

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-507076

(P2005-507076A)

(43) 公表日 平成17年3月10日(2005.3.10)

(51) Int. Cl.⁷

GO 1 N 33/531

C 1 2 N 15/09

F I

GO 1 N 33/531

C 1 2 N 15/00

Z

A

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 39 頁)

(21) 出願番号 特願2003-538707 (P2003-538707)
 (86) (22) 出願日 平成14年10月17日 (2002.10.17)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年4月23日 (2004.4.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/033059
 (87) 国際公開番号 W02003/036257
 (87) 国際公開日 平成15年5月1日 (2003.5.1)
 (31) 優先権主張番号 10/033,308
 (32) 優先日 平成13年10月24日 (2001.10.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), JP

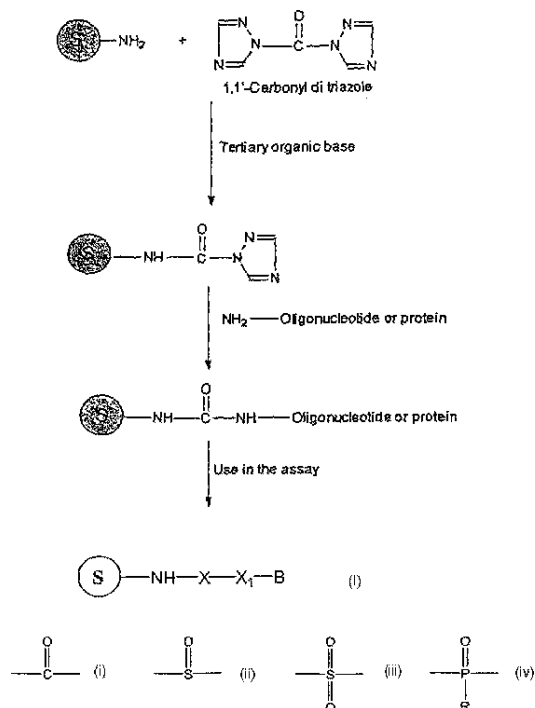
(71) 出願人 591028256
 ベックマン コールター インコーポレイ
 テッド
 BECKMAN COULTER, INC
 ORPORATED
 アメリカ合衆国 92834-3100
 カリフォルニア州 フラトン ピーオー
 ボックス 3100 ハーバー ブルバ
 ード 4300 エヌ
 4300N Harbor Boulev
 ard Fullerton, Calif
 ornia 92834-3100 U.
 S. A.
 (74) 代理人 100070024
 弁理士 松永 宣行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物学的分子の固定化

(57) 【要約】

本発明は、2つのステップを用いて、生物学的分子を利用可能なアミノ基を有する固体支持体に固定化するためのシステムを提供する。第1のステップでは、前記利用可能なアミノ基が活性化化合物の第1の脱離基を置換して、活性化された支持体を形成するように、求核置換反応が起こる。第2のステップでは、前記活性化された支持体が生物学的分子に反応して、以下の化学式(I)の化合物が生成される。化学式(I)において、Sは固体支持体であり、Xは、以下の化学式(i)、(ii)、(iii)および(iv)からなるグループから選択されることが好ましく、Rは、約18個以下の炭素原子を有する、アルキル基、アリル基およびOR¹からなるグループから選択され、R¹は、約18個以下の炭素原子を有する、アルキル基およびアリル基からなるグループから選択され、X₁は、NH、酸素およびイオウからなるグループから選択され、Bは生物学的分子である。

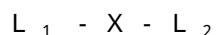


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 個の反応性のアミノ基、チオール基またはヒドロキシル基を有する生物学的分子を、少なくとも 1 個の利用可能なアミノ基を有する固体支持体に結合させる方法であって、

(a) L_1 および L_2 は脱離基で、 X は求核置換が可能な部分で、反応の結果、 L_1 が前記固体支持体の利用可能なアミノ基で置換されて、活性化された支持体を形成する、



の構造を有する活性化化合物に前記固体支持体の利用可能なアミノ基を反応させるステップと、

(b) 前記活性化された支持体に前記生物学的分子を反応させて、 L_2 を置換し、前記生物学的分子を前記固体支持体に結合するステップとを含む、方法。

10

【請求項 2】

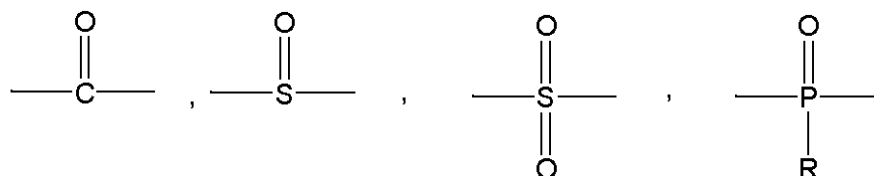
L_1 および L_2 は、ハロゲン、イミダゾール、トリアゾール、ピロール、チアゾール、テトラゾールおよび O -アリル- R からなるグループから独立に選択され、 R はハロゲン基、ニトロ基、シアノ基、アルコキシ基からなるグループから選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

X は以下の化学式からなるグループから選択され、

【化 1】

20



R は、約 18 個以下の炭素原子を有する、アルキル基、アリル基および OR^1 からなるグループから選択され、

R^1 は、約 18 個以下の炭素原子を有する、アルキル基およびアリル基からなるグループから選択される、請求項 2 に記載の方法。

30

【請求項 4】

前記活性化化合物はカルボニル 1, 2, 4-ジトリアゾールである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ (b) は、約 5 乃至約 25 ナノリットルの前記生物学的分子を、前記活性化された支持体の 1 または 2 以上の部位の約 10 ミクロン乃至約 500 ミクロンの直径を有する円形のスポットに付着させるステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記付着させるステップは、前記活性化された固体支持体にプリントすることを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

ステップ b) において、前記反応は加湿チャンバーで行われる、請求項 5 に記載の方法。

40

【請求項 8】

ステップ b) において、前記反応は加湿チャンバーで行われる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

ステップ (a) は有機溶液中で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

ステップ (a) は第 3 有機塩基の存在下で行われる、請求項 9 に記載の方法。

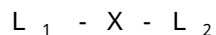
【請求項 11】

ステップ (b) は水溶液中で行われる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

50

少なくとも 1 個のアミノ基、チオール基またはヒドロキシル基を有する生物学的分子を、
 少なくとも 1 個の利用可能なアミノ基を有する固体支持体に結合させる方法であって、
 (a) L_1 および L_2 は同一の脱離基で、 X は求核置換可能で、反応の結果、 L_1 は前記
 固体支持体の利用可能なアミノ基で置換されて、活性化された支持体を形成する、



の構造を有する活性化化合物に、前記固体支持体の利用可能なアミノ基を反応させるステ
 ップと、

(b) 前記生物学的分子を前記活性化された固体支持体に反応させて、 L_2 を置換し、前
 記生物学的分子を前記固体支持体に結合させるステップとを含む、方法。

【請求項 13】

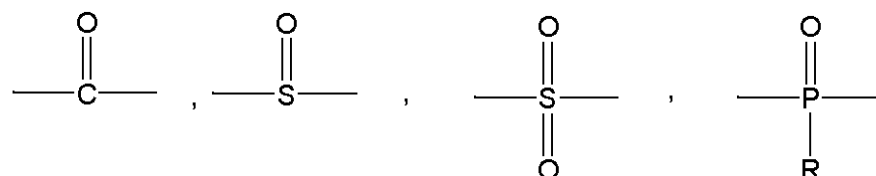
10

L_1 および L_2 は、ハロゲン、イミダゾール、トリアゾール、ピロールピラゾール、チア
 ザール、テトラゾールおよび O -アリル- R からなるグループから選択され、 R はハロゲ
 ン基、ニトロ基、シアノ基およびアルコキシ基からなるグループから選択される、請求項
 12 に記載の方法。

【請求項 14】

X は以下の化学式からなるグループから選択され、

【化 2】



20

R は、約 18 個以下の炭素原子を有する、アルキル基、アリル基および OR^1 からなるグ
 ループから選択され、

R^1 は、約 18 個以下の炭素原子を有する、アルキル基およびアリル基からなるグループ
 から選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

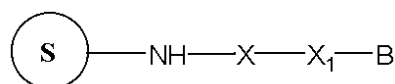
前記活性化化合物はカルボニル 1, 2, 4-ジトリアゾールである、請求項 12 に記載の
 方法。

【請求項 16】

30

以下の化学式を有する生物学的分子に結合した固体支持体であって、

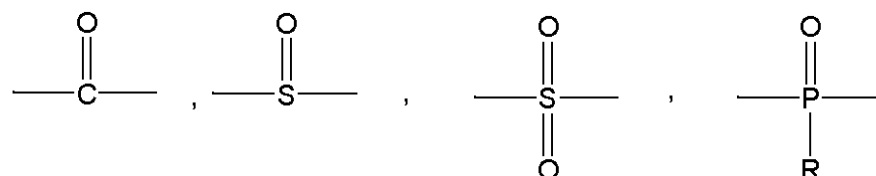
【化 3】



S は前記固体支持体であり、

X は以下の化学式からなるグループから選択され、

【化 4】



40

R は、約 18 個以下の炭素原子を有する、アルキル基、アリル基および OR^1 からなるグ
 ループから選択され、

R^1 は、約 18 個以下の炭素原子を有する、アルキル基およびアリル基からなるグループ
 から選択され、

X_1 は、 NH 、酸素およびイオウからなるグループから選択され、

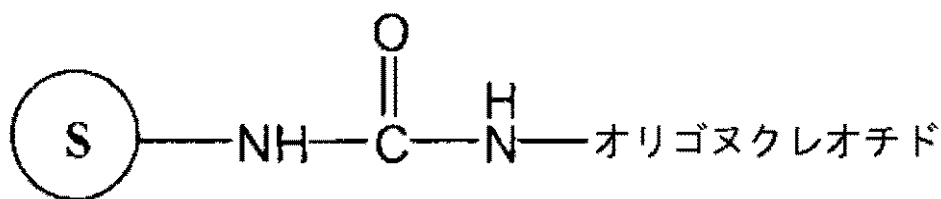
B は生物学的分子である、固体支持体。

【請求項 17】

50

以下の化学式

【化 5】



を有する請求項 16 に記載の固体支持体。

10

【請求項 18】

ステップ (a) の後でかつステップ (b) の前に前記固体支持体から未結合の化合物を洗浄するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

