

【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 1 部門第 1 区分

【発行日】平成30年3月15日(2018.3.15)

【公表番号】特表2017-503522(P2017-503522A)

【公表日】平成29年2月2日(2017.2.2)

【年通号数】公開・登録公報2017-005

【出願番号】特願2016-548235(P2016-548235)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 4 0 B 40/06 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 F

C 1 2 M 1/00 A

C 4 0 B 40/06

【手続補正書】

【提出日】平成30年1月29日(2018.1.29)

【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】

核酸ライブラリーを予備的に分離するデバイスであって、  
固相ブロックに配置された複数のハイブリダイゼーション親和性モノリスカラムを備えており、

ここで、前記モノリスカラムのそれぞれは、固有のハイブリダイゼーション結合特異性を有する共有結合オリゴヌクレオチドにより官能化されており、且つ、

前記モノリスカラムのそれぞれは、該カラムを通る強制対流が生じ得る位置に配置されている、デバイス。

【請求項 2】

前記モノリスカラムのそれぞれは、前記ブロックを貫通するホールの内壁に共有結合されている、請求項 1 に記載の分離デバイス。

【請求項 3】

前記モノリスカラムのそれぞれは、該モノリスカラムを強制対流が流れるときも前記ブロックに固定され続けるように前記貫通ホールの内壁に結合されている、請求項 2 に記載の分離デバイス。

【請求項 4】

前記モノリスカラムのそれぞれは、20PSIの圧力で該モノリスカラムを強制対流が流れるときも前記ブロックに固定され続けるように結合されている、請求項 3 に記載の分離デバイス。

【請求項 5】

前記ブロックは、前記モノリスカラムを強制対流が流れるときにアドレス可能なアライメントにおいて該モノリスカラムを維持し得、且つ、該モノリスカラムからの分離された核酸分子亜集団の解離およびトランスファーを可能とする物質から構成されている、請求項 1 に記載の分離デバイス。

【請求項 6】

前記ブロックは、金属から構成されている、請求項 5 に記載の分離デバイス。

【請求項 7】

前記金属は、アルミニウムである、請求項 6 に記載の分離デバイス。

【請求項 8】

前記アルミニウムの表面は、シラン処理されている、請求項 7 に記載の分離デバイス。

【請求項 9】

前記モノリスカラムは、有機ポリマーからなるモノリスカラムであり、該モノリスカラムと表面がシラン処理されたアルミニウムとの共有結合は、炭素 - 炭素結合である、請求項 8 に記載の分離デバイス。

【請求項 10】

前記モノリスカラムが、有機ポリマーからなるモノリスカラムである、請求項 1 に記載の分離デバイス。

【請求項 11】

前記モノリスカラムが、ポリ ( G M A - c o - E D M A ) である、請求項 10 に記載の分離デバイス。

【請求項 12】

前記モノリスカラムのそれぞれは、約  $0.5 \text{ fmol} / \mu\text{L}$  ~ 約  $0.4 \text{ nmol} / \mu\text{L}$  の核酸ライブラリーを結合し得る、請求項 1 に記載の分離デバイス。

【請求項 13】

前記モノリスカラムのそれぞれは、約  $1 \text{ pmol} / 10 \mu\text{L}$  ~ 約  $1 \mu\text{mol} / \mu\text{L}$  の密度で共有結合したオリゴヌクレオチドで官能化されている、請求項 1 に記載の分離デバイス。

【請求項 14】

前記モノリスカラムのそれぞれは、約  $0.5 \text{ fmol} / \mu\text{L}$  ~ 約  $0.4 \text{ nmol} / \mu\text{L}$  の核酸ライブラリーを結合し得る、請求項 13 に記載の分離デバイス。

【請求項 15】

前記ライブラリー核酸分子の、前記モノリスカラムにある相補的配列を有するオリゴヌクレオチドに結合する平均速度定数は、約  $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~ 約  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  である、請求項 1 に記載の分離デバイス。

【請求項 16】

k の数の核酸タグの混合物を、m の数の空間的位置にルートする方法であって、m および k は 1 より大きい整数であり、該核酸タグのそれぞれは、化学反応サイトまたはリガンドに動作的に連結されており、該方法は以下の ( a ) および ( b ) のステップ：

( a ) 前記 k の数の核酸の混合物を 1 つのアレイに接触させること、ここで該アレイは m の数の空間的位置を有し、該空間的位置のそれぞれはモノリスが付着した担体を備えており、各モノリスは、共有結合的に結合したポリマーを含み、該ポリマーは前記 k の数の核酸タグの内の 1 つと選択的にハイブリダイズする；および

( b ) 前記 k の数の核酸タグのそれぞれを、前記 m の数の空間的位置のいずれか 1 つにおける前記相補的なポリマーとハイブリダイズさせること；

を包含する、方法。

【請求項 17】

前記 m の数の空間的に規定された位置において前記ポリマーから前記 k の数の核酸タグを溶出することをさらに包含する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記アレイは、m の数の個々の空間的位置を含むブロックを備える、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記アレイは、1 より大きい数の動作的に連結されたブロックを備える、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記核酸タグが前記ポリマーにハイブリダイズする平均速度定数は、約  $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ~ 約  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 21】

