエーテル(PEGDGE)からなる群より選択されるビス-またはポリ-エポキシ架橋剤により相互に架橋結合されている。

10

【0074】

組み合わせられたガラスコーティングとヒドロゲル物質のような、基体上のコーティングの厚さは、非常に薄いものであつてよく、1マイクロメートルより薄くてもよい。いくつかの実施形態では、コーティングの厚さは約1マイクロメートルの厚さである。他の実施形態では、コーティングの厚さは少なくとも約10マイクロメートル、少なくとも約20マイクロメートル、少なくとも約50マイクロメートル、または少なくとも約100マイクロメートルの厚さである。ヒドロゲル物質それ自体の厚さも非常に薄くてもよい。例えば、ヒドロゲル物質の厚さは1マイクロメートル未満、約1マイクロメートル、少なくとも約10マイクロメートル、少なくとも約20マイクロメートル、少なくとも約50マイクロメートル、または少なくとも約100マイクロメートルの厚さでありうる。いくつかの実施形態では、ヒドロゲル物質の厚さは約50~100マイクロメートルの範囲であつてよい。コーティングおよび/またはヒドロゲル物質の厚さの選択は、実験条件または望まれる結合力に左右され、当業者により決定される。

20

【0075】

いくつかの実施形態において、多糖は第2の重合性部分に加えて結合性官能基を含む。この結合性官能基はアナライトと結合することができる。ヒドロゲル物質の結合性官能基には、例えば、カルボキシル、チオール、アルデヒド、エポキシ、スルホネート、アミノ、置換アミノ、ホスフェート、疎水性基、親水性基、反応性基、金属キレート化基、チオエーテル、ピオチン、ポロネート、および染料が含まれる。結合性官能基と第2の重合性部分を含む多糖の合成は当業者の技量の範囲内である。例えば、Immobilized affinity ligand techniques, Greg T. Hermanson, A. Krishna Mallia, Paul K. Smith. Academic Press, 1992を参照されたい。多糖は望ましい結合性官能基で予め官能基化しておくこともできるが、所望により、多糖を相互におよびアンカー試薬と架橋結合させてから結合性官能基を付加してもよい。

30

【0076】

いくつかの実施形態において、ヒドロゲルは結合性官能基で官能基化された重合性モノマーと架橋剤から形成される。これらの剤を1つの重合反応において多糖およびアンカー試薬と組み合わせてもよい。あるいはまた、第1の重合反応において多糖を相互におよびアンカー試薬と架橋結合させてから、結合性官能基で官能基化された重合性モノマー(本明細書では「官能基化重合性モノマー」という)と架橋剤との第2の重合反応を行つてもよい。この後者の実施形態では、第1の重合反応で形成された物質と第2の重合反応で形成された物質との間に相互浸透網目構造が形成される。

40

【0077】

好ましくは、重合性モノマーはアクリルモノマーである。アクリルモノマーの例は、アクリルアミド-グリコール酸、アクリルアミド-メチル-プロパン-スルホン酸、アクリルアミド-エチル-ホスフェート、ジエチル-アミノエチル-アクリルアミド、トリメチル-アミノ-プロピル-メタクリルアミド、N-オクチル-アクリルアミド、N-フェニル-アクリルアミ

50

ド、およびtert-ブチル-アクリルアミドである。

【0078】

結合性官能基としてカルボキシル基を含むヒドロゲルは、例えば、(メタ)アクリル酸、2-カルボキシエチルアクリレート、N-アクリロイル-アミノヘキササン酸、N-カルボキシメチルアクリルアミド、2-アクリルアミドグリコール酸、またはこれらの誘導体のような置換アクリルアミドまたは置換アクリレートモノマーを組み入れることにより得ることができる。

【0079】

結合性官能基としてスルホネート基を含むヒドロゲルは、例えば、アクリルアミドメチル-プロパンスルホン酸モノマーまたはその誘導体を組み入れることにより得ることができる。

10

【0080】

結合性官能基としてホスフェート基を含むヒドロゲルは、例えば、N-ホスホエチルアクリルアミドモノマーまたはその誘導体を組み入れることにより得ることができる。

【0081】

結合性官能基としてアミノ基を含むヒドロゲルは、例えば、トリメチルアミノエチルメタクリレート、ジエチルアミノエチルメタクリレート、ジエチルアミノエチルアクリルアミド、ジエチルアミノエチルメタクリルアミド、ジエチルアミノプロピルメタクリルアミド、アミノプロピルアクリルアミド、塩化3-(メタクリロイルアミノ)プロピルトリメチルアンモニウム、2-アミノエチルメタクリレート、N-(3-アミノプロピル)メタクリルアミド、2-(t-ブチルアミノ)エチルメタクリレート、2-(N,N-ジメチルアミノ)エチル(メタ)アクリレート、N-(2-(N,N-ジメチルアミノ))エチル(メタ)アクリルアミド、N-(3-(N,N-ジメチルアミノ))プロピルメタクリルアミド、塩化2-(メタ)アクリロイルオキシエチルトリメチルアンモニウム、塩化3-メタクリロイルオキシ-2-ヒドロキシプロピルトリメチルアンモニウム、臭化(2-アクリロイルオキシエチル)(4-ベンゾイルベンジル)ジメチルアンモニウム、2-ビニルピリジン、4-ビニルピリジン、ビニルイミダゾール、またはそれらの誘導体を組み入れることにより得ることができる。

20

【0082】

結合性官能基としてチオール基を含むヒドロゲルは、例えば、アクリロイルシステインを含めることにより得ることができる。

30

【0083】

結合性官能基としてエポキシ基を含むヒドロゲルは、例えば、グリシジルメタクリレートまたはアリルグリシジルエーテルを含めることにより得ることができる。

【0084】

結合性官能基としてアルデヒド基を含むヒドロゲルは、例えば、アクロレインを含めることにより得ることができる。

【0085】

結合性官能基として親水性基を含むヒドロゲルは、例えば、N-(メタ)アクリロイルトリス(ヒドロキシメチル)メチルアミン、ヒドロキシエチルアクリルアミド、ヒドロキシプロピルメタクリルアミド、N-アクリルアミド-1-デオキシソルピトール、ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート、ヒドロキシプロピルアクリレート、ヒドロキシフェニルメタクリレート、ポリエチレングリコールモノメタクリレート、ポリエチレングリコールジメタクリレート、アクリルアミド、グリセロールモノ(メタ)アクリレート、2-ヒドロキシプロピルアクリレート、4-ヒドロキシブチルメタクリレート、2-メタクリルオキシエチルグルコシド、ポリ(エチレングリコール)モノメチルエーテルモノメタクリレート、ビニル4-ヒドロキシブチルエーテル、またはこれらの誘導体を含めることにより得ることができる。

40

【0086】

結合性官能基として疎水性基を含むヒドロゲルは、例えば、N,N-ジメチルアクリルアミド、N,N-ジエチル(メタ)アクリルアミド、N-メチルメタクリルアミド、N-エチルメタクリルアミド、N-プロピルアクリルアミド、N-ブチルアクリルアミド、N-オクチル(メタ)アク

50

リルアミド、N-ドデシルメタクリルアミド、N-オクタデシルアクリルアミド、N-フェニルアクリルアミド、プロピル(メタ)アクリレート、デシル(メタ)アクリレート、ステアリル(メタ)アクリレート、オクチル-トリフェニルメチルアクリルアミド、ブチル-トリフェニルメチルアクリルアミド、オクタデシル-トリフェニルメチルアクリルアミド、フェニル-トリフェニルメチルアクリルアミド、ベンジル-トリフェニルメチルアクリルアミド、またはこれらの誘導体を含めることにより得ることができる。

【0087】

結合性官能基として金属キレート化基を含むヒドロゲルは、例えば、N-(3-N,N-ビスカルボキシメチルアミノ)プロピルメタクリルアミド、5-メタクリルアミド-2-(N,N-ビスカルボキシメチルアミノ)ペンタン酸、N-(アクリルアミドエチル)エチレンジアミンN,N',N'-三酢酸、またはこれらの誘導体を含めることにより得ることができる。

【0088】

結合性官能基として反応性基を含むヒドロゲルは、例えば、グリシジルアクリレート、塩化アクリロイル、グリシジルメタクリレート、塩化メタクリロイル、N-アクリロキシスクシンイミド、ビニルアズラクトン、アクリルアミドプロピルピリジルジスルフィド、N-(アクリルアミドプロピル)マレイミド、ビス-エポキシドまたはビス-オキシラン化合物で活性化されたアクリルアミドデオキシソルビトール、アリルクロロホルメート、無水メタクリル酸、アクロレイン、無水アリルコハク酸、無水シトラコン酸、アリルグリシジルエーテル、またはこれらの誘導体を含めることにより得ることができる。

【0089】

結合性官能基としてチオエーテル基を含むヒドロゲルは、例えば、チオフィリック(thiophilic)モノマー、例えば2-ヒドロキシ-3-メルカプトピリジルプロピル(メタクリレート)、2-(2-3-(メタ)アクリロキシエトキシ)エタンスルホニル)エチルスルファニルエタノール、またはこれらの誘導体を含めることにより得ることができる。

【0090】

結合性官能基としてビオチンを含むヒドロゲルは、例えば、ビオチンモノマー、例えばn-ビオチニル-3-(メタ)アクリルアミドプロピルアミン、またはその誘導体を含めることにより得ることができる。

【0091】

結合性官能基として染料を含むヒドロゲルは、例えば、染料モノマー、例えばN-(N'-染料結合アミノプロピル)(メタ)アクリルアミドを含めることにより得ることができる。染料は、チバクロンブルー(cibacron blue)など、どのような適当な染料から選択してもよい。

【0092】

結合性官能基としてボロネートを含むヒドロゲルは、例えば、ボロネートモノマー、例えばN-(m-ジヒドロキシボリル)フェニル(メタ)アクリルアミド、またはその誘導体を含めることにより得ることができる。

【0093】

所望により、一部の結合性官能基は重合工程の後に、すなわちヒドロゲルの後修飾により、結合させることができる。例えば、チオエーテル基はヒドロゲル物質のヒドロキシル基を修飾することにより生成することができる。もう一つの例は、活性化エステルまたは酸塩化物を含むヒドロゲル物質を修飾してヒドラジド基を有するヒドロゲル物質を生成することである。さらに別の例は、ヒドロゲル物質のヒドロキシル基または反応性基を修飾して、例えば染料基、レクチン基、またはヘパリン基を結合性官能基として含むヒドロゲル物質を生成することである。さらに、結合性官能基はコンジュゲーション化合物、例えばホモ-またはヘテロ-二官能性の架橋試薬またはカップリング試薬を用いて、ヒドロゲル物質に結合させることができる。カップリングおよび架橋試薬の例として、例えば、スクシンイミジルエステル、マレイミド、ヨードアセトアミド、カルボジイミド、ジ-アルデヒドおよびグリオキサール、ビス-エポキシドおよびポリ-オキシラン、カルボニルジイミダゾール、または酸無水物が挙げられる。これらのコンジュゲーション試薬は、官能

