

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4970654号
(P4970654)

(45) 発行日 平成24年7月11日 (2012. 7. 11)

(24) 登録日 平成24年4月13日 (2012. 4. 13)

(51) Int. Cl.	F I
C 0 8 F 2/00 (2006. 01)	C 0 8 F 2/00 C
C 0 8 F 4/00 (2006. 01)	C 0 8 F 4/00
C 0 8 F 20/00 (2006. 01)	C 0 8 F 20/00
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 F
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A
請求項の数 22 (全 18 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2000-594947 (P2000-594947)	(73) 特許権者	397013610
(86) (22) 出願日	平成12年1月25日 (2000. 1. 25)		ミクロナス ゲゼルシャフト ミット ベ
(65) 公表番号	特表2002-535450 (P2002-535450A)		シュレンクテル ハフツング
(43) 公表日	平成14年10月22日 (2002. 10. 22)		M i c r o n a s G m b H
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/000554		ドイツ連邦共和国 フライブルク ハンス
(87) 国際公開番号	W02000/043539		ーブンテーシュトラーセ 1 9
(87) 国際公開日	平成12年7月27日 (2000. 7. 27)	(74) 代理人	100099759
審査請求日	平成18年12月26日 (2006. 12. 26)		弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	99 10 1340.0	(74) 代理人	100077517
(32) 優先日	平成11年1月25日 (1999. 1. 25)		弁理士 石田 敬
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100087871
(31) 優先権主張番号	99 10 4278.9		弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成11年3月3日 (1999. 3. 3)	(74) 代理人	100087413
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 古賀 哲次
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ポリマーブラシを介する表面上での分子の固定化

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

表面に結合したポリマー鎖の集合を含んで成る多官能性ポリマー単層であって、

a) 当該表面を、当該表面に対する結合に適した 1 又は複数の官能基を含んで成る単層の重合開始剤で表面を覆う段階；及び

b) 得られたポリマー鎖と特異的な試料分子とのカップリング反応を可能にする官能基を有するモノマーの存在下で、重合反応を実行する段階、
を含んで成る方法により得ることができ、

各ポリマー鎖が、試料又はプローブ分子とポリマーとの相互作用を可能にする、カルボン酸基、マレインイミド基、N-ヒドロキシスクシンイミド基、エポキシ基、イソチオシアネート基、イソシアネート基又はアジド基から選択される 1 又は複数の官能基を有する多数の同一な又は異なる単位を含んで成る、多官能性ポリマー単層。

【請求項 2】

前記ポリマー鎖が表面と共有結合している、請求項 1 に記載のポリマー単層。

【請求項 3】

試料分子又はプローブ分子がタンパク質、ペプチド、多糖又は核酸及びそれらの誘導体から選択される、請求項 1 又は 2 に記載のポリマー単層。

【請求項 4】

ポリマーが、層を水膨潤性にするセグメントを含んで成る、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のポリマー単層。

【請求項 5】

水膨潤性が、アクリル酸、メタクリル酸、ジメチルアクリルアミド又はビニルピロリドンから選択されるモノマーによって提供される、請求項 4 に記載のポリマー単層。

【請求項 6】

官能基との反応を介してポリマー鎖に固定化されている、多数の同一な又は異なるプローブ分子を更に含んで成る、請求項 1、2、4 及び 5 のいずれか 1 項に記載のポリマー単層。

【請求項 7】

プローブ分子が核酸、PNA、多糖、タンパク質及びペプチドから選択される、請求項 6 に記載のポリマー単層。

10

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の多官能性ポリマー単層を有する表面。

【請求項 9】

ポリマー鎖がパターンアレイの形態にある、請求項 8 に記載の表面。

【請求項 10】

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の多官能性ポリマー単層の製造方法であって：

a) 表面への結合に適した 1 又は複数の官能基を含んで成る重合開始剤の単層で表面を覆い；そして

b) 得られたポリマー鎖と特異的な試料分子とのカップリング反応を可能にする官能基を有するモノマーの存在下で、重合反応を実行する、

20

段階を含んで成り、
各ポリマー鎖が、試料又はプローブ分子とポリマーとの相互作用を可能にする、カルボン酸基、マレインイミド基、N-ヒドロキシスクシンイミド基、エポキシ基、イソチオシアネート基、イソシアネート基又はアジド基から選択される 1 又は複数の官能基を有する多数の同一な又は異なる単位を含んで成る、方法。