固体支持体に有機分子を結合させる方法であって、

(a) 前記固体支持体を活性化するステップと、

(b) 少なくとも 60 パーセントの相対湿度を有する加湿チャンバー内で、前記固体支持体に前記有機分子を反応させるステップとを含む、固体支持体に有機分子を結合させる方法。

【発明の詳細な説明】

20

【背景技術】

【0001】

以下の説明は、本発明に関連する情報の概要を提示するものであって、ここに提示される情報または引用される刊行物のいずれかが本発明の先行技術であることの承認ではない。

【0002】

固体支持体に固定化 (immobilized) または結合した生物学的分子は、アッセイのような診断および分析の手順で有用である。固体支持体に生物学的分子を固定化する方法の 1 つは、活性化化合物として、フッ化アシル (acyl fluoride、以下「AcF」という。) を利用する。この結合方法に関する情報は、以下の特許文献 1 および 2 に見つけることができる。別の方法は、生物学的分子を固体支持体に結合するための活性化化合物として、カルボニルジイミダゾール (以下「CDI」という。) を利用する。前記 CDI 法の活性化の方法のステップおよび結合の化学は以下の非特許文献 1 に説明されている。

30

【特許文献 1】

米国特許第 6, 146, 833 号明細書

【特許文献 2】

米国特許第 6, 110, 699 号明細書

【非特許文献 1】

Greg、T.、Hermanson、A.、Krishna Mallia および Paul、K.、Smith、「固定化アフィニティリガンド技術 (Immobilized Affinity Ligand Techniques)」、64 - 67 頁、(1992 年、Academic Press Inc. 社刊)

40

【0003】

上記の 2 つの方法は、1 または 2 以上の欠点を抱えている。AcF 法および CDI 法は 2 または 3 以上のステップを有し、ステップの追加は生物学的分子の結合のコストを上昇させる。例えば、これらの方法は、該方法において生物学的分子の結合が起こる前に、サクシニル化のステップのような追加のリンカーの化学反応を必要とする。前記方法において生物学的分子を結合するためのステップがより多く必要になるにつれて調製コストは上昇する。AcF 法および CDI 法は、固体支持体への生物学的分子の装荷量 (loading) が少ない。AcF 法および CDI 法は、この装荷量が少ないことの帰結として、低濃

50

度の被検体の検出用アッセイに用いられるとき、感度が低い。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

したがって、上記の代替的技術よりも効率的で、経済的で、簡単で、迅速な生物学的分子の固体支持体への固定化と、より高感度の被検体検出とに用いるシステムの必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0005】

発明の概要

本発明は上記の必要性を満たす。本発明は、少なくとも1個のアミノ基を有する固体支持体に、少なくとも1個のアミノ基、チオール基またはヒドロキシ基を有する生物学的分子を結合する方法を提供する。

【0006】

本発明による方法は、(i)少なくとも1個の利用可能なアミノ基を有する固体支持体と、(ii)活性化化合物とを反応させることを含む。任意的に、前記反応は、前記活性化化合物が溶解可能な第1の溶液中で行われる。前記活性化化合物は以下の構造を有する。

【0007】

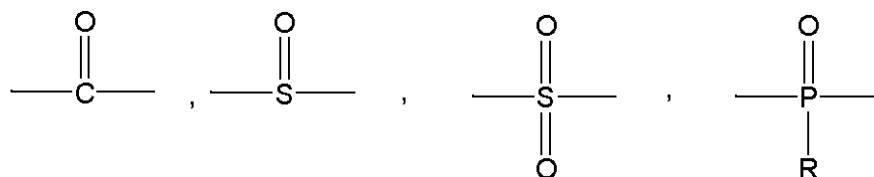
化学式(1)

$L_1 - X - L_2$

上記の化学式(1)で、 L_1 および L_2 は脱離基、すなわち求核置換反応において置換されることがある官能基で、 X は求核置換可能な部分(moiety)である。 L_1 および L_2 は、ハロゲン、イミダゾール、トリアゾール、ピロールピラゾール、チアゾール、テトラゾールおよびO-アリル-Rからなるグループから独立に選択されることがあり、 R は、ハロゲン基、ニトロ基、シアノ基およびアルコキシ基からなるグループから選択される。 X は、以下の化学式からなるグループから選択されることが好ましい。

【0008】

【化1】



【0009】

上記化学式で、 R は、約18個以下の炭素原子を有する、アルキル基、アリル基および $O-R^1$ 基からなるグループから選択され、 R^1 は、約18個以下の炭素原子を有する、アルキル基およびアリル基からなるグループから選択される。

【0010】

第1ステップの反応の結果、前記固体支持体の利用可能なアミノ基によって L_1 が置換され、活性化された支持体を形成する。

【0011】

本発明の第2ステップは、少なくとも1個の反応性のあるアミノ基、チオール基またはヒドロキシ基を有する生物学的分子を、前記活性化された支持体に反応させることを含む。任意的に、第2ステップは第2の溶液中で実施される。第2の溶液中の前記生物学的分子を含む低濃度の溶液が前記活性化された支持体の1または2以上の部位に付着される(deposited)とき、反応は加湿チャンバー内で行われることが好ましい。第2ステップの化学反応の結果、前記生物学的分子の前記反応性のアミノ基、チオール基またはヒドロキシ基が L_2 を置換し、前記生物学的分子を前記固体支持体に結合する。生物学的分子が結合した前記固体支持体は以下の化学式を有する。

【0012】

10

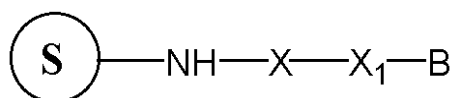
20

30

40

50

【化 2】



【0013】

上記化学式で X_1 は、反応性のアミノ基、チオール基またはヒドロキシル基からそれぞれ供与される、 NH 、酸素およびイオウからなるグループから選択され、 B は前記生物学的分子である。

【0014】

図面

本発明のこれらの特徴、観点および利点は、以下の説明と、特許請求の範囲と、活性化化合物としてカルボニル 1, 2, 4 - ジトリアゾールを用いる本発明の方法のステップを示す添付図面とを用いて、より良く理解されるであろう。

【0015】

発明の詳細な説明

以下に、本発明の実施態様と、該実施態様の複数の変形とを説明する。しかし、この説明は、本発明をこれらの具体的な実施態様に限定するものとして解釈されるべきではない。当業者は、多数の他の実施態様も認識するであろう。

【0016】

本発明は、少なくとも 1 個のアミノ基、チオール基またはヒドロキシル基を有する生物学的分子を、少なくとも 1 個の利用可能なアミノ基を有する固体支持体に結合するためのシステムと、これにより形成された新規な化合物とを提供する。本発明は複数の利点を有する。1 の利点は、本発明が前記 C D I 法および A c F 法より単純で、迅速でコストが安いことであるが、これは本発明が生物学的分子を固体支持体に結合するためにより少ないステップを用いるためである。別の利点は、本発明が前記 A c F 法および C D I 法より効率的で、結果として固体支持体への生物学的分子の装荷量がより多いことである。別の利点は、本発明が被検体の検出に C D I 法より高感度であることである。

【0017】

本発明は、アッセイまたは薬物検出キットの構成要素のような、分析および診断の手順のための構成要素の調製に有用である。本発明は、例えば、サイトカインの量および存在と、生物個体 (o r g a n i s m) における疾病の存在と、治療薬の量および存在と、感染源に由来する核酸の検出とのような、生物学的分子を伴うアッセイにおいて、利用可能である。

【0018】

ここで生物学的分子と称されるものは、いかなる有機分子をも網羅し、オリゴヌクレオチド、DNA および RNA のような核酸、ポリペプチド、ハプテンおよび糖質を含むが、これらに限定されない。ここでポリペプチドと称されるものは、タンパク質と、抗体と、これらのいずれかの断片とを網羅し、含むが、これらに限定されない。ハプテンは、一般に薬物、ホルモンおよび合成化合物のような低分子であり、該合成化合物は、治療薬および乱用薬物 (d r u g s o f a b u s e) の使用に関連する化合物を含むが、これらに限定されない。

【0019】

乱用薬物に関連するハプテンの例は、コカイン、モルヒネおよびニコチンの代謝または利用に関連する化合物を含むが、これらに限定されない。治療薬に関するハプテンの例は、トブラマイシン、フェノバルビトール、テオフィリン、ジゴキシンおよびゲンタマイシンの利用に関連する化合物を含むが、これらに限定されない。

【0020】

本発明の方法に用いられる生物学的分子は、少なくとも 1 個の反応性のアミノ基、チオール基またはヒドロキシル基を有する。少なくとも 1 個の反応性のアミノ基、チオール基またはヒドロキシル基を有する生物学的分子の例は、少なくとも 1 個の表面アミノ基を有す

10

20

30

40

50

るポリペプチドと、アミノ基誘導体化 (a m i n o d e r i v a t i z e d) オリゴヌクレオチドと、チオール化オリゴヌクレオチドと、チオール含有タンパク質とを含む。少なくとも1個の反応性のアミノ基、チオール基またはヒドロキシ基を有する、ポリペプチド、ハプテンおよび糖は、シグマ社 (ミズーリ州 6 3 1 7 8 、 セントルイス、 P . O . B o x 1 4 5 0 8) から購入可能である。前記ポリペプチドが、3次元形状を有するタンパク質または抗体のとき、アミノ基その他の反応性官能基が表面に配置されることは、前記置換反応が起こって、前記固体支持体に前記ポリペプチドを結合するうえで好ましい。少なくとも1個の表面の反応性のアミノ基、チオール基またはヒドロキシ基を有する多数のポリペプチドが本発明において利用可能である。例えば、リジンを含むポリペプチドは、少なくとも1個の表面のアミノ基を有することが典型的である。リジンは利用可能なアミノ基を有するアミノ酸である。利用可能な他のポリペプチドは、スルホヒドロキシ (s u l f h y d r o x y) 基含有タンパク質を含む。