10

20

30

40

50

基の反応の化学を制御することが望まれる場合に特に有用でありうる。

【0094】

いくつかの実施形態において、ヒドロゲルは三次元足場を与える。ヒドロゲルの三次元的性質は結合性官能基を含む二次元コーティングに有利である。表面上の結合性官能基の二次元提示は、単位面積あたりの活性官能基または結合性官能基を相当に制限する。これに対して、ヒドロゲルが三次元足場を提供し、その足場から結合性官能基が提示されると、単位面積あたりの官能基の数が増加する。このヒドロゲルの三次元的性質は高いアナライト結合能を有する表面を与え、検出感度の向上につながる。さらに、ヒドロゲルの骨格の親水性は、裸の基体と比較して、ヒドロゲルポリマー骨格へのタンパク質のような生体分子の非特異的結合を減少させる。その上、ヒドロゲル物質の適切なサイズの多孔性により、未結合のサンプル成分を洗浄工程で簡単に洗い流すことができる。

10

【0095】

C. 基体上のヒドロゲルの位置決め

ヒドロゲル物質は基体上に不連続的または連続的に存在することができる。不連続である場合は、1つの基体上に1個程度の少数の、または10、100、1000、10,000個以上もの多数のヒドロゲルのスポットが存在してよい。スポットの大きさは実験のデザインおよび目的に応じて変えることができる。しかしながら、それは衝突するエネルギー源の直径（例えば、レーザースポットの直径）より大きい必要はない。例えば、スポットの直径は約0.5mm～約5mm、場合により約1mm～約2mmとすることができる。スポットは同一のまたは異なるヒドロゲル物質により連続していてもよい。ある場合には、複数の異なる溶離液に対する評価を可能にするために、または結合されたアナライトを今後の使用のために保存することができるように、基体上の複数の位置に同一のヒドロゲル物質を付与することが有利である。基体が異なる結合特性を有する複数の異なるヒドロゲル物質を備えている場合は、1つのサンプルから多様な異なるアナライトを結合させて検出することが可能である。1つのサンプルの評価のために基体上の複数の異なるヒドロゲル物質を使用することは、本質的に、それぞれ異なるクロマトグラフィーカラムを使用する複数のクロマトグラフィー実験を同時に行うことに等しいが、本方法は1つのシステムを必要とするだけであるという利点を有する。

20

【0096】

基体が複数のヒドロゲル物質を含む場合は、ヒドロゲル物質をあらかじめ決められたアドレス指定可能な位置に付与することが特に有用である。例えば、図1のヒドロゲル物質102を参照されたい。アドレス指定可能な位置はどのようなパターンで配置されてもよいが、規則的なパターン、例えば直線、直交配列、または円のような規則的な曲線に配置することが好ましい。ヒドロゲル物質をあらかじめ決められたアドレス指定可能な位置に付与することによって、ヒドロゲル物質のそれぞれの位置を溶離液のセットで洗浄し、それによりヒドロゲル物質の結合特性を改変することが可能である。さらに、プローブが輸送可能なキャリッジに固定される場合は、あらかじめ決められたアドレス指定可能な位置でヒドロゲル物質に結合されたアナライトを、気相イオン分光計によるアナライトの検出を助けるために連続する位置に動かすことができる。

30

【0097】

あるいはまた、ヒドロゲル物質は基体上に連続して存在してもよい。ある実施形態では、1つのタイプのヒドロゲル物質が基体の表面全体に置かれる。別の実施形態では、異なる結合性官能基を有する複数のヒドロゲル物質が一次元または二次元勾配で基体上に置かれる。例えば、ストリップの一端に弱い疎水性のヒドロゲル物質を付与し、他端に強い疎水性のヒドロゲル物質を付与することができる。あるいは、プレートの一方のコーナーに弱い疎水性のアニオン性ヒドロゲル物質を付与し、対角線上の他方のコーナーに強い疎水性のアニオン性ヒドロゲル物質を付与する。こうした勾配は当技術分野で公知の方法により作ることができる。例えば、制御されたスプレー法により、または勾配の寸法にわたって反応の漸増的完了を可能にする時間的方法で表面の一方から他方に物質を流すことにより、勾配を作ることができる。さらに、段階的勾配を作るために光化学反応性基を照射と

40

50

組み合わせてもよい。この方法を正確な角度で繰り返すと、異なる結合性官能基を有する同様のまたは異なるヒドロゲル物質の直交勾配が得られる。

【0098】

IV. 表面に多糖系ヒドロゲルが結合されているバイオチップの作製方法

上述したように、基本的装置は多糖系ヒドロゲルをコーティングした基体を含んでなる。好ましくは、コーティングは、ヒドロゲルと基体表面のいずれにも存在する重合性部分を介して、基体の表面にヒドロゲルをグラフトすることにより行う。

【0099】

一実施形態において、重合性部分は次のようにして多糖に付加することができる。多糖（例えば、デキストラン）を、重合性部分と反応性部分（多糖に結合する）を含む二官能性分子と反応させる。例えば、デキストランをアルカリ性条件下でグリシジルメタクリレート(GMA)、エポキシメチルアクリルアミド(EMA)、例えばN-メチル-N-グリシジル-メタクリルアミド(MGMA)、グリシジルアクリレート、塩化アクリロイル、塩化メタクリロイル、またはアリル-グリシジル-エーテルと反応させることができる。これらの分子は、一端に重合性メタクリレート分子またはメタクリルアミド分子を、他端に反応性エポキシド基を含む二官能性分子である。エポキシドはデキストランのヒドロキシル部分と共有結合反応で反応する。その結果、メタクリレートまたはメタクリルアミド基が垂れ下がっている「修飾デキストラン」が得られる。

【0100】

グラフト反応法は次のように進行しうる。修飾した多糖と重合開始剤を含む溶液を、誘導体化した基体表面に接触させる。多糖分子の「第2」の重合性部分が多糖分子同士を結合させ、また、アンカー試薬の「第1」の重合性部分と結合する。この共重合反応はどのような公知の共重合開始剤を用いて開始させてもよい。好適な共重合反応は光感受性触媒、温度感受性触媒、またはアミンの存在下で過酸化物を用いて開始させる。その結果、重合反応から生じる結合を介して基体の表面に多糖がグラフトされたヒドロゲルが得られる。図2を参照されたい。

【0101】

あるいはまた、修飾した多糖を、多糖の重合性部分とカップリングする架橋剤（例えば、ビスアクリルアミド）を用いて架橋させることができる。

【0102】

タンパク質または核酸バイオチップとして特に有用な本発明の実施形態では、ヒドロゲルが結合性官能基をさらに含む。結合性官能基は多糖の重合前、重合中または重合後に与えることができる。ここで、それぞれの方法の例を順に説明する。

【0103】

ある実施形態では、結合性官能基が多糖の重合前に付与される。この方法の例では、結合性官能基で予め官能基化された多糖が提供される。これは、例えば、重合性部分および多糖と反応性の部分を含む二官能性リンカーとだけでなく、結合性官能基および多糖と反応性の部分を含む第2の二官能性リンカーとも多糖を反応させることにより、達成することができる。この場合には、修飾された多糖は重合性官能基と結合性官能基の両方を含む。この時点で、修飾多糖を上記のように基体の表面でヒドロゲルに重合させることができる。

【0104】

結合性官能基を多糖に組み入れるための一つの方法は、多糖をクロロ酢酸と反応させることを伴う。この例では、結合性官能基がカルボキシル基である。基体の表面にすでに結合された多糖に結合性官能基を組み入れるために使用しうる方法は、最初に多糖をカルボニルジイミダゾール、塩化トシル、トリクロロトリアジンまたはクロロホルメートで活性化することを含む。その後、活性化された多糖を、結合性官能基を含む結合性試薬と反応させる。

【0105】

別の実施形態では、ヒドロゲルの製造中に結合性官能基を付与する。この実施形態の一

10

20

30

40

50

例では、修飾多糖、結合性官能基を含む官能基化モノマー、および開始剤を含む溶液を、アンカー部分を含む基体の表面と接触させ、重合反応を進行させる。その結果、重合反応（この反応において、多糖が結合性官能基を含む成分でさらに誘導体化される）から生じる結合を介して基体の表面にグラフトされた多糖を含むヒドロゲルが得られる。図3を参照されたい。

【0106】

あるいはまた、結合性官能基を含む成分は、重合可能な架橋剤により多糖に結合させることができる。

【0107】

あるいはまた、重合溶液は「スパーサーモノマー」をさらに含んでいてもよい。スパーサーモノマーは修飾多糖の遊離の重合性部分と結合する重合性部分を含む。スパーサーモノマーは官能基化ヒドロゲルに所望の化学的性質を与えるように機能しうる。こうした性質は、結合性官能基により付与されたあまり望ましくない性質を中和するために有利になりうる。

10

【0108】

別の実施形態では、結合性官能基がヒドロゲルの製造後に付与される。この実施形態の例は、多糖系ヒドロゲルがすでにグラフトされている基体から開始される。（上記参照。）一つの例では、多糖ゲルに相互浸透網目構造を形成させることにより結合性官能基を付与するが、結合性官能基はゲルに共有結合で結合されてもされなくてもよい。図4を参照されたい。かかる方法の一つでは、結合性官能基を含む重合性モノマーを用意する。これらのモノマーと開始剤と任意に架橋剤を含む溶液をグラフト化ヒドロゲルと接触させ、重合させる。その結果、2つの独立したゲルの相互浸透網目構造が生じるが、一方のゲルは、基体表面にグラフトされた最初の多糖系ヒドロゲルであり、他方は、結合性官能基で官能基化されたモノマーと必要に応じて架橋剤を含む新しいゲルである。

20

【0109】

多糖系ゲルそのものが結合性官能基を含むケースでは、多糖系ゲル上で化学薬剤を反応させることにより、こうした官能基を付与することができる。化学的な活性化剤としては、カルボニルジイミダゾール、塩化トシル、トリクロロトリアジン、およびフェニルクロロホルメートがある。

【0110】

特定の実施形態においては、重合性溶液を複数の異なるアドレス指定可能な位置で基体の表面に配置して、最終的なバイオチップが基体上の異なる場所に個別的なヒドロゲルパッドを有するようにする。他の実施形態では、表面が異なるアドレス指定可能な位置に複数のアンカー試薬を含み、これらの複数の位置でヒドロゲルをアンカー試薬と重合させる。