【請求項 11】

開始剤がクロロシラン、アルコキシシラン、ジスルフィド又はチオール基を含んで成る、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

開始剤がアゾ基、ペルオキシ基、又はケトン基を芳香族系と一緒に含んで成る、請求項 10 又は 11 に記載の方法。

30

【請求項 13】

開始剤が芳香族ケトン又は硫黄を含む芳香族ケトンから選択される基を含んで成る、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

請求項 6 又は 7 に記載のポリマー単層を用いる、試料核酸分子の検出方法であって、

a) プローブと試料との間でハイブリダイゼーション反応を起こし、続いて

b) 洗浄段階でハイブリダイゼーションしなかった核酸分子を除去し、そして

c) ハイブリダイゼーションした核酸分子を検出する、

段階を含んで成る方法。

40

【請求項 15】

試料から化合物を精製するための方法であって、

(a) ポリマー鎖又はプローブ分子の官能基に前記化合物を結合させる条件下で、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のポリマー単層と試料とを接触させ；

(b) そしてポリマー層又はプローブ分子に結合しなかった試料から材料を除去する、段階を含んで成る方法。

【請求項 16】

(c) ポリマー層から、結合した複合体を溶出する、段階を更に含んで成る、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

50

前記化合物が、核酸、(多)糖又は(ポリ)ペプチド又はそれらの複合体である、請求項15又は16に記載の方法。

【請求項18】

請求項8又は9に記載の表面の、アフィニティマトリックスとしての使用。

【請求項19】

請求項8又は9に記載の表面の、センサーチップとしての使用。

【請求項20】

請求項8又は9に記載の表面を含んで成る、医療又は診断機具。

【請求項21】

オリゴ又はポリマーの形成のための開始分子の固定化のための、請求項8又は9に記載の表面の使用。

【請求項22】

請求項1～7のいずれか1項に記載のポリマー単層の、電場での分子の分離におけるゲルとしての使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

広範な科学的利用において絶えず増大している微視的技術の重要性により、分子と表面との相互作用を許容する系の開発は重要な問題として残されている。その様な相互作用は、特異的な分子を試料から除去する可能性を含み、これは例えばそれらの解析／検出を容易にするためであるが、更には表面上に分子を提示し、それにより次の反応を起こす可能性も含んでいる。分子の固定化のためのこれらの原理は、センサー又はクロマトグラフィー系あるいは一般に修飾されている表面の供給に適用されうる。

【0002】

近年、試料分子をセンサー表面に直接的又は間接的にカップリングする二官能性分子の自己組織化単層(SAM)に基づいているセンサーチップを加工するための多くのアプローチが行われてきた。典型的に、これらの二機能分子は、無機表面との結合を達成するためのシラン又はチオール／ジスルフィド部分及び、しばしばオリゴヌクレオチド、タンパク質又は多糖等の形態で生物学的試料に含まれる、試料分子と相互作用する追加の官能基(例えば、アミノ又はエポキシド基)を有する。

【0003】

前記二官能性分子と前記試料分子との間の直接的な結合の形成が可能である一方で、前記試料分子は、必ずしもカップリング剤が形成する単層と直接的に相互作用しない。あるいは、適当な固定化した生体分子は、それら自身が試料分子の検出のためのプローブとして働きうる。その様なプローブ分子は、単層の遊離官能基との反応を介して等しく固定化されうる。特に、生体分子がプローブ分子として使用されるならば、それらの存在は試料分子と修飾されている表面との相互作用の特異性は有意に増大しうる。例えば、DNAフラグメント又は分子の素速い解析を必要とされている場合、二官能性分子の単層は、結果として固定化される合成オリゴヌクレオチドと最初に接触させられうる。次に、特異的な分子、例えば試料由来の適合する鎖のハイブリダイゼーションが検出され、これは、例えば色素標識した試料分子を使用する場合、蛍光顕微鏡を介する。