10

【0021】

前記官能基を有する生物学的分子としてのオリゴヌクレオチドの例は、アミノ基誘導体化オリゴヌクレオチドと、少なくとも1個の遊離チオール基を有するオリゴヌクレオチドとを含む。アミノ化オリゴヌクレオチドは、DNA合成機ABI394 (カリフォルニア州 9 4 4 0 4 、 F o s t e r C i t y 、 8 5 0 L i n c o l n C e n t r e D r i v e 、 A p p l i e d B i o s y s t e m s 社から購入) を用いて、製造者のプロトコールに従い、3'アミノ基修飾剤C7CPG (バージニア州 2 0 1 6 4 、 2 2 8 2 5 S t e r l i n g 、 D a v i s D r i v e 、 G l e n R e s e a r c h 社から購入) で合成することができる。前記アミノ基は、オリゴヌクレオチドの3'末端または5'末端に付加される場合がある。3'アミノ化オリゴヌクレオチドが本発明のアミノ化オリゴヌクレオチドの調製に用いられることが好ましい。アミノ基誘導体化オリゴヌクレオチドの調製方法は、引用によりここに取り込まれる米国特許第6,110,669号明細書にも説明されている。さらに、少なくとも1個の遊離のチオール基を有するオリゴヌクレオチドが、Glen Research社から購入された支持体で製造者のプロトコールに従って合成される場合がある。

20

【0022】

当業者は、アッセイその他の診断または分析の手順において使用するために、生物学的分子が改変される場合があることを認めるであろう。本発明はこれらの改変を意図する。

30

【0023】

図1を参照して、本発明は、固体支持体に生物学的分子を固定化するための2つのステップを含む。本方法の第1のステップは、第1の溶液中で、少なくとも1個の利用可能なアミノ基を有する固体支持体と、第1の溶液中に溶解可能な活性化化合物とを反応させて、活性化固体支持体を形成することを含む。本方法の第2のステップは、第2の溶液中で、第1のステップ由来の活性化固体支持体に、少なくとも1個の反応性のアミノ基、チオール基またはヒドロキシ基を有する生物学的分子を反応させることを含む。第2のステップの結果、前記固体支持体に結合した生物学的分子ができる。

【0024】

利用可能なアミノ基を固体支持体に結合させることができる固体支持体は、天然材料および合成材料を含むが、これらに限らない広範囲の材料を含む。天然材料は、セルロースおよびアガロースを含むが、これらに限らない。合成材料は、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリメタクリル酸、ナイロンを含むが、これらに限らない。本発明に用いられる固体支持体は、ビーズ、プレート、フィルムその他の構造のような異なる形状をとる場合がある。利用可能なアミノ基を有する固体支持体を容易する手順は当業者に周知であり、手順の例は、引用によりここに取り込まれる米国特許第5,112,736号明細書に説明される。

40

【0025】

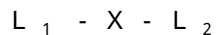
第1の溶液は、アセトニトリル (A c C N) 、ジメチルホルムアミド (D M F) 、ジメチルスルホキシド (D M S O) 、ジクロロメタン、ジクロロエタン、トルエンおよびテトロ

50

ヒドロフナン (t e t r o h y d r o f u n a n) のような有機溶媒の場合がある。

【 0 0 2 6 】

前記活性化化合物はの構造



を有する。

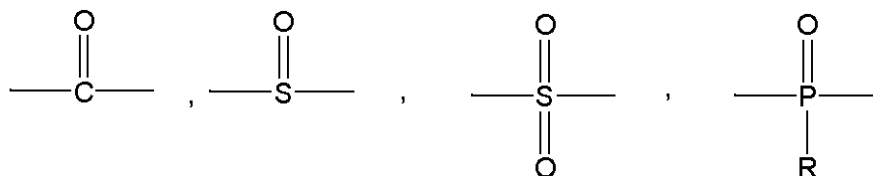
【 0 0 2 7 】

上記化学式で、 L_1 および L_2 は求核置換反応の脱離基であり、 X は求核置換可能な部分である。 L_1 および L_2 は、ハロゲン、イミダゾール、トリアゾール、ピロール、ピラゾール、チアゾール、テトラゾールおよび O -アシル-R からなるグループから独立に選択されることが好ましいが、 R は、ハロゲン基、ニトロ基、シアノ基およびアルコキシ基からなるグループから選択される。 X は以下の化学式からなるグループから選択されることが好ましい。

10

【 0 0 2 8 】

【化 3】



【 0 0 2 9 】

上記化学式で、 R は、約 18 個以下の炭素原子を有する、アルキル、アシルおよび OR_1 からなるグループから選択され、 OR_1 は、約 18 個以下の炭素原子を有する、アルキルおよびアシルからなるグループから選択される。

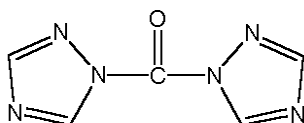
20

【 0 0 3 0 】

好ましい活性化化合物は、以下の構造式を有するカルボニル 1, 2, 4 - ジトリアゾールである。

【 0 0 3 1 】

【化 4】



30

【 0 0 3 2 】

(カルボニル 1, 2, 4 - ジトリアゾールは、ミズーリ州、セントルイス、シグマ社から入手可能である。) タンパク質および適当な活性化化合物は、カルボニルジイミダゾール (CDI)、2 塩化カルボニル (carbonyl dichloride) およびクロロ酸ニトロフェニルを含むが、これらに限られない。

【 0 0 3 3 】

トリエチルアミン、ジイソプロピルアミン、トリブチルアミン、トリメチルアミンのような第 3 有機塩基 (tertiary organic base) が第 1 の溶液に添加されて、第 1 の反応の速度および効率を増加させる。

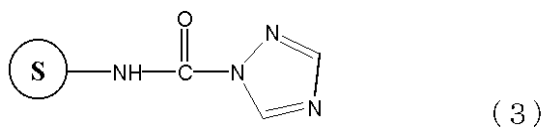
40

【 0 0 3 4 】

第 1 のステップで起こる化学反応は、前記活性化化合物と、前記固体支持体の利用可能なアミノ基との間の求核置換反応である。前記活性化化合物の第 1 の脱離基 L_1 は、前記固体支持体の利用可能なアミノ基に置換されて、活性化された支持体を形成する。カルボニル 1, 2, 4 - ジトリアゾールが活性化化合物のとき、前記活性化された支持体は以下の構造を有する。

【 0 0 3 5 】

【化 5】



【0036】

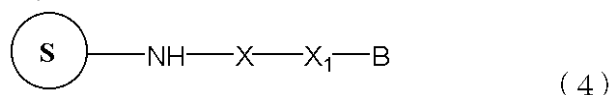
第2の溶液は、炭酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液のような緩衝液を含む水溶液の場合があるか、あるいは、DMF、DMSO、CH₃CNおよびCH₂Cl₂のような有機溶媒を利用する場合がある。

【0037】

第2のステップで起こる化学反応は、前記活性化固体支持体と、第2の溶液中の前記生物学的分子との間の求核置換反応である。前記活性化固体支持体の第2の脱離基L₂は、それぞれの生物学的分子の前記反応性のアミノ基、チオール基またはヒドロキシル基で置換される。得られる新規な組成物は、以下の構造式を有する。

【0038】

【化6】



【0039】

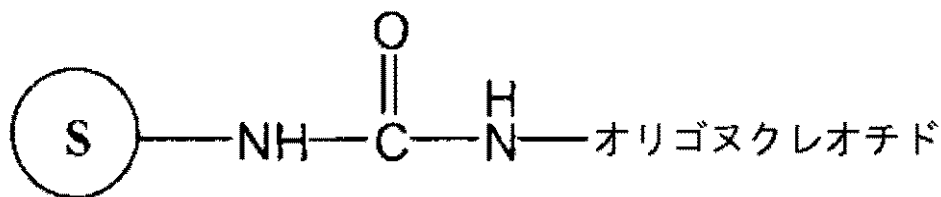
上記式で、X₁は、前記生物学的分子のアミノ基、チオール基またはヒドロキシル基からそれぞれ供与される、NH、酸素およびイオウからなるグループから選択され、Bは前記生物学的分子である。

【0040】

前記活性化された支持体(3)がアミノ基誘導体化オリゴヌクレオチドと反応するとき、得られる組成物は以下の構造を有する。

【0041】

【化7】



(5)

【0042】

本発明の別の実施態様(version)では、第2のステップは、第2の溶液中の生物学的分子を含む低濃度の溶液が前記活性化固体支持体の1または2以上の部位に付着されるとき、加湿チャンバー内で実施されることが好ましい。ここで用いられる低濃度とは、約10ミクロン乃至約500ミクロンの直径を有する円形のスポット内の約5乃至25ナノリットルの溶液の濃度を指す。湿度は、少なくとも60パーセントの相対湿度であることが好ましい。加湿チャンバーを形成する密閉容器内の湿度は、約80パーセントから100パーセントまでの相対湿度であることがより好ましい。低濃度の前記溶液が加湿チャンバー内で反応するときには、非加湿チャンバー内で同じ反応をする場合と比較すると、著しく高い装荷量の生物学的分子が前記固体支持体に装荷される。低濃度の溶液を付着または散布(dispense)する技術は、分析または診断の手順でしばしば用いられる。限定としてではなく例示として、インクジェット技術およびピエゾ電気マイクロジェット印刷技術が、低濃度の溶液を送達するために利用されてきており、前記固体支持体にスポットを「プリントする」とよばれる。低濃度の溶液を有するスポットのアレイが前記固体支持体にプリントされる。固体支持体に生物学的分子をプリントする方法は、引用によ