30

【0111】

別の実施形態においては、基体の表面に共有結合で結合されたアンカー試薬に結合した第1の官能基と、多糖またはヒドロゲルに結合した第2の官能基との間の相互作用により、ヒドロゲルを表面に結合させる。この装置は、初めに、表面にアンカー試薬が共有結合で結合されている基体を用意することにより製造される。この実施形態では、アンカー試薬が第1の官能基を有する。次に、このアンカー試薬を、第1の官能基と相互作用させるための第2の官能基により複数のヒドロキシル基において誘導体化された可溶性の非イオン性多糖と接触させる。第1および第2の官能基は、多糖のアンカー試薬への結合を可能にするような方法で相互作用する、どのような分子であってもよい。いくつかの実施形態では、第1および第2の官能基がピオチンとアビジンである。他の実施形態では、第1および第2の官能基が縮合反応で反応してペプチド結合を形成するカルボキシル基と一級アミノ基である。

40

【0112】

上記の多糖、モノマー、架橋剤および/またはアンカー試薬を混合し、当技術分野で公知の適当な重合法を用いて重合させることができる。生成物の品質および重合反応の制御

50

のしやすさは、適切な重合法を決定する際に考慮すべき要因である。例えば、塊状重合または沈殿重合を使用することができる。ある実施形態では、モノマーを水溶液の形で調製する。他の実施形態では、モノマーを有機溶液の形で調製する。この溶液を溶液重合または逆相懸濁重合に供する。

【0113】

モノマーの量は、溶媒または水、モノマーおよび他の添加剤を含む最終モノマー混合溶液の重量に基づいて、一般的には約1~約40重量%、好ましくは約3~約25重量%、最も好ましくは約5~約10重量%の範囲とすることができる。ここに記載するモノマーと架橋剤の適切な比率からは、水に不溶性で水に膨潤性の架橋ヒドロゲル物質が生じる。さらに、ここに記載するモノマーと架橋剤の適切な比率からは、アナライトが急速に浸透して結合性官能基と結合することを可能にする開放多孔性三次元ポリマー網目構造が形成される。また、未結合のサンプル成分をヒドロゲル物質の多孔性三次元ポリマー網目構造から容易に洗い流すことも可能である。

10

【0114】

架橋剤は、必要な場合は、2種以上のメンバーを組み合わせた形で使用することができる。架橋剤としては、2個以上の重合性不飽和基を有する化合物を使用することが好ましい。架橋剤はポリマーの隣接する分子鎖同士を結合させ、その結果として三次元足場（そこから結合性官能基が提示される）を有するヒドロゲル物質が生じる。架橋剤の量は、モノマーの重量基準で、一般的に約0.1~約10%、好ましくは約1~約10%の範囲とすることができる。架橋剤の最適量はゲルを製造するために用いるモノマーの量に応じて変化する。例えば、約40重量%のモノマーから製造されたヒドロゲル物質の場合には、約3重量%より少ない架橋剤を使用する。約5~約25重量%のモノマーから製造されたヒドロゲル物質の場合には、好ましくは約2~約5重量%の架橋剤を使用する。

20

【0115】

架橋剤の典型的な例としては、N,N'-メチレン-ビス-アクリルアミド、N,N'-メチレン-ビス-メタクリルアミド、エチレングリコールジアクリレート、ポリエチレングリコールジメタクリレート、ポリエチレングリコールジアクリレート、プロピレングリコールジアクリレート、プロピレングリコールジメタクリレート、ポリプロピレングリコールジアクリレート、ポリプロピレングリコールジメタクリレート、トリメチロールプロパントリアクリレート、トリメチロールプロパントリメタクリレート、トリメチロールプロパンジアクリレート、トリメチロールプロパンジメタクリレート、グリセロールトリアクリレート、グリセロールトリメタクリレート、グリセロールアクリレートメタクリレート、エチレンオキシド-修飾トリメチロールプロパントリアクリレート、エチレンオキシド-修飾トリメチロールプロパントリメタクリレート、ペンタエリスリトールテトラアクリレート、ペンタエリスリトールテトラメタクリレート、ジペンタエリスリトールヘキサアクリレート、ジペンタエリスリトールヘキサメタクリレート、トリアリルシアヌレート、トリアリルイソシアヌレート、トリアリルホスフェート、トリアリルアミン、ポリアリルオキシアルカン、ポリメタリルオキシアルカン、エチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル、グリセロールジグリシジルエーテル、エチレングリコール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、グリセロール、ペンタエリスリトール、エチレンジアミン、ポリエチレンジアミン、エチレンカーボネート、ジアリルタータルジアミド、グリシジルアクリレート、およびグリシジメタクリレートが挙げられる。

30

40

【0116】

重合反応は、重合反応混合物に重合開始剤を添加することにより開始させることができる。開始剤の濃度は、初期モノマー溶液の容積あたりの重量パーセントとして表して、約0.1~約2%、好ましくは約0.2~約0.8%である。例えば、こうした開始剤はフリーラジカルを生成する能力がある。適当な重合開始剤には、熱開始剤と光開始剤の両方がある。適当な熱開始剤として、例えば、過硫酸アンモニウム/テトラメチルエチレンジアミン(TEM ED)、2,2'-アゾビス(2-アミノプロパン)塩酸塩、過硫酸カリウム/ジメチルアミノブ

50

ロピオニトリル、2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル)、4,4'-アゾビス-(4-シアノ吉草酸)、2,2'-アゾビス-アミジノプロパン、および過酸化ベンゾイルが挙げられる。好ましい熱開始剤は過硫酸アンモニウム/テトラメチルエチレンジアミンおよび2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル)である。光開始剤として、例えば、イソプロピルチオキサントン、2-(2'-ヒドロキシ-5'-メチルフェニル)ベンゾトリアゾール、2,2'-ジヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン、およびリポフラビンが挙げられる。光開始剤を使用する場合は、重合プロセスを加速させるために過硫酸アンモニウムおよび/またはTEMEDのような促進剤を使用してもよい。

【0117】

一つの実施形態では、ヒドロゲル物質を基体表面上で現場重合させてコーティングを作る。現場重合プロセスにはいくつかの利点がある。第一に、基体表面に配置するモノマー溶液の量を調整することによってヒドロゲル物質の量を簡単に制御することができ、それにより利用可能な結合性官能基の量を制御することができる。例えば、基体表面に付着するモノマー溶液の量を、ピペティング、インクジェット、シルクスクリーン、エレクトロスプレー、スピコーティング、または化学蒸着のような方法を使って制御することができる。第二に、基体表面からのヒドロゲル物質の高さも制御することができ、それにより基体表面からの比較的均一な高さが得られる。

【0118】

現場重合に対しては、重合反応の光開始または熱開始を使用することができる。例えば、第1の重合性部分を含む1以上のアンカー試薬を含んでいる基体、第2の重合性部分により誘導体化された多糖、官能基化された重合性モノマー、架橋剤、および光開始剤を水中で混合し、その後ガス抜きする。続いて、混合したばかりの過硫酸アンモニウムまたは他の促進剤を添加する。このモノマー溶液を基体上に付着させてから、照射(例えば、UV曝露)により基体表面上で現場重合させる。その後、この溶液を自然乾燥、蒸気乾燥、赤外線乾燥、真空乾燥などの公知方法を使って乾燥させることができる。所望により、特定のヒドロゲル物質を保存のために処理してもよい。

【0119】

V. 使用法

特定の実施形態では、本発明のバイオチップは結合性官能基で官能基化される。記載したように、これらの結合性官能基は、それらが接触する分子と共有結合または非共有結合で係合することができる。このような結合性官能基と結合する分子は検出用のアナライトであってもよいし、また、それら自体が検出用の他のアナライトと結合してもよい。例えば、本発明の特定のバイオチップは結合性官能基としてエポキシドまたはカルボニルジイミダゾールを含んでなる。こうした基はポリペプチドや核酸といった生体分子と反応して、該分子と共有結合することができる。一実施形態では、これらの基を、抗体、受容体、または標的タンパク質もしくは小さい有機分子と特異的に結合する他のタンパク質との結合に用いる。他の実施形態では、結合性官能基が分子または分子のクラスと可逆的な共有結合を形成する。これらの分子の捕捉後、未結合分子を洗い流す。続いて、可逆的な結合を破壊して、その後の検出のためにアナライトを放出させることができる。あるいはまた、結合性官能基をアナライトまたはアナライト分子のクラスと非共有結合で係合させることができる。例えば、結合性官能基はクロマトグラフィーに用いる各種の吸着剤クラス(例えば、アニオン交換、カチオン交換、疎水性、親水性、金属キレート、または染料)と同様に機能することができる。したがって、サンプルからの各種アナライトが結合され、未結合分子が洗い流される。その後、捕捉された分子を検出することができる。

【0120】

上記の装置は、サンプルからアナライトを選択的に吸着させ、保持されたアナライトを質量分析をはじめとする本明細書に記載の方法により検出するために使用される。本発明の装置をWO 00/66265に記載されるとおりに利用することもできる。アナライトを複数の異なる選択条件下で選択的に吸着させることが可能である。例えば、異なる結合性官能基を有するヒドロゲル物質は異なるアナライトを選択的に捕獲する。さらに、溶離剤はヒド

10

20

30

40

50

ロゲル物質またはアナライトの結合特性を変えることができ、したがって、同じヒドロゲル物質またはアナライトに対して異なる結合選択条件を提供しうる。それぞれの選択条件は、吸着されたアナライトを吸着されていないものから分離する一次元分離を提供する。質量分析は、吸着されたアナライトを質量に従って互いから分離する二次元分離を提供する。この多次元分離はアナライトの分離とそれらの特性決定の両方をもたらす、この方法はリテンテートクロマトグラフィー (retentate chromatography) と呼ばれる。

【0121】

リテンテートクロマトグラフィーはいくつかの点で従来のクロマトグラフィーとは区別される。第一に、リテンテートクロマトグラフィーでは、吸着剤 (例えば、ヒドロゲル) 上に保持されるアナライトを検出する。従来のクロマトグラフィー法では、検出に先立ってアナライトを吸着剤から溶離させる。従来のクロマトグラフィーにおいて吸着剤から溶離されないアナライトを検出するための慣用または簡便な手段は存在しない。したがって、リテンテートクロマトグラフィーは保持されたアナライトの化学的または構造的な特徴についての直接的な情報を提供する。第二に、吸着クロマトグラフィーを脱離分光法による検出と組み合わせると、並外れた高感度 (フェムトモル範囲、またはアトモル範囲でさえも) および非常に微細な分解能が得られる。第三に、リテンテートクロマトグラフィーは、一部にはアナライトの直接検出を可能にするので、様々な異なる選択条件を用いて保持物を迅速に分析することができ、それゆえにサンプル中のアナライト類の多次元特性決定をもたらす。第四に、吸着剤を予め決められたアドレス指定可能な位置のアレイとして基体に付着させることができる。これにより、アレイ上の「アフィニティー部位」または「スポット」のような異なる吸着剤部位に曝露されたアナライトの異なる溶離条件下での並列処理が可能となる。

