

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5981667号

(P5981667)

(45) 発行日 平成28年8月31日 (2016. 8. 31)

(24) 登録日 平成28年8月5日 (2016. 8. 5)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 7 5
GO 1 N 33/58 (2006. 01)	GO 1 N 33/58 Z
GO 1 N 37/00 (2006. 01)	GO 1 N 37/00 1 0 2

請求項の数 32 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2015-558184 (P2015-558184)	(73) 特許権者	514199799
(86) (22) 出願日	平成26年2月17日 (2014. 2. 17)		ヴィブラント ホールディングス リミテッド ライアビリティ カンパニー
(65) 公表番号	特表2016-507072 (P2016-507072A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ヒルズバラ トーナメント ドライブ 1 1 1 6
(43) 公表日	平成28年3月7日 (2016. 3. 7)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/016737	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02014/127328		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成26年8月21日 (2014. 8. 21)	(74) 代理人	100102118
審査請求日	平成27年9月30日 (2015. 9. 30)		弁理士 春名 雅夫
(31) 優先権主張番号	61/765, 584	(74) 代理人	100160923
(32) 優先日	平成25年2月15日 (2013. 2. 15)		弁理士 山口 裕孝
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100119507
早期審査対象出願			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 増幅された電気化学発光検出のための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、標的生体分子を検出する方法：

標的生体分子を含むサンプルと、基板上の規定された位置に固定化されておりかつ該標的生体分子に特異的に結合し得る捕捉リガンドとを接触させる工程であって、それによって該標的生体分子が基板上の規定された位置に固定化される、工程；

固定化標的生体分子と、該固定化標的生体分子に特異的に結合し得かつペルオキシダーゼ活性を有し得る検出リガンドとを接触させる工程であって、それによって固定化標的生体分子-検出リガンド複合体が形成される、工程；

該複合体と、増幅された電気化学発光 (AECL) タグを含むタグ付け用溶液とを、該複合体への複数の AECL タグの共有結合を促進する条件下で接触させる工程；

未結合 AECL タグを基板から除去するために、基板を洗浄する工程；

基板と、結合している AECL タグと反応して基板上の規定された位置に電圧が適用された場合に発光をもたらす検出溶液とを接触させる工程；

基板上の規定された位置に電圧を適用する工程；および

基板上の規定された位置からの発光を測定する工程であって、それによって標的生体分子を検出する、工程。

【請求項 2】

基板上の規定された位置が、1つのマイクロアレイフィーチャまたは複数のマイクロアレイフィーチャを含む、請求項1記載の方法。

10

20

【請求項 3】

1つまたは複数のフィーチャが、50nm～1μmの辺縁寸法を有する、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

辺縁寸法が50nm～100nmである、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

辺縁寸法が50nm～75nmである、請求項4記載の方法。

【請求項 6】

捕捉リガンドが、基板上に設けられたCOOH部分を介して、基板上の規定された位置に共有結合している、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

捕捉リガンドが、基板上に設けられたNH2部分を介して、基板上の規定された位置に共有結合しているリガンドである、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

捕捉リガンドおよび検出リガンドが抗体を含む、請求項1～2のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

捕捉リガンドがペプチドを含む、請求項1～2のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

捕捉リガンドがタンパク質を含む、請求項1～2のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

標的生体分子がペプチドを含む、請求項1～2のいずれか一項記載の方法。

【請求項 12】

標的生体分子がタンパク質を含む、請求項1～2のいずれか一項記載の方法。

【請求項 13】

タンパク質が抗体である、請求項12記載の方法。

【請求項 14】

サンプルが、血液、血清、血漿、唾液、尿、糞便、または脳脊髄液（CSF）を含む、請求項1～2のいずれか一項記載の方法。

【請求項 15】

サンプルがヒトから得られる、請求項1～2のいずれか一項記載の方法。

【請求項 16】

検出リガンドが抗体－ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合体を含む、請求項1～2のいずれか一項記載の方法。

【請求項 17】

AECLタグが金属キレートを含む、請求項1～2のいずれか一項記載の方法。

【請求項 18】

金属が希土類金属である、請求項17記載の方法。

【請求項 19】

希土類金属がルテニウムである、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

AECLタグがトリス(ビピリジン)ルテニウム(II)を含む、請求項17記載の方法。

【請求項 21】

AECLタグがチラミドを含む、請求項1～2のいずれか一項記載の方法。

【請求項 22】

AECLタグが、金属キレートに結合したチラミドを含む、請求項1～2のいずれか一項記載の方法。

【請求項 23】

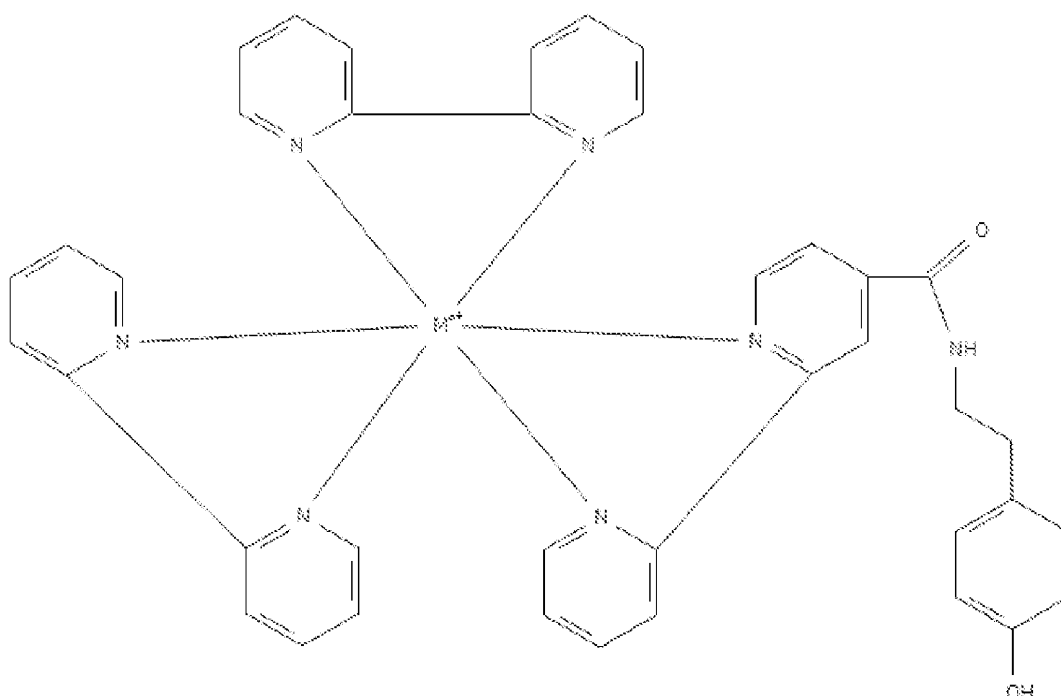
AECLタグが、以下：

10

20

30

40



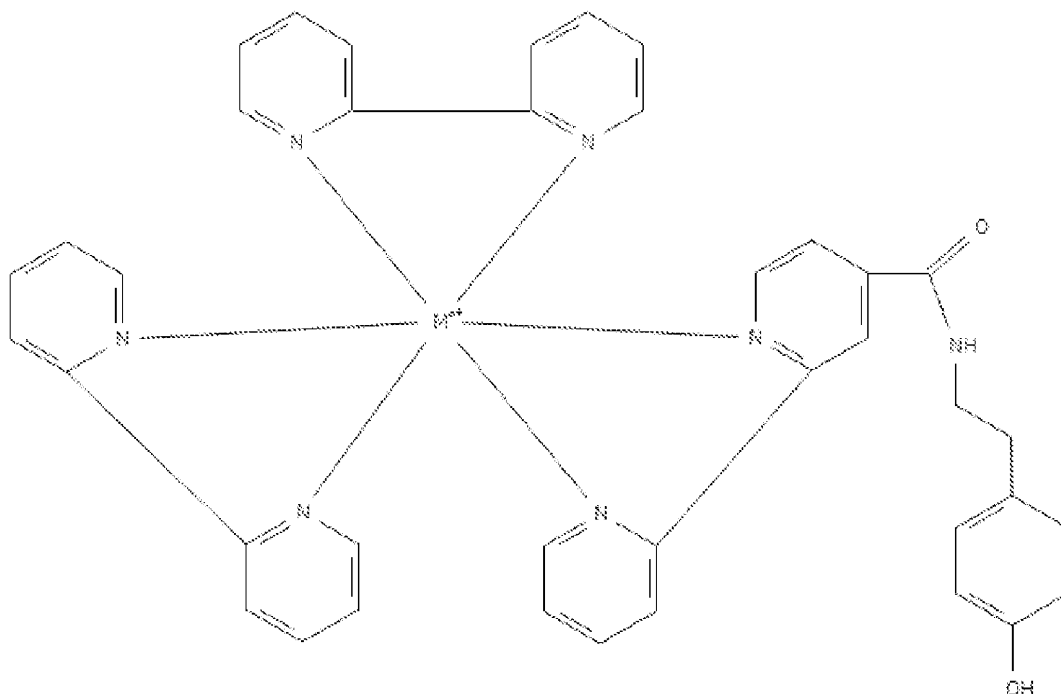
10

を含む、請求項1～2のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 4】

20

AECLタグが、以下：



30

を含み、式中、 M^{n+} が Ru^{2+} である、請求項1～2のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 2 5】

タグ付け用溶液が過酸化水素を含む、請求項1～2のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 6】

検出溶液がトリプロピルアミンを含む、請求項25記載の方法。

【請求項 2 7】

少なくとも2個のAECLタグが複合体に結合する、請求項1～2のいずれか一項記載の方法

。

【請求項 2 8】

サンプル中の100fg/mLの濃度の標的生体分子を検出し得る、請求項1記載の方法。

【請求項 2 9】

50

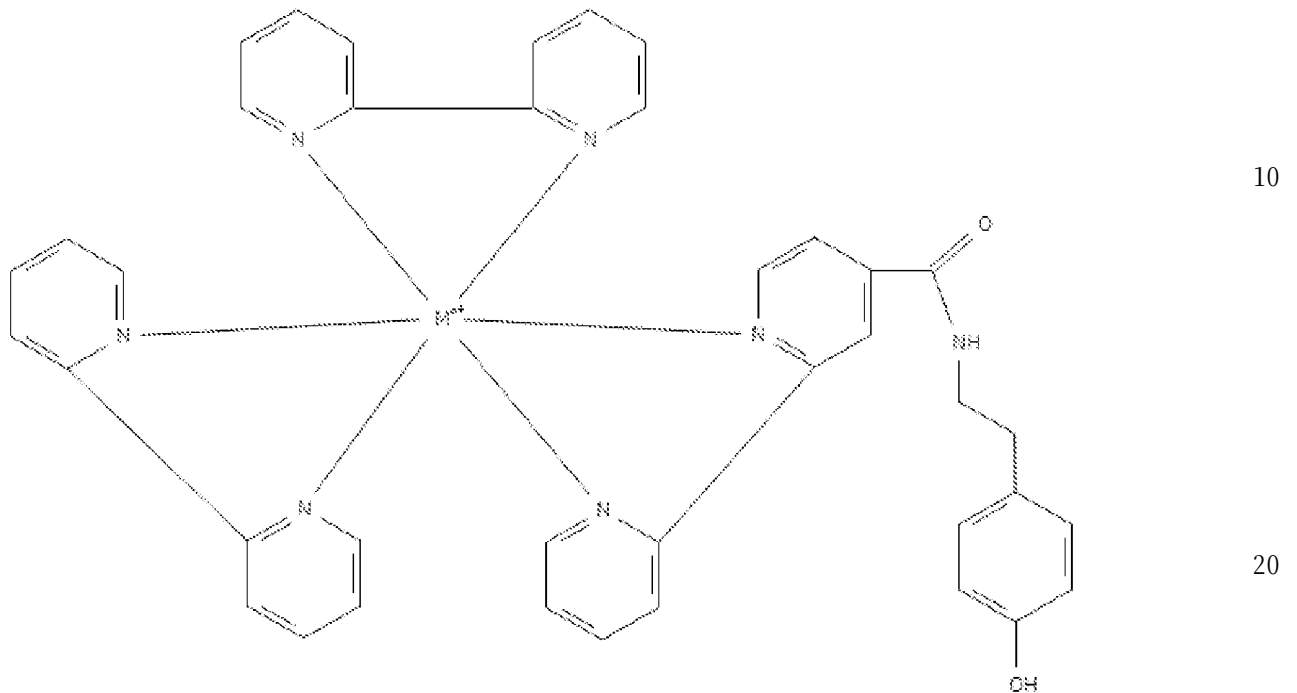
サンプル中の10fg/mLの標的生体分子を検出し得る、請求項28記載の方法。

【請求項30】

サンプル中の1fg/mLの標的生体分子を検出し得る、請求項29記載の方法。

【請求項31】

以下：



を含む、AECLタグ組成物。

【請求項32】

M^{n+} が Ru^{2+} である、請求項31記載のAECLタグ組成物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

背景

典型的なマイクロアレイシステムは、一般的に、ガラス、プラスチック、またはシリコンチップのような固体平面上に形式を合わせた、DNA、タンパク質、またはペプチドなどの生体分子プローブ、それに加えて、サンプルを扱うために必要とされる機器（自動ロボット工学）、レポーター分子を読み取るために必要とされる機器（スキャナー）、およびデータを解析するために必要とされる機器（バイオインフォマティクスツール）を含む。マイクロアレイ技術により、1平方センチメートルあたり多くのプローブのモニタリングが容易となり得る。多数のプローブを用いる利点には、速度、適応性、包括性、および大量製造の相対的により安価なコストが含まれるが、それらに限定されるわけではない。そのようなアレイの用途には、病原体の検出および同定を含めた診断微生物学、抗菌剤耐性の調査、疫学的系統分類、癌遺伝子の調査、宿主ゲノム発現を用いた微生物感染についての解析、ならびに多型プロファイルが含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0002】

電気化学発光または電気発生化学発光（ECL）は、溶液中での電気化学反応の間に產生される発光の1種である。電気発生化学発光において、電気化学的に発生した中間体は、発エルゴン性の高い反応を受けて、電子的に励起された状態を生じ、それは次いで、より低レベルの状態へ緩和されると光を放出する。光の放出光子のこの波長は、これら2つの状態の間のエネルギーギャップに相当する。ECL励起は、電気発生種のエネルギー電子移動（レドックス）反応によって引き起こされ得る。そのような発光励起は、1種/すべての反応物が電極上で電気化学的に產生される化学発光の一形態である。

【0003】

ECLは、通常、非プロトン性有機溶媒（ECL組成物）中に発光種（多環芳香族炭化水素、金属錯体、量子ドット、またはナノ粒子）の溶液を含有する電気化学セルの電極への電位（数ボルト）の適用中に観察される。有機溶媒中で、発光種の酸化型および還元型の両方は、異なる電極で同時に、または酸化および還元間でその電位を一掃することによって単一電極で産生され得る。励起エネルギーは、酸化種および還元種の再結合により得られる。

【0004】

大部分が分析的適用に用いられる水性溶媒中では、水自体の電気化学的分裂により、発光種の同時の酸化および還元は達成するのが困難であり、そのため共反応物を用いたECL反応が用いられる。後者の場合、発光種は、いくつかの化学転換の後に強力な還元剤を与える共反応物とともに電極で酸化される（酸化的還元メカニズム）。

