

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4350906号
(P4350906)

(45) 発行日 平成21年10月28日 (2009.10.28)

(24) 登録日 平成21年7月31日 (2009.7.31)

(51) Int. Cl. F I
CO8L 57/12 (2006.01) CO8L 57/12
CO8L 39/04 (2006.01) CO8L 39/04
CO8K 5/00 (2006.01) CO8K 5/00
G03F 7/038 (2006.01) G03F 7/038

請求項の数 8 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2000-580047 (P2000-580047)	(73) 特許権者	590000422
(86) (22) 出願日	平成11年3月8日 (1999.3.8)		スリーエム カンパニー
(65) 公表番号	特表2002-529543 (P2002-529543A)		アメリカ合衆国, ミネソタ 55144-
(43) 公表日	平成14年9月10日 (2002.9.10)		1000, セント ポール, スリーエム
(86) 国際出願番号	PCT/US1999/005143		センター
(87) 国際公開番号	W02000/026725	(74) 代理人	100077517
(87) 国際公開日	平成12年5月11日 (2000.5.11)		弁理士 石田 敬
審査請求日	平成18年3月7日 (2006.3.7)	(74) 代理人	100092624
(31) 優先権主張番号	09/183,197		弁理士 鶴田 準一
(32) 優先日	平成10年10月30日 (1998.10.30)	(74) 代理人	100111903
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 永坂 友康
		(74) 代理人	100082898
			弁理士 西山 雅也
		(74) 代理人	100081330
			弁理士 樋口 外治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アズラクトン共重合体をベースとする光硬化性および光パターナブルヒドロゲルマトリックス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 1 ~ 99 重量部の少なくとも 1 つのアズラクトン官能性モノマーと、 0 ~ 99 重量部の少なくとも 1 つのコモノマーとから誘導される少なくとも 1 つの共重合体、および

b) 少なくとも 1 つの光架橋剤を含む光硬化性および光パターナブル組成物であって、前記組成物が生体分子 - アズラクトン結合を含有しない場合、光架橋剤上に存在するアズラクトン反応性官能基の数が、前記組成物中に存在するアズラクトン官能基の数よりも少ない組成物。

【請求項 2】

請求項 1 の組成物を含むヒドロゲルを含む製品であって、前記組成物が光硬化され、前記ヒドロゲルが基材に結合する製品。

10

【請求項 3】

前記ヒドロゲルが前記基材にそれぞれが結合する離散したゾーンに別れ、前記離散したゾーンの 1 つから選択された特徴および前記離散したゾーン間の間隙が、前記ヒドロゲル層の平面において 200 μm 未満の最小の寸法を有する請求項 2 に記載の製品。

【請求項 4】

アズラクトン官能基の残基に共有結合した生物活性分子をさらに含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記ヒドロゲルのアズラクトン官能基の残基に共有結合した生物活性分子をさらに含む

20

、請求項 2 または請求項 3 に記載の製品。

【請求項 6】

前記ヒドロゲルの異なる離散したゾーン内のアズラクトン官能基の残基に共有結合した異なる生物活性分子をさらに含む、請求項 3 に記載の製品。

【請求項 7】

a) 請求項 1 に記載の組成物の層を基材に適用するステップと、

b) 前記層の少なくとも一部が硬化するように前記層を電磁線で照射して、ヒドロゲルを形成するステップと、
を含む製品を製造する方法。

【請求項 8】

前記ヒドロゲルのアズラクトン官能基との反応によって、生物活性分子を前記製品の一部に固定するステップをさらに含む請求項 7 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

この発明は、光架橋剤とアズラクトン官能性を有するポリマーとを含む光硬化性および光パターナブル組成物に関する。組成物は基材上において高解像度でパターン化されて、生物活性分子を結合するのに用いても良い。

【0002】

発明背景

生体分子を基材に固定化するための様々な方法が開示されている。

【0003】

US 5,552,270 は、DNA オリゴヌクレオチドが基材上に担持されるゲル平方マトリックス中に固定化される DNA 塩基配列決定方法に関する。DNA は付加 3' 末端 3-メチルウリジンの酸化と、それに続く「比較的安定したモルホリン誘導体」が生成される基材に結合したヒドラジンとの反応によって基材に結合する（'270 の 5 欄 41 ~ 47 行）。参考文献は一辺が 25 ~ 100 μm の間であって、その 2 倍の間隙によって分割されたゲル平方を開示する（'270 の 2 欄 60 ~ 64 行）。

【0004】

US 5,744,305 は、マスクを使用した光反応により各モノマー付加ステップに先立って、保護基が選択的に除去される「光誘導合成」により現場で合成される、DNA またはペプチドオリゴマーパッチをはじめとする生物チッププレートに関する。各オリゴマーストランドの最初のベースは、アミン官能基への付着によって基材に結合するのである（'305 の図 1 および 2）。

【0005】

US 4,871,824 は、生物活性分子固定化のための反応性担体として使用するためのアズラクトン官能性ポリマーの低膨潤性ビーズに関する。

【0006】

US 5,344,701 は、アズラクトン官能性コーティングへの付着によって生体分子を基材上に固定化する方法に関する。この参考文献は、フリーラジカル付加部位を有するアズラクトン官能性モノマー、および任意にジビニルなどのフリーラジカル架橋剤の基材への塗布、そして引き続く現場での重合を開示する。

【0007】

US 5,725,989 は、担体、光熱変換層、中間層、および熱転移層を含むレーザーアドレス可能熱転写画像形成要素に関する。

【0008】

発明の要約

手短に言えば本発明は、a) 1 ~ 99 重量部の少なくとも 1 つのアズラクトン官能性モノマーと、0 ~ 99 部の少なくとも 1 つのコモノマーとから誘導される少なくとも 1 つの共重合体、および b) 少なくとも 1 つの光架橋剤を含み、組成物が生物活性分子を結合する

10

20

30

40

50

のに使用される光硬化性および光パターン化組成物を提供する。

【0009】

別の態様において、本発明は発明の硬化した組成物を含み生物活性分子を結合できるヒドロゲルを提供する。ゲルは有利なことに膨潤性であるので、コーティングとして使用されると単位面積辺りより高濃度の生物活性分子を提供する。

