

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4426092号
(P4426092)

(45) 発行日 平成22年3月3日(2010.3.3)

(24) 登録日 平成21年12月18日(2009.12.18)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	M
C 1 2 M 1/00	(2006.01)	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
GO 1 N 33/566	(2006.01)	GO 1 N 33/566	

請求項の数 27 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2000-513975 (P2000-513975)	(73) 特許権者	506112683
(86) (22) 出願日	平成10年9月25日 (1998.9.25)		サーモディクス、インコーポレイティド
(65) 公表番号	特表2001-518604 (P2001-518604A)		アメリカ合衆国、ミネソタ 55344、
(43) 公表日	平成13年10月16日 (2001.10.16)		エデン プレイリー、ウエスト セブンテ
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/020140		イーフォース ストリート 9924
(87) 国際公開番号	W01999/016907	(74) 代理人	100077517
(87) 国際公開日	平成11年4月8日 (1999.4.8)		弁理士 石田 敬
審査請求日	平成17年9月8日 (2005.9.8)	(74) 代理人	100092624
(31) 優先権主張番号	08/940, 213		弁理士 鶴田 準一
(32) 優先日	平成9年9月30日 (1997.9.30)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 福本 積
		(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】 表層に標的分子を付加するための試薬及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

基体の表層に標的分子を付加するための、親水性ポリマー骨格を有する 1 又は複数の試薬分子を含んでなる試薬組成物であって、当該試薬に標的分子を吸引させるための 1 又は複数のイオン基と、この吸引された標的分子上の対応の官能基と共有結合を形成するための 1 又は複数の熱化学反応性のアミン反応基又はスルフヒドリル反応基とが、前記の 1 又は複数の試薬分子の親水性ポリマー骨格に結合してなる、試薬組成物。

【請求項 2】

前記標的分子が核酸であるとともに、適当なエネルギー源由来のエネルギーの適用により前記試薬組成物を前記表層に付加させるための 1 又は複数の光反応基が、前記の 1 又は複数の試薬分子の親水性ポリマー骨格に結合してなり、前記光反応基が光反応性アリールケトン類である、請求項 1 記載の試薬組成物。

【請求項 3】

基体の表層に標的分子を付加するための、第一試薬と第二試薬とを含んでなる試薬組成物であって、
第一試薬が親水性骨格を有するとともに、1 又は複数のイオン基と、1 又は複数の光反応基とが、前記第一試薬の親水性骨格に結合してなり、
第二試薬が親水性骨格を有するとともに、1 又は複数の熱化学反応性のアミン反応基又はスルフヒドリル基と、1 又は複数の光反応基とが、前記第二試薬の親水性骨格に結合してなる、試薬組成物。

10

20

【請求項 4】

基体の表層に標的分子を付加するための方法であって、

- (a) 請求項 1 記載の試薬組成物を、当該基体の表層に供与する工程；
- (b) 当該標的分子を前記表層に、当該イオン基が前記標的分子を結合した前記試薬組成物に吸引させることを可能にするのに十分に近づくる工程；そして
- (c) 前記熱化学反応性のアミン反応基又はスルフヒドリル反応基を、当該吸引された標的分子と共有結合を形成させるようにする工程を含んで成る方法。

【請求項 5】

適当なエネルギー源に由来するエネルギーの適用により前記試薬組成物を前記表層に付加させるための 1 又は複数の光反応基が、前記の 1 又は複数の試薬分子の親水性ポリマー骨格に結合してなる、請求項 4 記載の方法。

10

【請求項 6】

前記イオン基が第四アンモニウム基を含んで成る、請求項 4 記載の方法。

【請求項 7】

前記標的分子が核酸であり、そして前記光反応基が光反応性アリアルケトン類である、請求項 4 記載の方法。

【請求項 8】

基体の表層に標的分子を付加するための方法であって、

- (a) 請求項 3 記載の試薬組成物を、当該基体の表層に供与する工程；
- (b) 当該標的分子を前記表層に、当該イオン基が前記標的分子を結合した前記試薬組成物に吸引させることを可能にするのに十分に近づくる工程；そして
- (c) 前記熱化学反応性のアミン反応基又はスルフヒドリル反応基を、当該吸引された標的分子と共有結合を形成させるようにする工程を含んで成る方法。

20

【請求項 9】

前記標的分子が核酸である、請求項 4 又は請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記イオン基が第四アンモニウム基及びプロトン化第三アミンから成る群から選ばれる、請求項 4 又は請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記核酸がアミン及びスルフヒドリル基から成る群から選ばれる官能基を含んで成る、請求項 9 記載の方法。

30

【請求項 12】

前記光反応基が光反応アリアルケトン類である、請求項 4 又は請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

前記光反応アリアルケトン類が各々、独立して、アセトフェノン、ベンゾフェノン、アントラキノン、アントロン及びアントロン様複素環から成る群から選ばれる、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

請求項 4 又は請求項 8 に記載の方法により標的分子及び試薬組成物でコーティングされた基体表層。

40

【請求項 15】

前記試薬組成物がそれを適当な起源に由来するエネルギーの適用により前記表層に付加させるための 1 又は複数の光反応基を更に含んで成る、請求項 14 記載の表層。

【請求項 16】

前記標的分子が核酸である、請求項 15 記載の表層。

【請求項 17】

前記イオン基が第四アンモニウム基及びプロトン化第三アミンから成る群から選ばれる、請求項 14 記載の表層。

【請求項 18】

前記核酸がアミン及びスルフヒドリル基から成る群から選ばれる官能基を含んで成る、

50

請求項 1 6 記載の表層。

【請求項 1 9】

前記光反応基が光反応アリアルケトン類から成る群から選ばれる、請求項 1 4 記載の表層。

【請求項 2 0】

前記光反応アリアルケトン類が各々、独立して、アセトフェノン、ベンゾフェノン、アントラキノン、アントロン及びアントロン様複素環から成る群から選ばれる、請求項 1 9 記載の表層。

【請求項 2 1】

請求項 1 又は請求項 3 に記載の試薬組成物がコーティングされてなる表層。

10

【請求項 2 2】

前記試薬組成物がそれを適当な起源に由来するエネルギーの適用により前記表層に付加させるための 1 又は複数の光反応基を更に含んで成る、請求項 2 1 記載の表層。

【請求項 2 3】

前記標的分子が核酸である、請求項 2 2 記載の表層。

【請求項 2 4】

前記イオン基が第四アンモニウム基及びプロトン化第三アミンから成る群から選ばれる、請求項 2 1 記載の表層。

【請求項 2 5】

前記核酸がアミン及びスルフヒドリル基から成る群から選ばれる官能基を含んで成る、請求項 2 3 記載の表層。

20

【請求項 2 6】

前記光反応基が光反応アリアルケトン類から成る群から選ばれる、請求項 2 1 記載の表層。

【請求項 2 7】

前記光反応アリアルケトン類が各々、独立して、アセトフェノン、ベンゾフェノン、アントラキノン、アントロン及びアントロン様複素環から成る群から選ばれる、請求項 2 6 記載の表層。

【発明の詳細な説明】

【0001】

30

技術分野

本発明は標的分子、例えばオリゴヌクレオチド（オリゴ）を表層に付加させるための方法、及びかかる方法において利用するための組成物に関する。別の観点において、本発明は得られるコーティングされた表層自体に関連する。更なる別の観点において、本発明は分子を表層に付加させるための光化学及び熱化学手段の利用に関連する。

【0002】

発明の背景

支持体の表層上へのデオキシリボ核酸（DNA）の固定化はDNAを基礎とするアッセイ系の開発、並びにDNA分析のためのマイクロ集成アレーの開発等のその他の目的において重要な観点となってきた。例えば、「The Development of Microfabricated Arrays of DNA Sequencing and Analysis」O'Donnell-Maloney ら、TIBTECH 14 : 401-407 (1996) を参照のこと。一般に、かかる手順はマイクロウェルプレート、チューブ、ピース、顕微鏡スライド、シリコンウェーハ又は膜の表層上で実施する。特に、一定のアプローチが開発され、合成オリゴの表層への終点付着の可能性を実現又は向上させている。終点付着（即ち、一方又は他方の末端ヌクレオチドを介する核酸配列の付加による）が所望され、なぜなら配列全体が別の核酸配列とのハイブリダイゼーションのために有効となるからである。これはストリンジェントハイブリダイゼーション条件下での一塩基対変化の検出のために極めて有利である。

40

【0003】

ハイブリダイゼーションは固相支持体上に固定化されたプローブに対する塩基対形成によ

50

り核酸を測定するための最も日常的に利用されている方法である。増幅技術、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）又はリガーゼ連鎖反応（LCR）と組み合わせると、ハイブリダイゼーションアッセイは診断及び研究のための強力な手段となる。特にマイクロウェルプレートは比較的大量のサンプルをアッセイするために簡便且つ有用である。核酸プローブをマイクロウェルプレートに固定するためにいくつかの方法が利用されている。そのいくつかは未改質又は改質オリゴのポリスチレンプレートへの吸着を包含する。その他は共有固定化を包含する。様々な方法がハイブリダイゼーションアッセイの感度を高めるためにも利用されている。ポリマー捕獲及び検出プローブが合成され、そして 10^7 DNA分子/mlまでの感度を得るのに利用されている。別の方法はハイブリダイゼーションアッセイの感度を高めるために枝分れオリゴを利用する。更なる別の方法はマルチステップ抗体増強方法を利用する。その他のタイプの核酸プローブ、例えばリボ核酸（RNA）、相補性DNA（cDNA）及びペプチド核酸（PNA）も診断用途におけるPCR産物のハイブリダイゼーションのためにマイクロウェルに固定化されている。更に、PCRプライマーが固相PCRのためにマイクロウェルに固定化されている。

10

【0004】

今日まで、商業的製品に至っているDNAを固定化するアプローチはごくわずかしかない。かかる製品の一つは「NucleoLink（商標）」として知られ、そしてNalge Nunc Internationalから入手できる（例えば、Nunc Tech Note Vol. 3, No. 17 参照のこと）。この製品において、DNAはカルボジイミドと反応させて5'リン酸基を活性化させ、次いでそれを表層上の官能基と反応させている。このアプローチの欠点はそれがカルボジイミドの添加という追加の工程、並びにDNAの固定化のための5時間の反応を要し、そしてそれが単一タイプの基体材料に制約される点にある。

20

【0005】

別の例として、Pierceは最近「Reacti-Bind（商標）DNA Coating Solutions」として知られる適当なDNA固定化製品を紹介している（「Instructions-Reacti-Bind™ DNA Coating Solution」1/1997参照のこと）。この製品はDNAと混合し、そしてポリスチレン又はポリプロピレンの如き表層を適用するものである。一夜のインキュベーション後、溶液を除去し、表層をバッファーで洗い、そして乾かし、しかる後それはハイブリダイゼーションの用意が整う。この製品の説明書はそれが研究室において利用される全ての一般的なプラスチック表層に有用であると記載されてはいるものの、実際にはいくつかの制約がある。例えば、出願人はその製造者の仕様書を利用してポリプロピレンにDNAを固定化するのに有用であることを実証できなかった。更に、この製品は大量のDNAを必要とする。この仕様書はDNAが $0.5 \sim 5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で使用すべきことを示唆している。

30

【0006】

同様に、Costarはマイクロウェルプレート内のウェルの表層にDNAを付加するために利用する「DNA-BIND（商標）」という名の製品を販売している（例えば、DNA-BIND™「Application Guide」を参照のこと）。DNA-BIND（商標）プレートの表層にはN-オキシスクシニミド（NOS）反応基を含む無電荷の非ポリマー性低分子量ヘテロ二価試薬がコーティングされている。この基は求核基、例えば第一アミンと反応する。このヘテロ二価コーティング試薬は更にこの反応基をポリスチレンプレートの表層に共有結合させる光化学基及びスパーサーアームを含む。その後、アミン改質DNAがNOS表層に共有カップリングされうる。このDNAは第一アミンを合成プロセスの際に新生オリゴマーに付加することにより又は予備成形した配列に酵素的に付加させることにより改質されている。DNA-BIND（商標）製品はポリスチレン系であるため、熱サイクルの如き高温を要する用途への利用は制約される。

40

【0007】

このような様々な製品はいくつかの目的又は所定の環境のもとで有用でありうるが、全て1又は複数の欠点及び制約に悩まれる傾向にある。特に、それらは不適切に高いバックグラウンドノイズの原因となる大量のオリゴを要する傾向にあり、及び/又は多様性を欠く。

50

【0008】

オリゴの如き分子を表層に、このような従来のアプローチの欠点の一部又は全てを回避しながら付加させることができることが極めて所望されるであろう。

【0009】

発明の概要

本発明は基体、例えばマイクロウェルプレート、チューブ、ビーズ、顕微鏡スライド、シリコンウェーハ又は膜に標的分子を共有付加するための方法及び試薬組成物を提供する。好適な態様において、この方法及び組成物は核酸プローブをプラスチック材料、例えばハイブリダイゼーションアッセイに利用するためのマイクロウェルプレート等に固定化するために利用する。例えば、マイクロウェルプレートは様々な材料、例えば限定することなく、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルクロリド及びポリプロピレンから製造でき、そして本発明の試薬でコーティングされる。この試薬組成物はかくして核酸を吸引及び共有付加の双方のために利用でき、これにより核酸はその相補鎖とハイブリダイゼーションするのに利用できるようになる。