10

20

【0122】

A. アナライトの選択条件への曝露

1. アナライトとヒドロゲルとの接触

ヒドロゲルを基体に結合させる前または結合させた後に、アナライトとヒドロゲルとの結合を可能にする適当な方法を用いて、サンプルをヒドロゲルに加える。ヒドロゲルはサンプルと単に混合するかまたは一緒にするだけでよい。サンプルをヒドロゲル物質と接触させるには、基体をサンプル中に浸すまたは漬けるか、あるいは基体をサンプル中にちょっと浸漬するか、あるいは基体にサンプルをスプレーすることにより、基体上にサンプルを押し流すことにより、あるいはヒドロゲル物質と接触しているサンプルまたはアナライトを作製することにより行うことができる。さらに、サンプルをヒドロゲル物質と接触させるには、サンプルを溶離剤中で可溶化するかまたは溶離剤と混合し、溶離剤とサンプルの溶液を前記方法または当技術分野で公知の他の技法 (例えば、浸漬、スプレー、押し流し、ピペッティング) のいずれかを用いてヒドロゲル物質と接触させることにより行うことができる。一般に、ヒドロゲル物質に結合させるには、約1~500 μ l中に数アトモルから100ピコモルまでのアナライトを含有するサンプルの容量で十分である。

30

【0123】

サンプルは、アナライトをヒドロゲル物質に結合させるのに十分な時間にわたりヒドロゲル物質と接触させるべきである。一般的には、約30分から約12時間にわたってサンプルをヒドロゲル物質と接触させる。

40

【0124】

サンプルをヒドロゲル物質に接触させる温度は、選択された個々のサンプルおよびヒドロゲル物質の関数である。一般的には、周囲の温度および圧力条件下でサンプルをヒドロゲル物質に加える。しかし、一部のサンプルについては、改変された温度 (典型的には、4~37) および圧力条件が望ましいことがあり、これらは当業者が容易に決定できるだろう。

【0125】

2. 溶離剤によるヒドロゲル物質の洗浄

ヒドロゲルをアナライトと接触させて、結果的にヒドロゲル物質にアナライトを結合さ

50

せた後で、ヒドロゲル物質を「溶離剤」と呼ばれる洗浄液または溶液で洗う。ヒドロゲルは、それを基体に結合させる前または結合させた後でアナライトと接触させることができる。一般には、多次元分析を行うために、それぞれのヒドロゲル物質の位置を複数の異なる溶離剤で洗浄し、それにより特定のヒドロゲル物質に保持されたアナライト集団を改変する。ヒドロゲル物質の結合特性と溶離剤の溶離特性を組み合わせると、洗浄後にヒドロゲル物質に保持されるアナライトを制御する選択条件が得られる。したがって、洗浄ステップはヒドロゲル物質からサンプル成分を選択的に除去する。

【0126】

溶離剤はヒドロゲル物質の結合特性を変更することができる。溶離剤は、例えば、電荷またはpH、イオン強度、水の構造、特異的な競合試薬の濃度、表面張力、誘電率、および前記の組合せに関して、ヒドロゲル物質の選択性を変えることができる。一般的に吸着剤の結合特性を変えることができる溶離剤の他の例については、例えば、WO 98/59361を参照されたい。

10

【0127】

アナライトが結合しているヒドロゲル物質の洗浄は、例えば、基体を溶離剤に浸す、漬ける、もしくはちょっと浸漬する、溶離剤で基体をすすぐ、溶離剤を基体にスプレーする、または溶離剤で基体を洗うことにより行うことができる。溶離剤をヒドロゲル物質の小さなスポットに注入する場合は、マイクロフルイデクス (microfluidics) 法を用いることが好ましい。

【0128】

溶離剤をヒドロゲル物質に接触させる温度は、選択された個々のサンプルおよびヒドロゲル物質の関数である。一般的には、0~100、好ましくは4~37の温度で溶離剤をヒドロゲル物質に接触させる。しかし、一部の溶離剤については、改変された温度が望ましいことがあり、これは当業者が容易に決定できるだろう。

20

【0129】

アナライトをヒドロゲル物質にただ1つの位置で結合させて、複数の異なる溶離剤を洗浄ステップで用いる場合は、各溶離剤の存在下でのヒドロゲル物質の選択性に関する情報を個々に得ることができる。1つの位置でヒドロゲル物質に結合されたアナライトは、第1の溶離剤で洗浄し、保持されたアナライトを脱離および検出し、続いて第2の溶離剤で洗浄し、保持されたアナライトを脱離および検出する反復パターンに従うことにより、それぞれの溶離剤による洗浄後に測定することができる。洗浄とその後の脱離および検出ステップは、同じヒドロゲル物質を用いて複数の異なる溶離剤に対して連続的に繰り返すことができる。この方法では、アナライトが単一の位置で保持されたヒドロゲル物質を複数の異なる溶離剤で再試験することにより、それぞれの洗浄後に保持されたアナライトに関してまとまった情報が得られる。

30

【0130】

前記方法は、ヒドロゲル物質が全部同じであろうと異なっていようと、ヒドロゲル物質が複数の予め決められたアドレス指定可能な位置に提供される場合にも有用である。しかし、アナライトが同一のまたは異なるヒドロゲル物質に複数の位置で結合される場合には、洗浄ステップを、並列処理を含むより計画的で効率のよいアプローチを用いて実施してもよい。言い換えると、全てのヒドロゲル物質を1種の溶離剤で洗浄してから、ヒドロゲル物質の各位置について、保持されたアナライトを脱離させて検出する。所望により、ヒドロゲル物質の全ての位置を洗浄し、続いて各位置で脱離および検出を行うステップを、複数の異なる溶離剤について繰り返すことができる。この方法では、アレイ全体を利用して、サンプル中のアナライト類の特性を効率よく測定することができる。

40

【0131】

B. バイオチップ上に捕捉されたアナライトの検出方法

バイオチップ上に捕捉したら、例えば、気相イオン分光法、光学的方法、電気化学的方法、原子力顕微鏡検査、高周波法から選択される各種検出法によってアナライトを検出することができる。気相イオン分光法について本明細書で説明する。質量分析、特にSELDI

50

の使用は特に興味もてる。光学的方法としては、例えば、蛍光、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、複屈折、または屈折率（例えば、表面プラズモン共鳴、楕円偏光法、共鳴ミラー法、グレーティングカプラー導波管法、または干渉分析法）の検出が挙げられる。光学的方法には、顕微鏡検査（共焦点と非共焦点の両方）、イメージング法、および非イメージング法が含まれる。さまざまなフォーマットでのイムノアッセイ（例えば、ELISA）は、固相に捕捉されたアナライトを検出するために常用されている方法である。電気化学的方法には電圧分析法および電流分析法が含まれる。高周波法には多極共鳴分析法が含まれる。

【0132】

固相基体上に捕捉されたアナライトの検出方法は、フォトメトリック検出法と非フォトメトリック検出法とに大別される。

10

【0133】

フォトメトリック検出法には、限定するものではないが、吸光度、蛍光、屈折率、偏光、または光散乱を検出または測定する方法が含まれる。吸光度が関係する方法は、アナライトの光吸収度を直接（バックグラウンドに対する吸光度の増加を測定）または間接的（バックグラウンドに対する吸光度の減少を測定）に測定することを含む。当技術分野では紫外線、可視光線および赤外線を利用する方法がよく知られている。蛍光が関係する方法も直接および間接蛍光測定を含む。蛍光が関係する方法には、例えば、ELISAやサンドイッチアッセイのような免疫学的方法における蛍光標識付けが含まれる。屈折率の測定を含む方法としては、例えば、表面プラズモン共鳴（SPR）、グレーティングカップル法（例えば、均一なグレーティングカプラーのセンサー（波長インテロゲータッド光センサー（WIOS）およびチャードグレーティングカプラー）、共鳴ミラー法、および干渉分析法が挙げられる。偏光の測定を含む方法には、例えば、楕円偏光法（エリプソメトリー）が含まれる。光散乱法（比濁分析）も使用される。

20

【0134】

非フォトメトリック検出法には、限定するものではないが、気相イオン分光法、原子力顕微鏡検査、および多極カップル共鳴分光法が含まれる。気相イオン分光計は、質量分析計、イオン移動度分析計、および全イオン電流測定装置を含む。気相イオン分光法では、イオン化源が固相基体源からのイオンを供給する装置と連結されている。

【0135】

質量分析計では、イオンの質量-電荷比に翻訳可能なパラメーターを測定する。一般的に、対象となるイオンは単一の電荷を保有するため、質量-電荷比は単に質量と呼ばれることが多い。質量分析計は、導入部、イオン化源、イオン光学アセンブリ、質量分析部、および検出部を含む。質量分析計でプローブまたはバイオチップの表面からアナライトを脱離させてイオン化するために、いくつかの異なるイオン化源が使用されている。かかる方法には、レーザー脱離/イオン化（MALDI, SELDI）、高速原子衝撃、プラズマ脱離、および二次イオン質量分析計が含まれる。このような質量分析計において、導入部は、プローブとかみ合って、それをイオン化源と問合せ可能な関係で、同時に質量分析計（例えば、イオン光学アセンブリ、質量分析部、および検出部）と連絡した関係で位置づけることができるプローブインターフェースを含んでなる。質量分析計に関するさらなる情報については、例えば、Principles of Instrumental Analysis, 第3版, Skoog, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1985; Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 第4版, 第15巻 (John Wiley & Sons, New York 1995), pp.1071-1094、およびEncyclopedia of Analytical Chemistry, R.A. Meyers編 John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, 2000中の“Time-of-flight Mass Spectrometry” Scot R. Weinbergerら, pp. 11915-84を参照されたい。

30

40

【0136】

好ましい実施形態では、レーザー脱離飛行時間型質量分析計を本発明の装置と共に使用する。レーザー脱離質量分析計では、プローブ上のサンプルを導入部に導入する。サンプルを脱離させて、イオン化源からのレーザーエネルギーによって気相にイオン化する。し

50

たがって、アナライトを検出するには、最初に、本発明の装置にアドレス指定可能な位置でアナライトを接触させる。その後、この装置をレーザー脱離質量分析計のプロローブインターフェースに導入し、そこでアドレス指定可能な位置を質量分析計のレーザービームと問合せ可能な関係で位置づける。次に、ヒドロゲルにアドレス指定可能な位置でレーザーパルスを加え、アナライトを脱離させてイオン化する。最後に、脱離およびイオン化したアナライトを質量分析計で検出する。