前記空間的位置の 1 つまたはそれ以上において、前記核酸タグが前記ポリマーにハイブリダイズする収率は、約 40 % より大きい、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 22】

前記空間的位置の 1 つまたはそれ以上において、前記核酸タグが前記ポリマーにハイブリダイズする収率は、約 90 % より大きい、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 23】

前記ポリマーは、キャプチャーオリゴヌクレオチドである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 24】

前記キャプチャーオリゴヌクレオチドは、約 10 ヌクレオチド ~ 約 50 ヌクレオチド、15 ヌクレオチド ~ 約 45 ヌクレオチド、10 ヌクレオチド ~ 約 30 ヌクレオチド、約 15 ヌクレオチド ~ 約 24 ヌクレオチド、または、約 19 ヌクレオチド ~ 約 20 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記キャプチャーオリゴヌクレオチドは、直交性である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

前記キャプチャーオリゴヌクレオチドの  $T_m$  は、約 49 ~ 約 53 の範囲にある、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】

前記  $k$  は、10 またはそれよりも大きく、前記核酸タグの約 40 % は、相補的キャプチャーオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされ、および、

相補的キャプチャーオリゴヌクレオチドの数は、10 またはそれよりも大きい、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 28】

前記  $k$  は、10 よりも大きく、前記核酸タグの約 90 % は、相補的キャプチャーオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされ、および、

相補的キャプチャーオリゴヌクレオチドの数は、10 またはそれよりも大きい、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 29】

前記核酸タグは、前記キャプチャーオリゴヌクレオチドの  $T_m$  の温度または該  $T_m$  より約 10 以下の温度にて、前記キャプチャーオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされる、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 30】

前記担体は、チタン、アルミニウム合金、ステンレス鋼、ドーブドメタル、ガラス、石英、ポリカーボネート、溶融シリカ、ポリ(メチルメタクリレート)、プラスチック、ポリエーテルエーテルケトン、ドーブドポリエーテルエーテルケトン、ドーブドポリスチレン、環状オレフィンコポリマー、ポリエーテルイミド、ドーブドポリプロピレン、またはこれらの組合せから構成される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 31】

前記アレイは、動作的に連結された一連のカラムである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 32】

前記モノリスは、有機ポリマーからなるモノリスである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 33】

前記担体は、約  $0.5 \text{ fmol} / \mu\text{L}$  ~ 約  $0.4 \text{ nmol} / \mu\text{L}$  の前記核酸タグを結合する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 34】

前記核酸タグは、約 20 ヌクレオチド ~ 約 1000 ヌクレオチド、約 50 ヌクレオチド ~ 約 800 ヌクレオチド、約 100 ヌクレオチド ~ 約 600 ヌクレオチド、または、約 1

50ヌクレオチド～約300ヌクレオチドの長さを有する、請求項16に記載の方法。

【請求項35】

前記リガンドは、ペプチド、ペプチド、または、約50ダルトン～約3000ダルトンの分子量の有機化合物である、請求項16に記載の方法。

【請求項36】

前記モノリスは、前記担体に共有結合的に結合している、請求項16に記載の方法。

【請求項37】

前記モノリスは、アミド結合、エステル結合、ウレア結合、ウレタン結合、炭素-ケイ素結合、炭素-窒素結合、炭素-炭素結合、エーテル結合、チオエーテル結合、または、ジスルフィド結合により、前記担体に共有結合的に結合している、請求項16に記載の方法。

【請求項38】

kの数の核酸タグの混合物を、mの数の空間的位置にルートする方法であって、mおよびkは1より大きい整数であり、該方法は以下の(a)および(b)のステップ：

(a) 前記kの数の核酸の混合物を1つのアレイに接触させること、ここで該アレイはmの数の空間的位置を有し、該空間的位置のそれぞれはモノリスが付着した担体を備えており、各モノリスは、共有結合的に結合したポリマーを含み、該ポリマーは前記kの数の核酸タグの内の1つと選択的にハイブリダイズする；および

(b) 前記kの数の核酸タグのそれぞれを、前記mの数の空間的位置のいずれか1つにおける前記相補的なポリマーとハイブリダイズさせること；  
を包含する、方法。

【請求項39】

核酸プログラム型化合物ライブラリーの調製方法であって、該方法は以下の(a)～(e)のステップ：

(a) 請求項16に記載の方法を用いて前記kの数の核酸タグをルートすること；

(b) 該方法における前記mの数の空間的に規定された位置において前記ポリマーから前記核酸タグのそれぞれを溶出すること；

(c) 前記mの数の空間に局在化された核酸タグをxの数の異なる化学サブユニットと反応させること、ここでxは1より大きい整数である；

(d) 前記xの数の異なる化学サブユニットが結合した前記kの数の核酸タグをプールすること；および

(e) 前記ステップa)～d)をy回繰り返すこと、ここでyは1より大きい整数である；

を包含する、方法。

【請求項40】

前記ステップ(b)の後、該ステップ(b)において溶出された前記核酸タグはアニオン交換樹脂によって固定化され、前記ステップ(c)の後に該アニオン交換樹脂から溶出される、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

前記ライブラリーのメンバー数は、約1000メンバーを超える、請求項39に記載の方法。