【0010】

別の態様において、本発明は高解像度でパターン化でき硬化されても良い発明の組成物で被覆された基材を提供し、組成物は生体分子と反応して生体分子を基材上に固定化できる。

【0011】

別の態様では、本発明は上述の被覆された基材を作る方法を提供する。

【0012】

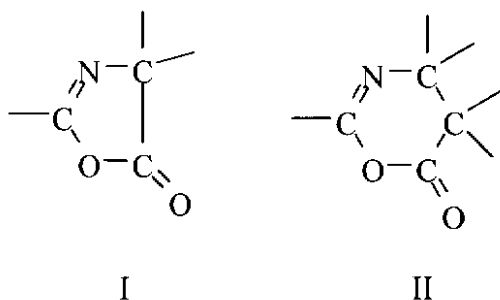
技術分野で既述されておらず本発明によって提供されるのは、アズラクトン官能性ポリマーを光架橋剤と組み合わせて用いる、生体分子を固定化するのに有用な組成物および方法である。さらに本発明の組成物は、高解像度で光パターン化することもできる。最後に、得られる硬化したゲルは好ましくは膨潤性であり、単位面積辺りより高濃度の生体分子を提供する。

【0013】

ここでの用例では、

「アズラクトン」、「アズラクトン官能基」、および「アズラクトン部分」とは、式 I の置換されたまたは置換されない 2 - オキサゾリン - 5 - オン基、および / または式 II の 2 - オキサジン - 6 - オン基を意味する。

【化 1】



「アズラクトン官能性モノマー」とは、その構造が生体分子 - アズラクトン結合を形成するアズラクトンの開環反応によって、任意に生体分子に結合されたアズラクトン部分を含むモノマーを意味する。

「ヒドロゲル」とは、吸着または吸収などの物理的相互作用、または加水分解などの化学的相互作用のいずれかによって水中で膨潤できるポリマー材料であり、水中での膨潤前または膨潤後のゲル材料を指す。

「光架橋剤」とは、電磁線の適用を受けて 2 つ以上のポリマー分子を結合でき、成長するポリマー鎖末端以外の部位でポリマー分子に付着できる化学種を意味する。

「共重合架橋剤」とは、2 つ以上のポリマー分子を結合でき、成長するポリマー鎖の末端でポリマーに付着する化学種を意味する。

「生物活性」は生化学的、免疫化学的、生理学または薬学的活性を含む。

「生物活性分子」および「生体分子」は区別なく使用され、抗体、抗原、酵素、補助因子、阻害剤、ホルモン、受容体、凝固因子、アミノ酸、ヒストン、ビタミン、薬剤、細胞表面マーカー、タンパク質およびポリペプチド、DNA オリゴヌクレオチドをはじめとする DNA、RNA オリゴヌクレオチドをはじめとする RNA、PNA および前出の誘導体を含む。

「置換された」とは、所望の生成物を妨害しない従来の置換基によって置換されたことを意味し、例えば置換基は、アルキル、アルコキシ、アリール、フェニル、ハロ（F、Cl、Br、I）、シアノ、ニトロなどであることができる。

【0014】

生体分子を基材に固定化するのに有用であり、多種多様の生体分子に適用可能であって高解像度で光パターン化できる組成物および方法を提供することが、本発明の利点である。

【0015】

好ましい実施態様の詳細な説明

本発明は、a) 1 ~ 99 重量部の少なくとも 1 つのアズラクトン官能性モノマーと、0 ~ 99 部の少なくとも 1 つのコモノマーとから誘導される少なくとも 1 つの共重合体、および b) 少なくとも 1 つの光架橋剤を含み、生物活性分子を結合するのに使用できる光硬化性および光パターナブル組成物を提供する。

【0016】

アズラクトン官能性モノマーの共重合体は、ポリオレフィン、ポリアミド、またはポリイミドをはじめとするあらゆる適切なポリマータイプであって良い。好ましくはポリマーは、ポリオレフィンである。共重合体は、ジビニル化学種などの共重合架橋剤から誘導される架橋を任意に含有しても良い。

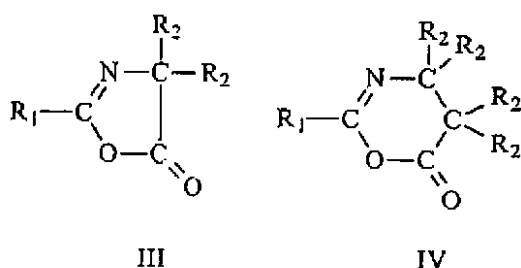
【0017】

アズラクトン官能性モノマーの共重合体は、US 4,451,619、US 4,737,560、US 5,200,471、US 5,292,840、US 5,336,742、US 5,344,701、US 5,403,902、US 5,451,453、および US 4,871,824 で開示された方法をはじめとするあらゆる適切な方法によって調製されても良い。好ましい方法としては、フリーラジカル重合が挙げられる。好ましくは共重合体の重合は、光架橋剤との反応前に完了する。

【0018】

アズラクトン官能性モノマーは、構造 III および IV、

【化 2】



(式中、R₁はビニル、プロピレニル、およびヘキセニルなどの重合性官能基であり、各 R²は独立に 1 ~ 14 個の炭素原子を有するアルキル基、3 ~ 14 個の炭素原子を有するシクロアルキル基、5 ~ 12 個の環原子を有するアリール基、6 ~ 26 個の炭素および 0 ~ 3 個の S、N、および非ペルオキシ O ヘテロ原子を有するアレニル基であることができ、あるいは 2 個の R²置換基はそれらが結合する炭素と一緒に、4 ~ 12 個の環原子を含有する炭素環を形成できる。)を有するモノマーをはじめとするアズラクトン官能基を含有するあらゆる適切なモノマーであっても良い。好ましいアズラクトン官能性モノマーは、2 - ビニル - 4,4 - ジメチル - 2 - オキサゾリン - 5 - オン (ビニルジメチルアズラクトン、VDM) である。