【0005】

様々な濃度の多数の分析物を同時に検出し得るプラットフォームが必要である。典型的なELISAベースのアッセイは4桁の大きさを有し、それゆえug/mlからfg/mlまで変動する多数の分析物を検出することにおいて制限される。電気化学発光における最近の進歩は、検出の限界をpg/mlまで押し広げており、対数スケールで最高4～5桁のダイナミックレンジを有する。しかしながら、電気化学発光に用いられるタグの制限により、6桁またはそれを上回る桁の大きさの様々な濃度の多数の分析物の同時検出は可能になっていない。

【発明の概要】

【0006】

概要

本発明は、いくつかの局面において、製剤、基板、およびアレイを包含する。本発明は、製剤、基板、およびアレイを用いて分析物を検出する方法も含む。

【0007】

一局面において、本発明は、標的生体分子を含むサンプルと、基板上の規定された位置に固定化されておりかつ標的生体分子に特異的に結合し得る捕捉リガンドとを接触させる工程であって、それによって標的生体分子が基板上の規定された位置に固定化される、工程；固定化標的生体分子と、固定化標的生体分子に特異的に結合し得かつペルオキシダーゼ活性を有し得る検出リガンドとを接触させる工程であって、それによって固定化標的生体分子－検出リガンド複合体が形成される、工程；複合体とAECLタグを含むタグ付け用溶液とを、複合体への複数のAECLタグの共有結合を促進する条件下で接触させる工程；基板を洗浄して、未結合AECLタグを基板から除去する工程；基板と、結合しているAECLタグと反応して基板上の規定された位置に電圧が適用された場合に発光をもたらす検出溶液とを接触させる工程；基板上の規定された位置に電圧を適用する工程；および基板上の規定された位置からの発光を測定する工程であって、それによって標的生体分子を検出する、工程、を含む、標的生体分子を検出する方法を含む。

【0008】

ある特定の態様において、基板上の規定された位置は、1つのマイクロアレイフィーチャ（feature）または複数のマイクロアレイフィーチャである。ある特定の態様において、フィーチャは、50nm～1μmまたは50nm～100nmまたは50nm～75nmの辺縁寸法を有してよい。ある特定の態様において、捕捉リガンドは、基板上に提供されたCOOHまたはNH₂部分を介して、規定された位置に共有結合している。

【0009】

ある特定の態様において、捕捉リガンドおよび検出リガンドには、抗体、ペプチド、タンパク質、または抗原結合タンパク質が含まれる。

【0010】

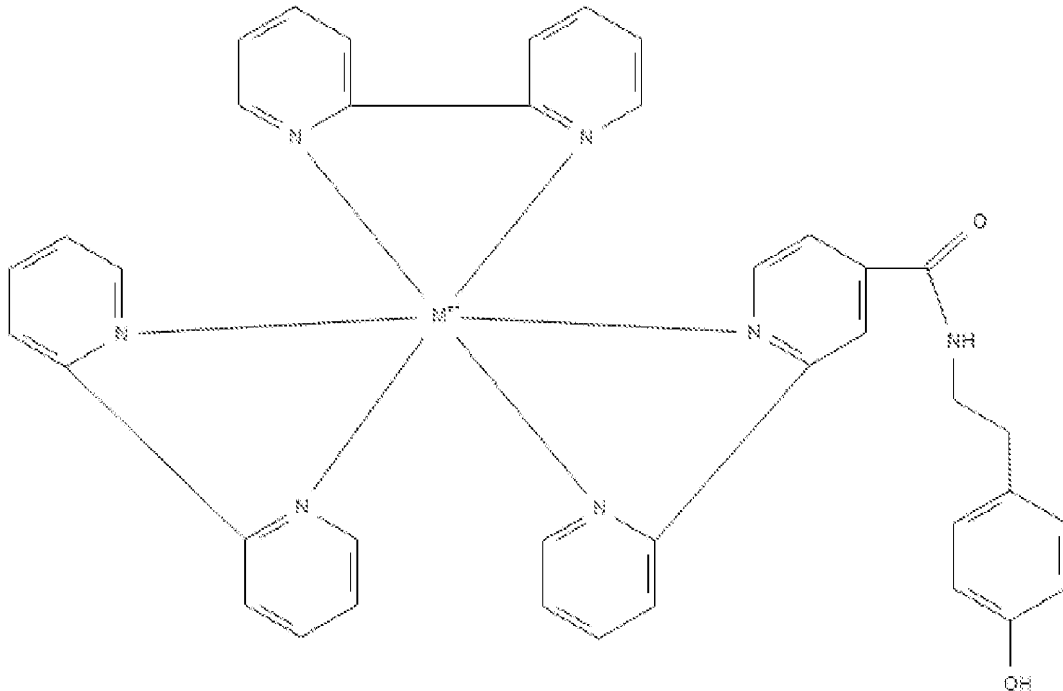
ある特定の態様において、サンプルには、血液、血清、血漿、唾液、尿、糞便、または脳脊髄液（CSF）が含まれていてもよい。

【0011】

ある特定の態様において、サンプルはヒト対象から得られる。

【0012】

ある特定の態様において、AECLタグには、金属キレート、希土類金属キレート、ルテニウムキレート、またはトリス(ピリジン)ルテニウム(II)が含まれる。AECLタグは、金属キレートに結合したチラミドをさらに含んでよい。ある特定の態様において、AECLタグは、以下：



を含み、式中、 M^{n+} は Ru^{2+} である。

【0013】

ある特定の態様において、本発明は、AECLタグ組成物だけでなく、AECLタグ組成物を標的生体分子に結合させるための、ならびに放出された発光シグナルによりそれらの結合を検出するための、キットおよび溶液を含む。

【0014】

他の態様において、本発明は、固体状マイクロアレイ、およびマイクロアレイを載せかつAECLアッセイを実施するためのピラー集合体を含む。ある特定の態様において、固体状マイクロアレイは、捕捉リガンドに共有結合させ得るCOOHまたはNH₂官能基を含む化学的に官能化された表面を含む。

【0015】

いくつかの態様において、本発明の固体状マイクロアレイは、結合しているAECLタグからの電気化学発光をもたらす、少なくとも一対の作用電極と対電極との間の電位差を有する。

【0016】

いくつかの態様において、固体状マイクロアレイは、少なくとも2、4、8、16、32、64、100、200、500、1000、2000、5000、10,000、15,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、1,000,000、1,500,000、2,000,000個、またはそれを上回る数の作用電極を含む。

【0017】

いくつかの局面において、本発明は、固体状マイクロアレイを載せるためのアッセイプレートを含む。アッセイプレートは、上面および底面を含むピラーを含む。上面は、本発明の固体状マイクロアレイを受け止める搭載面、ならびに固体状マイクロアレイの底面上の対応する少なくとも1つの作用電極および対電極と接触するようにかつ電氣的に連絡するように構成された少なくとも1つの作用電極および1つの対電極を含む。ピラーの底面は、少なくとも1つのピラー作用電極およびピラー対電極に電力を供給するための接点を含

10

20

30

40

50

む。いくつかの態様において、アッセイプレートは、24、96、384、または1586個のピラーなど、複数のピラーを含む。いくつかの態様において、ピラーは、少なくとも2、4、8、16、32、64、100、200、500、1000、2000、5000、10,000、15,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、1,000,000、1,500,000、2,000,000個、またはそれを上回る数の作用電極を含む。

【0018】

いくつかの態様において、本発明は、対応するピラーおよびマイクロアレイの作用電極および対電極が電氣的に接触するように、アッセイプレートピラーの表面に載せられたマイクロアレイを有するアッセイプレートを含む集合体を含む。さらに他の態様において、本発明の集合体はアッセイキャップをさらに含み、アッセイキャップは、ピラーマウントの溝とスライド可能に係合する支柱上に載せられたピラー壁を提供する。キャップとアッセイプレートとがかみ合った場合、ピラー壁は、マイクロアレイと接触しているアッセイ流体を保持し得る貯留部にバリアを提供する。

10

【0019】

さらに他の態様において、本発明のAECLアッセイは、サンプル中の標的生体分子の濃度が、100fg/mL、10fg/mL、または1fg/mLの桁の限界で検出され得るような、向上した検出限界を有する。

[本発明1001]

以下の工程を含む、標的生体分子を検出する方法：

標的生体分子を含むサンプルと、基板上の規定された位置に固定化されておりかつ該標的生体分子に特異的に結合し得る捕捉リガンドとを接触させる工程であって、それによって該標的生体分子が基板上の規定された位置に固定化される、工程；

20

固定化標的生体分子と、該固定化標的生体分子に特異的に結合し得かつペルオキシダーゼ活性を有し得る検出リガンドとを接触させる工程であって、それによって固定化標的生体分子-検出リガンド複合体が形成される、工程；

該複合体と、AECLタグを含むタグ付け用溶液とを、該複合体への複数のAECLタグの共有結合を促進する条件下で接触させる工程；

未結合AECLタグを基板から除去するために、基板を洗浄する工程；

基板と、結合しているAECLタグと反応して基板上の規定された位置に電圧が適用された場合に発光をもたらし検出溶液とを接触させる工程；

30

基板上の規定された位置に電圧を適用する工程；および

基板上の規定された位置からの発光を測定する工程であって、それによって標的生体分子を検出する、工程。

[本発明1002]

基板上の規定された位置が、1つのマイクロアレイフィーチャまたは複数のマイクロアレイフィーチャを含む、本発明1001の方法。

[本発明1003]

1つまたは複数のフィーチャが、50nm～1μmの辺縁寸法を有する、本発明1002の方法。

[本発明1004]

辺縁寸法が50nm～100nmである、本発明1003の方法。

40

[本発明1005]

辺縁寸法が50nm～75nmである、本発明1004の方法。

[本発明1006]

捕捉リガンドが、基板上に設けられたCOOH部分を介して、基板上の規定された位置に共有結合している、本発明1001の方法。

[本発明1007]

捕捉リガンドが、基板上に設けられたNH₂部分を介して、基板上の規定された位置に共有結合しているリガンドである、本発明1001の方法。

[本発明1008]

捕捉リガンドおよび検出リガンドが抗体を含む、本発明1001～1002のいずれかの方法。

50

[本発明1009]

捕捉リガンドがペプチドを含む、本発明1001～1002のいずれかの方法。

[本発明1010]

捕捉リガンドがタンパク質を含む、本発明1001～1002のいずれかの方法。

[本発明1011]

標的生体分子がペプチドを含む、本発明1001～1002のいずれかの方法。

[本発明1012]

標的生体分子がタンパク質を含む、本発明1001～1002のいずれかの方法。

[本発明1013]

タンパク質が抗体である、本発明1012の方法。

10

[本発明1014]

サンプルが、血液、血清、血漿、唾液、尿、糞便、または脳脊髄液（CSF）を含む、本発明1001～1002のいずれかの方法。

[本発明1015]

サンプルがヒトから得られる、本発明1001～1002のいずれかの方法。

[本発明1016]

検出リガンドが抗体－ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合体を含む、本発明1001～1002のいずれかの方法。

[本発明1017]

AECLタグが金属キレートを含む、本発明1001～1002のいずれかの方法。

20

[本発明1018]

金属が希土類金属である、本発明1017の方法。

[本発明1019]

希土類金属がルテニウムである、本発明1018の方法。

[本発明1020]

AECLタグがトリス(ビピリジン)ルテニウム(II)を含む、本発明1017の方法。

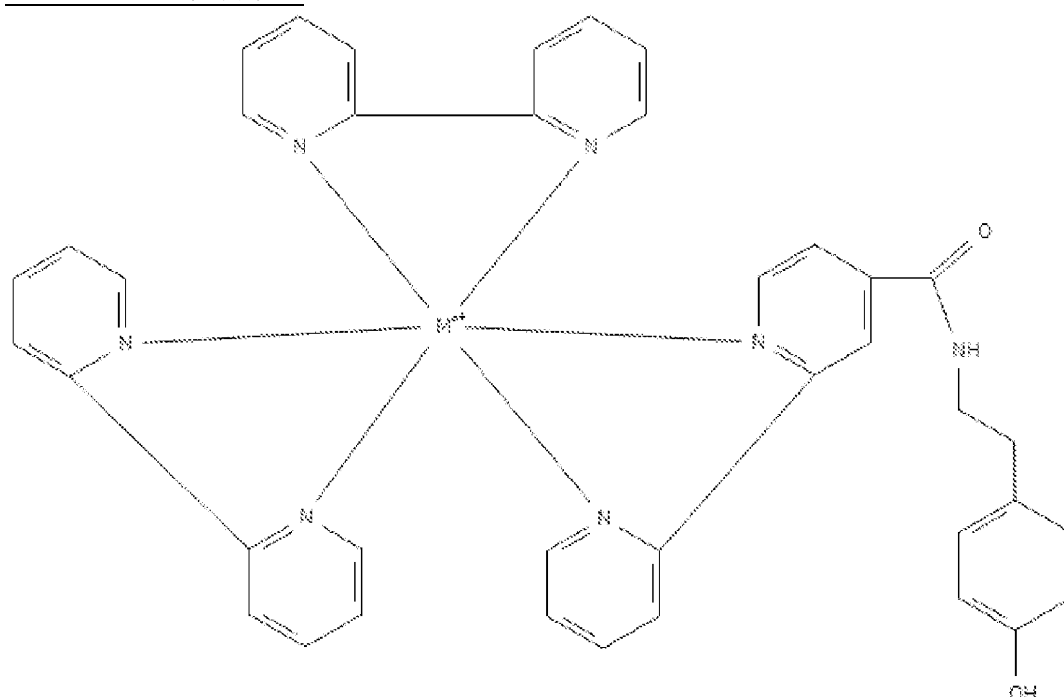
[本発明1021]

AECLタグが、金属キレートに結合したチラミドをさらに含む、本発明1001～1002のいずれかの方法。

[本発明1022]

AECLタグが、以下：

30



40

を含み、式中、 M^{n+} が Ru^{2+} である、本発明1001～1002のいずれかの方法。

50

[本発明1023]

タグ付け用溶液が過酸化水素を含む、本発明1001～1002のいずれかの方法。

[本発明1024]

検出溶液がトリプロピルアミンを含む、本発明1023の方法。

[本発明1025]

少なくとも2、5、10、20、50、100、200、500、または1,000個のAECLタグが複合体に結合する、本発明1001～1002のいずれかの方法。

[本発明1026]

サンプル中の100fg/mLの濃度の標的生体分子を検出し得る、本発明1001の方法。

[本発明1027]

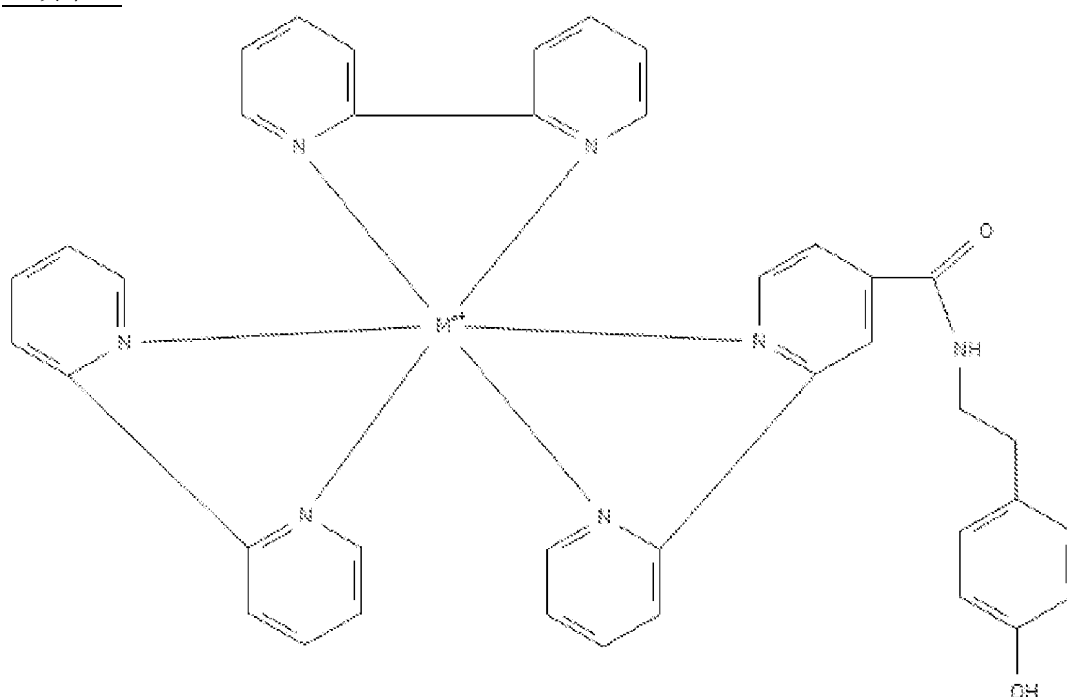
サンプル中の10fg/mLの標的生体分子を検出し得る、本発明1026の方法。

[本発明1028]