【0137】

生成したイオンは、イオン光学アセンブリで集められた後、飛行時間型質量分析計に導入され、短い高電圧場を通過して加速され、高真空チャンパーにドリフトされる。高真空チャンパーの遠端で、加速されたイオンが高感度検出器の表面に異なる時間で打ちあたる。飛行時間はイオンの質量の関数であるため、イオン化と衝突の間の経過時間を用いて、特定の質量の分子の有無を確認することができる。当業者であれば理解されるように、レーザー脱離飛行時間型質量分析計のこれらの構成要素はいずれも、脱離、加速、検出、時間測定などの各種手段を採用する質量分析計の組み立てにおいて、本明細書に記載される他の構成要素と組み合わせることができる。

10

【0138】

さらに、イオン移動度分析計を用いてサンプルを分析することができる。イオン移動度分析計の原理はイオンの異なる移動度に基づいている。特に、イオン化によって生成されたサンプルのイオンは、例えば、質量、電荷または形状が相違するために、電場の影響下にあるチューブの中を異なる速度で移動する。イオン（一般的には電流の形をしている）は検出器で記録され、その後これをサンプルの同定に使用することができる。イオン移動度分析計の一つの利点は大気圧で操作可能である点である。

20

【0139】

さらにまた、全イオン電流測定装置を用いてサンプルを分析することもできる。この装置は、プローブが1クラスのアナライトのみを結合させる表面化学を有する場合に使用される。1クラスのアナライトがプローブに結合される場合、イオン化アナライトから発生された全電流はアナライトの性質を反映している。その後、アナライトからの全イオン電流を記憶された既知化合物の全イオン電流と比較することができる。こうして、プローブに結合されたアナライトの正体を突き止めることができる。

30

【0140】

C. データ解析法

質量分析でのデータ生成はイオン検出器によるイオンの検出で始まる。典型的なレーザー脱離質量分析計は337.1 nmの窒素レーザーを使用することができる。有効なパルス幅は約4ナノ秒である。一般に、約1~25 μ Jのパワー出力を使用する。検出器に打ち当たったイオンは電位を発生し、この電位は、アナログ信号をデジタル捕獲する高速時間-アレイ記録装置によりデジタル化される。Ciphergen社のProteinChip（登録商標）システムはこれを行うためにアナログ-デジタル変換器(ADC)を採用している。このADCは検出器出力を規則的な時間間隔で時間依存的ピンに集積化する。時間間隔は一般的には1~4ナノ秒の長さである。さらに、最終的に解析された飛行時間スペクトルは、サンプルに対するイオン化エネルギーの単一パルスからの信号を表しているのではなく、多数のパルスからの信号の合計を表している。これはノイズを減らし、かつダイナミックレンジを増加させる。その後、この飛行時間データをデータ処理に供する。Ciphergen社のProteinChip（登録商標）ソフトウェアでは、データ処理が一般にTOF-M/Z変換、ベースライン減算、高周波ノイズフィルタリングを含んでいる。

40

【0141】

TOF-M/Z変換は、飛行時間を質量-電荷比(M/Z)に変換するアルゴリズムを使用する必要がある。この段階では、信号を時間ドメインから質量ドメインに変換する。すなわち、それぞれの飛行時間を質量-電荷比つまりM/Zに変換する。キャリアレーションは内部的にまたは外部的に行うことができる。内部キャリアレーションでは、分析されるサンプルはM/Zが知られているアナライトを1種以上含有する。これらの集合アナライトを表す飛行時間

50

の信号ピークに既知のM/Zを割り当てる。これらの割り当てたM/Z比に基づいて、飛行時間をM/Zに変換する数学的関数についてのパラメータを算出する。外部キャリブレーションでは、飛行時間をM/Zに変換する関数（例えば、先行の内部キャリブレーションにより得られたもの）を、内部キャリブレーションを使用することなく、飛行時間スペクトルに当てはめる。

【0142】

ベースライン減算は、スペクトルをかき乱す人工的な再現性のある装置オフセットを排除することによってデータ数量化を改善する。これは、ピーク幅のようなパラメータを組み入れるアルゴリズムを用いてスペクトルベースラインを算出した後で、そのベースラインを質量スペクトルから減算することを含む。

10

【0143】

高周波ノイズ信号は平滑化関数を適用することで排除される。典型的な平滑化関数はそれぞれの時間依存的ピンに移動平均関数を適用する。改善バージョンにおいては、移動平均フィルタが可変幅デジタルフィルタであり、この場合は、フィルタのバンド幅が例えばピークバンド幅（一般的には、飛行時間の増加とともに広がる）の関数として変化する。例えば、2000年11月23日付けのWO 00/70648 (Gavinら, "Variable Width Digital Filter for Time-of-flight Mass Spectrometry") を参照されたい。

【0144】

コンピュータは得られたスペクトルをディスプレイのための各種フォーマットに変換することができる。「スペクトルビュー」(spectrum view)または「リテンテッドマップ」(retentate map)と呼ばれるフォーマットでは、標準スペクトルビューを表示することができ、そのビューは特定の分子量で検出器に到達するアナライトの量を示している。「ピークマップ」(peak map)と呼ばれる別のフォーマットでは、ピークの高さ・質量情報のみがスペクトルビューから保持され、より鮮明な画像が得られるため、ほぼ同一の分子量を有するアナライトを一層簡単に見ることができる。「ゲルビュー」(gel view)と呼ばれるさらに別のフォーマットでは、ピーク図からの各質量を各ピークの高さに基づいてグレースケール画像に変換することができ、電気泳動ゲル上のバンドと同様の外観が得られる。「3-Dオーバーレイ」と呼ばれるさらに別のフォーマットでは、いくつかのスペクトルを重ね合わせて、相対的なピーク高さの微妙な変化を研究することができる。「差異マップビュー」と呼ばれるさらに別のフォーマットでは、2つ以上のスペクトルを比較

20

30

【0145】

アナライトの脱離および検出により生成されたデータは、プログラム可能なデジタルコンピュータを使用することで解析することができる。コンピュータプログラムは一般にコードを記憶する読み込み可能な媒体を含む。特定のコードは、プローブ上の各特徴の位置、その特徴でのヒドロゲル物質の正体、およびヒドロゲルの洗浄に使用した溶離条件を含むメモリに向けられる。その後、この情報を用いて、プログラムがプローブ上の特徴のセットを同定し、特定の選択特徴を規定することができる。また、コンピュータは、プローブ上の特定のアドレス指定可能な位置から受け取った各種分子量での信号の強度に関するデータをインプットとして受け取るコードを含んでいる。このデータは検出されたアナライトの数を示すことができ、場合により、検出された各アナライトについての信号強度および決定された分子量を示すことができる。

40

【0146】

コンピュータはまた、データを処理するコードも内蔵している。本発明はデータを処理するための各種方法を包含する。一実施形態において、それはアナライト認識プロファイルの作成を必要とする。例えば、分子量によって同定された特定のアナライトの保持に関するデータを、特定の結合特性（例えば、アニオンヒドロゲル物質または疎水性ヒドロゲル物質への結合）に従ってソーティングすることができる。集められたデータは個々のアナライトの化学的性質のプロファイルを提供する。保持特性はアナライトの機能を反映し

50

、ひいては構造を反映する。例えば、金属キレート化基への保持はポリペプチドアナライト中にヒスチジン残基が存在することを反映しうる。様々なpHレベルの溶離条件下での複数のカチオンおよびアニオンヒドロゲル物質への保持レベルのデータを使用すると、タンパク質の等電点を引き出すことができる情報が明らかになる。したがって、コンピュータに結合情報を構造情報に変換するコードを内蔵させることも可能である。

【0147】

また、コンピュータプログラムに、プログラマーからの指令をインプットとして受け取るコードを内蔵させることもできる。プローブの予め決められた特定位置からのアナライトの選択的脱離のための前進的かつ論理的経路を前もって予測してプログラムすることが可能である。

10

【0148】

コンピュータはプレゼンテーションのためにデータを別のフォーマットに変換することができる。データ解析には、例えば、集められたデータから特徴位置の関数として信号強度を測定し、「アウトライヤー」を取り除き、残りのデータからアナライトの相対的結合親和性を算出するステップが含まれる。アウトライヤーとは、統計的分布から外れているデータのことである。

【0149】

得られたデータは様々なフォーマットで表示させることができる。あるフォーマットでは、信号強度を分子量の関数としてグラフに表示する。「ゲルフォーマット」と呼ばれる別のフォーマットでは、信号強度が線形軸に沿って暗さの強度として示され、ゲル上のバンドによく似た外観をもたらす。別のフォーマットでは、ある閾値に達する信号が、分子量を表す水平軸上に垂直の線または棒として示される。したがって、各棒は検出されたアナライトを表している。また、結合特性および/または溶離特性に従ってグループ分けされたアナライトについてのデータを信号強度のグラフで表すこともできる。

20

【0150】

解析には一般に、アナライトからの信号を表すスペクトル中のピークの同定が必要である。ピークの選択は、もちろんのこと、肉眼で行うことができる。しかし、ピークの検出を自動的に行うCIPHERGEN社のProteinChip(登録商標)ソフトウェアの一部としてソフトウェアを利用することも可能である。一般的に、このソフトウェアは、所定の閾値を上回る信号対ノイズ比を有する信号を確認し、ピーク信号のセントロイドのピーク質量を表示することによって機能する。有用な一つの適用例では、多くのスペクトルを比較して、質量スペクトルの所定のパーセンテージで存在する同一のピークを確認する。このソフトウェアのあるバージョンは、特定した質量範囲内で各種スペクトルに出現する全ピークをクラスター化し、質量(M/Z)クラスターの間接点の近くにあるピーク全てに質量(M/Z)を割り当てる。

30

【0151】

1以上のスペクトルからのピークデータは、例えば、スプレッドシートを作成することにより、さらなる解析に供することができる。このスプレッドシートでは、各横列が特定の質量スペクトルを表し、各縦列が質量により特定されたスペクトル中のピークを表し、各セルがその特定のスペクトル中のピークの強度を含む。そのデータに種々の統計的またはパターン認識アプローチを当てはめることができる。

40

【0152】

本発明の実施形態において生成されるスペクトルは、分類モデルを使用するパターン認識法を使って分類することができる。一般に、スペクトルは分類アルゴリズムが求められる少なくとも2つの異なるグループからのサンプルを表すだろう。例えば、そのグループは病的と非病的(例えば、癌と非癌)、薬物応答者と薬物非応答者、毒性応答と非毒性応答、疾病状態に対する進行型と非進行型、表現型状態の存在と非存在でありうる。

【0153】

いくつかの実施形態においては、その後、「既知サンプル」のようなサンプルを用いて生成されるスペクトル(例えば、質量スペクトルまたは飛行時間型スペクトル)から誘導

50

されたデータを用いることにより、分類モデルを「トレーニング」することができる。「既知サンプル」は前もって分類されているサンプルである。スペクトルから誘導されたデータであって、分類モデルを形成するために用いられるデータは、「トレーニングデータセット」と呼ばれることがある。ひとたびトレーニングされると、分類モデルは未知のサンプルを用いて生成されるスペクトルから誘導されたデータのパターンを認識することができる。その後、分類モデルを用いて未知のサンプルをクラスに分類することが可能となる。これは、例えば、特定の生物学的サンプルがある種の生物学的状態（例えば、病的と非病的）と関連しているか否かを予測する上で有用でありうる。