【0019】

コモノマーはあらゆる適切なモノマーであっても良い。好ましいモノマーとしては、ビニル基含有およびアクリロイル基含有化合物が挙げられる。このようなモノマーを代表する

リストには、アクリルアミド、メタクリルアミド、N, N - ジメチルアクリルアミド、ジアセトンアクリルアミド、N - ビニルピロリドン、ヒドロキシエチルメタクリレート、2 - アクリルアミド - 2 - メチルプロパンスルホン酸とその塩、N - (3 - メタクリルアミド) - N, N, N - トリメチルアンモニウム塩、N, N - ジメチルアミノエチルメタクリレート、アクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸、およびそれらの組み合わせが含まれる。好ましいモノマーは、N, N - ジメチルアクリルアミドおよびN - ビニルピロリドンである。

【0020】

任意の共重合架橋剤は、2つ以上の重合性官能基があるあらゆる適切な化学種であっても良い。適切な多官能性架橋モノマーとしては、エチレンジアクリレート、エチレンジタク
10
リレート、トリメチロールプロパントリアクリレート、およびトリメタクリレートなどのエチレン性不飽和(, - 不飽和)エステルと、メチレンビス(アクリルアミド)、メチレンビス(メタクリルアミド)、N, N' - ジアクリロイル - 1, 2 - ジアミノエタン、N, N' - ジメタクリロイル - 1, 2 - ジアミノエタンなどの , - 不飽和アミドと、2 - アルケニルアズラクトンおよび短鎖ジアミンの反応生成物とが挙げられる。

【0021】

光架橋剤は、電磁線の適用を受けて2つ以上のポリマー分子を結合でき、成長するポリマー鎖の末端以外の部位にポリマーを付着できるあらゆる適切な化学種であっても良い。光架橋剤はポリマー重合の完了後、ポリマーに付着できなくてはならない。好ましい光架橋
20
剤としては、ビスアジド、ビスジアゾカルボニル、およびビスジアジリンが挙げられる。ビスアジドは、使用の容易さに関して最も好ましい。アジド(- N₃)基は、UV光の適用に際して窒素(N₂)を放出し、高度に反応性の二価の窒素、ニトレンが残る。反応性カルベンは、ジアゾカルボニルまたはジアジリンの光分解によって生成できる。活性ニトレンまたはカルベン化学種を初期重合されたポリマー上のC - CまたはC - H結合をはじめとする多くのタイプの結合に挿入して、架橋を提供できる。アジド、ビスアジド、アゾカルボニルおよびビスジアゾカルボニル架橋剤が、基材 - ポリマー結合、並びにポリマー - ポリマー架橋を形成できるので好ましい。好ましいジアジド化学種としては、2, 6 -
30
ビス(4 - アジドベンジリデン) - 4 - メチルシクロヘキサノン(BAMC)、4, 4' - ジアジドジフェニルエーテル、4, 4' - ジアジドジフェニルスルホン、4, 4' - ジアジドジフェニルアセトン、4, 4' - ジアジドジフェニルメタンが挙げられる。好ましいビスジアゾカルボニル化学種としては、1, 4 - ビス(- ジアゾベンジル)ベンゼンが挙げられる。光架橋剤は、熱硬化並びに光硬化することもできる。

【0022】

別の実施態様では光架橋剤は、ポリマーに付着する第1の官能基と、光の適用に際して架橋を形成する第2の官能基とを有するヘテロ二官能価化合物でも良い。例えば4 - [p - アジドサリチアミド]ブチルアミン(ASBA、イリノイ州ロックフォードのPierce Chemical Co. から入手できる)は、上述のようにアズラクトンに結合するアミン官能基と、UV光の適用に際し別のポリマー鎖との架橋を形成するアジド官能基とを有する。

【0023】

光架橋剤が、ポリマーのアズラクトン官能基を占有することによりポリマーに付着する場合、架橋剤は生体分子を結合するのに必要なアズラクトン部位の全てを占有しないように、1当量未満で存在しなくてはならない。換言すれば光架橋剤上に存在するアズラクトン - 反応性官能基の数は、ポリマー上に存在するアズラクトン官能基の総数に満たない。しかし生体分子が光架橋前に付着する場合、すなわち組成物が既に生体分子 - アズラクトン結合を含有する場合は、この条件は当てはまらない。

【0024】

本発明の組成物を基材上に塗布して硬化させ(すなわち光架橋させ)、パターン化して生体分子と反応させても良い。方法を変化させ、これらの4つのステップをあらゆる順序で実施しても良い。下で述べる写真平板パターン化およびレーザー誘導熱写真法(LITI
50

）パターン化などの多くの技術は、組成物のコーティング、硬化、またはパターン化から選択される同時またはほぼ同時のステップを伴う。

【 0 0 2 5 】

基材は、ポリマーが接着するあらゆる適切な材料でも良い。有用な基材としては、ガラス、セラミック、非加熱金属および非金属酸化物、粘土、ゼオライト、および有機ポリマーなどの無機固形物が挙げられる。好ましい基材は、光架橋剤と容易に反応するものである。光架橋剤がアジド官能基を含有する場合、このような好ましい基材としては有機ポリマーと、シロキサン変性ガラスをはじめとする表面処理ガラスとが挙げられる。

【 0 0 2 6 】

基材上の組成物のコーティングは、あらゆる適切な方法で達成されても良い。コーティングは $1 \text{ nm} \sim 5 \text{ mm}$ の範囲の厚さを有しても良いが、好ましくは $0.05 \sim 100 \mu\text{m}$ であり、最も好ましくは $1 \sim 20 \mu\text{m}$ である。

【 0 0 2 7 】

組成物は、溶剤の添加ありまたはなしで被覆されても良い。適切な方法としてはスピンコーティング、スプレーコーティング、ナイフコーティング、浸漬またはローラーコーティングが挙げられる。組成物は選択的に塗布されてパターン化された表面を提供しても良い。このような方法としては、インクジェット印刷、オフセット、フレキソ印刷などの既知の印刷方法が挙げられる。組成物が微小構造体中に存在しして、組成物のパターン化された配列を提供するように、組成物が微細構造化表面（例えばミクロンスケールの窪みまたは溝を有する表面）上にナイフコーティングされても良い。

【 0 0 2 8 】

本発明の組成物は、電磁線、好ましくはUV光、最も好ましくはUV-A光への曝露によって硬化されても良い。組成物は光への選択的曝露によって選択的に硬化されても良い。選択的曝露方法としては、マスクまたはネガを通した曝露、あるいは光またはレーザー有向ビームによる曝露が挙げられる。硬化しない組成物を次に例えば洗浄によって除去して、パターン化されたコーティングを提供しても良い。組成物を次に光または熱硬化によってさらに硬化しても良い。状況によっては、特にゲルがパターン化されない場合、または機械的手段などの光パターン化以外の手段によってパターン化される場合、光硬化を熱硬化で完全に置き換えても良い。