10

【0010】

本発明の試薬組成物は熱化学反応基（即ち、温度依存性の反応速度を有する基）及び吸引基を含む。任意的、且つ好適には、この組成物は更に光反応基も含みうる。更に、この試薬は1又は複数の親水性ポリマーを含んで成ってよく、それに熱化学反応性、吸引力及び/又は光反応性の基が懸垂している。この光反応基（又の名を「光学基」）は、例えば光の如き適当なエネルギー源の適用により試薬分子を支持体の表層に付加するのに利用できる。かくして、熱化学反応基は標的分子上の適当且つ相補的な官能基との共有結合を形成するのに利用できる。一般に、この試薬分子をまず光学基の活性化を介して表層に付加させ、しかる後に標的分子（例えばオリゴ）を結合試薬に対し、結合試薬上の吸引（例えばイオン）基と標的分子上の対立に帯電した基との間でイオンの相互作用をほとんど頼りにして吸引させる。結合試薬、換言すれば表層に一旦吸引すると、この標的分子は結合試薬の反応基と標的分子上の適当な官能基との反応により結合試薬に熱化学的にカップリングされうる。この熱化学反応基及びイオン基は同一のポリマー上にあるか、又は表層と一緒に固定化されている別々のポリマー上にあつてよい。

20

【0011】

理論に拘束されるつもりはないが、イオン基、例えば陽イオン基、例えば第四アンモニウム基又はプロトン化（即ち、酸性化）第三アミンの存在は、静電力及びその他の力を介して表層に核酸配列を吸引させるのを担うようである。この吸引は、かくして、核酸配列上の対応の反応基と効率的にカップリングするその反応基の能力を増強させる。任意的、且つ好適には、この標的分子は当該試薬分子の反応基で調製されているか、又はその反応基となる官能基が施されている。例えば、合成の際、オリゴはアミン及びスルフヒドリル基の如き官能基で調製できる。

30

【0012】

本発明は更に標的分子、例えばオリゴを表層に本明細書に記載の試薬を利用して付加する方法を提供する。かくして、本発明はかかる試薬を介して付加された核酸を有する表層、並びにかかる表層を提供する材料（例えばマイクロウェルプレート）を提供する。

40

【0013】

別の観点において、本発明は本発明の試薬と、この試薬の熱化学反応基と反応性の1又は複数の官能基を含む標的分子との組合せを含んで成る組成物を提供する。

【0014】

例えば、特に好適な試薬の例は本明細書の中で「フォトポリQuat」として記載されているものであり、それにおいては複数個の光学基及び複数個の陽イオン基（第四アンモニウム基の形態）が親水性ポリマー骨格に付加されている。かかる試薬は光学ポリNOSに、標的分子の固定化のための最適な濃度及び比と一緒に固定化されることにより、著しい多様性を供する。

【0015】

50

かかる試薬を利用して、出願人は捕獲プローブを様々な表層、例えば本来はプローブを吸着しないであろう表層（例えばポリプロピレン及びポリビニルクロリド）等に共有固定化することができる。得られる表層はポリスチレン又はポリカーボネート上に吸着される改質オリゴで得られるものと同様又はそれより優れたシグナルを供する。

【0016】

当該固定化試薬及び方法は従来報告されているものよりも簡単な態様で増幅方法に利用でき、そして求核試薬誘導化核酸の共有固定化のための改良された表層も提供できる。増幅方法及びハイブリダイゼーションアッセイのための固定化プローブの他に、本発明の試薬はPCR及びその他の固相配列決定のため及び増幅技術のための固定化プライマーのための改良された核酸固定化を提供できうる。

10

【0017】

詳細な説明

本発明の好適な試薬組成物は対応の標的分子を吸引する能力を有する1又は複数のイオン基を、表層に当該試薬を付加するのに有用な1又は複数の光反応基及び当該標的分子の対応の反応基と共有結合を形成するのに有用な1又は複数の熱化学反応基と共に抱える親水性骨格を含んで成る。任意的、且つ好適には、この組成物は2種類以上の試薬分子の利用を含むことができ、その第一の試薬分子は対応の標的分子を吸引する能力を有する1又は複数のイオン基を、表層に当該試薬を吸引するのに有用な1又は複数の光反応基と共に抱える親水性骨格を含んで成る。第二の試薬分子は前記標的分子の対応の官能基と共有結合を形成するのに有用な1又は複数の熱化学反応基を、表層に当該試薬を吸引するのに有用な1又は複数の光反応基と共に抱える親水性骨格を含んで成る。任意的に、当該試薬分子の一方が光反応基を有するだけでよく、なぜならこの試薬は光化学架橋を通じて第二ポリマーと一緒に固定化できるからである。しかしながら、このような場合、この試薬分子は表層及び第二ポリマーへのカップリングを供するために2以上の光反応基を有さなくてはならない。

20

【0018】

本発明の更なる外延において、イオン基及び熱化学反応基の双方が親水性ポリマーの一部として組込まれている必要はない。例えば、適当なスペーサーにより分離された1又は複数の光反応基と1又は複数の熱化学反応基を有する小型のヘテロ二価分子をイオン基を有する光反応親水性ポリマーと一緒に核酸配列の固定化を成し遂げるために利用してよい。反対に、適当なスペーサーにより分離された1又は複数の光反応基と1又は複数のイオン基とを有するヘテロ二価分子を熱化学反応基を有する光反応親水性ポリマーと一緒に利用してよい。好適ではあるが、親水性ポリマー骨格の利用は任意的にすぎず、なぜならイオン基及び熱化学反応基は共に2つの独立した光反応ヘテロ二価分子として又は双方のタイプの基を抱える単独の光反応分子として組込むことができるからである。

30

【0019】

本発明の別の態様において、光反応基を利用することなく核酸配列を固定化することが可能である。例えば、コーティングを施すべき材料の表層に、前述の通りイオン及び熱化学反応基を有する親水性ポリマーを固定化するのに利用できうる熱化学反応基を施してよい。例えば、表層をアンモニアプラズマで処理して所定の数の反応性アミンを材料の表層に導入することができる。この表層を次に第四アンモニウム基及びNOS基の双方を有する親水性ポリマーで処理するならば、このポリマーはそのNOS基と表層上のアミンとの反応を通じて固定化できる。好ましくは、このポリマー上のNOS基は、十分な数の熱化学反応基が固定化の後に残り、核酸配列のカップリングを可能にすることを確実にするよう、表層上のアミンに対して過剰量とする。

40

【0020】

当業者は、本説明により、注目の標的分子のタイプに依存して適当なイオン基を特定及び選定できるであろう。標的分子には、限定することなく、プラスミドDNA、コスミドDNA、バクテリオファージDNA、ゲノムDNA（限定することなく、酵母、ウイルス、細菌、哺乳動物、昆虫等）、RNA、cDNA、PNA及びオリゴが挙げられる。

50

【0021】

適当なイオン基には第四アンモニウム塩、プロトン化第三アミン及びその他の陽イオン基、例えばホスホニウム化合物が挙げられる。更に含まれるのは、酸性環境に置かれたときにプロトン化されることのできる第三アミン基である。第四アンモニウム塩にはアルキル第四アンモニウム化合物、例えば[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クロリド(MAPTAC)、並びに第四アンモニウム群、例えばピリジニウム化合物が挙げられる。ホスホニウム化合物にはトリブチル(4-ビニルベンジル)ホスホニウムクロリドの如きモノマーから調製され、そしてJ. Appl. Polymer Sci. 53, 1237 (1994)(その開示内容は引用することで本明細書に組入れる)に記載のポリマーが挙げられる。

10

【0022】

ポリマー骨格は合成又は天然であってよく、そして好ましくはオリゴマー、ホモポリマー及び付加又は縮合重合から得られるコポリマーから成る群から選ばれる合成ポリマーである。天然ポリマー、例えば多糖類、ポリペプチドも同様に利用できる。好適な骨格は、それが記載の態様での利用に適合しない、又は有害な生物学的機能を供与しない点で生物学的に不活性なものとする。

【0023】

かかるポリマー骨格にはアクリル、例えばヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシエチルメタクリレート、グリセリルアクリレート、グリセリルメタクリレート、アクリルアミド及びメタクリルアミドから重合されたもの、ビニル、例えばポリビニルピロリドン及びポリビニルアルコール、ナイロン、例えばポリカプロラクタム、ポリラウリルラクタム、ポリヘキサメチレンアジパミド及びポリヘキサメチレンドデカンジアミド、ポリウレタン及びポリエチレンオキシドが挙げられうる。

20

【0024】

本発明のポリマー骨格は所望の数及びタイプのイオン基、光学基及び熱化学反応基を抱えることのできる親水性骨格を供与するよう選定され、その組合せは選定の試薬に依存する。このポリマー骨格は表層と、様々なイオン基及び熱化学反応基との間のスペーサーを供与するよう選定する。このようにして、この試薬は最適活性を発揮する十分な運動自由度を有するその他の基を供与するよう、表層又は隣りの試薬分子に結合させることができる。このポリマー骨格は好ましくは親水性(例えば水溶性)であり、ポリアクリルアミド及びポリビニルピロリドンが特に好適なポリマーである。

30

【0025】

本発明の試薬は当該ポリマー骨格に共有結合した1又は複数の懸垂潜伏反応(好ましくは光反応)基を担持する。光反応基は本明細書において規定されたものであり、そして好適な基はその特性を保持する条件下で保存されるときに十分に安定なものである。例えば、引用することで本明細書に組入れる米国特許第5,002,582号を参照のこと。潜伏反応基は電磁スペクトルの様々な領域に応答性であるように選定でき、紫外光及びスペクトルの可視領域に対して応答性(ここでは、「光反応性」と称する)であることが特に好ましい。

【0026】

光反応基は特定の外部刺激に反応して活性種構築に入り、例えば同一又は別々の分子により供与される隣接化学構造への共有結合をもたらす。光反応基は保存条件下ではその共有結合をそのまま保持するか、外部エネルギー源による活性化により、他の分子と共有結合を形成する分子内の原子の基である。

40

【0027】

光反応基は活性種、例えばフリーラジカル、そして特にニトレン、カルベン及び励起状態のケトン電磁エネルギーの吸収により構築する。光反応基は電磁スペクトルの様々な領域に対して応答性となるよう選定し、そして例えば紫外光及びスペクトルの可視領域に対して応答性である光反応基が好ましく、そして本明細書において時々「光化学基」又は「光学基」と呼ぶことがある。

50

【 0 0 2 8 】

光反応アリールケトン類、例えばアセトフェノン、ベンゾフェノン、アントラキノン、アントロン及びアントロン様複素環（即ち、10位においてN、O又はSを有するようなアントロンの複素環類似体）又はその置換化（例えば、環置換化）誘導体が好ましい。かかるケトン類の官能基が好ましく、なぜならそれらは本明細書に記載の活性化/不活性化/再活性化サイクルに容易に入ることができるからである。ベンゾフェノンが特に好適な光反応成分であり、なぜならそれは三重項状態へのシステム間移行に入る励起単項状態の一次形成により光化学励起が可能だからである。励起三重項状態は水素原子の引き抜き（例えば支持体表層から）により炭素・水素結合に侵入でき、かくしてラジカルペアが構築される。ラジカルペアのその後の崩壊は新しい炭素-炭素結合の形成を招く。反応基（例えば炭素-水素）が結合のために有効でないなら、ベンゾフェノン基の紫外光誘導励起は可逆式となり、そしてその分子はエネルギー源の除去により基底状態のエネルギーレベルにまでもどる。光学活性化性アリールケトン類、例えばベンゾフェノン及びアセトフェノンが特に重要であり、なぜならこれらの基は水中で多重の再活性化に委ねられ、それ故コーティング効率の増大を供するからである。従って、光反応アリールケトン類が特に好ましい。

10

【 0 0 2 9 】

アジドは光反応基の好適なクラスを構成し、そしてアリールアジド（ $C_6R_5N_3$ ）、例えばフェニルアジド、そして特に4-フルオロ-3-ニトロフェニルアジド、アシルアジド（ $-CO-N_3$ ）、例えばベンゾイルアジド及びp-メチルベンゾイルアジド、アジドホルメート（ $-O-CO-N_3$ ）、例えばエチルアジドホルメート、フェニルアジドホルメート、スルホニルアジド（ $-SO_2-N_3$ ）、例えばベンゼンスルホニルアジド及びホスホリルアジド（ $RO)_2PON_3$ ）、例えばジフェニルホスホリルアジド及びジエチルホスホリルアジドが挙げられる。ジアゾ化合物は別のクラスの光反応基を構成し、そしてジアゾアルカン（ $-CHN_2$ ）、例えばジアゾメタン及びジフェニルジアゾメタン、ジアゾケトン（ $-CO-CHN_2$ ）、例えばジアゾアセトフェノン及び1-トリフルオロメチル-1-ジアゾ-2-ペンタノン、ジアゾアセテート（ $-O-CO-CHNH_2$ ）、例えばt-ブチルジアゾアセテート及びフェニルジアゾアセテート、及びベーターケト-アルファ-ジアゾアセテート（ $-CO-CN_2-CO-O-$ ）、例えばt-ブチルアルファ-ジアゾアセテートが挙げられる。その他の光反応基にはジアジリン（ $-CHN_2$ ）、例えば3-トリフルオロメチル-3-フェニルジアジリン、及びケテン（ $-CH=C=O$ ）、例えばケテン及びジフェニルケテンが挙げられる。光学活性化性アリールケトン類、例えばベンゾフェノン及びアセトフェノンが特に重要であり、なぜならこれらの基は水中で多重の再活性化に委ねられ、それ故コーティング効率の増大を供するからである。

20

30

【 0 0 3 0 】

光反応基の活性化により、この試薬分子は光反応基の残基を介する共有結合により互いと及び/又は材料表層と共有結合する。典型的な光反応基及び活性化によるその残基を以下に示す。