りここに取り込まれる米国特許第 6, 146, 833 号明細書に説明されている。

【発明を実施するための最良の形態】

【0043】

本発明は、この節で説明された好ましい実施態様に限定されない。前記実施態様は例示に過ぎず、当業者は、本発明に従う多くの他の実施態様が可能であることを認識するであろう。これまで一般的に本発明を説明してきたが、同じ発明は、例示のために提示され、特記されない限り本発明を限定することを意図しない以下の実施例を参照して、より容易に理解されるであろう。

【実施例 1】

【0044】

アミン基誘導体化プレートの調製

本実施例は、本発明に用いる固体支持体の調製を説明する。ポリプロピレンのプレートが、引用によりここに取り込まれる米国特許第 5, 112, 736 号明細書の手順に従ってアミノ化された。前記プレートは、以下の条件下で、Plasma Science モデル 0150E アミネーター (Aminator、カリフォルニア州 94533、2700 Maxwell Way、Fairfield、Plasma Science、Aircoco Coating Technology 社) を使って、プラズマチャンバー内に入れて、アンモニアガスでアミノ化された。

【0045】

ステップ I: アンモニア、0.256 トル、4 分間

ステップ II: アンモニア、0.306 トル、プラズマ電力 40% (RF)、2 分間

ステップ III: アンモニア、0.256 トル、2 分間

ステップ IV: アルゴン (Ar) 0.265 トル、10 分間

【実施例 2】

【0046】

加湿チャンバーおよび非加湿チャンバー内での、本発明と、CDI 法と、AcF 法とによる、アミノ化オリゴヌクレオチドのプレートへの装荷量の比較

本実施例は、加湿チャンバーと非加湿チャンバーとの両方において、本発明と、CDI 法と、AcF 法とを比較した。アミノ化されたプレートは実施例 1 に従って、それぞれの方法用に調製された。本発明に従う活性化固体支持体を作成するために、前記アミノ化されたプレートは、アルゴン存在下のグローブボックス内で、3 - 5% 無水 (dry) トリエチルアミンを含む無水 AcCN 溶液中の 0.1 M カルボニル 1, 2, 4 - ジトリアゾール (ミズーリ州、セントルイス、シグマ) と 2 - 3 時間反応させられた。前記プレートは 3 回洗浄され、風乾された。

【0047】

前記 AcF 法用の活性化固体支持体を作成するためには、米国特許第 6, 146, 833 号明細書および米国特許第 6, 110, 69 号明細書に説明されている手順をが用いられた。CDI 法用の活性化固体支持体を作成するためには、Greg、T.、Hermanson、A.、Krishna Mallia および Paul、K.、Smith、「固定化アフィニティリガンド技術 (Immobilized Affinity Ligand Techniques)」、64 - 67 頁、(1992 年、Academic Press Inc. 社刊) に説明されている手順が用いられた。

【0048】

それぞれの方法用の活性化固体支持体に結合される生物学的分子は、DNA 合成機 ABI 394 (カリフォルニア州、Foster City、Applied Biosystems 社から購入) を用いて、製造者のプロトコルに従い、3' アミノ基修飾剤 C7 CPG (バージニア州、Sterling、Glen Research 社) で合成された 3' - アミノ化オリゴヌクレオチド - 5' - Cy3 であった。Cy3 は、蛍光色素であるシアニン色素で、バージニア州 20166、Sterling、44901 Falcon Place の Glen Research 社から購入可能である。それぞれの方法に

10

20

30

40

50

において、4% Na_2SO_4 を含むpH9.3の重炭酸緩衝液中の20 mM 3'-アミノ化オリゴヌクレオチド-5'-Cy3が、Biomek 2000（カリフォルニア州、Fullerton、Beckman Coulter社）を用いて、密閉された無塵の加湿チャンバー内でプリントすることにより、前記プレートの複数の部位に約5-25ナノリットルで約10ミクロン乃至約500ミクロンの直径を有する円形のスポット内に3×3のアレイ状に付着された。プリントされた前記プレートは、実験のある観点のためには加湿チャンバー内で、実験の別の観点のためには非加湿チャンバー内で、終夜放置された。それぞれの方法で、未反応の活性化官能基は、50 mM 炭酸塩緩衝液、150 mM NaCl 、1 mg/ml カゼインで室温にて終夜不活性化され（quenched）、水洗されて、電荷結合素子カメラ（CCDカメラ）の下で観察された（imaged）。前記CCDカメラは570 nmの蛍光発光を集光し、前記蛍光の発光の強度または輝度は、前記プレートへの前記オリゴヌクレオチドの装荷量に対応した。

10

【0049】

実施例2についてのCCDカメラの結果は、加湿チャンバーおよび非加湿チャンバーの条件下で、それぞれの濃度レベルで、他の方法に比べて本発明がより強度の信号、すなわち、前記固体支持体へのオリゴヌクレオチドの装荷量がより大量であることを示した。加湿チャンバーの条件下では、本発明は全ての濃度で他の方法よりも強い強度を示した。非加湿チャンバー条件下では、本発明は、濃度の増加とともに相対的に大きな強度の増加を示したが、他の方法は、濃度の増加とともにより少ない増加を示した。

【0050】

20

実施例2のCCDカメラの結果は、本発明だけでなく、全ての方法で、非加湿チャンバーでの結果と対比して加湿チャンバーで反応させたときのほうが前記アミノ化オリゴヌクレオチドの装荷量がより高かったことを示した。

【実施例3】

【0051】

IL8アッセイを用いてCDI法と対比された本発明の感度

実施例3は、実験プロトコールと、被検体の検出における本発明とCDI法との感度の比較から得られた結果とを説明する。アミノ化プレートは、実施例1に従ってそれぞれの方法用に調製された。3'-アミノ化オリゴヌクレオチドが合成され、以下の2つの例外を除いて、実施例2に説明された手順に従ってプリントされた。第1の例外は、3×3のアレイ状にプリントされた前記アミノ化オリゴヌクレオチドが、該アミノ化オリゴヌクレオチドを含む液体の入ったプリント用ピンが前記プレートの表面に5回接するように、4回重複プリント（4 over prints）を行ったことである。第2の例外は、前記反応が加湿チャンバーのみで行われたことである。

30

【0052】

IL8アッセイが、本発明とCDI法との間での比較評価を提供するために利用された。本実験で用いられたIL8アッセイのプロトコールは、引用によりここに取り込まれた米国特許第5,548,213号明細書に説明されたものと同じのプロトコールであった。具体的には、前記プロトコールは以下に詳細に説明されている。

【0053】

40

ステップI。カゼイン緩衝液中の抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲート140 ng/ウェルを添加し、前記プレートを37°Cで1時間振盪した。前記プレートを洗浄緩衝液（1×Tris緩衝生理食塩水中の0.02% Tween 20）で3回洗浄した。

【0054】

ステップII。ウェルあたりカゼイン緩衝液中の1000-1 pg/mlの範囲の抗原を添加し、37°C 1時間反応させ、洗浄緩衝液で3回洗浄した。アッセイで用いられた抗原濃度は、0 pg/ml、1 pg/ml、5 pg/ml、10 pg/ml、25 pg/ml、50 pg/ml、250 pg/mlおよび1000 pg/mlであった。

【0055】

ステップIII。ウェルあたり50 ngのビオチン化抗体（ミネソタ州55413、Mi

50

nnapolis、614 McKinley Place N.E.、R&D systems社から購入)を添加し、37°C 1時間インキュベーションをし(incubate)、3回洗浄した。

【0056】

ステップIV。水1mlに1mg溶解したストレプトアビジンPBx1を、1:150希釈し、50 μ l/ウェルで添加して、37°C 1時間インキュベーションし、洗浄緩衝液で3回洗浄した。50 μ lの洗浄緩衝液が各ウェルに保存され、CCDカメラを用いて観察された。前記CCDカメラは670nmの蛍光発光を集光したが、該蛍光発光は、オリゴヌクレオチドでタグ付けされた抗体の前記固体支持体への装荷量に対応していた。

【0057】

実施例3のCCDカメラの結果は、同一の被検体濃度では、本発明のほうがCDI法よりも高い検出感度であることを証明した。前記蛍光発光または前記スポットの輝度は、前記被検体の検出量に対応していた。本発明は、1pg/mlからスポット(CCDで捕捉された輝度)を検出し、濃度が1000pg/mlまで増加するにつれて輝度が増大した。これに対し、CDI法は、約25pg/mlまではスポットを検出しはじめなかった。したがって、本発明は、CDI法よりも高い感度を示した。

【0058】

理論に拘泥するわけではないが、発明者は、本発明のほうが感度が高いことはアミノ化オリゴヌクレオチドの装荷量が多いことが原因であるかもしれないと信じた。本発明の方法で得られた大きい装荷量は、競合する加水分解に対してトリアゾール化尿素結合(triazolyl urea linkage)の安定性が増大し、これにより、アミノ化オリゴヌクレオチドが前記プレートに結合する機会が増加したためであると推定される。少なくとも1個の反応性のアミノ基、チオール基またはヒドロキシル基を有する他の生物学的分子は、本発明の下では、CDI法を用いた生物学的分子の結合よりも高い感度および大きい装荷量を示すはずである。

【0059】

本発明を以上のとおり説明してきたが、これまで説明し、また特許請求の範囲に記載されるとおりの本発明の範囲および正当な意味から逸脱することなく多数の改変および適応が行われる場合があることは明らかなはずである。

【0060】

本発明はそのいくつかの好ましい実施態様についてかなり詳しく説明されたが、他の実施態様が可能である。したがって、添付する特許請求の範囲の趣旨および範囲はここに説明された好ましい実施態様の説明に限定されるべきではない。