【 0 0 2 9 】

パターン化は、基材上での組成物の選択的コーティング、組成物の選択的硬化、または基材からの組成物の選択的除去をはじめとする種々の手段によって達成されても良い。組成物の選択的硬化によって、 $2 \mu\text{m}$ 未満の解像度に組成物が光パターン化されても良いことが本発明の利点である。典型的な徴群はサイズ $1000 \mu\text{m}$ 未満である。好ましくはパターン化されたコーティングは、サイズ $200 \mu\text{m}$ 未満、より好ましくは $20 \mu\text{m}$ 未満、そして最も好ましくは $2 \mu\text{m}$ 未満の徴群を有する。上述のサイズ寸法は、被覆された徴群または被覆された徴群間の間隙の平面寸法である。

【 0 0 3 0 】

組成物は、米国特許番号第5,725,989号で述べられたようなレーザーアドレス可能熱転写画像形成方法によって、基材上でパターン化されても良い。この方法では、担体層、光熱変換層、およびパターン化される組成物を含む転移層を含む熱転写供与体要素が構築される。供与体要素を受容体に接触させて画像に従って照射すると、メルトスティック転移過程が起きて、転移層含有組成物は受容体上に画像形成される。この発明の光架橋性アズラクトン組成物は、このようなシステムの転移層内で使用できる。この光架橋性アズラクトン組成物は、転移層への組み込み前、転移層への組み込み後、または受容体へのレーザーアドレス熱転写後に生体分子と反応できる。この発明のアズラクトン組成物は、転移工程前または後に、熱または光化学的に架橋される。この方法は、受容体基材に結合する個々のアズラクトン-生体分子のレーザーアドレス熱写真法に先だって、異なる生体分子を本アズラクトン組成物を含む転移層上に予備パターンする機会を提供する。供与体および受容体要素の位置合せが、転移ステップのいずれかまたは全ての間で自動装置によ

10

20

30

40

50

り変更されて、転移層上での生体分子のパターン化とは異なる、受容体上の転移された要素に関する所望の配列間隔およびサイズが構築されても良い。レーザーアドレス可能熱写真法は、高解像度画像形成および高い位置合わせ精度を提供する。本発明の組成物の明確な利点は、熱写真法の前または後に生体分子を結合し、転移後にサンプルを受容体に熱または光化学的に硬化する手段を提供する能力である。

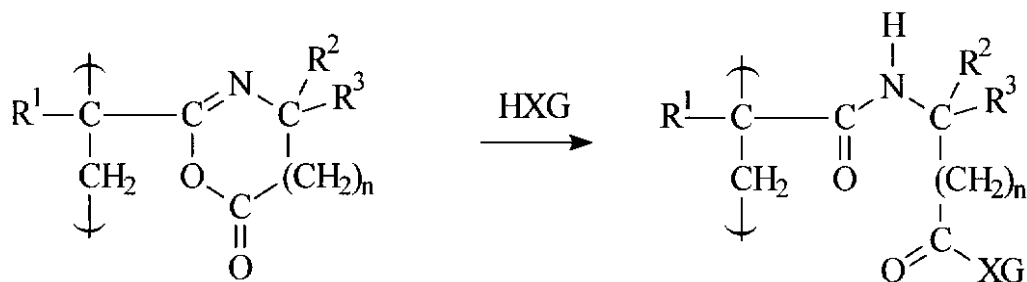
【0031】

ポリマーのアズラクトン官能基は、一級アミン、二級アミン、ヒドロキシ、およびチオールを含む、生体分子上に存在する種々の付着官能基に結合しても良い。これらの基は、アズラクトン官能基の残基と結合する生体分子の残基を生成する求核付加によって、適切な触媒の存在下または不在下でアズラクトンと反応する。

【0032】

典型的な反応経路は、

【化3】



(式中、 R^1 はHまたは CH_3 であり、 R^2 および R^3 は独立に1～14個の炭素原子を有するアルキル基、3～14個の炭素原子を有するシクロアルキル基、5～12個の環原子を有するアリール基、6～26個の炭素および0～3個のS、N、および非ペルオキシOヘテロ原子を有するアレニル基であることができ、または R^2 および R^3 はそれらが結合する炭素と一緒に4～12個の環原子を含有する炭素環を形成することができ、

n は0または1の整数であり、

Xは-O-、-S-、-NH-、または-NR⁴- (式中、R⁴はC₁～C₂₀アルキル、C₆～C₃₀アリール、またはGへの第2の結合であることができる。)であり

HXGは付着する官能基HX-を有する生体分子であり、

XGはポリマーに結合したままであるHXGの残基である。)である。

【0033】

生体分子の付着官能基によっては、効果的付着反応速度を達成するために触媒が必要となることもある。一級アミン官能基は触媒を必要としない。トリフルオロ酢酸、エタンスルホン酸、トルエンスルホン酸などの酸触媒は、ヒドロキシおよび二級アミン官能基に対して効果的である。トリエチルアミン、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エン(DBU)および1,5-ジアザビシクロ[4.3.0]ノン-5-エン(DBN) (どちらものウィスコンシン州ミルウォーキーのAldrich Chemical Co.から入手できる)などのアミン塩基は、ヒドロキシおよびチオール付着官能基に対しても同様に効果的である。用いる触媒のレベルは、100部のアズラクトンを基準にして概して1～10部、好ましくは1～5部である。本発明のアズラクトン官能基は、有利なことにポリペプチドおよびポリヌクレオチド配列末端に選択的に付着する。

【0034】

生体分子をポリマーに付着するステップは、コーティング前または後、硬化の前または後、パターン化の前または後に実施されても良い。

【0035】

生体分子の付着後キャッピング群が添加されて、あらゆる未使用アズラクトン官能基を占

10

20

30

40

50

有し、あらゆる好ましくない物質による後のゲル汚染を防止しても良い。キャッピング群は好ましくはアズラクトンと容易に反応し、好ましくはゲルの所望の特徴を妨害しない。好ましくはキャッピング基は水溶性で、そのためゲルの膨潤性を改善する。好ましいキャッピング群は、一級アミンおよび水である。