【 0 0 3 1 】

光反応性	基	残基官能
アリーリアジド	アミン	$R-NH-R'$
アシルアジド	アミド	$R-CO-NH-R'$
アジドホルメート	カルバメート	$R-O-CO-NH-R'$
スルホニルアジド	スルホンアミド	$R-SO_2-NH-R'$
ホスホリルアジド	ホスホラミド	$(RO)_2PO-NH-R'$
ジアゾアルカン	新しいC-C結合	
ジアゾケトン	新しいC-C結合及び ケトン	
ジアゾアセテート	新しいC-C結合及び エステル	
ペーターケト-アルファ -ジアゾアセテート	新しいC-C結合及び エステル	
脂肪族アゾ	新しいC-C結合	
ジアジリン	新しいC-C結合	
ケテン	新しいC-C結合	
光活性化ケトン	新しいC-C結合及び アルコール	

10

【0032】

当業者は、本説明により、適切に誘導化された核酸配列の共有固定化を供するよう適当な熱化学反応基を特定及び選定できるであろう。例えば、アミノ誘導化核酸配列は活性化エステル、例えばNOSエステルとの共有カップリング反応を経てアミド連結基を供するであろう。類似の活性化エステル、例えばp-ニトロフェニル及びペンタフルオロフェニルエステルもアミン基と反応したときにアミド結合を供するであろう。当業者は多種多様なその他のアミン反応性官能基、例えばイソシアネート、チオイソシアネート、カルボン酸クロリド、エポキシド、アルデヒド、アルキルハライド及びスルホネートエステル、例えばメシレート、トシレート及びトレシレートの各々も熱化学反応基として働きうることを認識している。

20

【0033】

別の例において、この核酸配列は当業界周知の技術を利用してスルフヒドリル基で誘導化されうる。対応の熱化学反応基は、例えば、マレイミド環構造体又はγ-ヨードアセトアミドであろう。これらの構造体はいずれもスルフヒドリル誘導化核酸配列と共有結合を供するよう容易に反応するであろう。

30

【0034】

本発明の官能化ポリマーは予備形成ポリマーの適当な誘導化により、又はより好ましくは、所望の置換パターンを供するよう一組のコモノマーの重合により調製できうる。この後者のアプローチが好ましく、その理由は様々なコモノマーの比の変更の容易性及びポリマーへの組込みレベルの管理能力にある。これら2通りのアプローチの組合せも最適な構造体の提供に利用されうる。

40

【0035】

好適な態様において、例えば、分子の一端において、他端にある光反応基又は熱化学反応基とはスペーサー基により隔離された重合性基を有するモノマーを調製する。例えば、重合性ビニル基、例えばアクリルアミド、アクリレート、又はマレイミドは短い炭化水素エステルを介して活性化エステル、例えばNOSエステルに、又は光反応基、例えば置換化ベンゾフェノンにカップリングされうる。これらの化合物は当業者に周知の有機合成技術を利用して調製且つ精製されうる。所望のモノマーのいくつか、例えばMAPTAC、N-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]メタクリルアミド(DMAPMA)及びN-(3-アミノプロピル)メタクリルアミド塩酸塩(APMA)は市販されており、そしてこのような化合物はポリマーの骨格と一緒に第四アンモニウム塩、第三アミン及び第一アミンを供する。

50

【0036】

コポリマーも当業者に公知の技術を利用して上記のモノマーから調製できる。好ましくは、これらのモノマー及びコポリマーはアゾ開始剤、例えば2,2'-アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)又はペルオキシド、例えばベンゾイルペルオキシドを利用してビニル基のフリーラジカル重合に入る。重合のために選定されるモノマーは最終ポリマー生成物の種類に基づいて選ばれる。例えば、第四アンモニウム基を含む光反応性ポリマーは光反応基を含むモノマーと第四アンモニウム基を含む第二モノマーとから調製する。NOS基を含む光反応性ポリマーは光反応基を含むモノマーと活性化NOSエステルを含む第二モノマーとから調製する。第四アンモニウム基及びNOSエステルの双方を含む光反応性ポリマーは3種類のモノマー全てを利用して調製する。

10

【0037】

最終ポリマーの組成は重合反応に添加するモノマーのモル比により調節できる。典型的には、このような官能化モノマーは重合反応の総モノマー含有量のうちの比較的低いモル%において利用され、この組成の残りは核酸配列に対して光反応でも熱化学反応性でもないモノマーから成る。かかるモノマーの例には、限定することなく、アクリルアミド及びN-ビニルピロリドンが挙げられる。利用するモノマーの相対的な反応性に基づき、骨格伝いのモノマーの分布はかなりランダムである。

【0038】

時折り、このポリマーの骨格上の熱化学反応基は重合の間に存在しているならそれ自体が重合性モノマーとして働くことがあり、かくしてポリマーの一次形成の後の第二工程においてその基の導入が必要となる。例えば、骨格伝いにマレイミドを有する光反応性ポリマーの調製は、上記の技術を利用しての光反応基及びアミン基の双方を含むポリマーの一次調製、しかる後のアミン基と短い炭化水素スペーサーにより接続されたマレイミド基及びイソシアネートを含むヘテロ二価分子との反応により成し遂げることができる。多種多様なかかるポリマー修飾技術が当業者に公知の典型的な有機反応を利用して有用である。

20

【0039】

本発明を以下の非限定例で更に詳しく説明する。当業者は本発明の範囲を逸脱することなくそれらの態様に様々な変更を施すことができることを承知しており、また本発明は開示の態様に限定されるものでもない。何らかのことわりのない限り、%は全て重量%で表示する。この実施例を通じて特定されている様々な「化合物」の構造は以降の表9に示してある。

30

【0040】

実施例

実施例1

4-ベンゾイルベンゾイルクロリド(BBA-C1)の調製(化合物I)

4-ベンゾイル安息香酸(BBA)、1.0kg(4.42mole)を還流コンデンサー及びオーバーヘッドスターラーの付いた乾燥した5リットルMortonフラスコに加え、次いで645ml(8.84mole)の塩化チオニル及び725mlのトルエンを加えた。次にジメチルホルムアミド3.5mlを加え、そしてこの混合物を4時間還流加熱した。冷却後、その溶媒を減圧で除去し、そして残留塩化チオニルは3×500mlのトルエンを利用する3回のエバポレーションにより除去した。この生成物を1:4のトルエン:ヘキサンから再結晶化し、真空オープンで乾燥後988g(収率91%)が得られた。生成物の融点は92-94であった。80MHz(¹H NMR(CDC1₃))での核磁気共鳴(NMR)分析は所望の生成物と一致した:芳香族プロトン7.20-8.25(m, 9H)。テトラメチルシラン内部標準の下流の化学シフト値は全てppmで表示する。最終化合物を、例えば実施例3記載の光活性化性ポリマーの合成において利用するモノマーの調製に利用するために保存した。

40

【0041】

実施例2

N-(3-アミノプロピル)メタクリルアミド塩酸塩(APMA)の調製(化合物II)

50

1000mlの CH_2Cl_2 中の1,3-ジアミノプロパン1910g(25.77mole)の溶液を12リットルのMortonフラスコに加え、そして氷浴上で冷却した。250mlの CH_2Cl_2 中のt-ブチルフェニルカルボネート1000g(5.15mole)の溶液を反応温度が15 未満に保たれる速度で滴下した。添加の後、この混合物を室温にまで温め、そして2時間攪拌した。この反応混合物を900mlの CH_2Cl_2 及び500gの氷で希釈し、次いで2500mlの2.2NのNaOHをゆっくりと添加した。この溶液が塩基性であることを確認する検査の後、この生成物を分液ろう斗に移し、そして有機層を除去し、そして抽出物#1としてとっておいた。次いで水性相を3×1250mlの CH_2Cl_2 で抽出し、各抽出物は別々の画分に保っておいた。4つの有機抽出物を画分#1から画分#4の順番で1250mlの0.6NのNaOHで1回ずつ洗った。2回目のこの洗淨工程を新しい1250mlの0.6NのNaOHで繰り返した。その有機抽出物を合わせ、そして Na_2SO_4 で乾かした。一定重量に至るまでの溶媒の濾過及びエバポレーションは825gのN-モノ-t-BOC-1,3-ジアミノプロパンを供し、それは更に精製することなく使用した。

【0042】

1020mlの CHCl_3 中の806g(5.23mole)の無水メタクリル酸の溶液をオーバーヘッドスターラーの付いた12リットルのMortonフラスコに入れ、そして氷浴上で冷却した。フェノチアジン60mgをインヒビターとして加え、次いで825mlの CHCl_3 中のN-モノ-t-BOC-1,3-ジアミノプロパン825g(4.73mole)を添加した。添加速度は反応温度を毎回10 未満に保つようにコントロールした。添加が完了した後、氷浴を取外し、そしてその混合物を一夜攪拌しておいた。この生成物を2400mlの水で希釈し、そして分液ろう斗に移した。よく混合した後、水性層を除去し、そして有機層を2400mlの2NのNaOHで洗い、水性層が塩基性であることを確実にした。その有機層を Na_2SO_4 で乾かし、そして濾過して乾燥剤を除去した。 CHCl_3 溶媒部を減圧で、生成物と溶媒の合計重量が約3000gとなるまで除去した。次に所望の生成物を11.0リットルのヘキサンを攪拌 CHCl_3 溶液にゆっくり添加することにより沈殿させ、次いで4 で一夜保存した。この生成物を濾過により単離し、そしてその固体を900mlのヘキサンと150mlの CHCl_3 との組合せ溶媒により2回すすいだ。この固体の十分な乾燥はDSCによりm.p. 85.8 の900gのN-[N-(t-ブチルオキシカルボニル)-3-アミノプロピル]-メタクリルアミドを供した。NMRスペクトルメーターでの分析は所望の生成物と一致した： ^1H NMR(CDCl_3)アミドNH 6.30-6.80、4.55-5.10(m, 2H)、ビニルプロトン5.65、5.20(m, 2H)、Nに隣接のメチレン2.90-3.45(m, 4H)、メチル1.95(m, 3H)、残りのメチレン1.50-1.90(m, 2H)及びt-ブチル1.40(s, 9H)。

【0043】

三つ口の2リットルの丸底フラスコにオーバーヘッドスターラー及びガススパージチューブを付けた。メタノール700mlをこのフラスコに加え、そして氷浴上で冷却した。攪拌しながら、HClガスをこの溶媒に約5リットル/分の速度で全部で40分吹込んだ。最終HCl/MeOH溶液のモル濃度は、インジケーターとしてフェノールフタレインを利用する1NのNaOHによる滴定により8.5Mと決定された。N-[N-(t-ブチルオキシカルボニル)-3-アミノプロピル]メタクリルアミド900g(3.71mole)をオーバーヘッドスターラー及びガス出口アダプターの付いた5リットルのMortonフラスコに加え、次いで1150mlのメタノール溶媒を添加した。フラスコ内に残っている多少の固体はこの溶媒の容積を有する。フェノチアジン30mgをインヒビターとして加え、次いで655ml(5.57mole)の8.5MのHCl/MeOH溶液を加えた。この固体をガスを発生させながら、しかし反応が発熱しないようにしてゆっくりと溶解させた。この混合物を室温で一夜攪拌し、反応の完了を確実にした。固体を全て濾過により除き、そして更に30mgのフェノチアジンを添加した。この溶媒を減圧で除去し、そして得られる固体残渣を3×1000mlのイソプロパノールと減圧でエバポレーションしながら

10

20

30

40

50

共沸させた。最後に、この生成物を2000mlの還流イソプロパノールに溶かし、そして4000mlの酢酸エチルを攪拌しながらゆっくりと添加した。この混合物をゆっくりと冷却し、そして4で一夜保存した。化合物IIを濾過により単離し、そして一定の重量となるまで乾かし、DSCにより124.7の融点を有する生成物を収量630gで供した。NMRスペクトルメーターでの分析は所望の生成物と一致した：¹H NMR(D₂O) ビニルプロトン5.60、5.30(m, 2H)、アミドのNに隣接するメチレン3.30(t, 2H)、アミンのNに隣接するメチレン2.95(t, 2H)、メチル1.90(m, 3H)及び残りのメチレン1.65-2.10(m, 2H)。最終化合物を例えば実施例3に記載の光活性化性ポリマーの合成に利用するモノマーの調製において利用するために保存した。

10

【0044】

実施例3

N-[3-(4-ベンゾイルベンズアミド)プロピル]メチルアクリルアミド(BBA-APMA)の調製(化合物III)

実施例2に記載の一般方法に従って調製した化合物II 120g(0.672mole)をオーバーヘッドスターラーの付いた乾燥した2リットルの三口丸底フラスコに加えた。フェノチアジン23~25mgをインヒビターとして加え、次いで800mlのクロロホルムを加えた。この懸濁物を氷浴上で10未満に冷却し、そして実施例1に記載の一般方法に従って調製した化合物I 172.5g(0.705mole)を固体として加えた。50mlのクロロホルム中のトリエチルアミン207ml(1.485mole)を次に1~1.5時間かけて滴下した。氷浴を取外し、そして周囲温度での攪拌を2.5時間続けた。次いでこの生成物を600mlの0.3NのHCl及び2×300mlの0.07NのHClで洗った。硫酸ナトリウムで乾燥後、クロロホルムを減圧で除去し、そしてその生成物を4:1のトルエン:クロロホルムから2回再結晶化させ、各再結晶化においては重合を防ぐために23~25gのフェノチアジンを使用した。化合物IIIの典型的な収率は90%であり、融点は147-151であった。NMRスペクトルメーターでの分析は所望の生成物を一致した：¹H NMR(CDCl₃) 芳香族プロトン7.20-7.95(m, 9H)、アミドNH 6.55(ブロードt, 1H)、ビニルプロトン5.65、5.25(m, 2H)、アミドのNに隣接するメチレン3.20-3.60(m, 4H)、メチル1.95(s, 3H)、及び残りのメチレン1.50-2.00(m, 2H)。最終化合物を例えば実施例9~11に記載の光活性化性ポリマーの合成に利用するために保存した。