【0154】

分類モデルを形成するために用いられるトレーニングデータセットは、生データまたは前処理したデータを含みうる。いくつかの実施形態では、生データを飛行時間スペクトルまたは質量スペクトルから直接入手して、その後上記のように「前処理」してもよい。

【0155】

分類モデルは、データに存在する客観的パラメーターに基づいてデータの内容をクラスに分離しようと試みる適当な統計的分類（または「学習」）法を用いて形成することができる。分類法は教師あり（supervised）または教師なし（unsupervised）のいずれかでありうる。教師ありおよび教師なし分類法の例は、Jain, "Statistical Pattern Recognition: A Review", IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, Vol. 22, No. 1, January 2000に記載されている。

【0156】

教師あり分類では、既知のカテゴリの例を含むトレーニングデータが学習メカニズムに提示されるが、この学習メカニズムが既知のクラスのそれぞれを定義する関係のセットを学習する。その後、この学習メカニズムに新データを当てはめて、学習した関係を用いて新データを分類する。教師あり分類法の例としては、線形回帰法（例えば、重線形回帰（MLR）、PLS(partial least squares)回帰、および主成分回帰（PCR））、バイナリー決定木（例えば、CART分類および回帰木のような再帰的分割法（recursive partitioning process））、バックプロパゲーションネットワークのような人工ニューラルネットワーク、判別式分析（例えば、Bayesian分類器またはFischer分析）、ロジスティック分類器、およびサポートベクター分類器（サポートベクターマシン）が挙げられる。

【0157】

好ましい教師あり分類法は再帰的分割法である。再帰的分割法は未知のサンプルから誘導されたスペクトルを分類するために再帰的分割木（recursive partitioning trees）を使用する。再帰的分割法についての更なる詳細は、U.S. 2002 0138208 A1 (Paulser, "Method for analyzing mass spectra," 2002年9月26日)に見出せる。

【0158】

他の実施形態においては、生成される分類モデルが教師なし学習法を用いて形成される。教師なし分類は、トレーニングデータセットが誘導されたスペクトルを前もって分類することなく、トレーニングデータセットにおける類似性に基づいて分類を学習しようとする分類である。教師なし学習法にはクラスター分析が含まれる。クラスター分析は、データを「クラスター」またはグループに分割するもので、このクラスターまたはグループは理想的には、互いと非常に類似しているが、他のクラスターのメンバーとは全く類似していないメンバーを含むべきである。その後、類似性を距離測定法により測定するが、この方法ではデータ項目間の距離を測定して、互いに近いデータ項目を一緒にクラスター化する。クラスターリング法には、MacQueen's K-meansアルゴリズムおよびKohonen's Self-Organizing Mapアルゴリズムが含まれる。

【0159】

生物学的情報の分類に使用することが提案されている学習アルゴリズムは、例えば、WO 01/31580 (Barnhill, "Methods and devices for identifying patterns in biological systems and methods of use thereof," 2001年3月3日); U.S. 2002 0193950 A1 (Gavin, "Method or analyzing mass spectra," 2002年12月19日); U.S. 2003 0004402

10

20

30

40

50

A1 (Hittら, "Process for discriminating between biological states based on hidden patterns from biological data," 2003年1月2日); およびU.S. 2003 0055615 A1 (Zhang & Zhang, "Systems and methods for processing biological expression data" 2003年3月20日)に記載されている。

【0160】

分類モデルは適当なデジタルコンピュータで形成し、そこで使用することができる。適当なデジタルコンピュータには、Unix、WindowsTMまたはLinuxTM系の操作システムのような標準または特殊な操作システムを用いるマイクロ、小型または大型コンピュータが含まれる。用いるデジタルコンピュータは、目的のスペクトルを作成するのに用いる質量分析計と物理的に分離していてもよいし、質量分析計に接続されていてもよい。

10

【0161】

本発明の実施形態に従うトレーニングデータセットおよび分類モデルは、デジタルコンピュータによって実行または使用されるコンピュータコードにより具体化することができる。コンピュータコードは、光学または磁気ディスク、スティック、テープなどの適当な読取可能媒体に保存することができ、C、C++、visual basicなどを含め、適当なコンピュータプログラミング言語を使って書き込むことができる。

【0162】

D. アナライト

本発明は、アナライトの様々な生物学的、化学的、または物理化学的性質ならびに適切な選択条件の使用に基づいたアナライトの分割を可能にする。適切な選択条件の使用を介して利用することができるアナライトの性質として、例えば、疎水性指数、等電点、疎水性モーメント、側方双極子モーメント、分子構造因子、二次構成成分、ジスルフィド結合、溶媒に曝露された電子供与基、芳香族性、および荷電原子の線形距離が挙げられる。

20

【0163】

これらは適切な選択条件を選ぶことによってサンプルからの所与のアナライトの分割に利用しうる性質のタイプの代表例である。特定のアナライトをサンプルから分割するための基礎を形成しうるアナライトのその他の適当な性質は、当業者に知られており、当業者が容易に決定することができよう。

【0164】

どのようなタイプのサンプルでも分析することができる。例えば、サンプルは固体、液体または気体状態であってよいが、一般的には、サンプルは液体状態である。固体または気体のサンプルは、好ましくは、当業者の技量の範囲内の技法に従って適当な溶媒中に可溶化して液体サンプルとする。サンプルは生物学的組成物、非生物学的有機組成物、または無機組成物であってよい。本発明の技法は生物学的サンプル(特に、生物学的液体および抽出物)中のアナライトを分割するのに、また、非生物学的有機組成物(特に、小さい有機および無機分子の組成物)中のアナライトを分割するのに、とりわけ有用である。

30

【0165】

アナライトは、分子、多量体の分子複合体、巨大分子アセンブリ、細胞、細胞内小器官、ウイルス、分子フラグメント、イオン、または原子でありうる。アナライトはサンプルの単一成分でもよいし、構造的、化学的、生物学的または機能的に関連した成分(分子量、等電点、イオン電荷、疎水性/親水性相互作用など、1以上の特性を共通して有するもの)のクラスであってよい。

40

【0166】

特に、アナライトの例としては、生物学的巨大分子、例えば、ペプチド、タンパク質、酵素、酵素基質、酵素基質類似体、酵素阻害剤、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸、炭水化物、オリゴ糖類、および多糖類が挙げられる。

【実施例】

【0167】

VI. 実施例

A. ヒドロゲルコーティング基体の合成

50

表面に(メタ)アクリロイル基を含む基体の作製(アクリロイル-チップ)

二酸化ケイ素をコーティングした清浄な基体を、10mLの(メタ)アクリロキシプロピルトリメトキシシラン(MAOPTMS)を含むガラスバイアルと共に真空オープンの中に入れた。図5を参照されたい。その後チャンパーを1トル未満の圧力に下げた。基体にMAOPTMSの薄層を蒸着するために、基体をこのチャンパー内に24時間入れておいた。24時間後、チャンパーを開き、MAOPTMSのバイアルを取り除いた。その後チャンパーを再度密閉し、基体に1トル未満の真空をさらに24時間かけてから、80℃に加熱して硬化させた。

【0168】

(メタ)アクリロイル-デキストランの製造

80mlの水に10gのデキストラン500(平均分子量500kDa)を溶解した。1M水酸化ナトリウム溶液10mlとグリシジル-メタクリレート(GMA)4mlを添加した。この混合物を激しく一晩攪拌して均一なエマルジョンを得た。グリシジル-メタクリレート(図5参照)は水に溶けないが、デキストランと前進的に反応することに気をつける。得られた溶液は透明であった。次いで、この溶液を塩酸の添加により中和した。アセトンを添加してデキストラン誘導体を含む沈殿物を形成させた。デキストラン誘導体はアセトン-水の混合溶媒に溶解しない。副生成物と試薬類は溶解状態のままである。沈殿物アクリロイル-デキストランを数回洗浄し、母液として中性条件の水に溶解した状態で保存した。

【0169】

ヒドロゲルコーティング基体の作製

上記のデキストラン溶液(約15%のメタクリロイル-デキストラン濃度)50μlを脱イオン水780μlと混合した。10%グリセロール水溶液150μlを加えて、この溶液を混合した。UV触媒(2,2-ジメトキシ-2-フェニル-アセトフェノン、0.5%のDMSO溶液)20μlを添加した。

【0170】

混合した後、得られた混合物5μlを、表面にアクリロイル基を有する基体(上記参照)の約3mm²の面積に配置した。

【0171】

溶媒を50℃で約20分間蒸発させた。反応させるべき表面を窒素下のUVチャンパーに移し、UV光を用いて15分間重合させた。表面を水で洗い、次いでアセトンで洗って、副生成物と過剰の試薬類を除去した。

【0172】

基体表面上のヒドロゲルの均質な層形成性の分析

ヒドロゲルが基体表面上に均質に層化されたことを検査するため、FITC標識コンカナバリンA(デキストランと特異的に相互作用するという公知の性質を有するタンパク質)の1mg/ml中性溶液を調製して、その1μlをチップ表面に置いた。15分のインキュベーション後、表面をバッファーで洗浄して過剰のコンカナバリンAを取り除いた。この装置を顕微鏡拡大下で観察し、UV光に曝露した。この装置の全表面上に均質な蛍光が観察され、これはデキストランが基体を均一にコーティングしていることを示した。

【0173】

コンカナバリンAアッセイの結果を確認するため、コンカナバリンAをコーティングした装置を、 α -メチル-マンノシドまたは α -メチル-グルコシドの溶液と共にインキュベートした。 α -メチル-マンノシドまたは α -メチル-グルコシドはコンカナバリンAを装置の表面から取り除く。なぜならば、 α -メチル-マンノシドと α -メチル-グルコシドはいずれも、デキストランと比較して、コンカナバリンAに対してより高い結合親和性を有するからである。この装置を顕微鏡拡大下で観察し、UV光に曝露した。UV光の不在が観察された。

【0174】

B. ヒドロゲルコーティング基体の合成(DMSOに基づく合成)

表面に(メタ)アクリロイル基を含む基体の作製(アクリロイル-チップ)

二酸化ケイ素をコーティングした清浄な基体を、10mLの(メタ)アクリロキシプロピルトリメトキシシラン(MAOPTMS)を含むガラスバイアルと共に真空オープンの中に入れた。図5

を参照されたい。その後チャンバーを1トル未満の圧力に下げた。基体にMAOPTMSの薄層を蒸着するために、基体をこのチャンバー内に24時間入れておいた。24時間後、チャンバーを開き、MAOPTMSのバイアルを取り除いた。その後チャンバーを再度密閉し、基体に1トル未満の真空をさらに24時間かけてから、80 ℃に加熱して硬化させた。