【 0 0 3 6 】

膨潤性ゲルは基材の所定面積あたりより多量の生体分子と結合できることから、得られる硬化したゲルは有利なことに膨潤性である。この面密度増大は標的部位の光学読み取りなどの測定能力を改善し、より高度な小型化を可能にする。ゲルは有利なことに水に一晩浸漬するとその乾燥容積の少なくとも2倍、好ましくはその乾燥容積の少なくとも3倍、より好ましくは少なくとも4倍、そして最も好ましくはその乾燥容積の少なくとも5倍に膨潤する。膨潤の程度は有利なことに、用いる光架橋剤の量を通じて制御できる。

10

【 0 0 3 7 】

この発明は、生体分子をテストプローブまたは参照基準として用いる分析装置において、特に基材の狭い領域で種々の異なる生体分子を用いることが望ましい場合に有用である。

【 0 0 3 8 】

例えばマイクロチップ上でのDNA塩基配列決定操作の小型化は、速度およびコストにおける進歩を提供する。本発明のオリゴヌクレオチド含有ゲルパッドは、チップ表面にスポットされた数千から数百万個程度のプローブを有する高密度DNAチップを作るのに使用できる。ハイブリッド形成法による配列決定方法では、オリゴヌクレオチドプローブの完全な配列（例えば可能な五量体1024個の全て、または可能な八量体65,536個の全て）が基材上にパターン化されて、配列決定されるDNAサンプルを配列に特異的にハイブリッド形成させる。標的DNA配列は、標的配列と共に完全な二重鎖を形成するオリゴマーの重複セットの分析によって同定できる。このようなチップは、一例として多遺伝子疾患の検出において要求されるような複数遺伝子変異の配列決定が必要な用途において有用である。

20

【 0 0 3 9 】

低密度DNAチップは、概して300個までのプローブを有することができ、特定の生物または菌種の検出、または試験パネルが必要な診断用途に特に適している。低密度配列の場合、本発明のオリゴヌクレオチド含有ゲルを例えば米国特許番号第5,632,957号、および第5,605,662号で述べられるような、標的DNAハイブリッド形成法の自由電界電気泳動制御のためにアドレスおよびプログラム可能電子マトリックスの役目を果たす個別にアドレス可能な微小電極上で、パターン化することができる。DNAサンプルは、1つの極小位置から次に電気泳動的に移動する。電子的切迫制御が使用されて、各極小位置で捕捉プローブと一致するDNAが保持される。

30

【 0 0 4 0 】

本発明の酵素含有ゲルパッドの極小配列を使用して、酵素阻害または活性化作用について化合物をスクリーンできる。個々のゲルパッドは様々な用量の標的化合物に暴露され、各ゲルパッド内の酵素活性の測定によって用量反応がモニターされる。

【 0 0 4 1 】

天然のまたは遺伝子操作された微生物を本発明の個々のゲルパッド上に固定化することもできる。微生物の表面生体分子は、ゲルへの付着のための固着点の役目を果たす。化学的刺激またはその他の環境条件に対する微生物の生物学的反応がモニターできる。代案としては、このような微生物含有ゲルパッドは個々のバイオリアクターとして使用できる。

40

【 0 0 4 2 】

細胞の付着および成長（例えば成長因子またはコラーゲン）を促進する生物学的分子を含有するゲルは、上述の方法および組成物を使用してパターン化できる。得られるパターン化されたゲルを使用して、神経回路網、皮膚または血管などの二次元細胞構造を生成できる。

【 0 0 4 3 】

本発明の組成物は、担体免疫アッセイパネル、薬剤濫用パネル、酵素をベースとする電極

50

およびオプトードにも使用できる。またゲルパッドの配列は、検出される微生物を含有する流体の規制量を吸い上げるのにも使用できる。成長栄養素および蛍光プローブをゲルパッドに組み込むことができる。サンプル中の生存生物数は、蛍光反応を示すゲルパッド数に相関できる。

【0044】

この発明の目的および利点を以下の実施例によってさらに例証するが、これらの実施例で述べる特定の材料およびそれらの量、並びにその他の条件と詳細は、この発明を不当に制限するものではない。

【0045】

実施例

特に断りのない限りあらゆる化学物質および試薬は、ウィスコンシン州ミルウォーキーの Aldrich Chemical Co. から入手され、または入手可能である。

【0046】

実施例 1 : 1 : 1 ジメチルアクリルアミド : ビニルジメチルアズラクトン (DMA : VDM) 共重合体の調製

210 部のメチルエチルケトン (MEK) 中、70 部のジメチルアクリルアミド (DMA) および 70 部の 2 - ビニル - 4 , 4 - ジメチル - 2 - オキサゾリン - 5 - オン (ビニルジメチルアズラクトン、VDM、ニュージャージー州プリンストンの SNPE から市販される) の溶液を 0.7 部の N , N' - アゾビス (イソブチロニトリル) 開始剤 (AIBN、バージニア州リッチモンドの Wako Chemicals USA, Inc. から V A Z O 6 4 TM として市販される) と混合した。混合物を窒素で 5 分間スパージし、次にジャーに入れて密封し、60 で 24 時間ランドロメータ水浴中で混転した。得られた反応混合物は、120 で 3 時間サンプルを蒸発させると、重量的に 40.6 % 固形分を有することが示された。

【0047】

実施例 2 : 2 , 6 - ビス (4 - アジドベンジリデン) - 4 - メチルシクロヘキサノン (BAMC) 光架橋剤 : ジメチルホルムアミド (DMF) 溶剤を使用した (DMA : VDM) の平板印刷パターン化