20

30

【0045】

実施例4

N-スクシニミジル6-マレイミドヘキサノエート(MAL-EAC-NOC)の調製(化合物IV)

官能化モノマーを下記の通りにして調製し、そしてポリマーの骨格上に活性化エステル基を導入するために実施例9及び12に記載の通りにして利用した。6-アミノヘキサン酸100.0g(0.762mole)をオーバーヘッドスターラー及び乾燥チューブの付いた三口3リットルフラスコ内の300mlの酢酸に溶かした。無水マレイン酸78.5g(0.801mole)を200mlの酢酸に溶かし、そして6-アミノヘキサン酸溶液に加えた。この混合物を沸騰湯浴上で加熱しながら1時間攪拌し、白色固体の形成が得られた。室温で一夜冷却後、固体を濾過により集め、そして2×50mlのヘキサンですすいだ。乾燥後、(Z)-4-オキソ-5-アザ-2-ウンデセンジオン酸の典型的な収量は158-165g(90-95%)であり、融点は160-165であった。NMRスペクトルメーターでの分析は所望の生成物と一致した：¹H NMR(DMSO-d₆) アミドプロトン8.65-9.05(m, 1H)、ビニルプロトン6.10、6.30(d, 2H)、窒素に隣接するメチレン2.85-3.25(m, 2H)、カルボニルに隣接するメチレン2.15(t, 2H)、残りのメチレン1.00-1.75(m, 6H)。

40

【0046】

(Z)-4-オキソ-5-アザ-2-ウンデセンジオン酸150.0g(0.654mole

50

)、無水酢酸 6.8 ml (73.5 g、0.721 mole) 及びフェノチアジン 500 mg をオーパーヘッドスターラーの付いた 2 リットルの三口丸底フラスコに加えた。トリエチルアミン 9.1 ml (0.653 mole) 及び 600 ml の THF を加え、そしてこの混合物を攪拌しながら還流加熱した。全部で 4 時間の還流の後、暗色の混合物を < 60 に冷却し、そして 3 リットルの水中の 250 ml の 1.2 N の HCl の溶液に注ぎ入れた。この混合物を室温で 3 時間攪拌し、次いで濾過パッド (Celite 545, J.T. Baker, Jackson, TN) に通して濾過して固体を除去した。この濾液を 4 × 500 ml のクロロホルムで抽出し、そして合わせた抽出物を硫酸ナトリウムで乾かした。重合を防ぐために 15 mg のフェノチアジンを添加した後、その溶媒を減圧で除去した。6 - マレイミドヘキサン酸を 2 : 1 のヘキサン : クロロホルムから再結晶化させ、76 - 83 g (55 - 60%) の典型的な収量を供し、融点は 81 - 85 であった。NMR スペクトルメーターでの分析は所望の生成物と一致した：¹H NMR (CDCl₃) マレイミドプロトン 6.55 (s, 2H)、窒素に隣接するメチレン 3.40 (t, 2H)、カルボニルに隣接するメチレン 2.30 (t, 2H)、及び残りのメチレン 1.05 - 1.85 (m, 6H)。

10

【0047】

6 - マレイミドヘキサン酸 20.0 g (94.7 mmol) をアルゴン雰囲気下で 100 ml のクロロホルムに溶かし、次いで 4.1 ml (0.47 mole) の塩化オキサリルを加えた。室温で 2 時間攪拌後、溶媒を減圧で除去し、ここで最後の過剰量の塩化オキサリルを除くために 4 × 25 ml の追加のクロロホルムを使用した。この酸クロリドを 100 ml のクロロホルムに溶かし、次いで 12.0 g (0.104 mol) の N - ヒドロキシスクシニミド及び 16.0 ml (0.114 mol) のトリエチルアミンを加えた。室温で一夜攪拌後、その生成物を 4 × 100 ml の水で洗い、そして硫酸ナトリウムで乾かした。溶媒の除去は 24.0 g の生成物 (82%) を供し、それを更に精製することなく使用した。NMR スペクトルメーターでの分析は所望の生成物と一致した：¹H NMR (CDCl₃) マレイミドプロトン 6.60 (s, 2H)、窒素に隣接するメチレン 3.45 (t, 2H)、スクシニミジルプロトン 2.80 (s, 4H)、カルボニルに隣接するメチレン 2.55 (t, 2H)、及び残りのメチレン 1.15 - 2.00 (m, 6H)。最終化合物を例えば実施例 9 及び 12 に記載の通りにして光活性化性ポリマーの合成に使用するために保存した。

20

【0048】

実施例 5

N - スクシニミジル 6 - メタクリルアミドヘキサノエート (MA - EAC - NOS) の調製 (化合物 V)

官能化モノマーを下記のようにして調製し、そしてポリマーの骨格上に活性化エステル基を導入するために実施例 11 に記載の通りを利用して利用した。6 - アミノカプロン酸 4.00 g (30.5 mmol) を乾燥チューブの付いた乾燥丸底フラスコに入れた。無水メタクリル酸 5.16 g (33.5 mmol) を加え、そしてこの混合物を室温で 4 時間攪拌した。得られる粘性の油をヘキサンで 3 回砕き、そして残りの油をクロロホルムに溶かし、次いで硫酸ナトリウムで乾かした。濾過及びエバポレーションの後、生成物の一部をシリカゲルフラッシュクラマトグラフィーにより、クロロホルム中の 10% のメタノールの溶媒系を用いて精製した。適当な画分を合わせ、1 mg のフェノチアジンを加え、そして溶媒を減圧で除去した。NMR スペクトルメーターでの分析は所望の生成物と一致した：¹H NMR (CDCl₃) カルボン酸プロトン 7.80 - 8.20 (b, 1H)、アミドプロトン 5.80 - 6.25 (b, 1H)、ビニルプロトン 5.20 及び 5.50 (m, 2H)、窒素に隣接するメチレン 3.00 - 3.45 (m, 2H)、カルボニルに隣接するメチレン 2.30 (t, 2H)、メチル基 1.95 (m, 3H) 及び残りのメチレン 1.10 - 1.90 (m, 6H)。

40

【0049】

6 - メタクリルアミドヘキサン酸 3.03 g (15.2 mmol) を 30 ml のドライクロロホルムに溶かし、次いで 1.92 g (16.7 mmol) の N - ヒドロキシスクシニミド及び 6.26 g (30.4 mmol) の 1,3 - ジシクロヘキシルカルボジイミドを加えた。反応体

50

をドライ雰囲気下で室温で一夜攪拌した。次いで固体を濾過により除去し、そして一部をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。非極性不純物をクロロホルム溶媒を利用して除去し、次いでクロロホルム中の10%のテトラヒドロフランを利用して所望の生成物を溶出させた。適当な画分をプールし、0.2mgのフェノチアジンを加え、そして溶媒を減圧下でエバポレーションした。不純物として少量の1,3-ジシクロヘキシル尿素を含むこの生成物を更に精製することなく使用した。NMRスペクトルメーターでの分析は所望の生成物と一致した：¹H NMR (CDCl₃) アミドプロトン 5.60 - 6.10 (b, 1H)、ビニルプロトン 5.20 及び 5.50 (m, 2H)、窒素に隣接するメチレン 3.05 - 3.40 (m, 2H)、スクシニミジルプロトン 2.80 (s, 4H)、カルボニルに隣接するメチレン 2.55 (t, 2H)、メチル 1.90 (m, 3H)、及び残りのメチレン 1.10 - 1.90 (m, 6H)。最終化合物を例えば実施例 11 に記載の通りにして光活性化性ポリマーの合成に利用するために保存した。

【0050】

実施例 6

4 - プロモメチルベンゾフェノン (BMBP) の調製 (化合物VI)

4 - メチルベンゾフェノン 750 g (3.82 mole) をオーバーヘッドスターラーの付いた5リットルのMortonフラスコに加え、そして2850mlのベンゼンに溶かした。この溶液を還流加熱し、次いで330mlのベンゼン中の610g (3.82 mole) のプロミンを滴下した。添加速度は約1.5ml/minとし、そしてフラスコに90ワット(90ジュール/sec)のハロゲンスポットライトで照射して反応を開始させた。10%の実働サイクル(5秒間オン、40秒間オフ)、次いで1時間後の20%の実働サイクル(10秒間オン、40秒間オフ)を供するようランプと共にタイマーを使用した。添加の終了時に、この生成物をガスクロマトグラフィーにより分析し、そして71%の所望の化合物VI、8%のジプロモ生成物及び20%の未反応の4 - メチルベンゾフェノンを含むことが認められた。冷却後、反応混合物を100mlの水中の10gの亜硫酸水素ナトリウムで洗い、次いで3×200mlの水で洗った。この生成物を硫酸ナトリウムで乾かし、そして1:3のトルエンから2回再結晶化させた。真空乾燥後、635gの化合物VIが単離され、60%の収率であり、そして112 - 114 の融点を有した。NMRスペクトルメーターでの分析は所望の生成物と一致した。¹H NMR (CDCl₃) 芳香族プロトン 7.20 - 7.80 (m, 9H) 及びベンジルプロトン 4.48 (s, 2H)。最終化合物を実施例 7 に記載の通りにして光活性化性連鎖移動剤の調製に利用するために保存した。

【0051】

実施例 7

N - (2 - メルカプトエチル) - 3, 5 - ビス(4 - ベンゾイルベンジルオキシ)ベンズアミドの調製 (化合物VII)

3, 5 - ジヒドロキシ安息香酸 46.2 g (0.30 mol) をソクスレーエキストラクター及びコンデンサーの付いた250mlのフラスコの中に秤量した。メタノール 48.6 ml 及び濃硫酸 0.8 ml をフラスコに加え、そして48gの3Aモレキュラーシーブをソクスレーエキストラクターに入れた。このエキストラクターをメタノールで満たし、そしてこの混合物を一夜還流加熱した。得られる生成物のガスクロマトグラフィー分析は所望のメチルエステルへの98%の転換率を示した。溶媒を減圧で除去して約59gの粗生成物を得た。この生成物を以下の工程に更に精製することなく使用した。少量のサンプルを予めNMR分析のために精製し、所望の生成物と一致するスペクトルが得られた：¹H NMR (DMSO - d₆) 芳香族プロトン 6.75 (d, 2H) 及び 6.38 (t, 1H) 及びメチルエステル 3.75 (s, 3H)。

【0052】

以上に由来する全メチルエステル生成物をオーバーヘッドスターラー及びコンデンサーの付いた2リットルのフラスコに入れ、次いで実施例 6 に記載の一般方法に従って調製した173.25 g (0.63 mol) の化合物VI、207 g (1.50 mol) の炭酸カリウム及び1200mlのアセトンを添加した。得られる混合物を一夜還流し、薄層クロマトグラ

10

20

30

40

50

フィー (TLC) による指示に従い完全な反応が得られた。この固体を濾過により除去し、そしてアセトンで減圧でエバポレーションして 49 g の粗生成物が得られた。この固体を 1 リットルの水に希釈し、そして 3 × 1 リットルのクロロホルムで抽出した。その抽出物をアセトン可溶性画分と合わせ、そして硫酸ナトリウムで乾かし、177 g の粗生成物が得られた。この生成物をアセトニトリルから再結晶化させ、150.2 g の白色固体が得られ、最初の 2 工程では 90 % の収率であった。この生成物の融点は 131.5 (DSC) であり、NMR スペクトルメーターでの分析は所望の生成物と一致した：¹H NMR (CDCl₃) 芳香族プロトン 7.25 - 7.80 (m, 18H)、7.15 (d, 2H) 及び 6.70 (t, 1H)、ベンジルプロトン 5.05 (s, 4H) 及びメチルエステル 3.85 (s, 3H)。

10

【0053】

メチル 3,5 - ビス (4 - ベンゾイルベンジルオキシ) ベンゾエート 60.05 g (0.108 mol) を 2 リットルのフラスコに入れ、次いで 120 ml の水、480 ml のメタノール及び 6.48 g (0.162 mmol) の水酸化ナトリウムを添加した。この混合物を 3 時間還流し、エステルの加水分解を完了させた。冷却後、メタノールを減圧除去し、そして酸のナトリウム塩を 2400 ml の温水に溶かした。この酸を濃塩酸を用いて沈殿させ、濾過し、水で洗い、そして真空オーブンで乾かして 58.2 g の白色固体 (収率 99 %) を得た。この生成物の融点は 188.3 (DSC) であり、そして NMR スペクトルメーターでの分析は所望の生成物と一致した：¹H NMR (DMSO - d₆) 芳香族プロトン 7.30 - 7.80 (m, 18H)、7.15 (d, 2H) 及び 6.90 (t, 1H) 及びベンジルプロトン 5.22 (s, 4H)。