【0175】

(メタ)アクリロイル-デキストランの製造

1.8gのデキストランを20mLのジメチルスルホキシド(DMSO)に加え、続いて全てのデキストランが溶解するまで加熱および音波処理を行って、デキストラン(平均分子量500kDa)のDMSO溶液を調製した。この溶液に、1.5gの1,8-ジアザピシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エン(DBU)および1.4gのグリシジルメタクリレート(GMA)を添加した。得られた溶液を室温で一晩激しく攪拌した。アセトンとヘキサンで沈殿させることによりこの溶液から粗製の修飾デキストランが得られた。粗製沈殿物を50mLの水に溶解し、1N HClでpHを7に調整した。この溶液を50kDa MWC0透析チューブに入れて、4Lの水に対して24時間透析することにより、小分子の副生成物と未反応の出発物質を除去した。透析している間に外側の水溶液を3回変えた。透析後、この溶液を凍結乾燥すると、精製された修飾デキストラン生成物が白色固体として得られた。

10

【0176】

ヒドロゲルコーティング基体の作製

5%の修飾デキストラン(上記の物質)および0.5%のUV光開始剤2-ヒドロキシ-4'-(2-ヒドロキシエトキシ)-2-メチルプロピオフェノンのDMSO溶液を調製した。

20

【0177】

表面にアクリロイル基を有する基体の約3mm²の面積にエタノール2μLを滴下した。エタノール滴下の1分以内に、200nLの修飾デキストラン/光開始剤の上記溶液を基体上のエタノール液滴に加えた。

【0178】

溶媒を基体表面から80 ℃で約2分間蒸発させた。次いで基体を密閉UVチャンバーに移し、不活性ガスでパージし、UV光を15分間照射して混合物を重合させた。その後表面を水で洗って、副生成物と未反応の試薬類を除去した。

【0179】

基体表面上のヒドロゲルの均質な層形成性の分析

ヒドロゲルが基体表面上に均質に層化されたことを検査するため、FITC標識コンカナバリンA(デキストランと特異的に相互作用するという公知の性質を有するタンパク質)の1mg/ml中性溶液を調製して、その1μlをチップ表面に置いた。15分のインキュベーション後、表面をバッファーで洗浄して過剰のコンカナバリンAを取り除いた。この装置を顕微鏡拡大下で観察し、UV光に曝露した。この装置の全表面上に均質な蛍光が観察され、これはデキストランが基体を均一にコーティングしていることを示した。

30

【0180】

コンカナバリンAアッセイの結果を確認するため、コンカナバリンAをコーティングした装置を、 α -メチル-マンノシドまたは β -メチル-グルコシドの溶液と共にインキュベートした。 α -メチル-マンノシドまたは β -メチル-グルコシドはコンカナバリンAを装置の表面から取り除く。なぜならば、 α -メチル-マンノシドと β -メチル-グルコシドはいずれも、デキストランと比較して、コンカナバリンAに対してより高い結合親和性を有するからである。この装置を顕微鏡拡大下で観察し、UV光に曝露した。UV光の不在が観察された。

40

【0181】

C. デキストランヒドロゲルとエポキシド反応性基を含む反応性バイオチップの作製

デキストランヒドロゲルとエポキシド反応性基を含む反応性バイオチップを作製した。このバイオチップは上記のセクションVI AまたはVI B、好ましくはセクションVI Bに従って作製したが、ただし、(メタ)アクリロイル-デキストランの溶液をグリシジル-メタクリレートと共に添加し、これら全てを、その表面にアクリロイル基を有する基体と共重合させた。デキストランヒドロゲルとエポキシド反応性基を含む反応性バイオチップを作製

50

する4つの代表的な実施形態を以下に示す。溶液は修飾デキストラン、官能性モノマー (GM A)、特定の実施形態ではスペーサーモノマー、を含有する。

【0182】

第1の実施形態では、溶液が1%の修飾デキストラン、1.5%のグリセロール、0.01%のI rgacure 2959光開始剤、および0.1%のGMAを含んでいた。この場合には、修飾デキストランのいくつかの重合性部分をGMAと共重合させる。その結果、遊離のエポキシド部分を含むヒドロゲルが得られる。これらの部分をタンパク質または他の生体分子と反応させると、これらの生体分子がヒドロゲルに結合される。

【0183】

第2の実施形態では、溶液が1%の修飾デキストラン、1.5%のグリセロール、0.01%の開始剤、および0.1%のEMAを含んでいた。EMAはMAよりも親水性であり、より均一な表面を有するバイオチップをもたらす。

【0184】

第3の実施形態では、溶液が1%の修飾デキストラン、1.5%のグリセロール、0.01%の開始剤、0.1%のGMA、および0.1%の2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA)を含んでいた。HEMAも修飾デキストランの重合性メタクリレート部分と共重合し、その機能はより大きなスペースと親水性を複合コポリマーに与えることである。

【0185】

第4の実施形態では、溶液が1%の修飾デキストラン、1.5%のグリセロール、0.01%の開始剤、0.1%のGMA、および0.1%のGMM (グリセロールモノメタクリレート)を含んでいた。GMMも修飾デキストランの重合性メタクリレート部分と共重合し、その機能はより大きなスペースと親水性を複合コポリマーに与えることである。

【0186】

D. アシルイミダゾール反応性基で誘導体化されたデキストランヒドロゲルを含むバイオチップの作製

デキストランがアシルイミダゾール反応性基で誘導体化されているデキストランヒドロゲルを含むバイオチップを作製した。デキストランヒドロゲルをコーティングした基体は上記のセクションVI AおよびVI Bに記載したように作製し、次にこれをアシルイミダゾール結合性官能基を付加するように誘導体化した。基体のデキストランコーティング領域に、1,1'-カルボニルジイミダゾール (CDI)の0.1重量%ジメチルホルムアミド (DMF)溶液3mLを添加した。この基体を容器に入れてから、容器をアルゴンでパージして密閉した。CDIを基体とアルゴン雰囲気下で1時間反応させた。その後、基体を新しいDMFで洗って未反応の試薬類と反応副生成物を除去した。この基体を乾燥状態で保存した。

【0187】

デキストランがアシルイミダゾール反応性基で誘導体化されているデキストランヒドロゲルを含むバイオチップを別の方法でも作製した。デキストランヒドロゲルをコーティングした基体は上記のセクションVI Aに記載したように作製した。次に、このデキストランコーティング基体を1,1'-カルボニルジイミダゾール (CDI)の5%ジメチルスルホキシド (DMSO)溶液4mL中に沈めた。CDIを基体と2時間反応させた。その後、基体を新しいDMSOで洗って未反応の試薬類と反応副生成物を除去し、その後アセトンで洗い、乾燥させて、乾燥状態で保存した。

【0188】

本発明は、基体にグラフトされた多糖ヒドロゲルを含む新規なバイオチップおよびその使用方法を提供する。具体的な例を示したが、上記の説明は例示であって、限定するものではない。本発明においては、上記の実施形態のいずれか1つ以上の特徴を、他の実施形態の1つ以上の特徴と、任意の方法で組み合わせることができる。さらに、本明細書を記載から、本発明の多くの変更が当業者には明らかになるだろう。したがって、本発明の範囲は、上記の説明を参酌するのではなく、添付の特許請求の範囲とそれらの均等な範囲から決定されるべきである。

【0189】

10

20

30

40

50

本出願で引用した全ての刊行物および特許文献は、それぞれの刊行物または特許文献が個々に示されているのと同じ程度に、あらゆる目的のためにその全体をそのまま参考として本明細書に組み入れるものとする。各種文献を本明細書に引用したとしても、それによって本出願人は、特定の文献が本発明の「先行技術」となることを容認するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0190】

【図1】ヒドロゲルでコーティングされた複数のスポットを含む装置を示す。この装置はストリップの形状である。

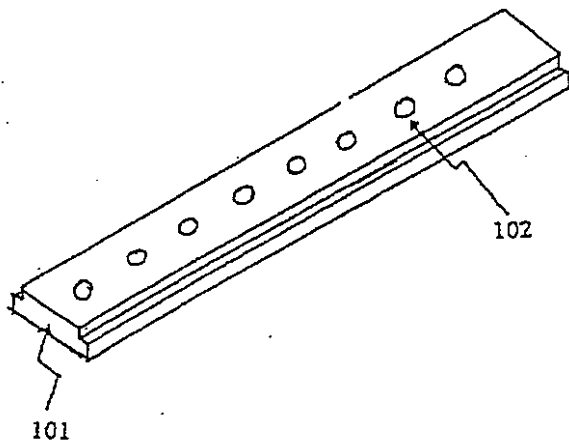
【図2】ヒドロゲルコーティング基体の合成を示す模式図である。ヒドロゲルコーティング基体は、重合性部分を介して表面にグラフトされたデキストラン系ヒドロゲルを有する基体からなる。

【図3】バイオチップの合成を示す模式図である。バイオチップは、重合性部分を介して表面にグラフトされたデキストラン系ヒドロゲルを有する基体からなる。ヒドロゲルは、タンパク質や他の生体分子と結合するための、または後続の化学反応および重合反応を行うための、BFとして示される結合性官能基を有する。

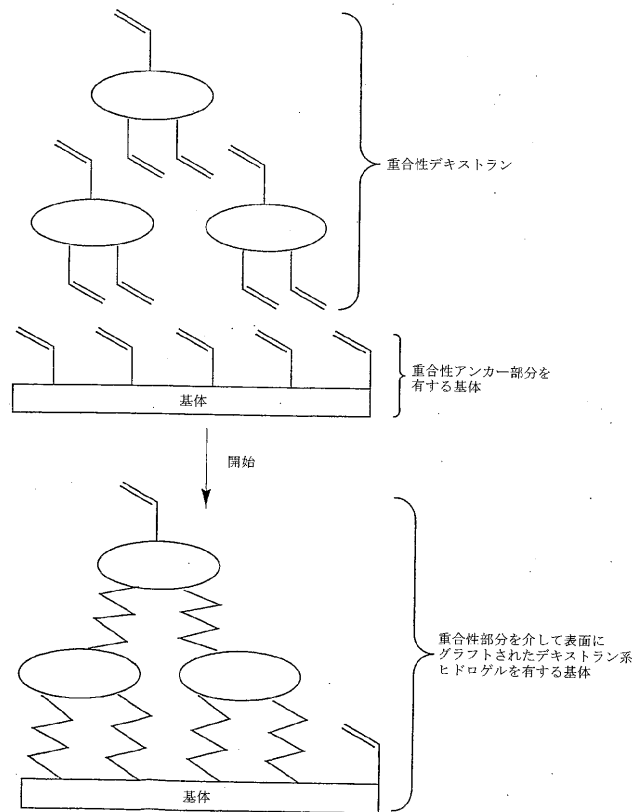
【図4】相互浸透ポリマーコーティングを有するバイオチップの合成を示す模式図である。出発材料は、重合性部分を介して表面にグラフトされたデキストラン系ヒドロゲルを有する基体、官能基化されたモノマー、および架橋剤である。