【0061】

特許請求の範囲、要約および図面を含む明細書に説明された全ての特徴と、開示されたいかなる方法または工程の全てのステップとは、かかる特徴および/またはステップの少なくとも一部が相互に排他的である組合せを除いて、いずれかの組合せで結合される場合がある。特許請求の範囲、要約および図面を含む明細書で開示されたそれぞれの特徴は、特記されないかぎり、同一、均等または類似の目的を果たす代替的な特徴によって置換可能である。したがって、特記されないかぎり、開示されたそれぞれの特徴は、均等または類似の特徴の上位概念の一例である。

【0062】

特定の機能を実行する「手段」または特定の機能を実行する「ステップ」と明記していない請求項の要素は、米国特許法第112条に定める「手段」または「ステップ」の条項として解釈されるべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】活性化化合物としてカルボニル1,2,4-ジトリアゾールを用いる本発明の方法のステップを示す工程図。

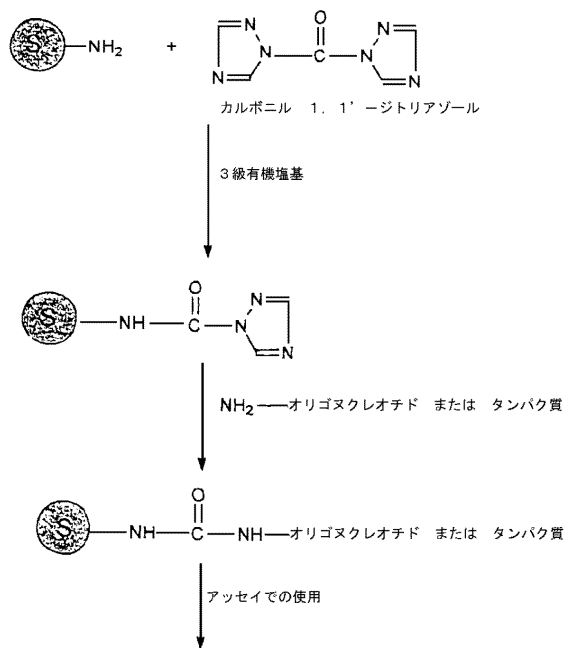
10

20

30

40

【 図 1 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

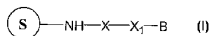
(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 May 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/036257 A2

- (51) International Patent Classification: G01N (74) Agents: MAY, William H. et al.; BECKMAN COULTER, INC., 4300 N. Harbor Blvd., Box 3100, Fullerton, CA 92834-3100 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/33059
- (22) International Filing Date: 17 October 2002 (17.10.2002) (81) Designated State (national): JP.
- (25) Filing Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 10/053,308 24 October 2001 (24.10.2001) US Published: without international search report and to be republished upon receipt of that report
- (71) Applicant: BECKMAN COULTER, INC. [US/US]; 4300 N. Harbor Blvd., Box 3100, Fullerton, CA 92834-3100 (US). For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.
- (72) Inventors: REDDY, M. Parameswara; 219 Valverde Avenue, Brea, CA 92821 (US); FAROOQUI, Firdous; 426 Shady Court, Brea, CA 92821 (US).

(54) Title: IMMOBILIZING BIOLOGICAL MOLECULES



(i)



(ii)



(iii)



(iv)

(57) Abstract: This invention provides a system for immobilizing biological molecules onto a solid support having an available amino group that uses two steps. In a first step, a nucleophilic substitution reaction occurs so that the available amino group displaces a first leaving group of an activating compound to form an activated support. In a second step, the activated support reacts with biological molecules resulting in a composition of the formula: (I) wherein S is a solid support, preferably X is selected from the group consisting of (i), (ii), (iii), (iv), wherein R is selected from the group consisting of alkyl, aryl, and OR¹ about 18 carbon atoms, wherein R¹ is selected from the group consisting of alkyl and aryl having no greater than about 18 carbon atoms, wherein X¹ is selected from the group consisting of NH, oxygen, and sulfur, and wherein B is a biological molecule.

WO 03/036257 A2

WO 03/036257

PCT/US02/33059

IMMOBILIZING BIOLOGICAL MOLECULES

by

M. Parameswara Reddy**Firdous Farooqui****BACKGROUND**

5 The following description provides a summary of information relevant to the
10 present invention and is not a concession that any of the information provided or
 publications referenced herein is prior art to the presently claimed invention.

 Biological molecules immobilized or attached to solid supports are useful in
 diagnostic and analytical procedures, such as assays. One method for immobilizing
15 biological molecules onto solid supports uses acyl fluoride ("AcF") as an activating
 compound. Information relevant to this method of attachment can be found in U.S.
 Patent No. 6,146,833 and U.S. Patent No. 6,110,699. Another method uses carbonyl
 diimidazole ("CDI") as an activating compound to attach biological molecules to a
 solid support. The steps for the activation method and coupling chemistry of the CDI
20 method are described in Greg T. Hermanson, A. Krishna Mallia, and Paul K. Smith,
 "Immobilized Affinity Ligand Techniques," pages 64-67 (1992 Academic Press Inc.

 The two methods described above suffer from one or more disadvantages. The
 AcF method and CDI method have more than two steps, and additional steps increase
 the cost of attachment of a biological molecule. For example, these methods require
 additional linker chemistry, such as a succinylation step, before attachment of
25 biological molecules occur in the method. As more steps are necessary to attach the
 biological molecule in the method, preparation costs increase. The AcF and CDI
 methods also result in a low loading of biological molecules onto a solid support. The
 AcF and CDI methods, as a consequence of this low loading, have diminished
 sensitivity when used in an assay for detection of a low concentration of an analyte.

30 Accordingly, a need exists for a system useful in immobilizing biological
 molecules to solid supports that is more efficient, more economical, simpler, and

WO 03/036257

PCT/US02/33059

faster than the alternatives as well as providing greater sensitivity for analyte detection.

SUMMARY

5

The present invention satisfies that need. The invention provides a method for attaching biological molecules with at least one reactive amino, thiol or hydroxyl group to a solid support having at least one available amino group.

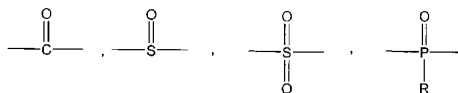
10 A method according to the present invention comprises reacting: (i) a solid support with at least one available amino group and (ii) an activating compound. Optionally the reaction is in a first solution, where the activating compound is soluble in the first solution. The activating compound has the structure:



15

wherein L_1 and L_2 are leaving groups, namely groups that can be displaced in nucleophilic substitution reactions, and X is a moiety capable of nucleophilic substitution. L_1 and L_2 can be independently selected from the group consisting of

20 wherein R is selected from a group consisting of halogen, nitro, cyano, and alkoxy moiety. Preferably, X is selected from the group consisting of:



25

wherein R is selected from the group consisting of alkyl, aryl, and OR^1 having no greater than about 18 carbon atoms, and

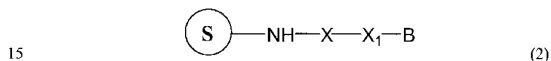
WO 03/036257

PCT/US02/33059

wherein R^1 is selected from the group consisting of alkyl and aryl having no greater than about 18 carbon atoms.

The reaction in the first step results in L_1 being displaced by the available amino group on the solid support to form an activated support.

5 The second step of the method of the present invention comprises reacting a biological molecule having at least one reactive amino, thiol or hydroxyl group with the activated solid support. Optionally the second step occurs in a second solution. When a low concentration of a solution comprising the biological molecule in the second solution is deposited onto one or more sites of the activated support, preferably
10 the reaction occurs in a humid chamber. The chemical reaction in the second step results in the reactive amino, thiol, or hydroxyl group of the biological molecule displacing L_2 , and attaching the biological molecule to the solid support. The solid-support with an attached biological molecule has the following formula:



wherein X_1 is selected from the group consisting of NH, oxygen, and sulfur provided by the reactive amino, thiol, or hydroxy group respectively of the biological molecule, and

20 wherein B is the biological molecule.

DRAWING

25 These features, aspects and advantages of the present invention will become better understood with regard to the following description, appended claims and accompanying drawing which shows the steps of the method of the present invention using 1,2,4-carbonyl di triazole as the activating compound.

WO 03/036257

PCT/US02/33059

DESCRIPTION

5 The following discussion describes embodiments of the invention and several variations of these embodiments. This discussion should not be construed, however, as limiting the invention to these particular embodiments. Practitioners skilled in the art will recognize numerous other embodiments as well.

10 The invention provides a system for attaching biological molecules having at least one reactive amino, thiol or hydroxyl group to a solid support having at least one available amino group, and the novel compositions formed thereof. The invention has several advantages. One advantage is the invention is simpler, faster, and less costly than the CDI and AcF methods because it uses less steps to attach biological molecules to solid supports. Another advantage is the invention is more efficient, and results in higher loading of biological molecules onto solid supports than the AcF and CDI methods. Another advantage is the invention has shown greater sensitivity than
15 the CDI method in detection of an analyte.

The invention is useful in preparation of components for analytical and diagnostic procedures, such as a component in an assay or drug detection kit. The invention can be used, for example, in an assay involving biological molecules such as for the quantity and presence of cytokines, the presence of a disease state in an
20 organism, the quantity and presence of a therapeutic drug, and detection of nucleic acids resulting from underlying infections.

Biological molecule as referred to herein encompasses any organic molecule, and includes but is not limited to oligonucleotides, nucleic acids, such as DNA and RNA, polypeptides, haptens, and carbohydrates. Polypeptide as referred to herein
25 encompasses, and includes but is not limited to proteins and antibodies, and any fragments thereof. Haptens are generally small molecules, such as drugs, hormones, and synthetic compounds including but not limited to compounds associated with the use of therapeutic drugs and drugs of abuse.