サンプル中の1fg/mLの標的生体分子を検出し得る、本発明1027の方法。

[本発明1029]

以下：



を含む、AECLタグ組成物。

[本発明1030]

M^{n+} が Ru^{2+} である、本発明1029のAECLタグ組成物。

[本発明1031]

マイクロアレイと一体化した作用電極および対電極のアドレス指定可能なネットワークを含み、該作用電極が、官能基を含む化学的に官能化された表面を含む、固体状マイクロアレイ。

[本発明1032]

化学的に官能化された表面がCOOH官能基を含む、本発明1031の固体状マイクロアレイ。

[本発明1033]

化学的に官能化された表面がNH₂官能基を含む、本発明1031の固体状マイクロアレイ。

[本発明1034]

官能基が捕捉リガンドに共有結合している、本発明1031の固体状マイクロアレイ。

[本発明1035]

捕捉リガンドが、ペプチドおよびタンパク質からなる群より選択される、本発明1034の固体状マイクロアレイ。

[本発明1036]

10

20

30

40

50

タンパク質が抗原結合タンパク質である、本発明1035の固体状マイクロアレイ。

[本発明1037]

抗原結合タンパク質が抗体である、本発明1036の固体状マイクロアレイ。

[本発明1038]

作用電極に結合した複数の生体分子複合体をさらに含み、該生体分子複合体が、少なくとも2、5、10、20、50、100、200、500、または1,000個の結合したAECLタグを含む、本発明1031の固体状マイクロアレイ。

[本発明1039]

AECLタグが金属キレートを含む、本発明1038の固体状マイクロアレイ。

[本発明1040]

金属が希土類金属である、本発明1039の固体状マイクロアレイ。

[本発明1041]

希土類金属がルテニウムである、本発明1040の固体状マイクロアレイ。

[本発明1042]

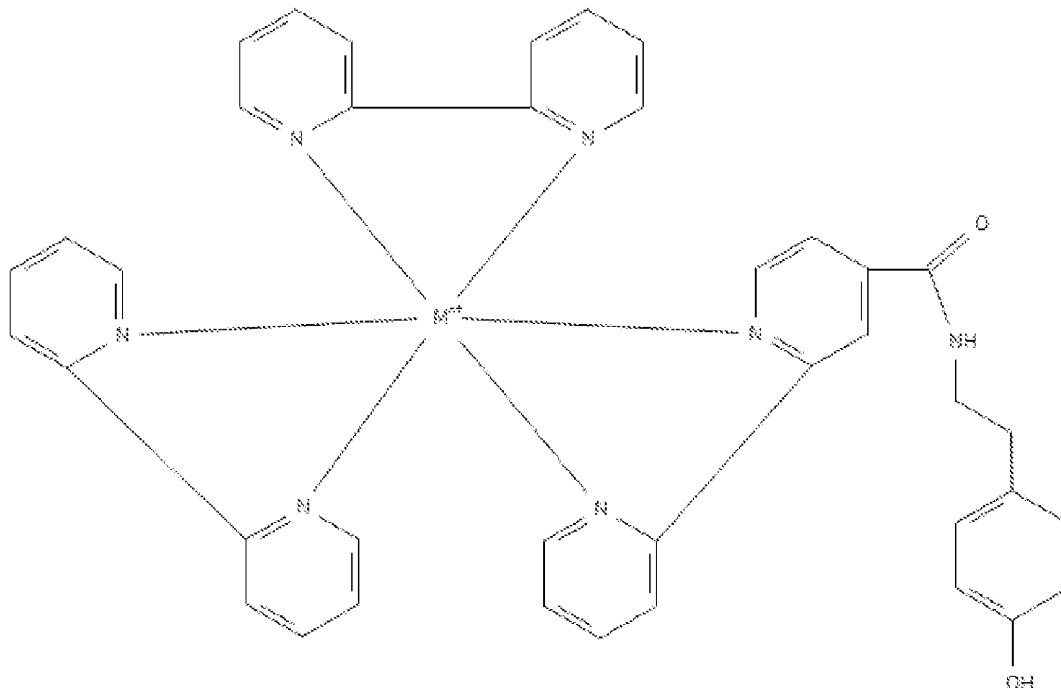
AECLタグがトリス(ピリジン)ルテニウム(II)を含む、本発明1038の固体状マイクロアレイ。

[本発明1043]

AECLタグが、金属キレートに結合したチラミドをさらに含み、本発明1039～1042のいずれかの固体状マイクロアレイ。

[本発明1044]

AECLタグが、以下：



である、本発明1039～1043のいずれかの固体状マイクロアレイ。

[本発明1045]

少なくとも一对の作用電極と対電極との間に電位差が存在し、該電位差がAECLタグからの電気化学発光をもたらす、本発明1038～1043のいずれかの固体状マイクロアレイ。

[本発明1046]

アレイが、少なくとも2、4、8、16、32、64、100、200、500、1000、2000、5000、10,000、15,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、1,000,000、1,500,000、2,000,000個、またはそれを上回る数の作用電極を含む、本発明1031～1043のいずれかの固体状マイクロアレイ。

[本発明1047]

固体状マイクロアレイを載せるためのアッセイプレートであって、アッセイプレートが

ピラーを含み、ピラーが上面および底面を含み、上面が、本発明1031～1046のいずれかの固体状マイクロアレイを受け止める搭載面、ならびに固体状マイクロアレイの底面上の対応する少なくとも1つの作用電極および対電極と接触するようにかつ電氣的に連絡するように構成された少なくとも1つの作用電極および1つの対電極を含み、ピラーの底面が、少なくとも1つのピラー作用電極および対電極に電力を供給するための接点を含む、アッセイプレート。

[本発明1048]

複数のピラーを含む、本発明1047のアッセイプレート。

[本発明1049]

前記複数の、24、96、384、または1586個である、本発明1048のアッセイプレート。

[本発明1050]

ピラーのそれぞれが、少なくとも2、4、8、16、32、64、100、200、500、1000、2000、5000、10,000、15,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、1,000,000、1,500,000、2,000,000個、またはそれを上回る数の作用電極を含む、本発明1047～1049のいずれかのアッセイプレート。

[本発明1051]

本発明1047～1050のいずれかのアッセイプレートのピラーマウント表面に載せられた本発明1031～1046のいずれかの固体状マイクロアレイを含み、固体状マイクロアレイの作用電極および対電極が、ピラーの作用電極および対電極と電氣的に連絡している、集合体。

[本発明1052]

少なくとも50、100、200、または500種の別個の分析物を、単一ピラー上に載せられた1つまたは複数の固体状マイクロアレイで検出することができる、本発明1051の集合体。

[本発明1053]

アッセイプレートと係合するように構成されたアッセイキャップをさらに含み、かつピラー壁を載せたピラー支柱を含み、ピラー支柱が、アッセイプレートピラーの側面の対応する溝にスライドするように構成されており、それによってピラー壁がピラーの上面に位置付けされる、本発明1047～1052のいずれかのアッセイプレートまたは集合体。

[本発明1054]

ピラー壁が、固体状マイクロアレイと接触しているアッセイ溶液を含有するための貯留部を構成する、本発明1053のアッセイプレートまたは集合体。

【図面の簡単な説明】

【0020】

本発明のこれらのおよび他の特長、局面、および利点は、以下の説明および添付の図面に関してよりよく理解されるようになるであろう。

【0021】

【図1】 チラミドに結合した金属キレートエステルを含む、増幅された電気化学発光（ECL）タグの態様の構造を示している。

【図2】 先行技術による、抗体に結合したホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）によって触媒されるチラミドシグナル増幅の過程を示している。チラミドは、蛍光マーカーに結合している。二次抗体に局在化されたHRPは、標的内の電子リッチな部分（主に、チロシン残基）へのチラミドの結合を触媒する。

【図3】 先行技術による、ECLタグ付き二次抗体、および捕捉された標的生体分子を定量化するために用い得る検出可能な光シグナルを産生するトリプロピルアミン（TPA）の存在下での電圧の適用を用いて、捕捉された標的生体分子を検出するサンドイッチELISAを示している。

【図4】 二次抗体－ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）結合体を用いて、捕捉された標的生体分子を検出する、本発明のサンドイッチELISA態様を図説している。過酸化水素の存在下でECLタグが添加されると、HRPは、結合している二次抗体に最も近い電子リッチな標的（主に、チロシン残基）へのECLタグのチラミド部分の結合を触媒し、ゆえに捕捉された標的生体分子複合体は多数のECLタグで標識される。TPAの存在下での電

10

20

30

40

50

圧の適用は、捕捉された標的生体分子を定量化するために用い得る、増幅された光シグナルを産生する。

【図5】アレイの電極およびウェルの配置についての断面図、上面図、および底面図を図説している。一態様において、アレイは、本明細書において記載される電気化学発光検出法とともに用いられる。

【図6】1フィーチャ群、4フィーチャ群、または16フィーチャ群を含むチップに関する上面図および底面図（電極およびウェルの配置の態様を含む）を示している。

【図7】1ピラー群、4ピラー群、または16ピラー群を含むチップに関する上面図および底面図を示している。

【図8】4個のAECLマイクロアレイアッセイチップが載せられているAECLピラーマウント（上部左）の詳細な図解を示している。示されているように、9個の別個のピラーマウントを含むAECLアッセイプレート（下部右）を覆うために、AECLアッセイキャップ（上部右）が用いられる。アッセイキャップは、アッセイプレートピラーの側面の溝に係合する、支柱上に載せられたピラー壁を含む。ピラーマウントの上面と接続させると、ピラー壁は、AECLアッセイ溶液を保つ貯留部を形成する（下部左、側面図を参照されたい）。

【図9】アッセイプレート上の単一ピラーでの分析物のAECL検出についての図解を示している。

【図10A】AECLチップ製造過程における工程を示している。

【図10B】AECLチップ製造過程における工程を示している。

【図11A】AECLピラーマウント製造過程における工程を示している。

【図11B】本発明の一態様に従ったAECLピラーマウントの上面図を示している。

【図12】本発明の一態様に従った、TNF- α に対するECLおよびAECLバイオチップアッセイの結果を比較している。Y軸は任意単位での発光であり、X軸は、アッセイされたサンプル溶液における1mLあたりのTNF- α の量である。ゆえに、X軸上の100ngは、アッセイされたサンプル溶液における100ng/mLのTNF- α 濃度に相当する。

【発明を実施するための形態】

【0022】

詳細な説明

特許請求の範囲および本明細書において用いられる用語は、別様に指定されていない限り、下記に明記されるように定義される。

【0023】

本明細書において使用するとき、「ウェハ」という用語は、一般的に集積回路の製作において用いられるシリコンまたはゲルマニウム結晶などの半導体材料の薄片を指す。ウェハは、例えば275 μ m～775 μ mの厚さを有して、1次元に沿って例えば25.4mm（1インチ）～300mm（11.8インチ）の多様なサイズであり得る。

【0024】

本明細書において使用するとき、「生体分子」、「ポリペプチド」、「ペプチド」、または「タンパク質」という用語は、結合によって一緒に連結されているアミノ酸の鎖またはポリマーを説明するために代替可能に用いられる。したがって、本明細書において用いられる「ペプチド」という用語には、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、およびポリペプチドが含まれる。「ペプチド」という用語は、任意の特定の数のアミノ酸に限定されない。いくつかの局面において、ペプチドは、約2～約50個のアミノ酸、約5～約40個のアミノ酸、または約5～約20個のアミノ酸を含有する。酵素を含めた、タンパク質またはポリペプチドなどの分子は、それが自然界に天然に存在することを意味する、「天然」または「野生型」の分子であり得、あるいはそれは、それが作製された、変更された、誘導された、または天然分子とはもしくは変異体などの別の分子とは何らかの点で異なっているもしくは変化していることを意味する、「変異体」、「変種」、「誘導体」、または「改変体」であり得る。

【0025】

本明細書において使用するとき、「マイクロアレイ」という用語は、タンパク質（例え

10

20

30

40

50

ば、抗体、抗体フラグメント、または他のポリペプチド配列)または特異的DNA結合配列の種々のプローブ分子が、規則正しい様式で別個の位置に貼り付けられており、ゆえに微視的アレイが形成されている基板を指す。フィーチャと称されるアレイ単位内には、特異的プローブが大量のコピー数(例えば、 10^6)で存在している。アレイは、フィーチャ密度(例えば、 $\#$ フィーチャ/ cm^2)、フィーチャの総数、フィーチャ辺縁の長さ、フィーチャ面積、またはフィーチャ間の分離(アレイの「ピッチ」と呼ばれることもある)によって特徴付けされ得る。

【0026】

本明細書において使用するとき、「マイクロアレイシステム」という用語は、ガラス、プラスチック、またはシリコンチップのような固体平面上に形式を合わせた生体分子プローブ、それに加えて、サンプルを扱うために必要とされる機器(自動ロボット工学)、レポーター分子を読み取るために必要とされる機器(スキャナー)、およびデータを解析するために必要とされる機器(バイオインフォマティクスツール)から通常構成されるシステムを指す。

10

【0027】

本明細書において使用するとき、「免疫学的結合」および「免疫学的結合特性」という用語は、免疫グロブリン分子(または、scFvなどのその変種)と、免疫グロブリンが特異的である抗原との間で生じる、非共有結合性相互作用のタイプを指す。

【0028】

本明細書において使用するとき、「生物学的サンプル」という用語は、関心対象の分析物についてアッセイされ得る、生物学的な組織または流体に由来するサンプルを指す。そのようなサンプルには、痰、羊水、血液、血液細胞(例えば、白血球)、組織生検もしくは細針生検サンプル、尿、腹水、および胸水、またはそれら由来の細胞が含まれるが、それらに限定されるわけではない。生物学的サンプルには、組織学的目的で採取された凍結切片など、組織の切片も含まれ得る。サンプルは典型的にヒト患者から採取されるが、アッセイを用いて、任意の生物(例えば、哺乳類、細菌、ウイルス、藻類、または酵母)、またはイヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、およびブタなどの哺乳類由来のサンプルにおける関心対象の分析物を検出することができる。サンプルは、適切な緩衝液での希釈によって必要に応じて前処理され得、または所望の場合には濃縮され得る。

20

【0029】

本明細書において使用するとき、「アッセイ」という用語は、物質の複合混合物を含有し得る溶液における、関心対象の物質の存在または濃度を測定する生化学的試験の一種を指す。