【図5】デキストラン、メタクリロイルオキシプロピルトリメトキシシラン、およびグリシジルメタクリレートの化学式を示す。

【図1】



【図2】



10

20

【手続補正書】

【提出日】平成15年12月12日(2003.12.12)

【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】

(A) 少なくとも1つの表面を提供する基体、および

(B) 前記表面に担持されたヒドロゲル、

を含んでなる装置であって、前記ヒドロゲルが前記表面に共有結合で結合された可溶性非イオン性多糖ポリマー鎖から構成されている、前記装置。

【請求項2】

前記ヒドロゲルが結合性官能基により官能基化されている、請求項1に記載の装置。

【請求項3】

前記結合性官能基が、エポキシ、アルデヒド、アシルイミダゾール、カーボネート、芳香族基、脂肪族基、ヒドロキシル、カルボキシル、チオール、スルホネート、スルフェート、任意に置換されたアミノ、ホスフェート、金属キレート化基、チオエーテル、ポロネート、染料、アビジン、ビオチン、抗体、受容体、酵素、レクチン、および核酸からなる群より選択される反応性基である、請求項2に記載の装置。

【請求項4】

(i) 前記ポリマー鎖がメタクリロイル誘導体化デキストランを含み、(ii) 前記共有結合がシリル部分を含み、(iii) 前記結合性官能基がアシルイミダゾールである、請求項3に記載の装置。

【請求項5】

前記装置が前記表面と前記ヒドロゲルの間にシラン層を含み、前記共有結合がメタクリロイル誘導体化デキストランを前記シリル部分と共重合させた結果である、請求項4に記載の装置。

【請求項6】

前記ヒドロゲルが架橋剤と重合性モノマーとのコポリマーをさらに含む、請求項1に記載の装置。

【請求項7】

(i) 前記ポリマー鎖がメタクリロイル誘導体化デキストランを含み、(ii) 前記共有結合がシリル部分を含み、(iii) 前記結合性官能基がアシルイミダゾールである、請求項6に記載の装置。

【請求項8】

前記重合性モノマーが官能基化アクリルモノマーである、請求項6に記載の装置。

【請求項9】

前記官能基化アクリルモノマーが、アクリルアミド-グリコール酸、アクリルアミド-メチル-プロパン-スルホン酸、アクリルアミド-エチル-ホスフェート、ジエチル-アミノエチル-アクリルアミド、トリメチル-アンモニウム-プロピル-メタクリルアミド、N-オクチル-アクリルアミド、N-フェニル-アクリルアミド、およびtert-ブチル-アクリルアミドからなる群より選択される、請求項8に記載の装置。

【請求項10】

前記装置が前記表面と前記ヒドロゲルの間にシラン層を含み、前記共有結合がメタクリロイル誘導体化デキストランを前記シリル部分と共重合させた結果である、請求項7に記載の装置。

【請求項11】

前記シランが、(3-アクリロキシプロピル)トリメトキシシラン、(3-アクリロキシプロ

ピル)メチルジメトキシシラン、(3-アクリロキシプロピル)ジメチルメトキシシラン、(3-アクリロキシプロピル)トリクロロシラン、(3-アクリロキシプロピル)メチルジクロロシラン、(3-アクリロキシプロピル)ジメチルククロロシラン、(3-メタクリロキシプロピル)トリメトキシシラン、(3-メタクリロキシプロピル)メチルジメトキシシラン、(3-メタクリロキシプロピル)ジメチルメトキシシラン、(3-メタクリロキシプロピル)トリクロロシラン、(3-メタクリロキシプロピル)メチルジクロロシラン、(3-メタクリロキシプロピル)ジメチルククロロシラン、ビニロキシトリメチルシラン、ビニルトリクロロシラン、ビニルトリメトキシシラン、アリルククロロメチルジメチルシラン、アリルククロロジメチルシラン、アシルプロモジメチルシラン、アシルジクロロメチルシラン、アシルジイソプロピルアミノジメチルシラン、アシルオキシ-tert-ブチルジメチルシラン、アシルトリメトキシシラン、およびこれらの組合せから選択されるシランを含む、請求項5または10に記載の装置。

【請求項12】

前記シランが(3-メタクリロキシプロピル)トリメトキシシランである、請求項11に記載の装置。

【請求項13】

(A) アンカー試薬が共有結合で結合されている少なくとも1つの表面を提供する基体、および(B) 前記表面に担持されたヒドロゲルを含んでなる装置であって、前記アンカー試薬のそれぞれが第1の官能基を含み、前記ヒドロゲルが、2個以上のヒドロキシル基において第2の官能基により誘導体化された非イオン性多糖から構成されており、第1および第2の官能基が相互作用して共有結合を形成している、前記装置。

【請求項14】

第1の官能基がピオチンであり、第2の官能基がアビジンである、請求項13に記載の装置。

【請求項15】

(a) 第1の重合性部分を含むアンカー試薬が共有結合で結合されている表面を有する基体を用意すること、
(b) 前記アンカー試薬を、複数のヒドロキシル基において第2の重合性部分により誘導体化された可溶性非イオン性多糖と接触させること、
(c) 第1および第2の重合性部分を共重合させることにより、前記表面に共有結合で結合された前記多糖を含むヒドロゲルを形成させること、
を含んでなる、装置の製造方法。

【請求項16】

(d) 前記アンカー試薬を、結合性官能基により官能基化された重合性モノマーと接触させ、それにより前記共重合から複合ポリマーを形成させること、をさらに含んでなる、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

(e) 前記複合ポリマーを、架橋剤と結合性官能基により官能基化された重合性モノマーとを含む混合物と接触させること、
(f) 得られた混合物を共重合させ、それにより相互浸透網目構造を形成させること、
をさらに含んでなる、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

(a) 第1の官能基を含む1以上のアンカー試薬が共有結合で結合されている表面を有する基体を用意すること、
(b) 前記アンカー試薬を、複数のヒドロキシル基において第2の官能基により誘導体化された可溶性非イオン性多糖と接触させること、
(c) 第1および第2の官能基を反応させることにより、前記基体と前記非イオン性多糖の間に共有結合を形成させること、
を含んでなる、装置の製造方法。

【請求項19】

第1の官能基がビオチンであり、第2の官能基がアビジンである、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

(a) 請求項1または13に記載の装置に、アドレス指定可能な位置でアナライトと接触させ、それによりアナライトを前記アドレス指定可能な位置に結合させること、

(b) 前記装置をレーザー脱離質量分析計のプロブインターフェースに導入し、それによりアドレス指定可能な位置を前記質量分析計のレーザービームと問合せ可能な関係で位置づけること、

(c) 前記装置にアドレス指定可能な位置でレーザーパルスを加えて、前記アナライトを脱離およびイオン化すること、

(d) 前記脱離およびイオン化したアナライトを質量分析計で検出すること、
を含んでなる、アナライトの検出方法。

【請求項21】

(a) ヒドロゲル、および

(b) 架橋剤と結合性官能基により官能基化された重合性モノマーとのコポリマー、
からなる相互浸透網目構造を含むゲル。

【請求項22】

複数のヒドロキシル基において結合性官能基により誘導体化された非イオン性多糖を含むゲル。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/11391
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : G01N 33/53 US CL : 435/7.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.5		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 5,055,171 A (PECK) 08 October 1991 (08.10.1991), see entire document.	1-10, 12, 13, 26, 27, 29, 30, 31-36, 40, 41, 43, 44, 69-71 ----- 11, 14-25, 28, 37-39, 42, 45-68
X --- Y	US 5,234,566 A (OSMAN et al) 10 August 1993 (10.08.1993), see entire document.	1-8, 12, 26, 27, 29-36, 39, 40, 41, 48, 49, 63- 68 ----- 9-11, 13-25, 28, 37, 38, 42-46, 50-62, 69- 71
Y	US 5,260,195 A (AZHAR et al) 09 November 1993 (09.11.1993), see entire document.	1-4, 8-22, 25-28, 31, 35-37, 41, 42-57, 69- 71
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"J" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"R" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 25 August 2003 (25.08.2003)	Date of mailing of the international search report 21 OCT 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Neilson Yang Telephone No. 703-305-4508	

PCT/US03/11391

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,286,654 A (COX et al) 15 February 1994 (15.02.1994), see entire document.	1-4, 8-22, 25-28, 31, 35-37, 41, 42-56, 63-65, 69-71
X --- Y	US 5,492,840 A (MALMQVIST et al) 20 February 1996 (20.02.1996), see entire document.	1-4, 9-22, 24-29, 31-38, 41-52, 63-65, 69-71 ----- 5-8, 23, 30, 39, 40, 53-62, 66-68
X --- Y	US 5,898,004 A (ASHER et al) 27 April 1999 (27.04.1999), see entire document.	1-10, 12-19, 21-23, 26-50, 63-65, 69-72 ----- 11, 20, 24, 25, 51-62, 66-68
X --- Y	US 6,174,683 B1 (HAHN et al) 16 January 2001 (16.01.2001), see entire document.	1-4, 8, 9, 12, 13, 15-17, 26, 30-35, 41, 42, 44, 46-49, 63, 66-71 ----- 5-7, 10, 11, 14, 18-25, 27-29, 36-40, 43, 45, 50-62, 64, 65
Y	WO 92/21976 B1 (FISONS PLC) 10 December 1992 (10.12.1992), see entire document.	1-71

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

UNIX

- (72) 発明者 ボチェッティ, エジスト
フランス国 エフ - 7 8 2 9 0 クロワシー スール セーヌ, アレ デュ ボワーズ ゴージェ
ノ, 9
- (72) 発明者 デイン, ジャン
アメリカ合衆国 9 4 5 6 8 カリフォルニア州, ダブリン, ラス パルマス コート 1 1 2 0
7
- (72) 発明者 ジロ, ピエール
フランス国 エフ - 7 5 0 1 0 パリ, リュ ド テラージュ, 7
- (72) 発明者 ゲリエール, リュック
フランス国 エフ - 7 8 0 0 0 ヴェルサイユ, アレ デ ガルド ロワイエール, 3
- (72) 発明者 ポール, クリストファー, エー.
アメリカ合衆国 9 4 5 8 7 カリフォルニア州, ユニオン シティー, モンテール コート 3
2 5 7 2
- (72) 発明者 グリメス, マイケル, ティー.
アメリカ合衆国 9 5 2 1 2 カリフォルニア州, サン ホセ, ガーフィールド アベニュー 1
1 5 4

Fターム(参考) 2G045 AA40 BA13 BB12 DA36 FA40 FB06