30 Examples of haptens associated with drugs of abuse include but are not limited to compounds associated with the metabolism or use of cocaine, morphine, and nicotine. Examples of haptens in terms of therapeutic drugs include but are not limited to compounds associated with the use of tobramycin, phenobarbital,

WO 03/036257

PCT/US02/33059

theophylline, digoxin, and gentamycin.

Biological molecules used in the method of the present invention have at least one reactive amino, thiol or hydroxyl group. Examples of biological molecules with at least one reactive amino, thiol or hydroxyl group include polypeptides with at least one surface amino group, amino derivatized oligonucleotides, thiolated oligonucleotides, and thiol containing proteins. Polypeptides, haptens, and carbohydrates with at least one reactive amino, thiol or hydroxyl group, can be purchased from Sigma, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178. When the polypeptide is a protein or antibody with a three dimensional configuration, the location of the amino group or other reactive group on the surface of the molecule is preferable for the substitution reaction to occur, and to attach the polypeptide to the solid support. Numerous polypeptides with at least one surface reactive amino, thiol, or hydroxy group can be used in the present invention. For example, polypeptides with lysine as a component typically have at least one surface amino group. Lysine is an amino acid with an available amino group. Other polypeptides that can be used include proteins containing sulphydroxy groups.

Example of oligonucleotides as the biological molecule having the reactive group include amino derivatized oligonucleotides and oligonucleotides having at least one free thiol group. Amino oligonucleotides can be synthesized on a 3'-Amino-Modifier C7 CPG (purchased from Glen Research, 22825 Davis Drive, Sterling, Virginia 20164) following the manufacturer's protocol using a DNA synthesizer ABI 394 (purchased from Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404). The amino group can be placed at 3' end or at 5' end of oligonucleotide. The 3' amino oligonucleotide is preferably used in the preparation of amino oligonucleotides for the present invention. A method for preparing amino derivatized oligonucleotides is also described in U.S. Patent No. 6,110,669 which is incorporated by reference hereto. In addition, oligonucleotides having at least one free thiol group can be synthesized on supports purchased from Glen Research following the manufacturer's protocol.

Those persons skilled in the art will recognize that biological molecules can be modified for use in assays, and other diagnostic or analytical procedures. The present invention contemplates these modifications.

WO 03/036257

PCT/US02/33059

With reference to the drawing, the present invention comprises two steps for immobilizing a biological molecule onto a solid support. The first step of the method comprises reacting in a first solution a solid support with at least one available amino group, and an activating compound soluble in the first solution to form an activated solid support. The second step of the method comprises reacting the activated solid support from the first step with a biological molecule having at least one reactive amino, thiol or hydroxyl group in a second solution. The second step results in the biological molecule attaching to the solid support.

Solid supports capable of having an available amino group attached thereto include a wide range of materials including but not limited to natural materials and synthetic materials. Natural materials include but are not limited to cellulose, and agarose. Synthetic materials include but are not limited to polypropylene, polystyrene, polymethacrylate, nylon. The solid supports used in the invention may take different forms such as a bead, plate, film, or other structures. Procedures for providing a solid support with an available amino group are well known in the art, and an example of a procedure is described in US Patent No. 5,112,736 which is incorporated by reference herein.

The first solution can be an organic solvent such as acetonitrile ("AcCN"), dimethyl formamide ("DMF"), dimethyl sulfoxide ("DMSO"), dichloromethane, dichloroethane, toluene, and tetrahydrofuran.

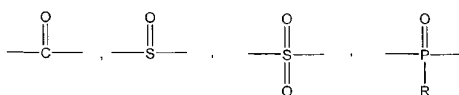
The activating compound has the structure:



wherein L_1 and L_2 are leaving groups in a nucleophilic substitution reaction, and X is a moiety capable of nucleophilic substitution. Preferably, L_1 and L_2 is independently selected from the group consisting of halogen, imidazole, triazole, pyrrole, pyrazole, thiazole, tetrazole, and O-Aryl-R, wherein R is selected from the group consisting of halogen, nitro, cyano, and alkoxy moiety. X is preferably selected from the group consisting of:

WO 03/036257

PCT/US02/33059

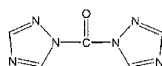


5 wherein R is selected from the group consisting of alkyl, aryl, and OR¹ having no greater than about 18 carbon atoms, and

wherein R¹ is selected from the group consisting of alkyl and aryl having no greater than about 18 carbon atoms.

A preferred activating compound is 1,2,4-carbonyl di triazole, which has the formula:

10



(1, 2, 4 - carbonyl di-triazole is available from Sigma, St. Louis, MO). Other suitable activating compounds include but are not limited to carbonyl diimidazole ("CDI"), carbonyl dichloride, and nitrophenyl chloroformate.

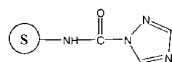
15

Preferably, a tertiary organic base such as triethylamine, diisopropylamine, tributylamine, trimethylamine is added to the first solution to increase the rate and efficiency of the first reaction.

20

The chemical reaction that occurs in the first step is a nucleophilic substitution reaction between the activating compound and the available amino group on the solid support. A first leaving group, L₁ of the activating compound, becomes displaced by the available amino group on the solid support to form an activated support. When 1,2,4-carbonyl di triazole is the activating compound, the activated support has the following structure:

25



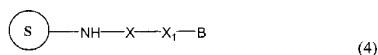
(3)

WO 03/036257

PCT/US02/33059

The second solution can be an aqueous solution containing a buffer, such as carbonate buffer, phosphate buffer, borate buffer, or can utilize an organic solvent such as DMF, DMSO, CH₃ CN, and CH₂Cl₂.

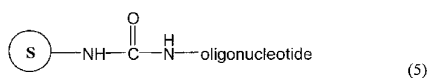
The chemical reaction that occurs in the second step is a nucleophilic substitution reaction between the activated solid support and the biological molecule in the second solution. The second leaving group, L₂ of the activating compound, becomes displaced by the reactive amino, thiol, or hydroxyl group of the respective biological molecule. The resulting novel composition has the following formula:



wherein X₁ is selected from the group consisting of NH, oxygen, and sulfur provided by the reactive amino, thiol, or hydroxy group respectively of the biological molecule, and

wherein B is the biological molecule.

When the activated support (3) reacts with an amino derivatized oligonucleotide, the resulting composition has the following structure:



In another version of the present invention, the second step is preferably performed in a humid chamber when low concentrations of a solution comprising biological molecules in the second solution is deposited onto one or more sites of the activated solid support. Low concentration as used herein refers to a concentration of solution between about 5 to about 25 nanoliters within a circular spot having a diameter of between about 10 microns to about 500 microns. Preferably the humidity is at least 60 percent relative humidity. More preferably, the humidity in an enclosure forming the humid chamber is from about 80 to 100 percent relative humidity. When

WO 03/036257

PCT/US02/33059

the low concentrations of the solution react in a humid chamber, a significantly higher loading of biological molecules onto the solid support occurs when compared against the same reactions in a non-humid chamber. Techniques to deposit or dispense low concentrations of solutions are often used in analytical or diagnostic procedures. For example, and not as a limitation, inkjet technology and piezo electric microjet printing technology have been used to deliver low concentrations of solution, and is referred to as "printing" spots on the solid supports. An array of spots having a low concentration of solution is printed onto the solid support. A method of printing biological molecules onto a solid support is described in U.S. Patent No. 6,146, 833 which is incorporated by reference herein.

The present invention is not limited to the preferred embodiments described in this section. The embodiments are merely exemplary, and one skilled in the art will recognize that many others are possible in accordance with this invention. Having now generally described the invention, the same will be more readily understood through references to the following examples, which are provide by way of illustration, and are not intended to be limiting of the present invention, unless so specified.

EXAMPLE 1

PREPARATION OF ANINE DERIVATIZED PLATES

This example describes the preparation of a solid support used in the invention. Polypropylene plates were aminated according to the procedure of US Patent No. 5,112,736 which is incorporated by reference herein. The plates were placed in plasma chamber and aminated with ammonia gas using a Plasma Science, Model 0150E Aminator (Plasma Science, Airco Coating Technology, 2700 Maxwell Way, Fairfield, CA 94533) under following conditions:

- Step I: Ammonia, 0.256 Torr, 4 min
- Step II: Ammonia, 0.306 Torr, Plasma 40% power (RF), 2 min
- Step III: Ammonia, 0.256 Torr, 2 min
- Step IV: Ar, 0.265 Torr, 10 min

WO 03/036257

PCT/US02/33059

EXAMPLE 2

COMPARISON OF AMINO OLIGONUCLEOTIDE LOADING ONTO
PLATES BETWEEN THE PRESENT INVENTION, CDI METHOD, AND
ACF METHOD IN A HUMID CHAMBER AND NON-HUMID CHAMBER

5

This example compared the present invention, CDI method, and AcF method in both a humid chamber and non-humid chamber. Aminated plates were prepared for each method according to Example 1. To create an activated solid support in accordance with the present invention, the aminated plates were reacted with 1,2,4 - carbonyl di-triazole (Sigma, St. Louis, MO.) 0.1 M solution in anhydrous AcCN with 3-5% dry triethylamine in a glove box under argon for 2-3 hours. The plates were washed three times and air dried.

10

To create an activated solid support for the AcF method, the procedure described in U.S. Patent No. 6,146,833 and U.S. Patent No. 6,110,69 was used to create an activated solid support for the CDI method, the procedure described in Greg T. Hermanson, A. Krishna Mallia, and Paul K. Smith, "Immobilized Affinity Ligand Techniques," pages 64-67 (1992 Academic Press Inc.) was used.