30

【0030】

本明細書において用いられる「対象」という用語は、試験、診断、または処置に対する障害を有する、ヒトまたは他の任意の動物を指し得る。

【0031】

本明細書において用いられる「抗原」という用語は、対象の免疫系による免疫応答、例えば免疫系による抗体の産生、および/または免疫系の細胞性免疫応答の活性化(例えば、抗原に応答した種々のサイトカインの放出に伴った、食細胞、ナチュラルキラー細胞、および抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球の活性化)の引き金となる分子を指す。抗原は、外因性、内因性、または自己抗原であり得る。外因性抗原は、吸入、摂取、または注入により外部から身体に入ったものである。内因性抗原は、正常な細胞代謝の結果としてまたはウイルスもしくは細胞内細菌感染が原因で、以前は正常であった細胞内に生成されたものである。自己抗原は、宿主身体内に存在している正常なタンパク質またはタンパク質複合体であるが、免疫応答を刺激し得るものである。

40

【0032】

本明細書において使用するとき、「エピトープ」または「免疫活性領域」という用語は、適応免疫系の成分、例えば抗体またはT細胞受容体によって結合され得る抗原の固有の分子表面特質を指す。抗原分子は、特異的抗体に対する相互作用の場としての役割を果た

50

し得るいくつかの表面特質を提示し得る。任意のそのような固有の分子特質がエピトープを構成し得る。したがって、抗原は、そのそれぞれが特定のエピトープに特異的であるいくつかの固有の抗体によって結合される潜在性を有する。

【0033】

本明細書において使用するとき、「抗体」または「免疫グロブリン分子」という用語は、免疫系の特定のタイプの細胞であるB細胞によって天然に分泌される分子を指す。抗体の5種の異なった天然に存在するアイソタイプ、すなわち：IgA、IgM、IgG、IgD、およびIgEがある。

【0034】

本明細書において使用するとき、「免疫関連分子」という用語は、免疫応答の活性化または調節に関与する生物学的分子を指す。これらには、例えば抗体、T細胞受容体、またはMHC複合体（例えば、ヒト白血球抗原）が含まれる。

10

【0035】

本明細書において使用するとき、「炎症応答分子」という用語は、炎症応答を示唆するまたは仲介する分子、例えばインターロイキンおよび腫瘍壊死因子などのサイトカインを指す。炎症応答分子には、例えば炎症促進性分子が含まれる。

【0036】

本明細書において使用するとき、「自己免疫障害」という用語は、対象の免疫系に対象自身の組織を損傷させる、免疫系の異常な機能によって特徴付けされる大きな群の疾患のうちのいずれかを指す。セリアック病、エリテマトーデス、および関節リウマチは、自己免疫障害の例である。自己免疫障害は、環境因子によって誘発され得る。

20

【0037】

2種またはそれを上回る種類の核酸またはポリペプチド配列の文脈における「同一性パーセント」または「配列同一性パーセント」という用語は、下記に記載される配列比較アルゴリズム（例えば、BLASTPおよびBLASTN、または当業者にとって利用可能な他のアルゴリズム）の1つを用いてまたは目視検査によって測定される、最大一致に対して比較しかつ整列させた場合に同じであるヌクレオチドまたはアミノ酸残基の特定パーセンテージを有する、2種またはそれを上回る種類の配列または部分配列を指す。適用に応じて、「同一性」パーセントは、比較されている配列の領域にわたって、例えば機能ドメインにわたって存在し得、あるいは比較される対象となる2種の配列の全長にわたって存在し得る。

30

【0038】

配列比較に関して、典型的には、1種の配列が、試験配列を比較する参照配列としての役割を果たす。配列比較アルゴリズムを用いる場合、試験配列および参照配列をコンピューターに入力し、必要な場合には部分配列座標を指定し、かつ配列アルゴリズムプログラムパラメーターを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムにより、指定されたプログラムパラメーターに基づき、参照配列に対する試験配列についての配列同一性パーセントが算出される。

【0039】

比較のための配列の最適なアラインメントは、例えばSmith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981) の局所的相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970) の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988) の類似性検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピューターによる実行 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.における、GAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA) によって、または目視検査（概して、下記Ausubel et al.を参照されたい）によって行われ得る。

40

【0040】

配列同一性および配列類似性パーセントを判定するのに適しているアルゴリズムの一例は、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990) に記載されているBLASTアルゴリズムである。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、国立生物工学情報センタ

50

ー (National Center for Biotechnology Information) ウェブサイトを通じて公的に入手可能である。

【0041】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用するとき、「一つの (a)」、「一つの (an)」、および「その (the)」という単数形は、文脈において別様にはっきりと記されていない限り、複数形の指示対象を含むことに留意しなければならない。

【0042】

組成物

AECLタグおよび二次抗体

アレイでの、関心対象の生体分子についての増幅された電気化学発光検出のための組成物も本明細書において開示される。一態様において、電気化学発光 (ECL) 部分をシグナル増幅部分と共有結合で連結させて、増幅された電気化学発光 (AECL) タグを生成する化合物が提供される。図1。AECLタグは、トリプロピルアミン (TPA) の存在下で電圧に曝露されると、検出可能な電磁放射線 (すなわち、光) を生成する。一態様において、ECL部分は金属キレートエステルである。一態様において、金属は希土類金属である。一態様において、希土類金属はルテニウム (Ru) である。一態様において、シグナル増幅部分はチラミドである。AECLタグの一部としてのチラミドの使用は、最小限のバックグラウンドを提供する。AECLタグを、高度に局在化した酵素介在性AECLタグ蓄積をもたらす酵素結合型抗原結合タンパク質 (例えば、HRP結合型抗体) とともに用いて、結合している標的分子の検出を向上させる。図4および付随する下記の説明を参照されたい。

【0043】

先行技術のチラミドシグナル増幅アッセイは、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) および過酸化水素の存在下で、(例えば、二次抗体、標的生体分子、および一次抗体上の) チロシン残基への標識チラミドの共有結合をもたらす。標識は、蛍光タグ、または検出可能な反応産物、例えば発色基質に対するアルカリホスファターゼなどの別の酵素の作用によって産生される不溶性産物であり得る。図2を参照されたい。

【0044】

先行技術のECLアッセイは、例えばサンドイッチELISA形式において用いられる二次抗体などの検出リガンドに共有結合した金属キレートエステルを含むECLタグを用いる。ECLタグは、電場に曝露された場合に (例えば、捕捉された標的生体分子を含む結合複合体と電気的に連絡している作用電極および対電極にわたって電圧差を供給することによって)、トリプロピルアミン (TPA) の存在下で光を放出し、現象は電気化学発光と称される (図3)。

【0045】

本発明のいくつかの態様において、関心対象の生体分子を含むサンプルに抗体アレイを曝露する。アレイ表面に結合した少なくとも1種の一次抗体は、関心対象の生体分子に結合する。アレイを洗浄した後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) と結合した二次抗体の溶液にアレイを曝露すると、二次抗体が関心対象の生体分子に結合する。洗浄後、過酸化水素およびAECLタグを含む溶液にアレイを曝露する。AECLタグは、タンパク質に結合した一次抗体、およびHRPと結合した二次抗体を含む、アレイに接着した複合体に結合する。AECLタグは、(二次抗体と結合した) HRPの存在下でチロシンに結合するチラミドを含む。次いで、アレイを洗浄し、かつAECLタグの金属キレートと反応してそれを活性化するトリプロピルアミン (TPA) に曝露すると、電圧電位 (例えば、アレイからの電圧電位) に曝露された場合に化学発光を発生させる。ゆえに、電圧適用下で、金属キレートエステルは、電気化学発光 (ECL) 出力を発生する (図4)。このAECLタグ化の方法は、市販のECLと比較して、検出感度を少なくとも10倍~1000倍向上させる。

【0046】

基板

基板も本明細書において開示される。いくつかの局面において、基板表面は平面 (すなわち、2次元) である。いくつかの局面において、基板表面を遊離カルボン酸基で官能化

する。いくつかの局面において、基板表面を遊離アミン基で官能化する。遊離アミン基で官能化された表面は、少なくとも2個の遊離カルボン酸基を含む分子のカルボン酸基を活性化して反応させ（例えば、カルボジイミドを用いて、カルボン酸基をカルボニル基に変換する）、かつ該分子と基板の表面に結合した遊離アミン基とを反応させることによって、遊離カルボン酸基に変換され得る。いくつかの態様において、多数のカルボン酸基を含む分子は、無水コハク酸、ポリエチレングリコール二酸、ベンゼン-1,3,5-トリカルボン酸、ベンゼンヘキサカルボン酸、またはカルボキシメチルデキストランである。

【0047】

いくつかの局面において、基板は、第1のモノマー構成要素に結合するための官能基を含む多孔質層（すなわち、3次元の層）を含んでよい。いくつかの局面において、基板表面は、ペプチドの接着または合成のためのピラーを含む。いくつかの態様において、多孔質層をピラーの上部に付加する。

10

【0048】

多孔質層基板

用い得る多孔質層は、第1のペプチド構成要素の接着のための、（構成ポリマーに由来するまたは多孔質層に導入されている）カルボン酸官能基を有する、多孔質構造の平らで透過性のポリマー材料である。例えば、多孔質層は、多孔質シリコンの表面へのポリマー構成要素の接着のための官能基を有する多孔質シリコンから構成され得る。別の例において、多孔質層は架橋ポリマー材料を含んでよい。いくつかの態様において、多孔質層は、ポリスチレン、サッカロース、デキストラン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリアクリレート、ポリメチルアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリアクリロイルピロリドン、ポリビニルアセテート、ポリエチレングリコール、アガロース、セファロース、他の従来のクロマトグラフィータイプの材料、ならびにそれらの誘導体および混合物を採用してよい。いくつかの態様において、多孔質層構築材料は、ポリ(ビニルアルコール)、デキストラン、アルギン酸ナトリウム、ポリ(アスパラギン酸)、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(アクリル酸)-ナトリウム塩、ポリ(アクリルアミド)、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)、ポリ(ヒドロキシエチルアクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(スチレンスルホン酸ナトリウム)、ポリ(2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸)、多糖類、およびセルロース誘導体より選択される。好ましくは、多孔質層は10~80%の多孔性を有する。一態様において、多孔質層の厚さは0.01 μm ~約1,000 μm に及ぶ。多孔質層に含まれる細孔サイズは、2nm~約100 μm に及び得る。

20

30

【0049】

本発明の別の局面によれば、反応基が細孔表面に化学的に結合しておりかつ反応種、例えば脱保護されたモノマー構成要素またはポリマー鎖と、例えば化学的に結合することによって相互作用するための使用に適応している、10~80%の多孔性を有する多孔質ポリマー材料を含む基板が提供される。一態様において、反応基はカルボン酸基である。カルボン酸基は、例えばペプチドまたはポリペプチドの、保護されていないアミン基に自由に結合する。

【0050】

一態様において、多孔質層は支持層と接触している。支持層には、例えば金属、プラスチック、シリコン、酸化シリコン、または窒化シリコンが含まれる。別の態様において、多孔質層は、下に記載されるピラー基板の上部などで、パターン化された表面と接触してよい。

40

【0051】

AECLチップ基板

半導体製造過程を用いてAECLチップを生成することができ、AECLチップは、シリコン基板の一方の表面に組み込まれた固体状電極回路と、基板の反対の面の作用電極表面上に通常アレイとしてパターン化されて存在している生体分子フィーチャとを有する。N $\rightarrow$ CもしくはC $\rightarrow$ N配置で、インサイチューでペプチドを合成するためのもの、または共有ケースの

50

WO2013/119845およびPCT/US2013/070207に記載されているもの、ならびに下記に記載されるものなど、カルボジイミドに基づく化学反応を用いて、規定された位置に総タンパク質を拘束するためのものを含めた、ペプチドまたはタンパク質などの生体分子フィーチャをパターン化するのに有用な任意の技術を用いることができる。

【0052】

AECLチップ製造過程は、参照および作用電極への電圧給電を推進して本発明の態様に従って増幅される化学発光シグナルを励起するために用いられる、制御器に取り付けられる集積バイオチップセンサー装置の産生をもたらす。

【0053】

制御器をプログラム化し、アッセイ結果のための画像取得およびデータ記憶を推進するのに用いることもできる。AECLチップ基板製造、および結果として生じたチップのAECLアッセイにおける使用に関するさらなる詳細は、下記の実施例1〜6においてより詳細に記載されている。

【0054】

アレイ

アレイも本明細書において開示される。いくつかの局面において、アレイの表面を遊離カルボン酸で官能化する。いくつかの局面において、遊離カルボン酸を、例えばアレイの表面でのポリペプチド合成中に、アミン基に結合するように活性化する。いくつかの態様において、アレイ上の遊離カルボン酸基の表面密度は、 $10/\text{cm}^2$ 、 $100/\text{cm}^2$ 、 $1,000/\text{cm}^2$ 、 $10,000/\text{cm}^2$ 、 $100,000/\text{cm}^2$ 、 $1,000,000/\text{cm}^2$ 、または $10,000,000/\text{cm}^2$ を上回る。

【0055】

いくつかの局面において、アレイは3次元アレイ、例えば多孔質アレイの表面に接着したフィーチャを含む多孔質アレイであってよい。いくつかの局面において、多孔質アレイの表面には、外表面、および多孔質アレイ内の細孔容積を規定する表面が含まれる。いくつかの局面において、3次元アレイは、ポジション規定された位置で表面に接着したフィーチャを含んでよく、フィーチャはそれぞれ、判定可能な配列および意図される長さのペプチド鎖のコレクションを含む。一態様において、個々のフィーチャ内で、意図される長さを有するコレクション内のペプチド鎖の画分は、各カップリング工程に関して98%を上回る平均カップリング効率によって特徴付けされる。

【0056】

いくつかの局面において、各カップリング工程に関する平均カップリング効率は、少なくとも98.5%である。いくつかの局面において、各カップリング工程に関する平均カップリング効率は、少なくとも99%である。いくつかの局面において、各カップリング工程に関する平均カップリング効率は、少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、98.5、98.6、98.7、98.8、98.9、99.0、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9、または100%である。

【0057】

いくつかの局面において、各ペプチド鎖は、長さが5〜60個のアミノ酸である。いくつかの局面において、各ペプチド鎖は、長さが少なくとも5個のアミノ酸である。いくつかの局面において、各ペプチド鎖は、長さが少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、または60個のアミノ酸である。いくつかの局面において、各ペプチド鎖は、長さが5個未満、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60個、または60個を上回るアミノ酸である。いくつかの局面において、各ペプチド鎖は、1種または複数種のLアミノ酸を含む。いくつかの局面において、各ペプチド鎖は、1種または複数種のDアミノ酸を含む。いくつかの局面において、各ペプチド鎖は、1種または複数種の天然に存在するアミノ酸を含む。いくつかの局面において、各ペプチド鎖は、1種または複数種の合成アミノ酸を含む。

【0058】

いくつかの局面において、アレイは、表面に接着した少なくとも1,000種の異なるペプチド鎖を含み得る。いくつかの局面において、アレイは、表面に接着した少なくとも10,000種の異なるペプチド鎖を含み得る。いくつかの局面において、アレイは、表面に接着した少なくとも100、500、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000種、または10,000種を上回る種類（またはその間にある任意の整数）の異なるペプチド鎖を含み得る。

【0059】

いくつかの局面において、ポジション規定された位置のそれぞれは、他のポジション規定された位置のそれぞれから物理的に分離されている異なる公知の位置にある。いくつかの局面において、ポジション規定された位置のそれぞれは、ポジション識別可能な位置である。いくつかの局面において、各判定可能な配列は公知の配列である。いくつかの局面において、各判定可能な配列は固有の配列である。

10

【0060】

いくつかの局面において、フィーチャは表面に共有結合で接着している。いくつかの局面において、ペプチド鎖は、リンカー分子またはカップリング分子を介して表面に接着している。