50 : 50 (w/w) DMA : VDM 共重合体 (実施例 1 で述べたようにして調製された) は、メチルエチルケトン (MEK) 溶剤中 40 % (w/w) 溶液として調製された。MEK は真空デシケータ内で 24 時間抽出された。乾燥した共重合体をジメチルホルムアミド中で再溶解して 40 % (w/w) 溶液を作った。弱い照明条件 (< 0.1 フィート燭 (fc)、コネティカット州ウェストベリーの Spectronics Corp. からの Spectroline DIX - 555 A 検出器を使用して 555 nm で測定) 下で、28 mg の濡れた 2 , 6 - ビス (4 - アジドベンジリデン) - 4 - メチルシクロヘキサノン (BAMC) (水 30 % 含有) を 23 、およそ 0.1 mトルで真空デシケータ内で乾燥し、次に 2 g の DMA : VDM 溶液を添加した。得られる混合物をスパチュラを使って 1.5 cm x 2.0 cm x 1 mm 厚さのポリ (メチルメタクリレート) シート (PMMA、DRG - 100、ペンシルベニア州フィラデルフィアの Atohaas Americas, Inc.) 上に手で塗り広げた。離型剤として 1 % ドデシル硫酸ナトリウム水溶液を使用して、溶融シリカ写真平板マスク (MRS - 3、マサチューセッツ州トップスフィールドの Geller Microanalytical Laboratory) を浸漬コーティングし、次に窒素ストリーム下で乾燥した。クロム酸塩パターンを DMA : VDM コーティングに接触させて、マスクを被覆された PMMA シートに手で適用し、ラミネートを UV 照射源 (モデル : ELC 4001、コネチカット州ダンベリーの Electro-lite Corp. 18 mW/cm² の 400 W 水銀灯付き、コネティカット州ウェストベリーの Spectronics Corp. からの Spectroline DIX - 365 検出器により 365 nm で測定) に 3 分間暴露した。弱い照明条件 (上述のように) 下でマスクを除去し、暴露されないポリマーを PMMA から 100 % イソプロピルアルコールですすぎ落とした。得られた平板印刷でパターン化された DMA : VDM

10

20

30

40

50

ヒドロゲルを窒素下で乾燥し、高解像度ゲル配列を提供した。200倍での顕微鏡（ライカモデルDMRX顕微鏡使用、ドイツ国ウェツラーのライカ）観察からは、 $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ のゲルパッド、および $5\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ までのゲルパッドが容易に製造されることが示された。図1を参照されたい。

【0048】

同様にして上述のMRS-3マスクを使用して、 $2\mu\text{m}$ 未満の解像度を有するパターンを提供し、PMMA上にヒドロゲルパターンを得た。拡大率1000倍の顕微鏡写真（ライカモデルDMRX顕微鏡を使用して撮影、ドイツ国ウェツラーのライカ）からは、アズラクトンヒドロゲルが、平板印刷で $2\mu\text{m}$ よりも良い解像度でパターン化できることが示された。図2を参照されたい。

10

【0049】

実施例3：BAMC光架橋剤：MEK/酢酸ブチル溶剤混合物を使用したDMA：VDMの平板印刷パターン化

50：50のDMA：VDM共重合体のMEK中40%（w/w）溶液（実施例1で述べたようにして調製された）を等量のBAMCの酢酸ブチル中2.86%（w/w）溶液（30%水性懸濁液）と混合した。光レジストスピナー（モデル1-EC101D-R435、テキサス州ガーランドのHeadway Research Inc.）上で、得られる混合物の酢酸ブチル溶液を $1.5\text{cm} \times 2.0\text{cm} \times 1\text{mm}$ のPMMAシートに4,500rpmでスピン被覆した。コーティングを23、およそ0.1mトルで真空デシケータ内で1時間乾燥させた。顕微鏡で示されるように、実施例2で述べたような平板印刷方法によって、実施例2に示すのと実質的に同一の解像度を有するゲルパターンを提供した。

20

【0050】

これらのゲルを加水分解させ水中で一晩膨潤させた。ゲルは約500%膨潤し、30日の期間中顕著に形状を変えなかった。顕著なことに膨潤ゲルはPMMA担体に結合したままであった。

【0051】

光架橋された組成物の反応性を実証するために、第2のサンプルを調製して次のように処理した。蛍光フルオレセインレポータープローブ（5'-FITC- T_8 -3'- NH_2 、カリフォルニア州サンフランシスコのGenemed Synthesis、FITC=イソチオシアン酸フルオレセイン）を含有する54nMのアミン末端オリゴヌクレオチド八量体を $20\mu\text{L}$ の炭酸重炭酸塩緩衝液（0.05M、pH9.2）に溶解した。EFD32ゲージのフラットチップ針（ロードアイランド州E.プロビデンスのEFD Corp.）を使用して、オリゴヌクレオチド溶液を光硬化したDMA：VDMコーティング上にスポットした。サンプルをDI水での洗浄前に密閉した加湿容器内に室温で2時間入れて、DI水中に10時間定温放置した。アミンとアズラクトン官能基との反応を通じた、オリゴヌクレオチドと光架橋されたゲルとの共有結合を示すFITCレポーターを検出する蛍光分析顕微鏡（ライカ）を使用して、明るい蛍光スポットが観察された。

30

【0052】

対照サンプルでは、硬化したDMA：VDMコーティングをDI水中で1時間定温放置してアズラクトン環を加水分解し、次に窒素ストリーム中で乾燥した後に、アミン末端オリゴヌクレオチド溶液をスポットして加湿容器内に2時間定温放置した。サンプルをDI水で洗浄し、蛍光顕微鏡の下で調べた。同一検出ゲインの下で、蛍光スポットは観察されなかった。

40

【0053】

これらの結果は、（1）反応性アズラクトン官能性が光架橋ステップ中に保存される、（2）アミン末端オリゴヌクレオチドの共有結合は、これらの無処置のアズラクトン環との反応を通じて迅速に進行する、そして（3）カップリング反応（残留アズラクトンのカルボキシレートへの転換）が完結するとオリゴヌクレオチドの非特異的結合は起きないことの補強証拠を提供する。