20

【0054】

3,5 - ビス (4 - ベンゾイルベンジルオキシ) 安息香酸 20.0 g (36.86 mmol) を 250 ml のフラスコに加え、次いで 36 ml のトルエン、5.4 ml (74.0 mmol) の塩化チオニル及び 28 µl の N,N - ジメチルホルムアミドを添加した。この混合物を 4 時間還流し、酸クロリドを形成した。冷却後、溶媒及び過剰の塩化チオニルを減圧で除去した。残留塩化チオニルを 20 ml づつのクロロホルムを用いながらの 4 回の更なるエバポレーションにより除去した。その粗材料をトルエンから再結晶化させ、18.45 g の生成物、収率 89 % を得た。この生成物の融点は 126.9 (DSC) であり、NMR スペクトルメーターでの分析は所望の生成物と一致した：¹H NMR (CDCl₃) 芳香族プロトン 7.30 - 7.80 (m, 18H)、7.25 (d, 2H)、及び 6.85 (t, 1H)、及びベンジルプロトン 5.10 (s, 4H)。

30

【0055】

2 - アミノエタンジオール塩酸塩 4.19 g (36.7 mmol) をオーバーヘッドスターラーの付いた 250 ml のフラスコに加え、次いで 15 ml のクロロホルム及び 10.64 ml (76.5 mmol) のトリエチルアミンを加えた。このアミン溶液を氷浴上で冷却後、50 ml のクロロホルム中の 3,5 - ビス (4 - ベンゾイルベンジルオキシ) ベンゾイルクロリド 18.4 g (32.8 mmol) の溶液を 50 分かけて滴下した。水上での冷却を 30 分続け、次いで室温に 2 時間温めた。この生成物を 150 ml のクロロホルムで希釈し、そして 5 × 250 ml の 0.1 N の塩酸で洗った。この生成物を硫酸ナトリウムで乾かし、そして 15 : 1 のトルエン : ヘキサンで 2 回再結晶化させ、13.3 g の生成物、収率 67 % を得た。この生成物の融点は 115.9 (DSC) であり、そして NMR スペクトルメーターでの分析は所望の生成物と一致した：¹H NMR (DMSO - d₆) 芳香族プロトン 7.20 - 7.80 (m, 18H)、6.98 (d, 2H) 及び 6.65 (t, 1H)、アミド NH 6.55 (ブロード t, 2H)、ベンジルプロトン 5.10 (s, 4H)、アミドの N に隣接するメチレン 3.52 (q, 2H)、SH に隣接するメチレン 2.10 (q, 2H) 及び SH 1.38 (t, 1H)。最終化合物を例えば実施例 12 に記載の通りにして光活性化性ポリマーの合成における連鎖移動剤として利用するために保存した。

40

【0056】

実施例 8

50

N - スクシニミジル 11 - (4 - ベンゾイルベンズアミド) ウンデカノエート (BBA - AUD - NOS) の調製 (化合物VIII)

実施例 1 に記載の一般方法に従って調製した化合物 I (50 g、0.204 mol) を 2500 ml のクロロホルムに溶かし、次いで 1500 ml の水中の 43.1 g (0.214 mol) の 11 - アミノウンデカン酸及び 60.0 g (1.5 mol) の水酸化ナトリウムの溶液を添加した。この混合物を 5 リットルの Morton フラスコの中で 1 時間強く攪拌し、2 層の十分な混合を確実なものとした。この混合物を 250 ml の濃塩酸で酸性にし、そして更に 30 分攪拌した。その有機層を分離し、そして水性層を 3 × 500 ml のクロロホルムで抽出した。合わせた有機抽出物を硫酸ナトリウムで乾かし、濾過し、そしてエバポレーションして固体を得た。その生成物をトルエンから再結晶化させ、68.37 g (82 %) の 11 - (4 - ベンゾイルベンズアミド) ウンデカン酸が得られ、融点は 107 - 109 °C であった。NMR スペクトルメーターでの分析は所望の生成物と一致した：¹H NMR (CDCl₃) 芳香族プロトン 7.20 - 7.80 (m, 9 H)、アミド NH 6.30 (ブロード t, 1 H)、アミドの N に隣接するメチレン 3.35 (m, 2 H)、カルボニルに隣接するメチレン 2.25 (t, 2 H) 及び残りのメチレン 1.00 - 1.80 (m, 16 H)。

10

【 0057 】

11 - (4 - ベンゾイルベンズアミド) ウンデカン酸 60.0 g (0.146 mol) をオープン乾燥した 2000 ml のフラスコ内の 1200 ml の無水 1,4 - ジオキサンの中に温めながら溶解した。室温にまで冷却後、17.7 g (0.154 mol) の N - ヒドロキシスクシニミド及び 33.2 g (0.161 mol) の 1,3 - ジシクロヘキシルカルボジミドをこの溶液に加え、そしてこの混合物を乾燥雰囲気下で一夜攪拌した。固体を濾過により除去し、フィルターケーキを 1,4 - ジオキサンですすいだ。この溶媒を真空下で除去し、そしてその生成物をエタノールから 2 回再結晶化させた。真空オープンの中で十分に乾燥後、53.89 g (収率 73 %) の白色固体が得られ、融点は 97 - 99 °C であった。NMR スペクトルメーターでの分析は所望の生成物と一致した：¹H NMR (CDCl₃) 芳香族プロトン 7.20 - 7.80 (m, 9 H)、アミド NH 6.25 (ブロード t, 1 H)、アミドの N に隣接するメチレン 3.35 (m, 2 H)、スクシニミジル環上のメチレン 2.75 (s, 4 H)、カルボニルに隣接するメチレン 2.55 (t, 2 H)、及び残りのメチレン 1.00 - 1.90 (m, 16 H)。

20

30

【 0058 】

実施例 9

アクリルアミド、BBA - APMA 及び MAL - EAC - NOS のコポリマー (ランダム フォト PA - ポリ NOS) の調製 (化合物 IX、A - C)

本発明の光活性化性コポリマーは下記のようにして調製した。アクリルアミド 4.298 g (60.5 mmol) を 57.8 ml のテトラヒドロフラン (THF) に溶解し、次いで実施例 3 に記載の一般方法に従って調製した 0.219 g (0.63 mmol) の化合物 III、実施例 4 に記載の一般方法に従って調製した 0.483 g (1.57 mmol) の化合物 IV、0.058 ml (0.39 mmol) の N,N,N',N' - テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) 及び 0.154 g (0.94 mmol) の 2,2 - アゾビスイソブチロニトリル (AIBN) を溶解した。この溶液を 3 分間のヘリウムスパージ、その後の更に 3 分間のアルゴンスパージにより脱酸素した。次いでシールをした槽を 60 °C で一夜加熱し、重合を完了させた。その固体生成物を濾過により単離し、そしてフィルターケーキを THF 及び CHCl₃ でよくすすいだ。この生成物を真空オープン内で 30 °C で乾かし、5.34 g の白色固体を得た。NMR 分析 (DMSO - d₆) は 2.75 ppm での NOS 基の存在を確証し、そして光学基負荷量は 0.118 mmol の BBA / 1 g のポリマーと決定された。MAL - EAC - NOS は化合物 IX - A を供するようこの反応において 2.5 モル % の重合性モノマーを占める。

40

【 0059 】

上記の手順を 5 モル % の化合物 IV を有するポリマーを調製するために利用した。アクリル

50

アミド 3.849 g (54.1 mmol) を 52.9 ml の THF に溶かし、次いで実施例 3 に記載の一般方法に従って調製した 0.213 g (0.61 mmol) の化合物 VI、実施例 4 に記載の一般方法に従って調製した 0.938 g (3.04 mmol) の化合物 IV、0.053 ml (0.35 mmol) の TEMED 及び 0.142 g (0.86 mmol) の AIBN を溶解した。得られる固体、化合物 IX-B を前述の通りに単離すると、4.935 g の生成物が得られ、光学基負荷量は 0.101 mmol の BBA / 1 g のポリマーであった。

【0060】

上記の手順を 10 モル% の化合物 IV を有するポリマーを調製するために利用した。アクリルアミド 3.241 g (45.6 mmol) を 46.4 ml の THF に溶解し、次いで実施例 3 に記載の一般方法に従って調製した 0.179 g (0.51 mmol) の化合物 III、実施例 4 に記載の一般方法に従って調製した 1.579 g (5.12 mmol) の化合物 IV、0.047 ml (0.31 mmol) の TEMED 及び 0.126 g (0.77 mmol) の AIBN を溶解した。得られる固体、化合物 IX-C を上記の通りに単離すると、4.758 g の生成物が得られ、光学基負荷量は 0.098 mmol の BBA / 1 g のポリマーであった。

【0061】

実施例 10

アクリルアミド、BBA-APMA 及び〔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クロリドのコポリマー(ランダムフォトPA-ポリQuat)の調製(化合物X、A-B)

本発明の光活性化性コポリマーを下記のようにして調製した。アクリルアミド 10.681 g (0.150 mol) を 150 ml のジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、次いで実施例 3 に記載の一般方法に従って調製した 0.592 g (1.69 mmol) の化合物 III、7.08 ml の 50% の水性溶液として導入する 3.727 g (16.90 mmol) の〔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クロリド (MAPTAC)、0.169 ml (1.12 mmol) の TEMED 及び 0.333 g (2.03 mmol) の AIBN を溶解した。この溶液を 4 分間のヘリウムスパージ、次いで更に 4 分間のアルゴンスパージで脱酸素した。シールした槽を次に 55 で一夜加熱し、重合を完了させた。この DMSO 溶液を水で希釈し、そして 12,000 - 14,000 の分子量カットオフチューブを利用して水に対して透析した。得られる溶液の凍結乾燥は 14.21 g の白色固体を供した。NMR 分析 (D₂O) は第四アンモニウム基上での 3.10 ppm のメチル基の存在を示し、そして光学基負荷量は 0.101 mmol の BBA / 1 g のポリマーと決定された。化合物 III は化合物 X-A を供するこの反応において重合性モノマーの 1 モル% を占めた。

【0062】

上記の手順を 2 モル% の化合物 III を有するポリマーの調製のために用いた。アクリルアミド 10.237 g (0.144 mol) を 145 ml の DMSO に溶解し、次いで実施例 3 に記載の一般方法に従って調製した 1.148 g (3.277 mmol) の化合物 III、7.23 ml の 50% の水性溶液として導入する 3.807 g (17.24 mmol) の MAPTAC、0.164 ml (1.09 mmol) の TEMED 及び 0.322 g (1.96 mmol) の AIBN を溶解した。上記の通りの作業は 12.54 g の生成物 (化合物 X-B) を供し、光学基負荷量は 0.176 mmol の BBA / 1 g のポリマーであった。

【0063】

実施例 11

アクリルアミド、BBA-APMA、MA-EAC-NOS 及び〔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クロリドのコポリマー(ランダムフォトPA-ポリNOS-ポリQuat)の調製(化合物XI)

本発明の光活性化性コポリマーを下記のようにして調製した。市販の 50% の水性 MAPTAC 中の水をクロロホルムとの共沸蒸留により除去した。10.88 g の MAPTAC を含む水性 MAPTAC 溶液を 20 ml の DMSO 及び 100 ml のクロロホルムで希釈した。この混合物を無水硫酸ナトリウムを含む水より重い液-液エキストラクターへと全部で

10

20

30

40

50

80分間還流した。ゆっくりとしたエアフローを還流の間維持し、モノマーの重合を防いだ。還流の終了時に、過剰のクロロホルムを減圧で除去してM A P T A CのD M S O溶液を約352mg/mlの濃度にした。

【0064】

アクリルアミド1.7g(23.90mmol)を57.7mlのジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、次いで実施例3に記載の一般方法に従って調製した0.215g(0.614mmol)の化合物III、1.93ml(0.677g、3.067mmol)の上記のM A P T A C / D M S O溶液、実施例5に記載の一般方法に従って調製した0.91g(3.068mmol)の化合物V、及び0.060g(0.365mmol)のA I B Nを溶解した。この溶液を4分間のヘリウムスパージ、次いで更に4分間のアルゴンスパージにより脱酸素した。シールした槽を55℃で一夜加熱し、重合を完了させた。この反応混合物を600mlのジエチルエーテルに注ぎ入れることによりポリマーを単離した。これらの固体を遠心分離により分離し、そしてその生成物を200mlのジエチルエーテル及び200mlのクロロホルムで洗った。真空下の溶媒のエバポレーションは3.278gの生成物を供し、光学基負荷量は0.185mmolのB B A / 1gのポリマーであった。

【0065】

実施例12

N - (2 - メルカプトエチル) - 3 , 5 - ビス (4 - ベンゾイルベンジルオキシ) ベンズアミドを利用するアクリルアミド及びM A L - E A C - N O Sのコポリマー (終点ジフォトP A - ポリN O S) (化合物XII)

本発明の光活性化性コポリマーを下記のようにして調製した。アクリルアミド3.16g(44.5mmol)を45.0mlのテトラヒドロフランに溶解し、次いで0.164g(1mmol)のA I B N、0.045ml(0.30mmol)のT E M E D、実施例7に記載の一般方法に従って調製した0.301g(0.5mmol)の化合物VII及び実施例4に記載の一般方法に従って調製した1.539g(5mmol)の化合物IVを溶解した。この溶液を4分間のヘリウムスパージ、次いで更に4分間のアルゴンスパージにより脱酸素した。シールした槽を55℃で一夜加熱して重合を完了させた。沈殿ポリマーを濾過により単離し、そしてクロロホルムで洗浄した。最終生成物を真空オープンで乾かし、0.011mmolのB B A / 1gのポリマーの光学基負荷量を有する4.727gのポリマーが得られた。

【0066】

実施例13

N - [3 - (ジメチルアミノ) プロピル] メタクリルアミド及びB B A - A P M Aのコポリマー (ランダムフォトP A - ポリ第三アミン) (化合物XIII)