【0061】

いくつかの局面において、フィーチャは、公知の配列を有する供給源タンパク質に由来する部分配列を含む、固有の、入れ子になった、重複している複数のペプチド鎖を含む。いくつかの局面において、複数の中の各ペプチド鎖は実質的に同じ長さである。いくつかの局面において、複数の中の各ペプチド鎖は同じ長さである。いくつかの局面において、複数の中の各ペプチド鎖は、長さが少なくとも5個のアミノ酸である。いくつかの局面において、複数の中の各ペプチド鎖は、長さが少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、または60個のアミノ酸である。いくつかの局面において、複数の中の各ペプチド鎖は、長さが5個未満、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60個、または60個を上回るアミノ酸である。いくつかの局面において、複数の中の少なくとも1つのペプチド鎖は、長さが少なくとも5個のアミノ酸である。いくつかの局面において、複数の中の少なくとも1つのペプチド鎖は、長さが少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、または60個のアミノ酸である。いくつかの局面において、複数の中の少なくとも1つのペプチド鎖は、長さが5個未満、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60個、または60個を上回るアミノ酸である。いくつかの局面において、フィーチャ内の各ポリペプチドは実質的に同じ長さである。いくつかの局面において、フィーチャ内の各ポリペプチドは同じ長さである。いくつかの局面において、フィーチャは、それぞれが無作為の判定可能なアミノ酸の配列を有する複数のペプチド鎖を含む。

20

30

【0062】

40

カルボン酸活性化溶液

カルボン酸を活性化するための活性化製剤が本明細書において開示され、それによって、それは生体分子、例えばペプチドの遊離アミノ基と反応することができる。活性化製剤は、カルボン酸基活性化化合物および溶媒などの成分を含んでよい。一態様において、カルボン酸基活性化化合物は、カルボジイミドまたはカルボジイミド前駆体である。いくつかの局面において、カルボジイミドは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドである。いくつかの態様において、カルボン酸基活性化化合物はN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) である。いくつかの態様において、カルボン酸基活性化化合物は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド [EDC]、N-ヒドロキシスクシンイミド [NHS]、1,3-ジイソプロピルカルボジイミド [DIC]、ヒドロキシベンゾトリアゾー

50

ル (HOBt)、(0-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート) [HATU]、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート [PyBOP]、およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン [DIEA] より選択される。いくつかの態様において、溶媒は水である。いくつかの態様において、溶媒はN-メチルピロリドン (NMP) である。いくつかの態様において、カルボン酸基活性化化合物は、カルボン酸をカルボニル基に変換する (すなわち、カルボン酸基活性化)。いくつかの態様において、カルボン酸基は、活性化製剤への曝露後、5、10、15、20、30、45、または60分間活性化される。

【0063】

いくつかの局面において、活性化製剤は、脱イオン水中に溶解された4重量%の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドおよび2重量%のN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) を含む。いくつかの局面において、活性化製剤は、NMP中に溶解された4重量%の1,3-ジイソプロピルカルボジイミド (DIC) および2重量%のヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) を含む。いくつかの局面において、活性化製剤は、NMP中に溶解された4重量%の(0-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート) (HATU) および2重量%のN,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) を含む。いくつかの局面において、活性化製剤は、NMP中に溶解された4重量%のベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (PyBOP) および2重量%のN,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) を含む。

【0064】

いくつかの態様において、カルボン酸基活性化化合物はカルボジイミド前駆体である。一局面において、カルボジイミド前駆体は、放射線、例えば紫外線放射への曝露によりカルボジイミドに変換される。一態様において、カルボジイミド前駆体はチオンである。カルボジイミド前駆体は、光活性化カルボジイミドとも呼ばれ得る。一態様において、光活性化カルボジイミドを用いて、好ましい活性化波長における電磁放射線への光活性化カルボジイミド溶液の曝露を空間的に制御することによって、アレイ上のカルボン酸基の部位特異的活性化を提供する。いくつかの態様において、好ましい活性化波長は248nmである。

【0065】

一態様において、カルボジイミド前駆体は、光活性化によりカルボジイミドに変換されるチオンである。一局面において、チオンは、電磁放射線への曝露後にヒドロキシメチルフェニルカルボジイミドに変換される。いくつかの態様において、チオンは、4,5-ジヒドロ-4-(ヒドロキシメチル)-1-フェニル-1H-テトラゾール-5-チオン、1-エチル-4-ジメチルアミノプロピルテトラゾール5-チオン、1,3-ビス(2,2-ジメチル-1,3-ジオキサラン-4-イルメチル)-5-チオン、4-シクロヘキシル-1H-テトラゾール-5(4H)-チオン、または1-フェニル-4-(ピペリジノメチル)テトラゾール-5(4H)-チオンである。

【0066】

いくつかの態様において、活性化溶液は、カルボジイミド前駆体、溶媒、およびポリマーを含む。一態様において、カルボジイミド前駆体は、4,5-ジヒドロ-4-(ヒドロキシメチル)-1-フェニル-1H-テトラゾール-5-チオン、1-エチル-4-ジメチルアミノプロピルテトラゾール5-チオン、または1,3-ビス(2,2-ジメチル-1,3-ジオキサラン-4-イルメチル)-5-チオンである。いくつかの局面において、カルボジイミド前駆体は、2.5重量%の濃度で活性化溶液中に存在している。いくつかの局面において、カルボジイミド前駆体は、総製剤濃度の0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、または5.0重量%の濃度で活性化溶液中に存在している。

【0067】

いくつかの態様において、溶媒は水である。いくつかの局面において、溶媒は、総製剤濃度の約80~90重量%である。いくつかの局面において、溶媒は、総製剤濃度の約70、70

、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99重量%未満であるか、または99重量%を上回る。

【0068】

いくつかの局面において、ポリマーは、ポリビニルピロリドンおよび/またはポリビニルアルコールである。いくつかの局面において、ポリマーは、総製剤濃度の約0.5～5重量%である。いくつかの局面において、ポリマーは、総製剤濃度の約0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0重量%未満であるか、または5.0重量%を上回る。

10

【0069】

いくつかの局面において、カップリング試薬はカルボジイミドである。いくつかの局面において、カップリング試薬はトリアゾールである。いくつかの局面において、カップリング試薬は1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドである。いくつかの局面において、カップリング試薬は、総製剤濃度の約0.5～5重量%である。いくつかの局面において、カップリング試薬は、総製剤濃度の約0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0重量%未満であるか、または5.0重量%を上回る。

20

【0070】

リンカー製剤

リンカー製剤も本明細書において開示される。リンカー製剤は、溶媒、ポリマー、リンカー分子、およびカップリング試薬などの成分を含んでよい。いくつかの局面において、ポリマーは1重量%のポリビニルアルコールおよび2.5重量%のポリビニルピロリドンであり、リンカー分子は1.25重量%のポリエチレンオキシドであり、カップリング試薬は1重量%の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドであり、かつ溶媒には水が含まれる。いくつかの局面において、ポリマーは0.5～5重量%のポリビニルアルコールおよび0.5～5重量%のポリビニルピロリドンであり、リンカー分子は0.5～5重量%のポリエチレンオキシドであり、カップリング試薬は0.5～5重量%の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドであり、かつ溶媒には水が含まれる。

30

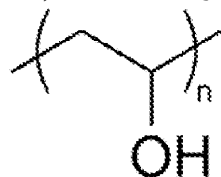
【0071】

いくつかの局面において、溶媒は、水、有機溶媒、またはそれらの組み合わせである。いくつかの局面において、有機溶媒は、Nメチルピロリドン、ジメチルホルムアミド、ジクロロメタン、ジメチルスルホキシド、またはそれらの組み合わせである。いくつかの局面において、溶媒は、総製剤濃度の約80～90重量%である。いくつかの局面において、溶媒は、総製剤濃度の約70、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99重量%未満であるか、または99重量%を上回る。

【0072】

40

いくつかの局面において、ポリマーは、ポリビニルピロリドンおよび/またはポリビニルアルコールである。ポリビニルアルコールの一般的構造は、以下のとおりであり、



式中、nは、1よりも大きい任意の正の整数である。

【0073】

いくつかの局面において、ポリマーは、総製剤濃度の約0.5～5重量%である。いくつか

50

の局面において、ポリマーは、総製剤濃度の約0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0重量%未満であるか、または5.0重量%を上回る。

【0074】

リンカー分子は、本明細書において開示される表面と、カップリング分子により合成されているペプチドとの間に挿入される分子であり得る。リンカー分子は、分子認識官能性など、結果として生じたペプチドに必ずしも官能性をもたらしわけではないが、その代わりに、表面とペプチドとの間の距離を伸長させて、表面上のペプチドの官能性領域の曝露を高め得る。いくつかの局面において、リンカーは、曝露をもたらしために約4個～約40個の原子長であり得る。リンカー分子は、例えばアリアルアセチレン、2～10個のモノマー単位を含有するエチレングリコールオリゴマー（PEG）、ジアミン、二酸、アミノ酸、およびそれらの組み合わせであり得る。ジアミンの例には、エチレンジアミンおよびジアミノプロパンが含まれる。あるいは、リンカーは、例えばアミノヘキサン酸などのアミノ酸誘導体のポリペプチドおよびポリマーなど、合成されているもの（例えば、新生ポリマーまたは種々のカップリング分子）と同じ分子タイプであり得る。いくつかの局面において、リンカー分子は、該分子の第1の末端にカルボン酸基および該分子の第2の末端に保護基を有する分子である。いくつかの局面において、保護基は、t-Boc保護基またはFmoc保護基である。いくつかの局面において、リンカー分子は、アリアルアセチレン、ポリエチレングリコール、新生ポリペプチド、ジアミン、二酸、ペプチド、またはそれらの組み合わせであるか、またはそれらを含む。いくつかの局面において、リンカー分子は、総製剤濃度の約0.5～5重量%である。いくつかの局面において、リンカー分子は、総製剤濃度の約0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0重量%未満であるか、または5.0重量%を上回る。

【0075】

リンカー分子の未結合部分、つまりリンカー分子の遊離末端は、除去可能な保護基、例えば上記で言及されているt-BocまたはF-Mocによって遮断されているか、保護されているか、または別様に反応に利用できなくされている反応性官能基を有し得る。モノマー、ポリマー、またはリンカー分子に保護基を結合させて、該モノマー、ポリマー、またはリンカー分子上の反応性官能性を保護することができる。用い得る保護基には、すべての酸不安定性および塩基不安定性の保護基が含まれる。例えば、ペプチドアミン基は、その両方が酸不安定性であるt-ブトキシカルボニル（t-BOCまたはBOC）もしくはベンジルオキシカルボニル（CBZ）によって、または塩基不安定性である9-フルオレニルメトキシカルボニル（FMOC）によって保護され得る。

【0076】

用い得るさらなる保護基には、アミノ部分を保護するための酸不安定性基：tert-アミルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、1-メチルシクロブチルオキシカルボニル、2-(p-ビフェニル)プロピル(2)オキシカルボニル、2-(p-フェニルアゾフェニル)プロピル(2)オキシカルボニル、 α , α -ジメチル-3,5-ジメチルオキシベンジルオキシカルボニル、2-フェニルプロピル(2)オキシカルボニル、4-メチルオキシベンジルオキシカルボニル、フルフリルオキシカルボニル、トリフェニルメチル（トリチル）、p-トルエンスルフェニルアミノカルボニル、ジメチルホスフィノチオイル、ジフェニルホスフィノチオイル、2-ベンゾイル-1-メチルビニル、o-ニトロフェニルスルフェニル、および1-ナフチリデン；アミノ部分を保護するための塩基不安定性基として：9フルオレニルメチルオキシカルボニル、メチルスルホニルエチルオキシカルボニル、および5-ベンゾイソオキサゾリルメチレンオキシカルボニル；還元された場合に不安定である、アミノ部分を保護するための基として：ジチアスクシノイル、p-トルエンスルホニル、およびピペリジノ-オ

キシカルボニル；酸化された場合に不安定である、アミノ部分を保護するための基として：(エチルチオ)カルボニル；混合型試薬に不安定であり、適切な作用物質が基の後の丸括弧内に挙げられている、アミノ部分を保護するための基として：フタロイル（ヒドラジン）、トリフルオロアセチル（ピペリジン）、およびクロロアセチル（2-アミノチオフェノール）；カルボン酸を保護するための酸不安定性基：tert-ブチルエステル；ヒドロキシ基を保護するための酸不安定性基：ジメチルトリチルが含まれる。（Greene, T. W., *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, NY (1981) も参照されたい。）

【0077】

アレイの表面に電圧を適用するための電極を有するアレイ

10

単一アッセイピラーに適合させ得る作用電極/対電極の数の有意な増加を提供する、シリコンプラットフォーム上の電気化学発光を増強するためのシステムも本明細書において記載される。図5は、アレイまたはピラー上の2つのウェルにわたる作用電極および対電極の配置についての一態様を示している。断面図（図5の上のパネル）において、それは4層の集積回路である。上層は作用電極および対電極の位置を規定し、それは誘電材料によって隔てられている。ペプチドまたは他の捕捉リガンド（例えば、抗体、scFvなどの抗原結合タンパク質）はインサイチュール合成されるか、または別様に（例えば、カルボジイミド化学反応を用いて）作用電極の表面でカップリングされる。中央の2層は、対電極または作用電極を接続しかつグループ化する金属製インターコネクト層であり、それも誘電材料によって隔てられている。下層は作用電極および対電極の出力部を含み、それは電力供給または制御ユニットに接続されている。上面図（図5、中央のパネル）において、各アレイフィーチャはそれ自体の作用電極および対電極を有し、電極が電力供給された場合にそれを用いて電位差を発生させる。底面図（図5、下のパネル）は、電極出力部の例を示している。下記に記載されるように、フィーチャグループ化のデザイン選定に従って、電極出力部のレイアウトは異なる。

20

【0078】

図6は、3つの異なる態様に従ったマイクロアレイチップ上の16個のフィーチャの概観を示している。一態様において、最高1種の関心対象の生体分子の検出および定量を可能にする、1「フィーチャ群」が検出される（上部左）。別の態様において、最高4種の関心対象の生体分子の検出および定量を可能にする、4「フィーチャ群」が検出される（上部中央）。別の態様において、最高16種の関心対象の生体分子の検出および定量を可能にする、16「フィーチャ群」が検出される（上部右）。チップ底面図において、作用電極および対電極出力部が示されている。いくつかの態様において、マイクロアレイチップは、2、4、8、16、32、64、100、200、500、1000、2000、5000、10,000、15,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、1,000,000、1,500,000、2,000,000個、またはそれを上回る数の作用電極または電極対を含む。いくつかの態様において、マイクロアレイチップは多数の電極対を含み、これら多数の電極対と結び付いた各フィーチャは、同じ分析物を捕捉する同じ捕捉リガンドを含む。いくつかの態様において、マイクロアレイは、作用電極と同じ数の対電極を含み、かつチップ上で単一分析物または多数の固有の分析物を検出するように構成されている。同じ数の対電極および作用電極を有することによって、フィーチャに適用される電圧を正確に制御することができる。いくつかの態様において、500種またはそれを上回る種類の分析物（例えば、上記に記載されているものなど、三つ組測定に関しては、フィーチャの総数の3分の1）を、1つのチップ上で検出することができる。同じ捕捉リガンドを有する多数のフィーチャを有することによって、統計的に堅牢なデータを得ることができる。

30

40

【0079】

本発明のマイクロアレイは、増幅されたECLタグシステムにより極めて高いシグナル対ノイズ比を生じるため、辺縁で50nmほどの小さなフィーチャを含み得る。いくつかの態様において、フィーチャは50nm～1μmの辺縁寸法を有する。他の態様において、フィーチャは50nm～100nmの辺縁寸法を有する。さらに他の態様において、辺縁寸法は50nm～75nmで