15

The biological molecules attached to the activated solid support for each method were 3'-amino oligonucleotide-5'-Cy3 synthesized on a 3'-Amino-Modifier C7 CPG (Glen Research, Sterling, Virginia) following manufacturer's protocol on DNA synthesizer ABI 394 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Cy3 is a cyanine dye which is a fluorophore, and can be purchased from Glen Research, 44901 Falcon Place, Sterling, VA 20166. In each method, 20 μ M of 3'-amino oligonucleotide-5'-Cy3 in bicarbonate buffer pH 9.3 with 4% Na₂SO₄ were deposited in about 5 - 25 nanoliters within a circular spot having a diameter of between about 10 microns to about 500 microns onto several sites of the plates in the form of 3 x 3 array by printing in a closed, dust free, and humid chamber using with a Biomek 2000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). The printed plates were left overnight in a humid chamber for one aspect of the experiment and a non humid chamber for the other aspect of the experiment. In each method, the unreacted active groups were quenched with 50 mM carbonate buffer, 150 mM NaCl, 1 mg/ml casein overnight at room temperature, washed with water, and imaged under a charge coupled device camera ("CCD camera"). The CCD camera collected fluorescent emission at 570 nm, and the

20

25

30

WO 03/036257

PCT/US02/33059

intensity or brightness of the fluorescent emissions correlated to loading of the oligonucleotides onto the plates.

5 The CCD camera results for Example 2 showed that the present invention exhibited more intense signals, i.e. higher loading of oligonucleotides on the solid support, at each concentration level when compared against the other methods under their respective humid chamber and non-humid chamber conditions. Under the humid chamber conditions, the present invention exhibited greater intensity at every concentration than the other methods. Under the non-humid chamber conditions, the present invention exhibited a relative large increase in intensity with increase in concentration; whereas, the other methods exhibited a smaller increase in intensity as concentration increased.

10 The CCD camera results from Example 2 further showed that all methods, not merely the present invention, resulted in higher loading of the amino oligonucleotides when reacted in a humid chamber in contrast to the same results for the method in a non-humid chamber.

EXAMPLE 3

20 THE SENSITIVITY OF THE PRESENT INVENTION IN COMPARISON TO THE CDI METHOD USING AN IL 8 ASSAY

Example 3 describes the experimental protocol and results obtained from a comparison of the sensitivity of the present invention and the CDI method in detection of an analyte. Aminated plates were prepared for each method according to Example 1. 3'-amino oligonucleotide were made and printed according to the procedure discussed under Example 2 with two exceptions: The first exception was that the amino oligonucleotides printed in 3 x 3 arrays had 4 over prints so that the printing pin with liquid containing the amino oligonucleotides touched the surface of the plates five times. The second exception was the reactions took place only in the humid chamber.

30 An IL 8 assay was used to provide a comparative evaluation between the present invention and the CDI method. The protocol for the IL 8 assay used in this experiment was the same protocol discussed in U.S. Patent No. 5,548, 213 which is incorporated by reference herein. In particular, the protocol is described in detail

WO 03/036257

PCT/US02/33059

below.

Step I. Added 140 ng/well of antibody-oligonucleotide conjugate in casein buffer and shook the plate at 37°C for 1 hour. Washed the plate with wash buffer (0.02% Tween 20 in 1x Tris Buffer Saline) 3 times.

5 Step II. Added antigen ranging from 1000-1 pg/ml per well in casein buffer and reacted at 37°C for 1 hour and washed with wash buffer 3 times. The concentrations of antigen used in the assay were: 0 pg/ml, 1 pg/ml, 5 pg/ml, 10 pg/ml, 25 pg/ml, 50 pg/ml, 250 pg/ml, and 1000 pg/ml.

10 Step III. Added biotinylated antibody (purchased from R & Ds systems, 614 McKinley Place N.E. Minneapolis, MN 55413) 50 ng per well and incubate at 37°C for 1 hour, washed 3 times.

15 Step IV. Added Streptavidin PBxl (purchased from Martek, 6480 Dobbin Road, Columbia, Maryland 21045) 1 mg dissolved in 1 ml of water) 1:150 dilution, 50 Φ /well and incubated at 37°C for 1 hour and washed 3 times with wash buffer. 50 Φ l of wash buffer were kept in each well and image using CCD camera. The CCD camera collected the fluorescent emission at 670 nm that correlated to loading of an oligonucleotide tagged antibody onto the solid support.

20 The CCD camera results from Example 3 showed that the present invention exhibited higher sensitivity for detection of an analyte than the CDI method at the same concentrations of the analyte. The intensity of the fluorescent emissions or brightness of the spots correlated to the detection of the analyte. The present invention showed spots (brightness captured by CCD camera) starting at 1 pg/ml, and increasing in brightness as concentration increased to 1000 pg/ml. In contrast, the CDI method did not begin to show any spots until about 25 pg/ml. Thus, the present
25 invention exhibited greater sensitivity than the CDI method.

Not to be bound by theory, the inventors believed that the higher sensitivity of the present invention may be a result of higher loading of amino oligonucleotides. The higher loading obtained with the method of the present invention is presumably due to an increased stability of triazolyl urea linkage toward competing aqueous
30 hydrolysis, thereby increasing the chances for amino oligonucleotide coupling to the plates. Other biological molecules with at least one reactive amino, thiol or hydroxyl group should experience higher sensitivity and higher loading under the present

WO 03/036257

PCT/US02/33059

invention than attachments of biological molecules using the CDI method.

Having thus described the invention, it should be apparent that numerous modifications and adaptations may be resorted to without departing from the scope and fair meaning of the instant invention as set forth hereinabove and as described
5 hereinbelow by the claims.

Although the present invention has been described in considerable detail with reference to certain preferred versions thereof, other versions are possible. Therefore, the spirit and scope of the appended claims should not be limited to the description of
10 the preferred versions described herein.

All features disclosed in the specification, including the claims, abstracts, and drawings, and all the steps in any method or process disclosed, may be combined in any combination, except combinations where at least some of such features and/or steps are mutually exclusive. Each feature disclosed in the specification, including the
15 claims, abstract, and drawings, can be replaced by alternative features serving the same, equivalent or similar purpose, unless expressly stated otherwise. Thus, unless expressly stated otherwise, each feature disclosed is one example only of a generic series of equivalent or similar features.

Any element in a claim that does not explicitly state "means" for performing a
20 specified function or "step" for performing a specified function, should not be interpreted as a "means" or "step" clause as specified in 35 U.S.C. § 112.

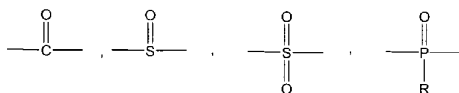
WO 03/036257

PCT/US02/33059

What is claimed is:

1. A method of attaching a biological molecule having at least one reactive amino, thiol or hydroxyl group to a solid support having at least one available amino group, the method comprising the steps of:
 - (a) reacting the available amino group on the solid support with an activating compound, the activating compound having the structure:

$$L_1 - X - L_2$$
 wherein L_1 and L_2 are leaving groups, and X is a moiety capable of nucleophilic substitution so that the reaction results in L_1 being displaced by the available amino group on the solid support to form an activated support; and
 - (b) reacting the biological molecule with the activated support, thereby displacing L_2 and attaching the biological molecule to the solid support.
2. The method of claim 1 wherein L_1 and L_2 are independently selected from the group consisting of halogen, imidazole, triazole, pyrrole, pyrazole, thiazole, tetrazole and O-Aryl-R, and wherein R is selected from the group consisting of halogen, nitro, cyano, and alkoxy moiety.
3. The method of claim 2 wherein X is selected from the group consisting of:



- wherein R is selected from the group consisting of alkyl, aryl, and OR^1 having no greater than about 18 carbon atoms, and
- wherein R^1 is selected from the group consisting of alkyl and aryl having no greater than about 18 carbon atoms.

WO 03/036257

PCT/US02/33059

4. The method of claim 1 wherein the activating compound is 1,2,4-carbonyl di triazole.
5. The method of claim 1 wherein step (b) comprises depositing between about 5 to about 25 nanoliters of the biological molecule in the circular spot having a diameter of between about 10 microns to about 500 microns at one or more sites on the activated support.
6. The method of claim 5 wherein the step of depositing comprises printing onto the activated solid support.
7. The method of claim 5 wherein in step b, the reaction occurs in a humid chamber.
8. The method of claim 6 wherein in step b, the reaction occurs in a humid chamber
9. The method of claim 1 wherein step (a) occurs in an organic solution.
10. The method of claim 9 wherein step (a) occurs in the presence of a tertiary organic base.
11. The method of claim 10 wherein step (b) occurs in an aqueous solution.
12. A method of attaching a biological molecule having at least one reactive amino, thiol or hydroxyl group to a solid support having at least one available amino group, the method comprising the steps of:
- (a) reacting the available amino group on the solid support with an activating compound, the activating compound having the structure:



WO 03/036257

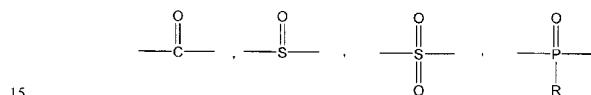
PCT/US02/33059

wherein L_1 and L_2 are identical leaving groups, and X is capable of nucleophilic substitution so that the reaction results in L_1 being displaced by the available amino group on the solid support to form an activated support; and

- 5 (b) reacting the biological molecule with the activated support, thereby displacing L_2 and attaching the biological molecule to the solid support.

13. The method of claim 12 wherein L_1 and L_2 are selected from the group consisting of halogen, imidazole, triazole, pyrrole, pyrazole, thiazole, tetrazole and O-Aryl-R, and wherein R is selected from the group consisting of halogen, nitro, cyano, and alkoxy moiety.

14. The method of claim 13 wherein X is selected from the group consisting of:

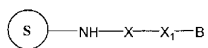


wherein R is selected from the group consisting of alkyl, aryl, and OR^1 having no greater than about 18 carbon atoms, and

- 20 wherein R^1 is selected from the group consisting of alkyl and aryl having no greater than about 18 carbon atoms.