本発明の光活性化性コポリマーを下記のようにして調製した。N - [3 - (ジメチルアミノ) プロピル] メタクリルアミド33.93g(0.2mol)を273mlのDMSOに溶解し、次いで16.6mlの濃塩酸及び実施例3に記載の一般方法に従って調製された6.071g(17.3mmol)の化合物IIIを溶解した。最後に、0.29ml(1.93mmol)のT E M E D、0.426g(2.6mmol)のA I B N及び100mlの水をこの反応混合物に加えた。この溶液を10分間ヘリウムスパージで脱酸素し、そしてヘッドスペースをアルゴンで満たした。シールした槽を55℃で一夜加熱し、重合を完了した。その生成物を脱イオン水に対して数日間、12,000-14,000MWCOのチューブを利用して透析した。この生成物を透析後に濾過して全ての固体を除去し、そして凍結乾燥して47.27gの固体生成物を得た。このポリマーは0.33mmolのB B A / 1gのポリマーの光学基負荷量を有することが決定された。

【0067】

実施例14

ポリスチレン (P S) マイクロウェルプレート上のランダムフォトP A - ポリN O S (化合物IX - C) とランダムフォトP A - ポリN O S - ポリQ u a t (化合物XI) との比較
化合物IX - C及び化合物XIを別々に脱イオン水に5ng/mlで溶解させた。別々のウェルに100µlの化合物IX及び化合物XIを含むP S プレート (P S , Medium Bind, Corning Cos

10

20

30

40

50

tar, Cambridge, MA) に H e r a e u s バルブ (W.C.Heraeus GmbH, Hanau, Federal Republic of Germany) を含む D y m a x ランプ (モデルNo. P C - 2、Dymax Corporation, Torrington, CT) で照射した。照射時間は 1.5 分、330 - 340 nm の波長域で 1 ~ 2 mW / cm² の強度とした。このコーティング溶液を捨て、そしてウェルを 2 時間風乾した。このプレートに更に 1 分間照射を行った。このコーティングプレートを直ちに、2 ヶ月までシールパウチの中に保存しておいたオリゴを固定化するために用いた。

【 0 0 6 8 】

5 0 塩基オリゴマー捕獲プローブ 5' - N H₂ - GTCTGAGTCGGAGCCAGGGCGGCCCAACAGCAGG AGCAGCGTGACCG - 3' (I D 1) (C - 1 2 スペースを含む 5' - アミノモディファイヤーで合成) を 1 0 p m o l e / ウェルで P S ウェル内にて 5 0 m M のリン酸バッファー pH 8 . 5、1 m M の E D T A の中で 3 7 ° C で 1 時間インキュベーションした。ハイブリダイゼーションは下記の通りにして、相補性 5' - ビオチン - CCGTGCACGCTGCTCCTGCTGTTGGCGGCCGCC TGGCTCCGACTCAGAC - 3' (I D 3) 検出プローブ又は非相補性 5' - ビオチン - CGGTGGAT GGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGAGCGGGAGACACAGAA - 3' (I D 4) オリゴを利用して実施した。それらは共に 5' - ビオチン修飾で合成したものである。

10

【 0 0 6 9 】

固定化捕獲プローブを有するプレートを 0 . 0 5 % の T w e e n 2 0 を含むリン酸緩衝食塩水 (P B S、1 0 m M の N a₂ P O₄、1 5 0 m M の N a C l、pH 7 . 2) により、マイクロプレートオートウォッシャー (モデル E L 4 0 3 H、Bio-Tek Instruments, Winooski, VT) を用いて洗浄した。このプレートを 5 5 ° C で 3 0 分ハイブリダイゼーションバッファーでブロックした。このバッファーは 5 x の S S C (0 . 7 5 M の N a C l、0 . 0 7 5 M のクエン酸塩、pH 7 . 0)、0 . 1 % のラウロイルサルコシン、1 % のカゼイン及び 0 . 0 2 % のドデシル硫酸ナトリウムから成る。検出プローブを捕獲プローブにハイブリダイズさせるとき、1 0 0 μ l 中の 5 0 f m o l e の検出プローブを各ウェルに加え、そして 5 5 ° C で 1 時間インキュベーションした。次いでこのプレートを 0 . 1 % のドデシル硫酸ナトリウムを含む 2 x の S S C で 5 5 ° C で 5 分かけて洗った。結合した検出プローブをストレプトアビジン及び西洋ワサビペルオキシダーゼのコンジュゲート 1 0 0 μ l (S A - H R P、Pierce, Rockford, IL) を 0 . 5 μ g / m l で加え、そして 3 7 ° C で 3 0 分インキュベーションすることによりアッセイした。次いでこのプレートを P B S / T w e e n で洗い、次いでペルオキシダーゼ基質 (H₂ O₂ 及びテトラメチルベンジジン : Kirkegard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) を添加し、そしてマイクロウェルプレートリーダー (モデル 3 5 5 0、Bio-Rad Labs, Cambridge, MA) で 6 5 5 n m で測定を行った。プレートは 1 0 分目に測定した。

20

30

【 0 0 7 0 】

表 1 に挙げる結果は、化合物 IX - C でコーティングされたマイクロウェルプレートがアミン捕獲プローブを有効に固定しなかったことを示す。しかしながら、コーティングとしての化合物 XI との対比により、有意義な結合及び良好なハイブリダイゼーションシグナルが供された。化合物 IX - C 試薬は表層をほとんど通り過ぎてしまい、そして捕獲オリゴの結合を阻害した。反対に、化合物 XI を使用すると、オリゴはイオン相互作用により表層に吸引され、そこでそれらは N O S 基と共有結合できた。

40

【 0 0 7 1 】

【表 1】

表 1 : 化合物 IX - C 及び化合物 XI でコーティングされた PS マイクロウェルプレートのハイブリダイゼーションシグナル (A_{655})

	化合物 IX - C	化合物 XI
相補性検出プローブ	0.187 ± 0.031	1.666 ± 0.064
非相補性検出プローブ	0.127 ± 0.016	0.174 ± 0.005

10

【 0 0 7 2 】

実施例 1 5

ランダムフォト PA - ポリ NOS (化合物 IX - B) 及びランダムフォト PA - ポリ Qu a t (化合物 X - B) の混合物による様々なマイクロウェルプレートのコーティング

5 mg / ml の化合物 IX - B 及び 0 . 5 mg / ml の化合物 X - B を含むコーティング溶液を脱イオン水中で調製した。この混合物をポリプロピレン (PP 、 Corning Costar, Cambridge, MA)、PS、ポリカーボネート (PC 、 Corning Costar, Cambridge, MA) 及びポリビニルクロリド (PVC 、 Dynatech, Chantilly, VA) マルチウェルを実施例 1 4 に記載の通りにして処理するのを用いた。30 量体の捕獲オリゴ 5' - NH₂ - GTCTGAGTCGGAGCCAGGGCGGCCGCAAC - 3' (ID 2) (C - 1 2 スペーサーを含む 5' - アミノモディファイヤーで合成) を 0 . 0 3 , 0 . 1 , 0 . 3 , 1 , 3 又は 1 0 pmole / ウェルにて 4 時間で一夜インキュベーションした。ハイブリダイゼーションは実施例 1 4 において前述した通りにして、相補性 ID 3 検出オリゴ又は非相補性 ID 4 オリゴを用いて実施した。PP プレートは光学的に透明ではないため、各ウェルの内容物を 2 0 分間のインキュベーションの後に発色基質と一緒に PS ウェルに移した。ハイブリダイゼーションシグナルが PS プレートで測定された。その他のプレートは 1 0 分目に移すことなく測定を行った。シグナルレベルは同一の基質グループ内でのみ同等であり、その理由は異なる材料から作られたマイクロウェルプレートの異なる幾何学形態による。表 2 はハイブリダイゼーションシグナルを挙げ、そしてハイブリダイゼーションシグナルの強度と化合物 IX - B 及び化合物 X - B の混合物でコーティングされた様々なマイクロウェルプレートに適用した捕獲プローブの量との関係を示す。PP 及び PVC プレート上では、プローブの吸着はごくわずかであり、そしてポリマー試薬によるコーティングはシグナルを劇的に上昇させた。シグナルはコーティングウェルに加える捕獲プローブを増やすと上昇するが、約 3 pmole / ウェルの捕獲プローブで平衡に達する。発生シグナル値におけるこのプラトーはハイブリダイゼーションの飽和レベルによるものではなく、比色アッセイにおける色調変化反応の限界によるものである。

20

30

【 0 0 7 3 】

オリゴ誘導体はコーティングされていない PS 及び PC マイクロウェルプレートに効率的に吸着し、そして特異的なハイブリダイゼーションシグナルをもたらす。Crosら (米国特許第 5 , 5 1 0 , 0 8 4 号) はアミン官能化オリゴが不明なメカニズムによりポリスチレンマイクロウェルプレート上に十分に吸着することを報告している。しかしながら、種々のロット内でコーティングされていない PS プレート上での吸着量に著しい変動がある (Chevier ら、FEMS 10: 245, 1995)。

40

【 0 0 7 4 】

【 表 2 】

表2：化合物IX-B及び化合物X-Bの混合物でコーティングされた様々なマイクロウェルプレート
 材料のハイブリダイゼーションシグナル (A₆₅₅)

添加した捕獲オリゴ (pmole/ウェル)

	0.03		0.1		0.3		1		3		10	
	Comp	NC	Comp	NC	Comp	NC	Comp	NC	Comp	NC	Comp	NC
PP												
非コーティング	0.083	0.082	0.076	0.072	0.076	0.074	0.088	0.074	0.070	0.067	0.078	0.073
コーティング	0.541	0.099	1.070	0.099	1.769	0.091	2.283	0.094	2.582	0.141	2.490	0.320
PVC												
非コーティング	0.074	0.079	0.081	0.075	0.097	0.078	0.137	0.076	0.215	0.081	0.337	0.092
コーティング	0.423	0.116	0.875	0.110	1.326	0.112	1.583	0.142	1.628	0.186	1.604	0.332
PS												
非コーティング	0.235	0.099	0.435	0.091	0.827	0.090	1.205	0.093	1.380	0.093	1.404	0.136
コーティング	0.435	0.121	0.801	0.105	1.177	0.116	1.401	0.132	1.470	0.132	1.487	0.302
PC												
非コーティング	0.676	0.248	1.364	0.244	2.103	0.256	2.701	0.266	2.745	0.295	2.930	0.388
コーティング	1.034	0.327	1.602	0.306	2.136	0.295	2.218	0.287	2.380	0.342	2.500	0.572

Comp. : ハイブリダイゼーションのために相補性検出プローブを添加。

NC : ハイブリダイゼーションのために非相補性検出プローブを添加。

【0075】

実施例16

PP及びPVCマイクロウェルプレート上の終点ジフォトPA - ポリNOS (化合物XII) 及びランダムフォトPA - ポリQuat (化合物X-B) の評価

5mg/mlの化合物XII及び0.5mg/mlの化合物X-Bの混合物を含むコーティング溶液を脱イオン水で調製した。この2種類の試薬の混合物を、実施例14に記載のものと同じ

条件下でPP及びPVCマイクロウェルプレートにコーティングするのに用いた。30量体のID2捕獲プローブを0.03, 0.1, 0.3, 1, 3又は10 pmole / ウェルにおいて0.1 mlで4で一夜インキュベーションした。ハイブリダイゼーションは相補性ID3検出オリゴ又は非相補性ID4オリゴを利用して実施例14に記載の通りにして実施した。表3に挙げるハイブリダイゼーションシグナルはハイブリダイゼーションシグナルの強度と化合物XII及び化合物X-Bの混合物でコーティングされたPP及びPVCマイクロウェルプレートに適用した捕獲プローブの量との関係を示す。シグナルはコーティングウェルに添加する捕獲オリゴを増やすと上昇するが、約1 pmole / ウェルで平衡に達する。シグナル、対、ノイズ比(相補性検出プローブ、対、非相補性検出プローブに由来)はコーティングPP及びPVC表層についてそれぞれ2.6及び1.1と高かった。

【0076】

【表3】

表3：化合物XII及び化合物X-Bの混合物でコーティングしたPP及びPVCプレートのハイブリダイゼーションシグナル (A_{655})

pmole/ウェル 捕獲プローブ 添加量	PPマイクロウェルプレート		PVCマイクロウェルプレート	
	Comp. 検出プローブ	Non-comp.	Comp. 検出プローブ	Non-comp.
0.03	0.153±0.008	0.070±0.007	0.289±0.029	0.094±0.020
0.1	0.537±0.042	0.075±0.009	0.759±0.054	0.104±0.014
0.3	1.206±0.106	0.080±0.003	1.262±0.023	0.117±0.011
1	2.157±0.142	0.081±0.003	1.520±0.044	0.189±0.064
3	2.624±0.162	0.108±0.012	1.571±0.031	0.179±0.016
10	2.921±0.026	0.200±0.018	1.625±0.040	0.286±0.021

【0077】

実施例17

ランダムフォトPA - ポリQuat (化合物X-B) 及びBBA-AUD-NOSによる逐次コーティング (化合物VIII)