50

ある。より大きなフィーチャと比較して捕捉リガンドおよび結合している標的の数が少ないにもかかわらず、辺縁が50nmほどの小さなフィーチャを有するAECLマイクロアレイに関して、本発明者らは標的生体分子の信頼可能かつ精密な検出を実証した。一定の捕捉リガンド密度を仮定すると、1フィーチャあたりの捕捉リガンドの数は、フィーチャ面積の関数である。ゆえに、100nmの辺縁長を有する正方形フィーチャと比較して、50nmフィーチャは、1/4の数の捕捉リガンドを有すると考えられる。AECL手法および50nmフィーチャ長を用いることによって、3mm×3mmマイクロアレイチップは、典型的に、どの場所でも200,000~2,000,000個のフィーチャを含み得る。

【0080】

図7において、AECLアッセイプレートアレイが16個のピラーのセットを含む態様で示されており、そのそれぞれは4個の別個のAECLマイクロアレイチップに対する電圧を受けかつ供給する。AECLアッセイプレートが1ピラー群（左のパネル）、4ピラー群（中央のパネル）、または16ピラー群（右のパネル）に分割されている、3種の異なるピラーグループ化が示されている。底面図は、各態様に従った、それぞれの数のピラー群に対する作用電極および対電極の配置を示している。

【0081】

図8は、本発明の一態様に従った、AECLアッセイプレートの詳細な概観を示している。対電極（図8における「カウント電極」）および作用電極は、ピラーマウントの上部でアレイに取り付けられている（上部左のパネル）。アレイは、それぞれに取り付けられた対電極および作用電極を有する、多数の区画に分割され得る。AECLアッセイキャップ（上部右のパネル）は、そのそれぞれがこの例では4個の別個のAECLマイクロアレイチップに対する電圧を受けかつ供給する、9個のAECLピラーマウント（すなわち、上部左のパネルに示される構造物）を含む例示的なAECLアッセイプレート（下部右のパネル）上に載せられる。アッセイキャップは、キャップをアッセイプレート上に載せた場合にアッセイ溶液を囲うピラー壁を含む。図8の下部左（側面図）および上部右（アッセイキャップ）を参照されたい。下部左のパネル（側面図）は、ピラー上に載せられかつAECLアッセイ溶液で覆われたAECLマイクロアレイ（「チップ」）を示している。アッセイプレートに含まれるアッセイピラーの数は、実施されることを要求される異なるアッセイの数に従って選択され得る。例えば、アッセイプレートは、標準的なマイクロタイタープレート配置に従って、24、96、384、または1586個のピラーを含み得る。

【0082】

図9は、本発明の一態様に従った、AECLマイクロアレイチップに結合した生体分子を検出するための例示的なシステムを図解している。電圧は、電力供給制御器に取り付けられた主制御器を介して、選択された作用電極および対電極リードアレイに適用される。本明細書において記載されるように、アレイに電圧が適用された後、AECLタグは、結合している関心対象の標的生体分子を含むフィーチャを照らし出す。発光がある。チップはスキャナ台上に置かれ、発光は光学的に検出される。

【0083】

一態様において、システム光学は、ピラー上部から極めて最小距離（およそ0.5mm）で進みかつ走査する湿式（すなわち、液浸）顕微鏡レンズを採用して、開口数を増加させかつAECLからの光の喪失を低下させる。画像取り込みのために、光学に対するアレイフィーチャの最適な位置付けと正確に合致する時間に個々の電極をオンおよびオフにし得、ゆえに光のシグナル減衰によるシグナルの喪失を最小限に抑えるように、システムの制御を完全に自動化することができる。

【0084】

アレイを製造する方法

アレイに生体分子を接着させる方法

アレイを製造するための方法も本明細書において開示される。いくつかの局面において、本明細書において開示される、マイクロアレイ上のあらかじめ規定された位置に置かれた捕捉リガンドを、表面、例えば本明細書において開示される基板上でインサイチュー合

10

20

30

40

50

成することができる。ある場合には、フォトリソグラフィーを用いてアレイを作製する。例えば、基板を光活性カップリング溶液と接触させる。マスクを用いて、保護基を有する遊離リンカー分子または遊離カップリング分子を提供された表面上の特異的位置への対照放射線または光の露光を制御することができる。露光された位置において、保護基は除去され、カップリング分子またはリンカー分子上に、1つまたは複数の新たに露光される反応性部分をもたらす。次いで、所望のリンカーまたはカップリング分子を、例えばカルボン酸基において、保護されていない接着した分子にカップリングさせる。過程を繰り返して、表面上の特異的なまたはポジション規定された位置で数多くのフィーチャを合成することができる（例えば、そのそれぞれは参照により本明細書に組み入れられる、Pirrungらに対する米国特許第5,143,854号、米国特許出願公報第2007/0154946号（2005年12月29日に提出）、第2007/0122841号（2005年11月30日に提出）、第2007/0122842号（2006年3月30日に提出）、第2008/0108149号（2006年10月23日に提出）、および第2010/0093554号（2008年6月2日に提出）を参照されたい）。

10

【0085】

いくつかの局面において、フィーチャの3次元（例えば、多孔質）アレイを産生する方法は、表面に接着した多孔質層を獲得する工程；および該多孔質層にフィーチャを接着させる工程を含んでよく、該フィーチャはそれぞれ、判定可能な配列および意図される長さのペプチド鎖のコレクションを含み、個々のフィーチャ内で、意図される長さを有する、コレクション内のペプチド鎖の画分は、各カップリング工程に対する少なくとも約98%の平均カップリング効率によって特徴付けされる。いくつかの局面において、光活性化化合物、カップリング分子、カップリング試薬、ポリマー、および溶媒を含む光活性カップリング製剤を用いて、フィーチャを表面に接着させる。いくつかの局面において、本明細書において開示される光活性カップリング製剤を用いて、フィーチャを表面に接着させる。いくつかの局面において、水を用いて光活性カップリング製剤を剥がす。

20

【0086】

一態様において、アレイを製造する工程が本明細書において記載される。結合したカルボン酸基を含む表面を提供する。表面と、光活性化化合物、カップリング分子、カップリング試薬、ポリマー、および溶媒を含む光活性カップリング溶液とを接触させる。フォトマスクによって規定されたパターンに従って、表面を深紫外線スキャナーツール内で紫外線光に露光し、紫外線光に露光された位置は、光活性カップリング溶液中の光塩基発生剤の存在により、光塩基発生を受ける。十分な光塩基を産生するために、露光エネルギーは $1\text{mJ}/\text{cm}^2 \sim 100\text{mJ}/\text{cm}^2$ であってよい。

30

【0087】

露光したら、露光後バークモジュールにおいて、表面をポストバークする。露光後バークは、化学的増幅工程としての役割を果たす。バーク工程は、初めに発生した光塩基を増幅し、かつ基板への拡散の割合も増強する。少なくとも60秒間、通常は120秒間を超えずに、ポストバーク温度は、多孔質表面の厚さに応じて $75^\circ\text{C} \sim 115^\circ\text{C}$ で変動し得る。遊離カルボン酸基を、遊離ペプチドまたはポリペプチドの脱保護されたアミン基にカップリングさせ、表面に結合したカルボン酸基への遊離ペプチドまたはポリペプチドのカップリングがもたらされる。この表面は多孔質表面であってよい。表面に結合したカルボン酸基にカップリングしたペプチドの合成は、合成方向 $\text{N} \rightarrow \text{C}$ で生じ、遊離ペプチドのアミン基は、基板の表面に結合したカルボン酸基に結合する。あるいは、ジアミンリンカーを遊離カルボン酸基に結合させて、合成を $\text{C} \rightarrow \text{N}$ 方向に向かわせ得、遊離ペプチドのカルボン酸基は、基板の表面に結合したアミン基に結合する。

40

【0088】

ここで、光活性カップリング溶液を剥がすことができる。いくつかの局面において、DI水でフォトレジストを完全に剥離する方法が本明細書において提供される。この過程は、現像液モジュールにおいて達成される。ウェハを真空チャック上で例えば60秒間～90秒間回転させ、かつ脱イオン水をノズルを通して約30秒間分注する。

【0089】

50

光活性カップリング製剤を、カップリング回転モジュールにおいて表面に適用し得る。カップリング回転モジュールは、典型的に、光活性カップリング製剤を配給する20個またはそれを上回る数のノズルを有し得る。これらのノズルは、これらの溶液を保持するシリンダーに加圧することによって、または必要とされる量を分注するポンプによって、光活性カップリング製剤を分注するように作製され得る。いくつかの局面において、ポンプを採用して、基板上に5~8ccの光活性カップリング製剤を分注する。基板を真空チャック上で15~30秒間回転させ、かつ光活性カップリング製剤を分注する。回転速度は、2000~2500rpmに設定され得る。

【0090】

任意で、キャップフィルム溶液コートを表面に適用して、基板上の未反応アミノ基が、隣のカップリング分子と反応するのを防止する。キャップフィルムコート溶液は、以下のとおり、溶媒、ポリマー、およびカップリング分子で調製され得る。用い得る溶媒は、Nメチルピロリドン、ジメチルホルムアミド、またはそれらの組み合わせのような有機溶媒であってよい。キャッピング分子は典型的に無水酢酸であり、かつポリマーは、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリメチルメタクリレート、ポリ(メチルイソプロペニル)ケトン、またはポリ(2メチルペンテン1スルホン)であってよい。いくつかの態様において、キャッピング分子はエタノールアミンである。

【0091】

この過程は、キャッピング回転モジュールにおいて行われる。キャッピング回転モジュールは、基板上にキャップフィルムコート溶液を分注するように作製され得る1個のノズルを含み得る。この溶液は、キャップフィルムコート溶液を蓄えるシリンダーに加圧することにより、または必要とされる量を正確に分注するポンプにより分注され得る。いくつかの局面において、ポンプを用いて、基板上におよそ5~8ccのキャップコート溶液を分注する。基板を真空チャック上で15~30秒間(s)回転させ、かつカップリング製剤を分注する。回転速度は、2000~2500rpmに設定され得る。

【0092】

キャッピング溶液を有する基板を、キャップベークモジュールにおいてベークする。キャッピングベークモジュールは、キャッピングフィルムコートが適用された直後にウェハを受け止めるように特異的に組み立てられたホットプレートである。いくつかの局面において、キャッピング反応を有意に加速するために、回転コーティングされたキャッピングコート溶液をホットプレートでベークする方法が本明細書において提供される。ホットプレートベークは、一般的に、アミノ酸に対するキャッピング時間を2分間未満に減少させる。

【0093】

キャッピング反応の副産物を、剥離モジュールにおいて剥離する。剥離モジュールは、アセトン、イソプロピルアルコール、Nメチルピロリドン、ジメチルホルムアミド、DI水など、有機溶媒を分注するように組み立てられたいくつかのノズル、典型的に最高10個を含み得る。いくつかの局面において、ノズルは、回転しているウェハ上に分注されるように、アセトン、それに続くイソプロピルアルコールに対して指定され得る。回転速度は、およそ20秒間、2000~2500rpmであるように設定される。

【0094】

この全サイクルを、異なるカップリング分子に関して所望されるとおりに毎回繰り返して、所望の配列を獲得することができる。

【0095】

いくつかの局面において、遊離カルボン酸の表面を含むアレイを用いて、N→C方向にポリペプチドを合成する。一態様において、基板の表面上のカルボン酸を活性化して(例えば、カルボニルに変換して)、それらをアミノ酸上の遊離アミン基に結合させる。一態様において、表面の基上のカルボン酸の活性化は、カルボジイミドまたはスクシンイミドを含む溶液のアレイの表面への添加によって行われ得る。いくつかの態様において、カルボン酸は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド [EDC]、N-ヒドロキシ

10

20

30

40

50

スクシンイミド [NHS]、1,3-ジイソプロピルカルボジイミド [DIC]、ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt)、(0-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート) [HATU]、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート [PyBOP]、またはN,N-ジイソプロピルエチルアミン [DIEA]を含む溶液のアレイの表面への添加によって活性化され得る。活性化溶液を洗い流し、かつアレイの表面をアミノ酸層（すなわち、各活性化カルボン酸基に1個のアミノ酸）の付加のために調製する。カルボン酸基は、最高2、3、4、5、6、7、8、9、または10時間活性化されたままである。

【0096】

アレイの活性化カルボン酸表面への、遊離アミン基を有するアミノ酸を含む溶液の添加は、各カルボン酸基への単一アミノ酸の結合をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸には、保護されたアミン基を有するアミノ酸が含まれる。感光性化学反応を用いることにより、レチクルを用いて、部位特異的位置における選択アミノ酸のアミン基から保護基を除去することができる。例えば、Fmoc保護されたアミノ酸を、光塩基を含む溶液中で混合する。部位特異的位置で特異的周波数の光にアレイ上の溶液を露光すると、光塩基は、アミノ酸を脱保護する塩基を放出し、アレイの表面上の活性化カルボン酸基へのアミノ酸のカップリングがもたらされる。塩基を発生させる別の方法は、光酸発生剤の使用によるものである。いくつかの態様において、光酸発生剤は、N-Boc-ピペリジンまたは1-Boc-4-ピペラジンである。

【0097】

アミノ酸の完全層がカップリングされた後、残存する未カップリング活性化カルボン酸をキャッピングして、その後の合成工程でのアミノ酸の非特異的結合を防止する。アレイ上の特異的位置で所望のポリペプチドを合成するために、活性化、アミノ酸層の付加、およびキャッピングの工程を必要に応じて繰り返す。

【0098】

一態様において、N→C末方向に合成されたペプチドをジアミン分子でキャッピングして、生物学的分子、例えば抗体への、選択ポリペプチド配列の結合特性を増強することができる。他の局面において、C→N方向に合成されたペプチドをジカルボン酸分子でキャッピングして、生物学的分子への選択配列の結合特性を増強することができる。

【0099】

アレイの表面で並行してポリペプチドを合成する間に、本明細書において記載される方法は、アレイの表面でのカルボン酸の完全な活性化を確保する。活性化エステルの長期間の安定性により、1回の活性化工程の後に、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25回、またはそれを上回る回数のカップリングサイクルを完了させ得る（例えば、アレイ上の異なる位置で2～25種またはそれを上回る種類の異なるアミノ酸の層全体をカップリングする）。カップリングは、ハードベークの間にかつ溶液中の過剰なアミノ酸の存在により生じるため、Fmoc保護されたアミノ酸の完全な100%脱保護は、著しく高いカップリング産出量に必要とされ得ない。全アミノ酸の付加およびキャッピングの後、全遊離活性化カルボン酸をカップリングしまたはキャッピングし、ゆえに高い効率および精度のポリペプチド合成がもたらされる。

【0100】

一態様において、タンパク質、ポリペプチド、または他の分子を、アレイの表面上の活性化カルボン酸基に接着させる。アレイ上のカルボン酸基の活性化後、遊離アミン基を有するタンパク質、ポリペプチド、または他の分子を含む溶液をアレイの表面に添加する。アミン基は活性化カルボン酸基に結合し、ゆえにタンパク質、ポリペプチド、または他の分子がアレイに接着する。一態様において、この方法を用いて、アレイの表面に抗体を接着させる。一態様において、アミン基を保護し、その後にチップの表面で脱保護する。一態様において、保護されたアミン基を脱保護する光不安定性化合物、例えば光塩基または光酸と相互作用するために、脱保護は、レチクルを通して照らされる光を用いてチップ上の指定の位置で生じる。