15. The method of claim 12 wherein the activating compound is 1,2,4-carbonyl di triazole.

- 25 16. A solid-support attached to a biological molecule having the formula:

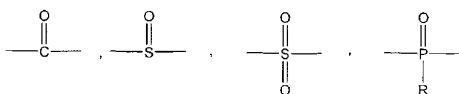


wherein S is the solid support,

WO 03/036257

PCT/US02/33059

wherein X is selected from the group consisting of:



5

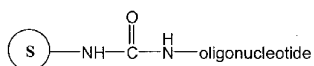
wherein R is selected from the group consisting of alkyl, aryl, and OR^1 having no greater than about 18 carbon atoms,

wherein R^1 is selected from the group consisting of alkyl and aryl having no greater than about 18 carbon atoms,

wherein X_1 is selected from the group consisting of NH, oxygen, and sulfur, and

wherein B is the biological molecule.

17. A solid-support of claim 16 having the formula:



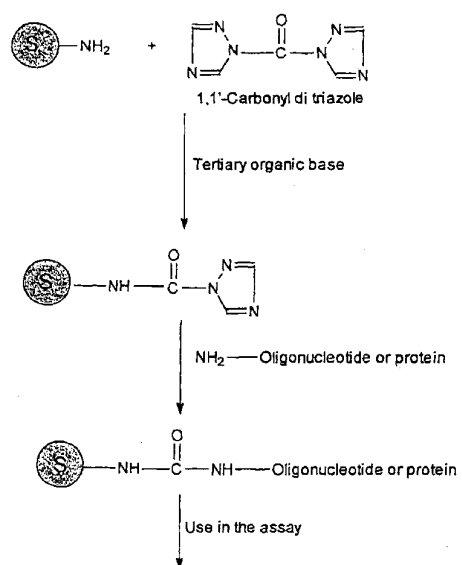
18. The method of claim 1 comprising the step of washing from the solid support non-bound compounds after step (a) and before step (b).

19. A method of attaching an organic molecule to a solid support, the method comprising the steps of:

- (a) activating the solid support; and
- (b) reacting the organic molecule with the activated support in a humid chamber, having a humidity of at least 60 percent relative humidity.

WO 03/036257

PCT/US02/33059

Figure 1

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 May 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/036257 A3(51) International Patent Classification⁷: G01N 33/543

(74) Agents: MAY, William H. et al.; BECKMAN COULTER, INC., 4300 N. Harbor Blvd., Box 3100, Fullerton, CA 92834-3100 (US).

(21) International Application Number: PCT/US2002/033059

(22) International Filing Date: 17 October 2002 (17.10.2002)

(81) Designated State (national): JP.

(25) Filing Language: English

(84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

(26) Publication Language: English

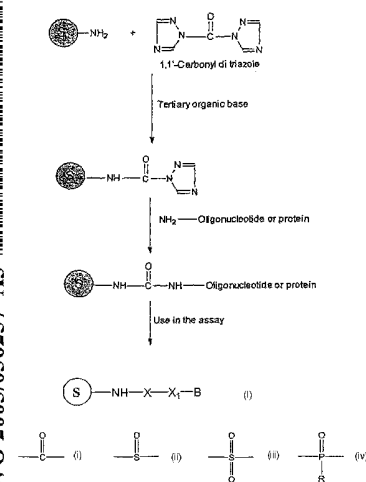
Published:

(30) Priority Data:
10/033,508 24 October 2001 (24.10.2001) US— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments(71) Applicant: BECKMAN COULTER, INC. [US/US];
4300 N. Harbor Blvd., Box 3100, Fullerton, CA 92834-3100 (US).(88) Date of publication of the international search report:
24 June 2004

(72) Inventors: REDDY, M. Parameswara; 219 Valverde Avenue, Brea, CA 92821 (US). FAROOQUI, Firdous; 426 Shady Court, Brea, CA 92821 (US).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: IMMOBILIZING BIOLOGICAL MOLECULES



(57) Abstract: This invention provides a system for immobilizing biological molecules onto a solid support having an available amino group that uses two steps. In a first step, a nucleophilic substitution reaction occurs so that the available amino group displaces a first leaving group of an activating compound to form an activated support. In a second step, the activated support reacts with biological molecules resulting in a composition of the formula: (I) wherein S is a solid support, preferably X is selected from the group consisting of (i), (ii), (iii), (iv), wherein R is selected from the group consisting of alkyl, aryl, and OR¹ about 18 carbon atoms, wherein R¹ is selected from the group consisting of alkyl and aryl having no greater than about 18 carbon atoms, wherein X¹ is selected from the group consisting of NH, oxygen, and sulfur, and wherein B is a biological molecule.

WO 2003/036257 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 02/33059
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 601N33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 601N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	POTEMPA L A ET AL: "CONJUGATION OF A MODIFIED FORM OF HUMAN CARBOXYL-REACTIVE PROTEIN TO AFFINITY MEMBRANES FOR EXTRACORPOREAL ADSORPTION" CLINICAL MATERIALS, vol. 11, no. 1-4, 1992, pages 105-117, XP009028877 WORKSHOP ON BIOLOGICAL MODIFICATION OF POLYMERIC BIOMATERIAL SURFACES, SIDE, TURKEY, JUNE 1991. CLIN ISSN: 0267-6605 abstract page 108, column 1, paragraphs 1,3 -column 2, paragraph 1 page 111, column 2, paragraph 2 -page 112, column 1, paragraph 1 --- -/-	1-3,9, 12-14, 16,18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another document or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document: member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 April 2004		Date of mailing of the international search report 15/04/2004
Name and mailing address of the applicant European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Thumb, W

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 02/33059
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 611 592 A (PALL CORP) 24 August 1994 (1994-08-24) abstract page 2, line 47-53 page 3, line 30-32 page 5, line 27-32 figure 1; example 9	1-3, 7-9, 12-14, 18, 19
Y	US 4 330 440 A (AYERS JOHN S ET AL) 18 May 1982 (1982-05-18) the whole document	1-18
Y	REDDY M P ET AL: "NEW AND EFFICIENT SOLID SUPPORT FOR THE SYNTHESIS OF NUCLEIC ACIDS" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 35, 1994, pages 5771-5774, XP000651241 ISSN: 0040-4039 the whole document	1-18
A	WO 01/02452 A (SYMYX TECHNOLOGIES INC) 11 January 2001 (2001-01-11) the whole document in particular page 55 et seq.	1-18
A	WO 01/70641 A (INCYTE PHARMA INC) 27 September 2001 (2001-09-27) the whole document	1-18
X	US 6 268 141 B1 (MATSON ROBERT S ET AL) 31 July 2001 (2001-07-31) abstract example 2	19
Y	the whole document	1-18
P, X	WO 02/39113 A (MOTOROLA INC) 16 May 2002 (2002-05-16) abstract page 6, line 3 - line 12	19

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

International Application No. PCT/ US 02/33059

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ASA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-18

Methods for attaching biological molecules to a solid support having at least one available amino group, the method comprising the step of reacting the solid support with an activating compound of the structure L1-X-L2, wherein L1 and L2 are leaving groups and X is a moiety capable of nucleophilic substitution, wherein L1 and L2 are displaced by the amino group in the surface and by reaction with a biological molecule, respectively.
Supports obtainable by said methods.

2. Claim : 19

A method of attaching an organic molecule to a solid support, the method comprising activating the solid support and reacting the organic molecule with the activated support in a humid chamber having a humidity of at least 60% relative humidity.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 02/33059
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 5.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
see additional sheet		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
		<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US 02/33059

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
EP 0611592	A	24-08-1994	GB	2275270 A		24-08-1994
			WO	9417903 A2		18-08-1994
			EP	0611592 A2		24-08-1994
US 4330440	A	18-05-1982	AU	515785 B2		30-04-1981
			AU	3305778 A		16-08-1979
			CA	1106841 A1		11-08-1981
			DE	2805056 A1		19-10-1978
			FR	2379552 A1		01-09-1978
			GB	1598763 A		23-09-1981
			SE	447119 B		27-10-1986
			SE	7801355 A		09-08-1978
			US	4224439 A		23-09-1980
WO 0102452	A	11-01-2001	US	2002010267 A1		24-01-2002
			US	2002061988 A1		23-05-2002
			AU	3733800 A		28-09-2000
			AU	5785400 A		22-01-2001
			CA	2377739 A1		11-01-2001
			EP	1165625 A1		02-01-2002
			EP	1208126 A1		29-05-2002
			WO	0053640 A1		14-09-2000
			WO	0102452 A1		11-01-2001
			US	2002013430 A1		31-01-2002
			US	6692914 B1		17-02-2004
			US	2002001845 A1		03-01-2002
			WO	0109204 A2		08-02-2001
WO 0170641	A	27-09-2001	US	6413722 B1		02-07-2002
			AU	4763201 A		03-10-2001
			CA	2402263 A1		27-09-2001
			EP	1274661 A1		15-01-2003
			JP	2003528301 T		24-09-2003
			WO	0170641 A1		27-09-2001
			US	2003165905 A1		04-09-2003
			US	2002037509 A1		28-03-2002
US 6268141	B1	31-07-2001	EP	1208226 A2		29-05-2002
			JP	2002544508 T		24-12-2002
			WO	0070088 A2		23-11-2000
			US	2001039018 A1		08-11-2001
WO 0239113	A	16-05-2002	US	6500921 B1		31-12-2002
			AU	9322401 A		21-05-2002
			WO	0239113 A2		16-05-2002

フロントページの続き

(74)代理人 100125081

弁理士 小合 宗一

(74)代理人 100125092

弁理士 佐藤 玲太郎

(72)発明者 レディー、 エム パラメスワラ

アメリカ合衆国 9 2 8 2 1 カリフォルニア州 ブレア ヴァルヴァード アヴェニュー 2 1
9

(72)発明者 ファルークイ、 ファーダス

アメリカ合衆国 9 2 8 2 1 カリフォルニア州 ブレア シェイディ コート 4 2 6

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 HA12