脱イオン水中の0.1 mg/mlの化合物X-BをPP及びPVCウェルの中に20分インキュベーションした。ウェルにこの溶液が入っているこのプレートを実施例14において前述した通りにして1.5分照射に付した。この溶液を捨て、そしてウェルを乾かした。イソプロピルアルコール(IPA)中の0.5 mg/mlの化合物VIIIを化合物X-Bのコーティングされたウェルの中で5分間インキュベーションした。次いでこの溶液を捨て、プレートを乾かし、そしてウェルが乾燥してから実施例14に記載の通りにして1分間照射した。0.1 ml中において0.03, 0.1, 0.3, 1, 3又は10 pmole / ウェルの30量体のID2捕獲オリゴを4で一夜インキュベーションした。ハイブリダイゼーションを相補性ID3検出オリゴ又は非相補性ID4オリゴを利用して実施例14に記載の通りにして実施した。表4はハイブリダイゼーションシグナルを含み、そしてハイブリダイゼーションシグナルの強度と、化合物X-Bでコーティングされ、続いて化合物VIIIコーティングの施されたPP及びPVCマイクロウェルプレートに適用した捕獲プローブの量との関係を示す。シグナルは、コーティングウェルに加える捕獲プローブを増やすと上昇するが、約1 pmole / ウェルの捕獲オリゴで平衡となった。シグナルは、非コーティングコントロールと比較し、コーティングPP及びPVC表層のそれぞれについて2.9及び1

10

20

30

40

50

1倍高くなった。

【0078】

【表4】

表4：化合物X-Bでコーティングされ、続いて化合物VIIIコーティングの施されたPP及びPVCマイクロウェルプレートのハイブリダイゼーションシグナル(A₆₅₅)

pmole/ ウェル 捕獲 プローブ 添加量	PPマイクロウェルプレート		PVCマイクロウェルプレート	
	非コーティング	コーティング	非コーティング	コーティング
0.03	0.083±0.003	0.157±0.004	0.074±0.004	0.244±0.014
0.1	0.076±0.003	0.544±0.006	0.081±0.005	0.694±0.065
0.3	0.076±0.006	1.095±0.015	0.097±0.010	1.113±0.033
1	0.088±0.006	1.676±0.030	0.137±0.016	1.304±0.027
3	0.070±0.010	1.865±0.057	0.215±0.023	1.237±0.013
10	0.078±0.009	2.274±0.005	0.337±0.024	1.182±0.041

10

20

30

40

【0079】

実施例18

ランダムフォトPA-ポリNOS(化合物IX-A)及びランダムフォトPA-ポリQuat(化合物X-A)の混合物とのランダムフォトPA-ポリQuat(化合物X-A)の比較

化合物X-Aを0.5又は0.1mg/mlにおいてPPマイクロウェルプレート内で10分インキュベーションした。次いでこれらのプレートを実施例14に記載の通りにして照射した。化合物IX-A及び化合物X-Aの混合物を含むコーティング溶液をPPマイクロウェルプレートにコーティングを施すため、脱イオン水中の5/0.5mg/ml及び0.5/0.1mg/mlの化合物IX-A/化合物X-Aの2通りの割合で調製した。この溶液をウェ

50

ル内で10分間インキュベーションし、そしてウェルを実施例14に記載の通りにして照射した。30量体のID2捕獲プローブを1pmole / ウェルにおいて各ウェル内で37で1時間インキュベーションした。ハイブリダイゼーションは相補性ID3検出オリゴ又は非相補性ID4オリゴを利用して実施例14に記載の通りにして実施した。表5に挙げる結果は、化合物IX-A及び化合物X-Aの組合せを含むコーティングが化合物X-Aコーティングのみから由来するものと比べて高いシグナルを供することを示した。

【0080】

【表5】

表5：化合物X-AコーティングされたPPマイクロウェルプレートでの
ハイブリダイゼーションシグナル (A₆₅₅)

化合物IX-A / 化合物X-Aの比	Comp. 検出プローブ	Non-comp. 検出プローブ
5 / 0.5	1.436 ± 0.056	0.077 ± 0.001
0 / 0.5	0.454 ± 0.149	0.052 ± 0.006
0.5 / 0.1	1.346 ± 0.044	0.062 ± 0.003
0 / 0.1	0.192 ± 0.082	0.055 ± 0.002

【0081】

実施例19

コーティングマイクロウェルプレート上でのランダムフォトPA-ポリNOS (化合物IX-B) 及びランダムフォトPA-ポリQuat (化合物X-B) に対する非修飾オリゴ対アミン修飾オリゴの比較

化合物IX-B (5 mg / ml) 及び化合物X-B (0.5 mg / ml) の混合物を含むコーティン

10

20

30

40

50

グ溶液を脱イオン水中で調製し、PP、PS及びPVCマイクロウェルコートにコーティングした。この溶液を約10分インキュベーションし、そして実施例14に記載の通りにして照射した。30量体の捕獲5'-NH₂-TTCTGTGTCTCCCGCTCCCAATACTCGGGC-3' (ID5)オリゴを1 pmole / ウェルにおいて50 mMのリン酸バッファー、pH 8.5、1 mMのEDTA中でウェル内に4℃で一晩かけてカップリングさせた。ハイブリダイゼーションは相補性検出オリゴID4又は非相補性オリゴID3を利用して実施例14に記載の通りにして実施した。捕獲オリゴのアミン官能基の効果を調べるため、非修飾30量体捕獲プローブ5'-TTCTGTGTCTCCCGCTCCCAATACTCGGGC-3' (ID6) (アミンなし)もコーティング表層に加え、そして試験した。表6に示す結果は5'-アミン修飾のないオリゴを化合物IX-B / 化合物X-Bコーティング表層上に捕獲プローブとして利用すると、ハイブリダイゼーションシグナルはアミン修飾によるものの30%未満であることを示す。

10

【0082】

【表6】

表6：化合物IX-B／化合物X-Bコーティングマイクロウェルプレート上のID5又はID6オリゴの
いづれかとのハイブリダイゼーション反応により発生するシグナル (A₆₅₅)

	捕獲プローブ添加なし		非修飾捕獲プローブ		アミン修飾捕獲プローブ	
	Comp. 検出オリゴ	Non-comp. 検出オリゴ	Comp. 検出オリゴ	Non-comp. 検出オリゴ	Comp. 検出オリゴ	Non-comp. 検出オリゴ
PP 非コーティング	0.032±0.001	0.036±0.004	0.033±0.001	0.036±0.001	0.037±0.005	0.033±0.001
コーティング	0.038±0.002	0.040±0.001	0.555±0.041	0.044±0.001	1.915±0.029	0.066±0.003
PVC 非コーティング	0.248±0.049	0.176±0.008	0.259±0.049	0.128±0.013	0.404±0.100	0.118±0.025
コーティング	0.115±0.027	0.090±0.014	0.379±0.028	0.091±0.014	1.319±0.027	0.101±0.017
PS 非コーティング	0.084±0.013	0.089±0.014	0.668±0.047	0.085±0.023	1.269±0.034	0.106±0.024
コーティング	0.080±0.006	0.081±0.023	0.364±0.010	0.089±0.015	1.437±0.012	0.098±0.005

【0083】

実施例20

ランダムフォトPA - ポリNOS (化合物IX - A) 及びランダムフォトPA - ポリQua
t (化合物X - A) でコーティングされたマイクロウェルプレート上のオリゴ付加密度
オリゴ付加密度を決定する及び比色アッセイ系の結果を確認するため、放射性ラベルアッ
セイを実施した。本実施例においては、化合物IX - A及び化合物X - Aの組合せコーティ
ングを実施例14に記載の通りにしてPVCウェルで実施した。ID2及びID5の30

10

20

30

40

50

量体捕獲オリゴをコーティングウェル上に固定化させた。放射性ラベルした I D 2 プローブをウェル表層上の固定化捕獲オリゴの付加密度を測定するために利用した。I D 2 に対しては相補性であるが、I D 5 に対しては相補性でない放射性ラベルされた I D 3 を固定化捕獲プローブのハイブリダイゼーション反応を測定するために利用した。オリゴ I D 2 及び I D 3 を末端トランスフェラーゼ (Boehringer Mannheim Indianapolis, IN) 及び ^{32}P -ddATP (3000Ci/mmole, Amersham, Arlington Heights, IL) を利用し、その製造者の仕様書に従って 3' 末端においてラベルした。 ^{32}P -ラベルされた I D 2 並びにラベルされていない I D 2 及び I D 5 捕獲プローブをコーティングウェル内で 50 pmole / ウェルで室温にて 2.25 時間インキュベーションした。プレートを洗浄し、そして実施例 14 に記載の通りにしてブロッキングした。

10

【0084】

ラベルされていない捕獲プローブの入ったウェルを ^{32}P -ラベル化 I D 3 検出プローブと、ハイブリダイゼーションバッファーの中で 55°C で 1 時間ハイブリダイゼーションさせた。 ^{32}P -ラベル化捕獲プローブを含むウェルを I D 3 プローブの入っていないハイブリダイゼーションバッファー内でインキュベーションした。0.1% の SDS を含む 2x の SSC で 55°C で 5 分にて 3 回、次いで PBS / 0.05% Tween で 3 回洗浄した後、プレートを個々のウェルに切り、そしてテトラヒドロフランに溶解した。各ウェル内の放射能の量を Aquasol-2 Fluor (DuPont NEN, Boston, MA) でのシンチレーションカウンティングにより測定した。表 7 の結果は捕獲プローブの良好な固定化のために化合物 IX - A 及び化合物 X - A の双方が必要であることを示す。また、化合物 IX - A 及び化合物 X - A の濃度を上げると固定化される捕獲オリゴの量が増える。試験した最大の濃度において、シグナル、対、ノイズ比は 3000、対、1 より高かった。

20

【0085】

【表 7】

表7：固定化捕獲プローブ及びハイブリダイズした³²P-検出オリゴの密度

化合物IX-A (mg/ml)	コーティング試薬の混合物 化合物IX-A (mg/ml) X-A (mg/ml)	固定化捕獲 プローブ fmole/well	ハイブリダイズしたcomp. 検出プローブ fmole/well	ハイブリダイズしたnon-comp. 検出プローブ fmole/well
0	0	41.3	2.3	0.6
0	0.05	37.5	10.9	0.7
0.55	0	32.6	5.4	0.6
1	0.1	344.1	308.8	26.4
0.1	0.1	285.7	222.2	55.7
1	0.001	52.8	26.2	0.6
0.1	0.001	73.5	20.8	13.1
1.19	0.05	280.4	256.9	1.1
0.55	0.12	401.9	379.1	0.7
0.55	0.05	338.0	315.1	1.6
2	0.5	1633.4	1108.4	0.3

10

20

30

【0086】

実施例21

ランダムフォト - PA - ポリ第三アミン (化合物XIII)、ランダムフォト - PA - ポリNOS (化合物IX - A)、並びにランダムフォトPA - ポリNOS (化合物IX - A) 及びランダム - PA - ポリ第三アミン (化合物XIII) の混合物間の比較

40

化合物XIIIを0.02 mg/mlにて脱イオン水中でPPマイクロウェルプレート内で10分インキュベーションした。ウェルを実施例14に記載の通りにして照射した。化合物IX - AをPPウェル上に2 mg/mlに脱イオン水中で化合物XIIIについて記載の通りにコーティングした。脱イオン水中の2 mg/mlの化合物IX - A及び0.02 mg/mlの化合物XIIIを含むコーティング溶液を調製し、そして化合物XIIIについて記載の通りにコーティングした。ハイブリダイゼーションは相補性ID3検出オリゴ及び非相補性ID4オリゴを利用して実施例14に記載の通りにして実施した。各ウェルの内容物をペルオキシダーゼ基質との10分間のインキュベーションの後にPSウェルに移した。表8に挙げる結果は化合物IX - A及び化合物XIIIの組合せが、化合物IX - A又は化合物XIIIのコーティングのみから

50

のものとは比べて高いシグナルを供与することを示した。

【0087】

【表8】

表8：コーティングPPマイクロウェルプレートのハイブリダイゼーションシグナル (A_{655})

コーティング	Comp. 検出オリゴ	Non-comp. 検出オリゴ
化合物IX-A	0.057±0.001	0.052±0.006
化合物XIII	0.746±0.042	0.081±0.009
化合物IX-A / 化合物XIII混合物	1.195±0.046	0.078±0.014

10

【0088】

実施例22

アミン誘導化表層上の核酸配列の固定化

20

本発明のコポリマーは下記のようにして調製される。アクリルアミド 5.686 g (80.0 mmol) を 100 ml の DMSO に溶解し、次いで実施例4に記載の一般方法に従って調製した 3.083 g (10.0 mmol) の化合物IV及び実施例11に記載の方法に従って調製したドライDMSO溶液として導入する 2.207 g (10.0 mmol) の MAPTAC を溶解する。TEMED 0.134 ml (0.89 mmol) 及び AIBN 0.197 g (1.20 mmol) をこの混合物に加え、そしてこの系をヘリウムスパージで5分間、次いでアルゴンスパージで更に5分間脱酸素する。シールした槽を 55 に加熱して重合を完了させる。ポリマーは反応混合物を 800 ml のジエチルエーテルに注ぎ、そして遠心分離して固体を分離することにより単離する。この生成物を 200 ml のジエチルエーテル、次いで 200 ml のクロロホルムで洗う。このポリマーを真空乾燥し、残りの溶媒を除去する。

30

【0089】

ポリマー表層をメタン及びアンモニアガスの 3 : 1 の混合物を利用してプラズマ処理することにより誘導化する (例えば、米国特許第 5,643,580 号に記載の一般方法を参照のこと)。メタン (490 SCCM) 及びアンモニア (161 SCCM) の混合物を、コーティングするポリマーと一緒にプラズマチャンバーに入れる。ガスを 0.2 ~ 0.3 torr の圧力に保ち、そしてチャンバー内に 300 ~ 500 ワットのグロー放電を樹立させる。サンプルを全部で 3 ~ 5 分、この条件下で処理する。アミン誘導化表層の形成は、非コーティング表層と比べての水接触角の縮小により確認する。