【実施例】

【0101】

下記は、本発明を実践するための具体的な態様の例である。実施例は、例証目的のためにのみ与えられるものであって、決して本発明の範囲を限定することを意図するものではない。用いられる数（例えば、量、温度など）に関して、精度を確保するために努力がなされたが、いくつかの実験誤差および偏差は当然考慮されるべきである。

【0102】

実施例1：AECLウェハ加工

工程1～7は図10Aを参照して記載されており、工程8～14は図10Bを参照して記載されている。

10

【0103】

工程1：シリコンウェハをUniversity wafersから得た。酸化チャンバー内での熱酸化物堆積を用いて、1000Å酸化シリコンを堆積させた。

【0104】

工程2：Rohm and Haasから得たP5107（フォトレジスト）を、RF3S Sokudoコータを用いてウェハ上にコートした。作用電極用フォトマスクを用いて、これらのウェハをNikon S205 DUVにおいて18mj/cm²で露光した。ウェハを現像液中で60秒間現像した。フッ化水素酸（HF）槽を30秒間用いて酸化物エッチングを実施して、1000Å酸化物を除去した。コータ内でのそれぞれ30秒間のアセトン洗浄、それに続くイソプロパノール洗浄を用いて、フォトレジストを剥離した。すべての溶媒およびHFを、Sigma Aldrichから得た。

20

【0105】

工程3：均一な厚さの1500Å金を、スパッタリングによってこのウェハ基板の上部に堆積させた。

【0106】

工程4：酸化物層に達するまで、ウェハを化学機械平坦化（CMP）研磨器で研磨した。

【0107】

工程5：Rohm and Haasから得たP5107フォトレジストを、RF3S Sokudoコータを用いてウェハ上にコートした。対電極用フォトマスクを用いて、これらのウェハをNikon S205 DUVにおいて18mj/cm²で露光した。ウェハを現像液中で60秒間現像した。フッ化水素酸（HF）槽を用いて酸化物エッチングを実施して、1000Å酸化物を除去した。コータ内でのそれぞれ30秒間のアセトン洗浄、それに続くイソプロパノール洗浄を用いて、フォトレジストを剥離した。

30

【0108】

工程6：均一な厚さの1500Å銅を、スパッタリングによってこのウェハ基板の上部に堆積させた。

【0109】

工程7：酸化物層に達するまで、ウェハをCMP研磨器で研磨した。

【0110】

工程8：酸化チャンバー内で、1000Åの熱酸化物をウェハの上部で増大させた。Rohm and Haasから得たP5107フォトレジストを、RF3S Sokudoコータを用いてウェハ上にコートした。インターコネクト用フォトマスクを用いて、これらのウェハをNikon S205 DUVにおいて18mj/cm²で露光した。ウェハを現像液中で60秒間現像した。フッ化水素酸（HF）槽を用いて酸化物エッチングを実施して、1000Å酸化物を除去した。アセトン洗浄、それに続くイソプロパノール洗浄を用いて、フォトレジストを剥離した。

40

【0111】

工程9：均一な厚さの500Åアルミニウムインターコネクトを、スパッタリングによってこのウェハ基板の上部に堆積させた。

【0112】

工程10：電極層に達するまで、ウェハをCMP研磨器で研磨した。

【0113】

50

工程11：Rohm and Haasから得たP5107フォトレジストを、RF3S Sokudoコータを用いてウェハ上にコートした。出力用フォトマスクを用いて、これらのウェハをNikon S205 DUVにおいて18mj/cm²で露光した。ウェハを現像液中で60秒間現像した。フッ化水素酸（HF）槽を用いて酸化物エッチングを実施して、1000Å酸化物を除去した。アセトン洗浄、それに続くイソプロパノール洗浄を用いて、フォトレジストを剥離した。

【0114】

工程12：均一な厚さの500Å銅を、スパッタリングによってこのウェハ基板の上部に堆積させた。

【0115】

工程13：酸化物層に達するまで、ウェハをCMP研磨器で研磨した。

10

【0116】

工程14：次いでウェハを反転させ、フォトレジストをウェハ裏面にコートした。フォトマスクを用いて、これらのウェハをNikon S205 DUVにおいて18mj/cm²で露光した。ウェハを現像液中で60秒間現像した。フッ化水素酸（HF）槽を用いてシリコンエッチングを実施して、接点に達するまでシリコンを除去した。アセトン洗浄、それに続くイソプロパノール洗浄を用いて、フォトレジストを剥離した。

【0117】

実施例2：ウェハの官能化およびチップ産物へのダイシング

アレイフィーチャに電圧を供給するための、図10AおよびBに示される、電極を含むウェハを実施例1に従って提供した。COOH官能化表面を、AECLウェハ上で以下のとおり形成した。

20

【0118】

11-メルカプトウンデカン酸および酢酸をSigma Aldrichから得た。エタノール、過酸化水素、硫酸をVWRから得る。

【0119】

COOH基で官能化するために、金の作用電極を有する実施例1のAECLウェハを、50重量%の高純度硫酸および50重量%の過酸化水素を含むピラニア溶液で60分間浄化した。次いで、ウェハをDI水で連続的に5分間リンスし、その後にエタノールでの5分間リンスが続いた。ウェハを、50%エタノールおよび50% DI水の混合物で10分間洗浄した。次いで、ウェハと、2.5重量%の11-メルカプトウンデカン酸および97.5重量%の高純度エタノールを含有する溶液とを、穏やかな振とう条件下で12時間接触させた。10～12時間後、次いで、ウェハをエタノールおよびイソプロパノール（IPA）でそれぞれ5分間リンスした。この後に、DI水での10分間、および10重量%の酢酸を90重量%のDI水中で60℃で混合することによって調製された温酢酸溶液での45分間のウェハの洗浄が続いた。最後に、ウェハをDI水およびIPAでそれぞれ5分間リンスし、窒素下で送風乾燥させた。この工程の後、ウェハを3.0mm×3.0mmのチップにダイスカットした。

30

【0120】

実施例3：チップ活性化および抗TNF-α抗体カップリング

1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド [EDC]、N-ヒドロキシスクシンイミド [NHS]、エタノールアミン、およびリン酸緩衝生理食塩水（PBS）緩衝液をSigma Aldrichから得た。一次および二次抗TNF-α抗体、ならびにTNF-αをABCAMから得た。EDCおよびNHSの活性化溶液を、脱イオン水中に4重量%のEDCおよび2重量%のNHSを溶解することによって調製した。次いで、活性化溶液をウェハの表面に室温で10分間適用した。次いで、チップを脱イオン水で3分間洗浄した。

40

【0121】

PBS緩衝液中10ug/mlの抗体の溶液を、活性化COOH基を有するウェハの表面に30分間添加することによって、一次抗TNFα抗体をチップにカップリングさせ、一次抗体の遊離アミンへのCOOH基の結合がもたらされた。この後に、95重量%のDI水中5重量%のエタノールアミンによる、表面上の未反応カルボン酸基の10分間のキャッピングが続き、その後にDI水でのウェハの10分間の洗浄が続いた。

50

【0122】

実施例4：AECLバイオチップに対する原型ピラーマウント

図11Aは、AECLバイオチップに対するピラーマウントを調製するための工程を示している。

【0123】

工程1：シリコンウェハをUniversity wafersから得た。酸化チャンバー内での熱酸化物堆積を用いて、1000Å二酸化シリコンを堆積させた。

工程2：Rohm and Haasから得たP5107（フォトレジスト）を、RF3S Sokudoコートを用いてウェハ上にコートした。AECLピラー作用電極用フォトマスクを用いて、これらのウェハをNikon S205 DUVにおいて18mj/cm²で露光した。ウェハを現像液中で60秒間現像した。フッ化水素酸（HF）槽を30秒間用いて酸化物エッチングを実施して、1000Å酸化物を除去した。

工程3：均一な厚さの1500Å金を、スパッタリングによってこのウェハ基板の上部に堆積させた。酸化物層に達するまで、ウェハを化学機械平坦化（CMP）研磨器で研磨した。

工程4：Rohm and Haasから得たP5107フォトレジストを、RF3S Sokudoコートを用いてウェハ上にコートした。AECLピラー対電極用フォトマスクを用いて、これらのウェハをNikon S205 DUVにおいて18mj/cm²で露光した。ウェハを現像液中で60秒間現像した。フッ化水素酸（HF）槽を用いて酸化物エッチングを実施して、1000Å酸化物を除去した。コート内でのそれぞれ30秒間のアセトン洗浄、それに続くイソプロパノール洗浄を用いて、フォトレジストを剥離した。

工程5：均一な厚さの1500Å銅を、スパッタリングによってこのウェハ基板の上部に堆積させた。酸化物層に達するまで、ウェハをCMP研磨器で研磨した。

【0124】

図11Bは、本実施例において上記で概説された工程に従って調製された、AECLバイオチップに用いられるピラーマウントの上面図を示している。AECL-TNF α チップの性能を試験するために、AECLバイオチップを以下のとおりピラー上に載せた。

【0125】

AECLバイオチップの作用電極および対電極を選別し、AECLピラーマウントの上に置いた。ピラーマウントと、チップ作用電極および対電極との間のポジション対応および電氣的接触を、3Mから得た導電性テープを用いて安定させた。AECLピラーマウント作用電極および対電極を、1.5～12Vを供給するElenco製のXP-100型電圧制御器に銅クリップを介して接続させた。

【0126】

実施例5：AECLタグの調製

本実施例は、増幅された電気化学発光タグの調製を記載する。本実施例において、ルテニウムビス(2,2ビピリジン)ビス(2,2ジカルボン酸エステル)が電気化学発光部分であり、かつチラミドがシグナル増幅部分（図1）であり、それを介して、複数のAECLタグが、ペルオキシダーゼ活性（例えば、HRP酵素）および酸化剤（例えば、過酸化水素）付近の標的分子に結合する。

【0127】

50ulの0.01MのチラミンHClおよび50ulの0.01Mのルテニウムビス(2,2ビピリジン)ビス(2,2ジカルボン酸)エステルを、5ulのN,N-ジイソプロピルエチルアミン（DIEA）の存在とともに、DI水中で混合した。混合物を400rpmにセットされた回転式ミキサーで2時間振とうし、その後に1ulのエタノールアミンの添加が続き、次いでさらに10分間再度振とうした。TLCを用いて溶液を精製し、結果として生じた溶液を脱塩かつ凍結乾燥させて、図1に示される0.56mgのAECLタグを得た。AECLタグをある容量のPBS緩衝液中に溶解して、0.5mg/mLストック溶液を生成した。

【0128】

実施例6：TNF- α AECLアッセイ

TNF α をPBST（PBSTは、3.2mM Na₂HPO₄、0.5mM KH₂PO₄、1.3mM KCl、135mM NaCl、0.05% Tween（登録商標）20、pH 7.4を含有する）中に1fg/mL～100ng/mLの様々な濃度で溶解し、かつピラー基板上のAECLチップに添加した。これを37℃で30分間インキュベートした。その後、チップをPBST緩衝液で5分間洗浄した。PBST中1:1000の希釈で、ABcamから得た二次TNF- α 抗体-HRP結合体を添加し、かつ37℃で15分間インキュベートした。次いで、PBS中に1:10希釈のAECLタグストック溶液および0.003重量%の過酸化水素を含むタグ溶液を作製した。これをチップに添加し、捕捉されたTNF α /抗体-HRP複合体への多数のAECLタグの結合をもたらし、Tween 20を含む0.02%酢酸ナトリウム緩衝液中0.1Mの濃度で、トリプロピルアミン（TPA）をチップに添加した。作用電極における電位を0から3.5Vに増加した。620nmにおけるAECLの強度をCCDカメラによって読み取った。Meso Scale Diagnosticsから得たECLタグを用いることによって異なる同様のアッセイも行った。両アッセイからのデータを図12に示す。AECLタグはpg/mL以下範囲のTNF α をはっきりと検出し得、一方でECLタグはpg/mLレベル範囲を検出し得るのみである。

10

【0129】

本発明は、好ましい態様および種々の代替的な態様を参照してとくに示されかつ記載されているが、形式および詳細の種々の変化が、本発明の主旨および範囲から逸脱することなくその中でなされ得ることは、関連技術分野における当業者によって理解されるであろう。