50

【0054】

実施例4：4 - (p - アジドサリチアミド) ブチルアミン (A S B A) を使用した D M A : V D M 平板印刷パターン化

弱い照明条件 (上述のように) 下で、25 mg の 4 - (p - アジドサリチアミド) ブチルアミン (A S B A 、イリノイ州ロックフォードの P i e r c e C h e m i c a l C o . から市販される) および 10 mg の 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド助触媒 (E D C 、 H C l 塩、イリノイ州ロックフォードの P i e r c e C h e m i c a l C o .) を 0.5 ml の 95 : 5 (v / v) イソプロパノール : 水に溶解した。この溶液および 1 滴の 1 N H C l 水溶液を 50 : 50 の D M A : V D M 共重合体 (実施例 1) の M E K 中 40 % (w / w) 溶液 1 m l に添加した。A S B A のブチルアミン部分をアズラクトン官能基に、室温で 2 時間にわたり熱カップリングさせた。得られる混合物の M E K 溶液を P M M A 基材にスピンコーティングし、真空デシケータ内で 15 分間乾燥させた。M R S - 3 マスクを 3 分間使用して、サンプルを 365 nm の測定で $18 \text{ mW} / \text{cm}^2$ (S p e c t r o l i n e D I X - 365 検出器、コネティカット州ウェストベリーの S p e c t r o n i c s C o r p .) の U V 照射に平板印刷で暴露し、結合 A S B A のアジド部分を通じて光架橋した。マスクを除去し、サンプルを純性イソプロピルアルコールで十分に洗浄した。ライカモデル D M R X 顕微鏡を使用して、実施例 2 と比較できる解像度を有するゲルパターンが顕微鏡で観察された。この二重硬化アプローチにより、ビス - アジド架橋剤に比べて架橋の効率が上がる。

10

【0055】

実施例5：UV 硬化性アクリレート接着剤を使用した D M A : V D M の平板印刷パターン化

この実施例は、アズラクトンポリマーと UV 硬化性ポリマーとの混合物を使用して、アズラクトン官能基のあるゲルが平板印刷でパターン化できることを実証する。このアプローチの利点は、UV 硬化性ポリマーおよびアズラクトンポリマーを異なる割合で混合することにより、アズラクトン濃度が変えられることである。

20

【0056】

50 : 50 D M A : V D M 共重合体 (実施例 1) の M E K 中 40 % (w / w) 溶液を 1 : 1 ~ 1 : 30 v / v 比の異なる量で UV 硬化性アクリレート接着剤 (クラス V I 医療等級接着剤、モデル 4 M 0 1 、コネチカット州ダンバリーの E l e c t r o - l i t e C o r p .) と混合した。混合物を P M M A の上に手で塗り広げた。実施例 2 で述べたような平板印刷の手順に従い、5 分間 UV 曝露した。アクリレート接着剤 5 部 : アズラクトン共重合体 2 部の v / v 比で、ゲル配列上に実施例 2 と比較できる解像度が得られた。

30

【0057】

実施例6：B A M C 光架橋剤を使用した D M A : V D M のレーザー誘導熱写真法 (L I T I)

レーザー誘導熱写真法 (L I T I) 供与体シートは、アズラクトンヒドロゲル層、ポリアクリレート中間層、およびポリエチレンテレフタレート基材上のカーボンブラック光熱変換層から成る。これらの供与体シートは次のようにして調製した。

【0058】

光熱変換層は、Y a s u i S e i k i L a b C o a t e r 、モデル C A G - 150 (インディアナ州ブルーミントンの Y a s u i S e i k i C o .) で直線インチあたり 90 らせんセルの極小グラビアロールを使用して、放射線硬化性樹脂中のカーボンブラック水性懸濁液を 4 ミル P E T 基材上に塗布して調製された。コーティング組成物は、1 部のトリメチロールプロパントリアクリレート (S a r t o m e r TM S R 351 H P 、ペンシルベニア州エクストンの S a r t o m e r C o . I n c .) 、1.15 部の 3 M M a t c h p r i n t N e g a t i v e B l a c k M i l l b a s e (ミネソタ州セントポールの 3 M C o .) 、および 5 % の 2 - ヒドロキシ - 2 , 2 - ジメチルアセトフェノン光開始剤 (D a r o c u r TM 1173 、ニューヨーク州タリータウンの C i b a S p e c i a l t y C h e m i c a l s C o .) であった。コーティングを引き続

40

50

いてコーター上でインライン乾燥してUV硬化した。被覆されたフィルムの透過吸光度 ($TOD = -\log T$ 、式中 T は測定された部分透過率) は、 1060 nm で 2.35 であった。

【0059】

ポリアクリレート中間層は、 130 g のトリメチロールプロパントリアクリレート (SartomerTM SR351HP)、 130 g の $3:1$ 混合物 (25% 固形分 w/w) およびポリビニルブチラル (ButvarTM B98、ミズーリ州セントルイスのMonsanto Co.)、 221 g の1-メチル-2-プロパノール、 331.5 g のメチルエチルケトン中の 8.13 g のDarocurTM 1173の 20% 固形分溶液として調製され、それは次に $1.0 \sim 1.2\text{ }\mu\text{m}$ の厚さで光熱変換層上に被覆され、Radiation Polymer Corporation (イリノイ州プレーンフィールド) UV ProcessorモデルNo. QC1202AN3TR (中圧UV灯、総曝露量約 100 mJ/cm^2 、 N_2 雰囲気) 内での曝露を通じて化学線により硬化されて、中間層が生成した。

【0060】

$60:40$ (w/w) DMA/VDM共重合体 (56 部のDMAおよび 84 部のVDMを使用して実施例1に述べられたようにして調製した) 固形物の 40% (w/w) 溶液は、シクロヘキサノン中で実施例2で述べられたようにして調製された。BAMC架橋剤の 30% 水性懸濁液 28 mg を乾燥して得られる残滓を 2 mL のポリマー-シクロヘキサノン溶液に溶かして、得られる混合物を弱い照明条件下、目標コーティング厚 $5\text{ }\mu\text{m}$ で中間層に手で塗り広げ、LITI供与体基材を完成した。

【0061】

材料をLITIによってガラス受容体シートに移した。LITI装置は、連続波 (cw) モードで操作されるYAGレーザー (フロリダ州オーランドのControl Laser Corporationからのモデル2600) を使用した。cw出力ビームは、どちらもカリフォルニア州スプリングフィールドのIsomet Corporationから入手できるモデル231A rf駆動装置によって駆動されるモデル1201E-2音響光学的モジュレータ (AOM) 上に入射した。AOMによって一次回折されたYAGレーザービームの構成成分は、アパチャによって選択され、3要素 2.5 インチ焦点距離対物レンズにより $100\text{ }\mu\text{m}$ 径の点に集束された。ガラス受容体と接触するLITI供与体シートをペンシルベニア州ピッツバーグのAerotech Inc. からのモデル番号ATS50030 xy平行移動台上の対物レンズの焦点に置いた。AOMのためのrf駆動装置は、カリフォルニア州サンタクララのHewlett-Packardからのモデル8116A官能基発生装置によって、ゲートオンおよびオフされた。このようにしてLITI供与体シート/受容体の組み合わせの異なる領域が、レーザービーム中に移動され、レーザービームがオンおよびオフになって、 $0.1 \sim 100$ ミリ秒範囲のパルス幅で光学的パルスを生成した。供与体シートによるこれらのレーザーパルスの吸収の結果、上述のDMA/VDM共重合体層の急速な加熱と、共重合体のガラス受容体への熱転写が起きた。