【0090】

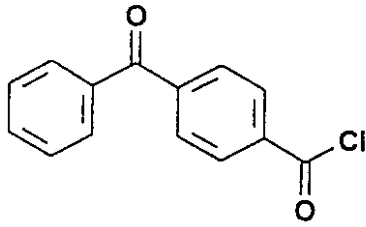
アミン誘導化表層を室温で 10 分、50 mM のリン酸バッファー、pH 8.5 中の上記のポリマーの 10 mg/ml の溶液とインキュベーションする。この反応時間の経過後、コーティング溶液を除去し、そして表層を脱イオン水で十分に洗い、そして十分に乾かす。オリゴマー捕獲プローブの固定化及びハイブリダイゼーションを実施例14に記載の通りに実施する。

40

【0091】

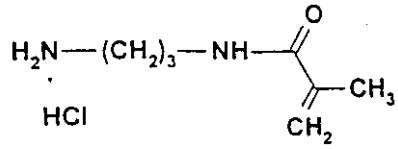
表9：化合物

【化1】



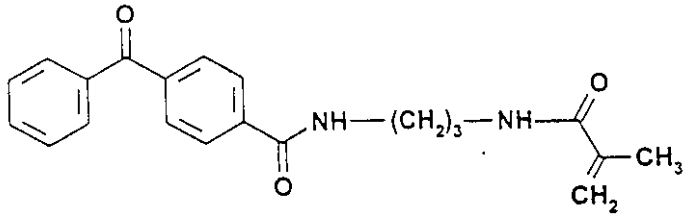
化合物 I

【化 2】



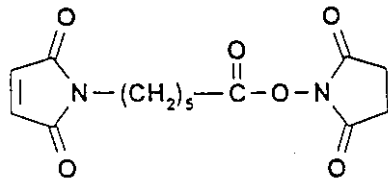
化合物II

10



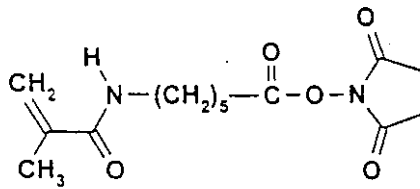
化合物III

20



化合物IV

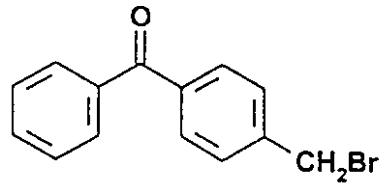
30



化合物V

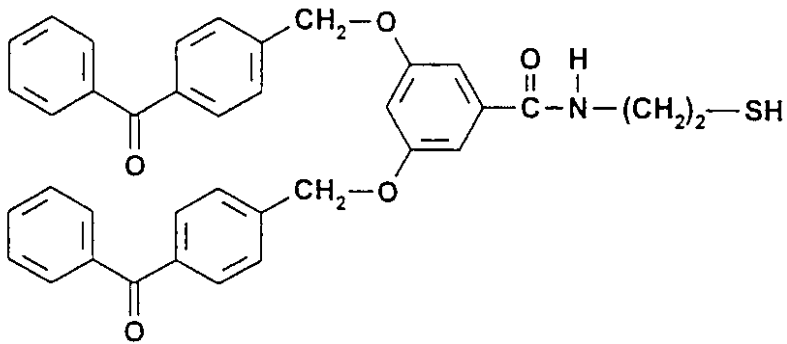
40

【化3】



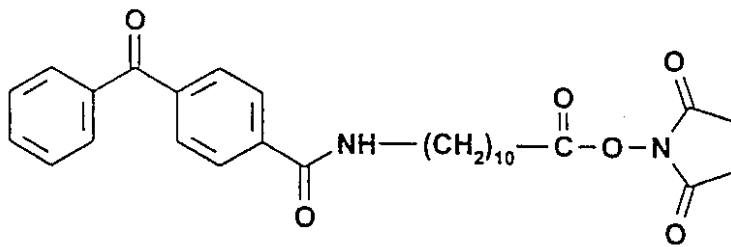
化合物VI

10



20

化合物VII

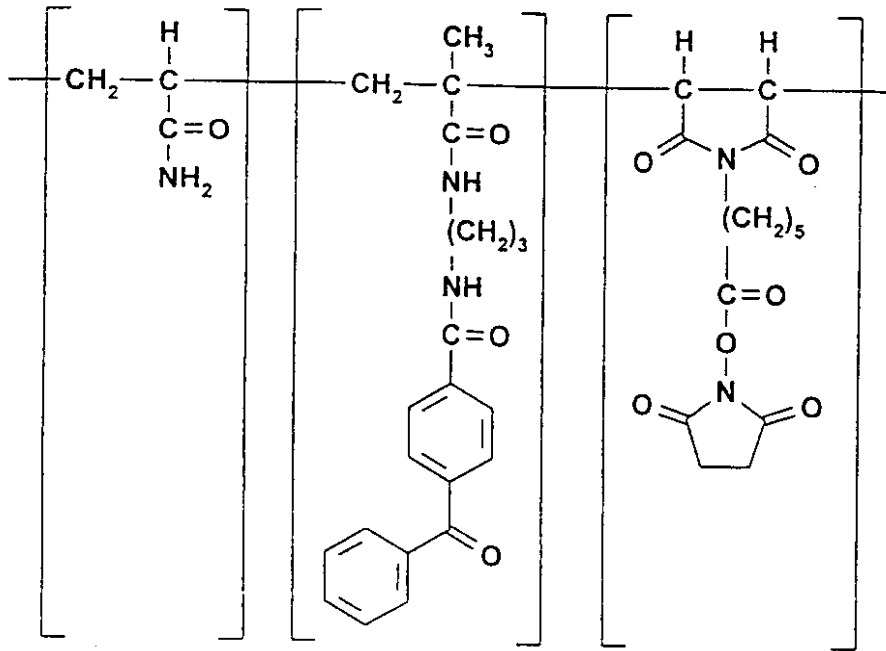


30

化合物VIII

【化4】

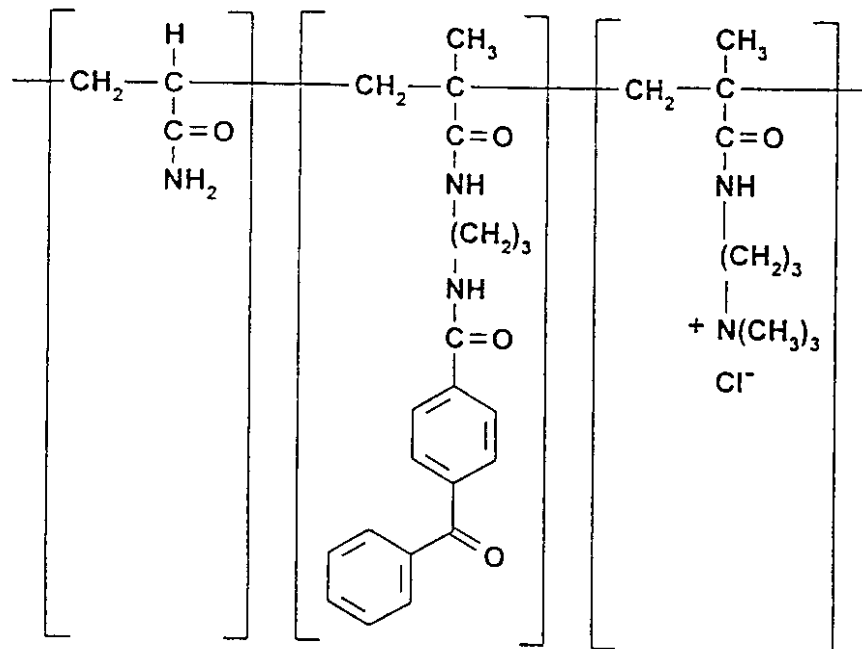
40



化合物IX

10

20

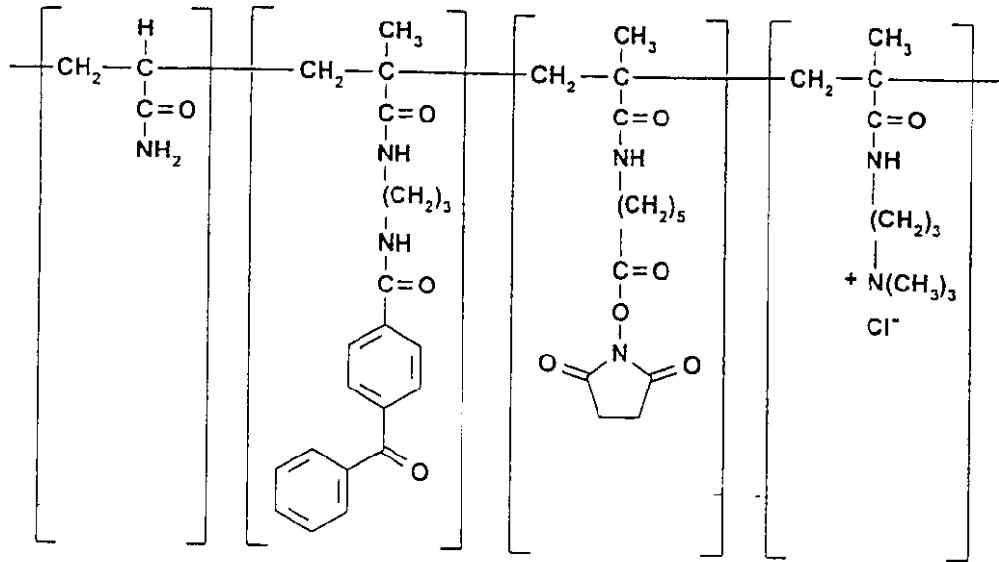


化合物X

30

40

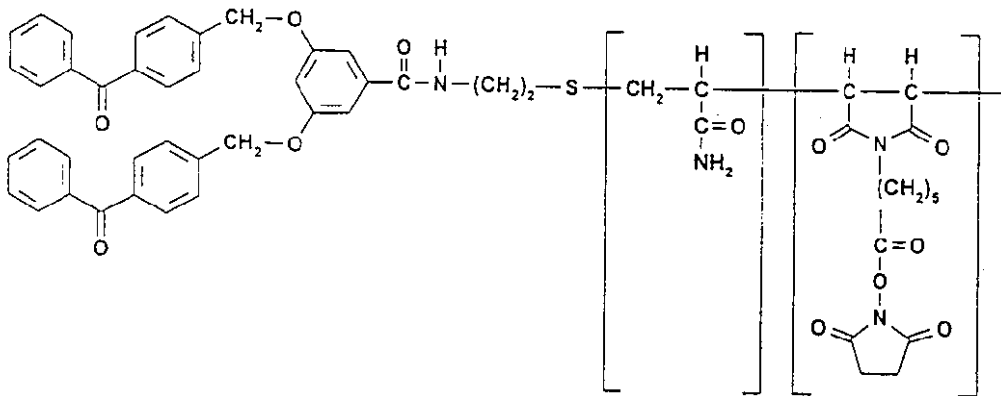
【化5】



10

化合物XI

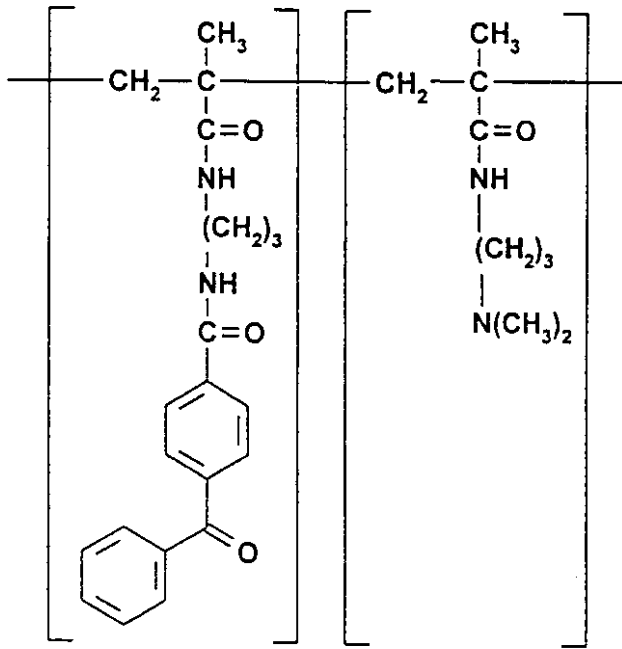
20



30

化合物XII

【化6】



10

20

化合物XIII

フロントページの続き

- (72)発明者 デュラン, リズ ダブリュ.
アメリカ合衆国, ミネソタ 55311, メープル グローブ, シックスティフォース アベニュー
ノース 14602
- (72)発明者 スワンソン, メルビン ジェイ.
アメリカ合衆国, ミネソタ 55315, カーバー, マウント カーマル ロード 5290
- (72)発明者 エイモス, リチャード エー.
アメリカ合衆国, ミネソタ 55418, セント アンソニー, スカイクロフト サークル 34
37
- (72)発明者 フー, ショー - ピン
アメリカ合衆国, ミネソタ 55113, ファルコン ハイツ, ハウエル アベニュー 1810
- (72)発明者 ギアー, パトリック イー.
アメリカ合衆国, ミネソタ 55346, エデン ブレイリー, タータン サークル 6741

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 特開平06-265553(JP, A)
特表平11-505554(JP, A)
特開平01-155272(JP, A)
特開平02-272081(JP, A)
特開平01-240188(JP, A)
特開平06-157646(JP, A)
特開平06-336509(JP, A)
特開平06-160394(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53
C12M 1/00
C12N 15/09
G01N 33/566