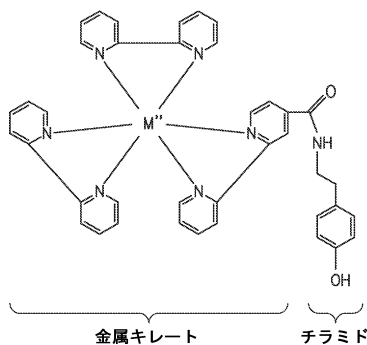
【0130】

本明細書の本文中で引用されるすべての参考文献、交付済み特許、および特許出願は、すべての目的のために、参照によりそれらの全体として本明細書によって組み入れられる。

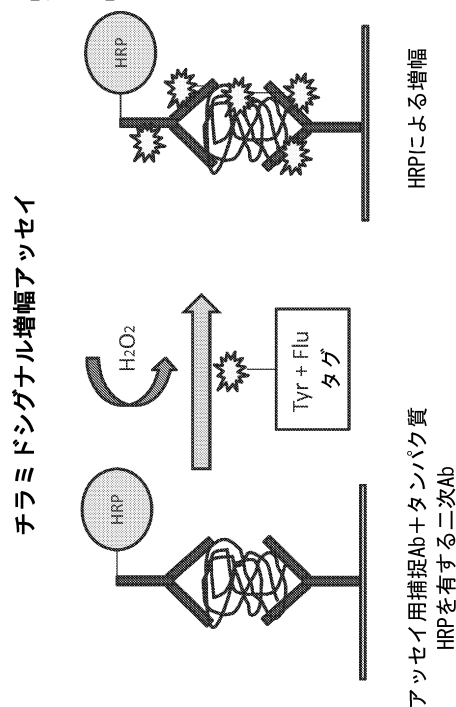
20

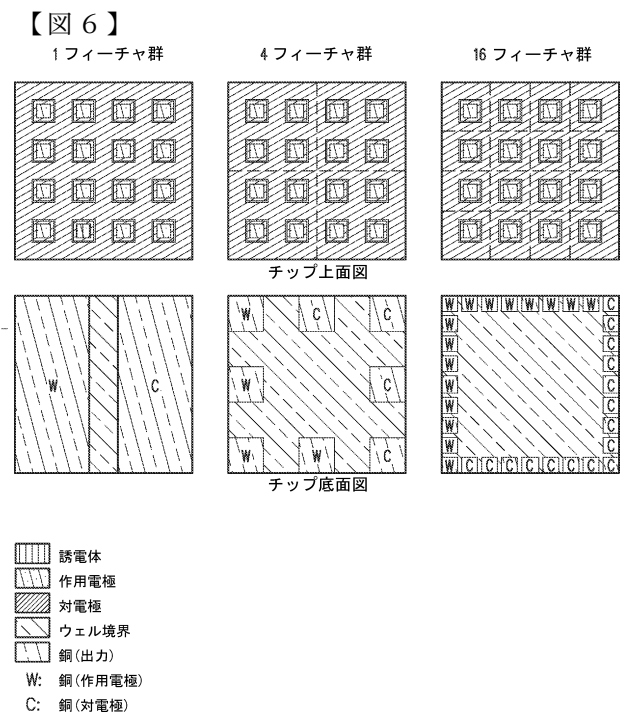
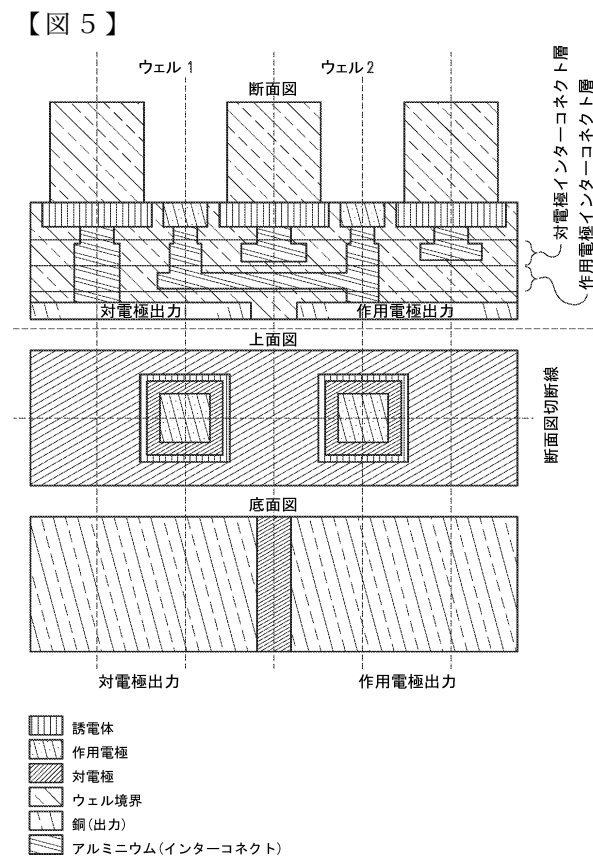
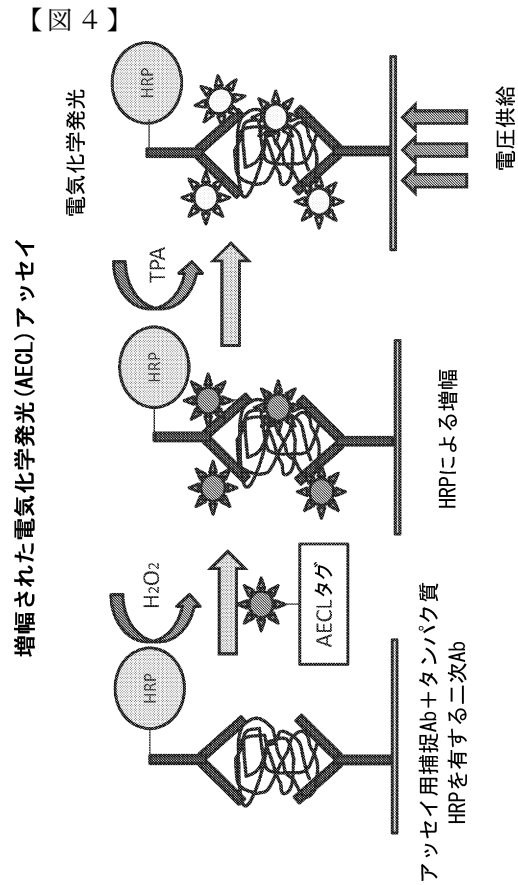
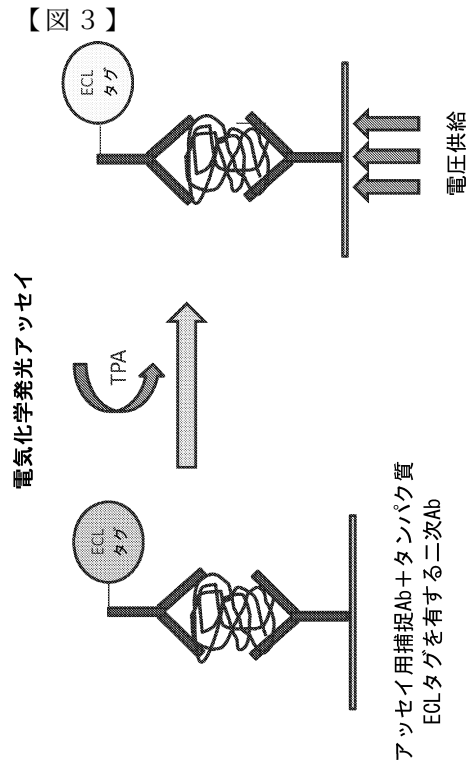
【図1】

増幅された電気化学発光 (AECL) タグ

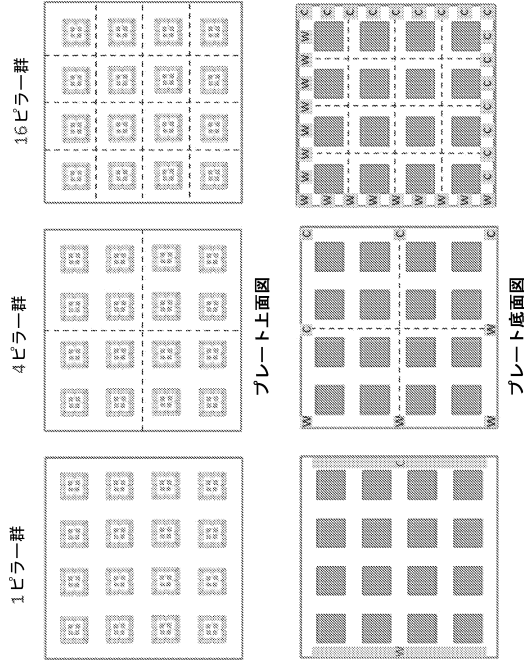


【図2】

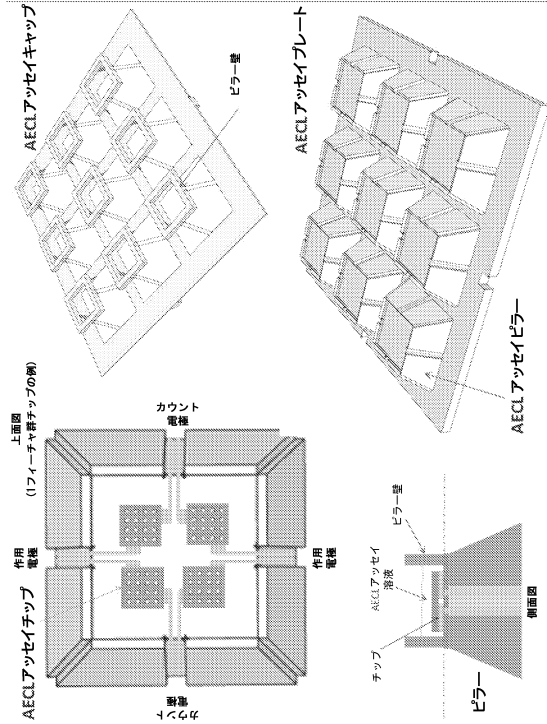




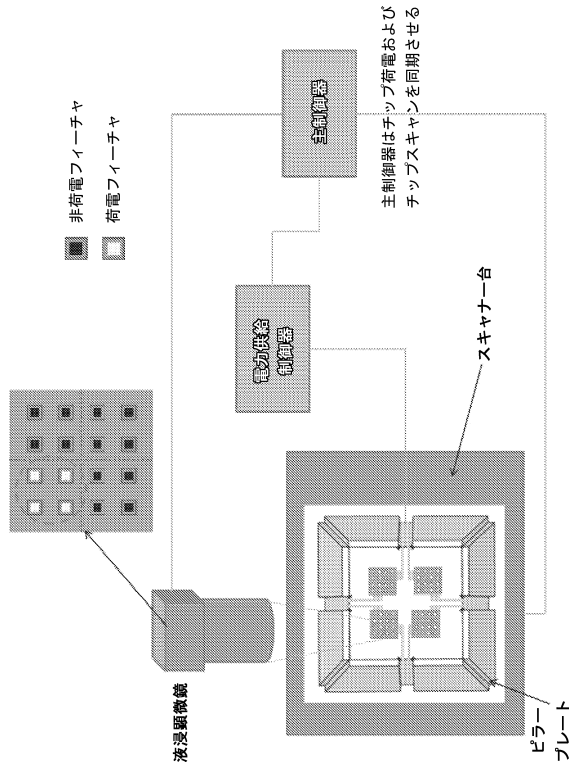
【図 7】



【図 8】

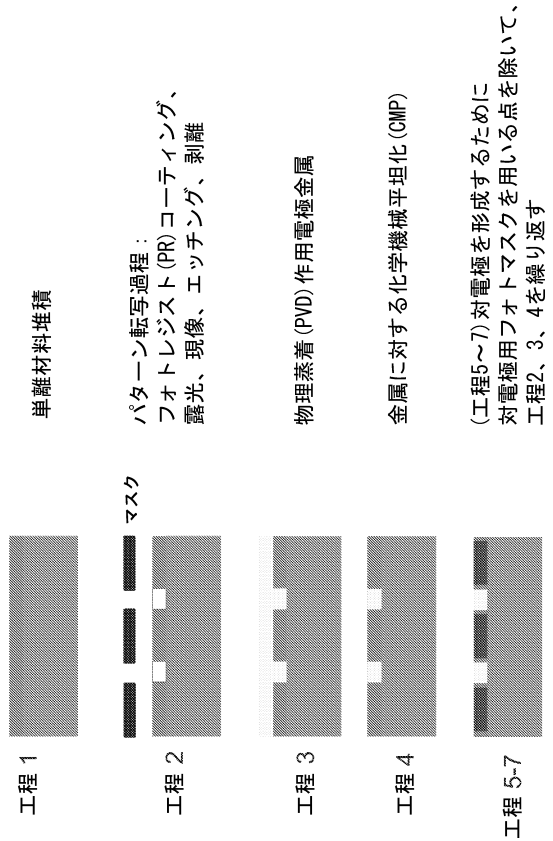


【図 9】



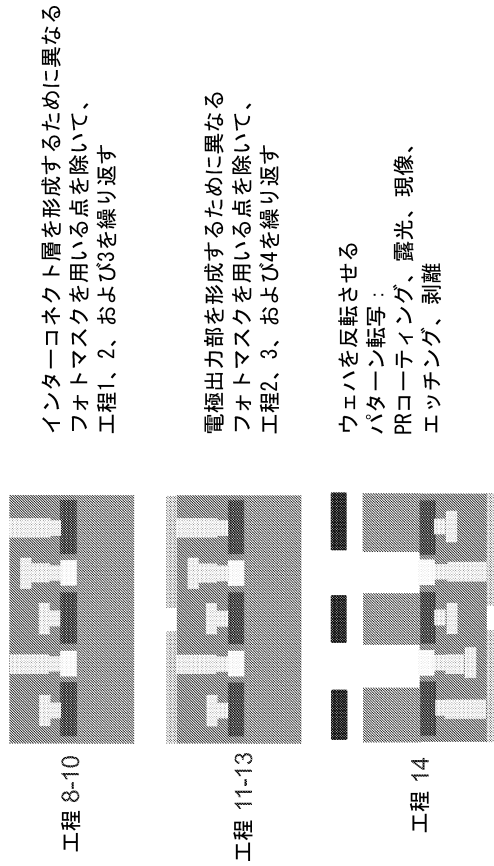
【図 10 A】

AECLチップ製造過程

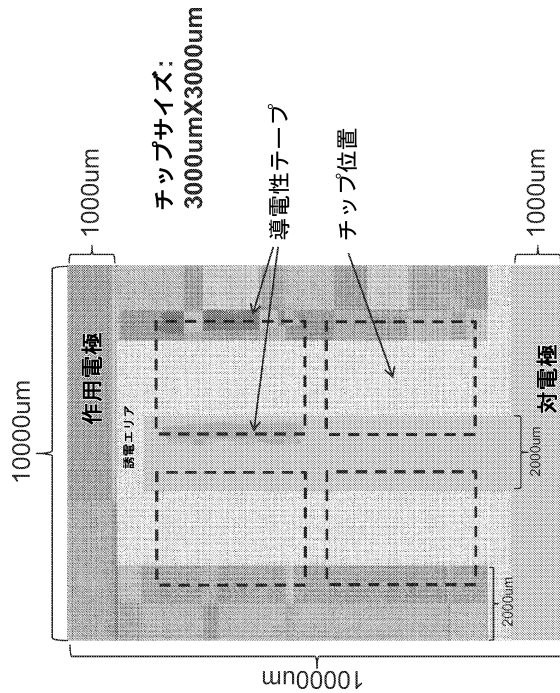


AECLチップ製造過程 (続き)

【図 1 0 B】

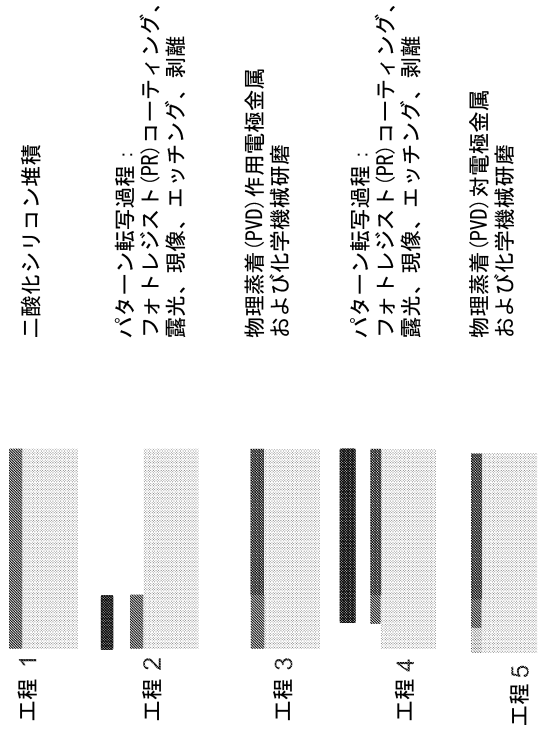


【図 1 1 B】



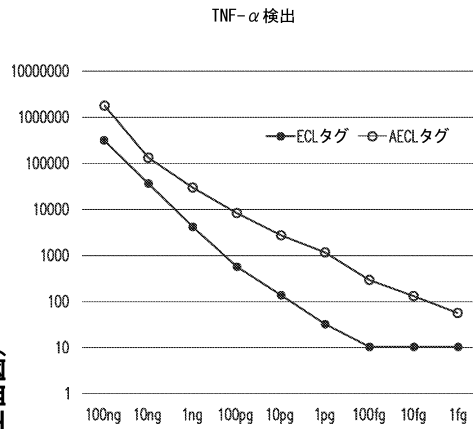
AECLピラー (上面図)

【図 1 1 A】



AECLピラー調製

【図 1 2】



フロントページの続き

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ラジャセカラン ジョン ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ヒルズバラ トーナメント ドライブ 1116 ヴィブ
ラント ホールディングス リミテッド ライアビリティ カンパニー内
- (72)発明者 ジャヤラマン ヴァサンス
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ヒルズバラ トーナメント ドライブ 1116 ヴィブ
ラント ホールディングス リミテッド ライアビリティ カンパニー内
- (72)発明者 ワン ティアンハオ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ヒルズバラ トーナメント ドライブ 1116 ヴィブ
ラント ホールディングス リミテッド ライアビリティ カンパニー内
- (72)発明者 베이 칸
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ヒルズバラ トーナメント ドライブ 1116 ヴィブ
ラント ホールディングス リミテッド ライアビリティ カンパニー内
- (72)発明者 크리스ナムルティー ハリー 크리스ナン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ヒルズバラ トーナメント ドライブ 1116 ヴィブ
ラント ホールディングス リミテッド ライアビリティ カンパニー内

審査官 大瀧 真理

- (56)参考文献 国際公開第2012/122929 (WO, A1)
Proton-Coupled Electron Transfer in a Model for Tyrosine Oxidation in Photosystem II,
Journal of the American Chemical Society, 2003年, Vol.125, p.10429-10436

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98
CAplus/REGISTRY (STN)