【0062】

熱転写実験は、オレゴン州ポートランドのMolelectron Detector, Inc. からのモデルJ3-09検出器による測定で、LITIサンプルにおいて 0.128 W の値に設定されたレーザー出力で実施された。これらの実験では、光学的パルス幅は $2 \sim 7$ ミリ秒の間で変化した。共重合体がBAMC架橋剤を含有しない供与体シートでは、レーザービームに暴露しない領域でいくらかの共重合体転移があることが分かった。供与体シートからの残留シクロヘキサノンの除去によってこの転移は低下したが、完全に除外することはできなかった。架橋した共重合体材料は、いかなるブロック傾向も示さなかった。ライカモデルDMRX顕微鏡を使用した 100 倍の顕微鏡観察で見られたように、 $6 \sim 7$ ミリ秒のパルス幅で、 $50\text{ }\mu\text{m}$ 径 $4\text{ }\mu\text{m}$ 厚のゲルパッドを架橋された供与体シートから製造することが可能であった。図3を参照されたい。

【 0 0 6 3 】

実施例 7：B A M C 光架橋剤を使用した D M A：V D M に結合した酵素のレーザー誘導熱写真法 (L I T I)

以下の変更を加えて実施例 6 に述べたようにして、レーザー誘導熱写真法 (L I T I) 供与体シートを調製した。 - D - グルコシダーゼ酵素の 5 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7 . 6) 中 1 m g / m L の溶液により、様々な位置でアズラクトンヒドロゲルコーティングを処理して乾燥させた。これにより酵素上の反応性ペンダント基とヒドロゲル組成物のアズラクトン官能基との反応を通じて、酵素と供与体シート構造体のアズラクトン転移層との共有結合が提供された。

【 0 0 6 4 】

実施例 6 で述べたのと類似の方法を使用し、L I T I によって酵素含浸アズラクトンを P V d C (ポリ塩化ピリデン) 下塗 P E T 受容体シートに転移した。この場合、1 0 0 μ m 幅ストライプを受容体上に画像形成し、引き続いて架橋した。いくつかのストライプは、酵素が塗布された供与体シートの領域に対応した。いくつかのストライプは、酵素が塗布されない対照領域に対応した。全てのストライプに、 - D - グルコシダーゼ酵素による酵素的切断の結果として蛍光を発する指示薬 (4 メチル - ウンベリフェリル - - D - グルコシド) の 0 . 0 5 m M 溶液を接種した。ライカ蛍光分析顕微鏡を使用して、酵素含浸ストライプで明るい青の蛍光が観察された一方、対照ストライプは蛍光を示さなかった。これらの結果はヒドロゲル組成物への共有結合、組成物の L I T I 転移、および組成物の架橋後、酵素活性が保持されることを示した。

【 0 0 6 5 】

この発明の精神と範囲を逸脱することなくこの発明の様々な変更と修正が可能であることは、当業者には明らかであり、この発明は上で述べた例証を意図する実施態様により不当に制限されないものとする。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、本発明によるヒドロゲルパッドを拡大率 2 0 0 倍で撮影した顕微鏡写真である。棒線は 1 0 0 μ m を表す。

【図 2】 図 2 は、本発明によるヒドロゲルパターンを拡大率 1 0 0 0 倍で撮影した顕微鏡写真である。棒線は 4 0 μ m を表す。

【図 3】 図 3 は、本発明によるヒドロゲルパッドを拡大率 1 0 0 倍で撮影した顕微鏡写真である。中心と中心の間隔は 2 0 0 μ m である。

10

20

30

【図 1】

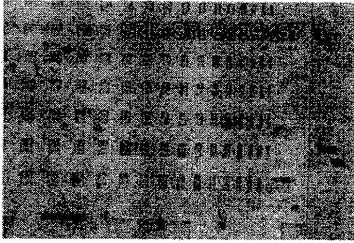


Fig. 1

【図 2】

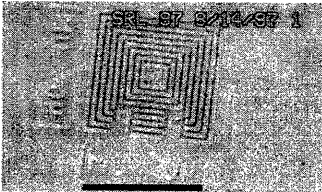


Fig. 2

【図 3】

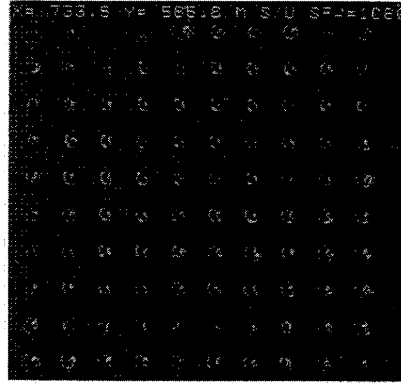


Fig. 3

フロントページの続き

- (72)発明者 リュー, チエ
アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 3 3 - 3 4 2 7, セント ポール, ピー . オー . ボックス 3
3 4 2 7
- (72)発明者 ベンツェン, ジェームズ ジー .
アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 3 3 - 3 4 2 7, セント ポール, ピー . オー . ボックス 3
3 4 2 7

審査官 藤本 保

- (56)参考文献 特開平 0 4 - 0 5 0 9 4 6 (J P , A)
特開平 0 9 - 0 9 0 6 3 7 (J P , A)
特表平 1 0 - 5 0 1 5 6 5 (J P , A)
特開平 0 2 - 2 9 4 3 0 8 (J P , A)
国際公開第 9 7 / 0 3 8 8 6 5 (W O , A 1)
米国特許第 0 3 5 8 3 9 5 0 (U S , A)
米国特許第 0 4 9 8 1 9 3 3 (U S , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G03F7/038
G03F7/008-7/012
C08L1/00-101/16
C08K5/00-13/08