【0004】

図1は、従来のDNAセンサーの設計の略図(一定に比例していない)を示す。プローブとして通常合成されるオリゴヌクレオチドの単層は表面上に固定化され、そしてハイブリダイゼーションを介して結合する相補的な試料オリゴヌクレオチドのためのプローブ分子を務める。ハイブリダイゼーション反応は、例えば試料分子に結合する適当な色素標識から生じる蛍光を介して検出される。

【0005】

これらの技術は、この目的のために非常に確立されているが、標準的な検出方法の適用は、特に、試料分子のある特異的な型の検出に利用可能な表面積が制限されている場合に、例えば様々な分子が並列の過程で解析されうる場合に問題があるのは、単層がそれらのグ

10

20

30

40

50

ラフト密度に限定されているためである。例えば、センサーの表面単位当たりのハイブリダイズした二本鎖の数を容易に増大することができないので、適当な検出器は、それらの感度に関して非常に高い要求を満たさねばならない。従って、ある型のオリゴヌクレオチドの検出に必要なセンサー上の最小の表面積を容易に縮小することができない。更に、最大密度、すなわちカップリング剤の官能基当たり1つの試料又はプローブ分子もほとんど達成することができないのは、二次元的に広がる単層上での立体障害により、わずかな官能基だけが試料又はプローブ分子と反応することができるためである。

【0006】

表面単位当たりの限定数の反応部位に関する同様の問題は、他の適用において、表面上で増大した量の分子を固定化するのが望ましい場合に起こりうる。

10

【0007】

上文で概説した問題を乗り越えるために、様々な試みが行われてきた。オリゴヌクレオチドの解析に関して、オリゴヌクレオチド鎖（又はその結合のための官能基）を有するオリゴマー又はポリマーを、これらのオリゴマー又はポリマーをセンサーチップの表面に結合させる適当な基と一緒に用いることによって、グラフト密度を増大させることが試みられてきた。オリゴマー又はポリマー鎖の増大した柔軟性により、表面にカップリングする、より大きな割合の二官能性オリゴマー又はポリマーがオリゴヌクレオチドプローブ分子に固定化することができる。

【0008】

しかし、合計のオリゴヌクレオチドのグラフト密度が有意に増大しないのは、前記表面上の二官能性オリゴマー又はポリマーのグラフト密度が限定されているからである。前記オリゴマー又はポリマーの自己組織化が動力学的理由のために妨害されるのは、1度センサー表面がその様な分子で覆われると、更にポリマーがその表面に到達するために集合に対して拡散しなければならないためであるという事実は重要である。

20

【0009】

従って、試料又はプローブ分子との相互作用のための官能基を含んで成るポリマー単層で修飾される表面を提供することが本発明の目的であり、この中で、表面単位当たりで相互作用している分子の数は、二官能性分子の従来の（短鎖）単層と比較して驚くほど増大している。更に、利用可能な相互作用部位の密度は、二官能性ポリマー又はオリゴマーと前記表面との反応から得られるものより高いはずである。

30

【0010】

DNA分子、例えばオリゴヌクレオチドの検出の具体的な場合において、本発明の目的は、それぞれのオリゴヌクレオチドを低分子量のカップリング剤の官能化した単層にカップリングさせることによって作製されるものよりも高い、合成オリゴヌクレオチド鎖の表面の提供として表すことができる。また、グラフト密度は、合成オリゴヌクレオチド一本鎖で修飾されるポリマー又はオリゴマーと、前記表面との反応から生じるものより大きいはずである。

【0011】

この目的は、ポリマー鎖の集合が結合し、前記ポリマーを試料又はプローブ分子と相互作用させる、それぞれが多く官能基を含んで成る表面によって達成されてきた。例えば、その様な多官能性ポリマー鎖が、1又は複数の合成オリゴヌクレオチドプローブを固定化するために使用されるならば、相補核酸は、ハイブリダイゼーション反応が起きた後、試料分子の混合物から引き続いて検出されうる。驚いたことに、ポリマーブラシとしても言及される、多官能性ポリマー鎖の集合が、高グラフト密度を達成することができない従来の検出方法の問題に苦しむことがないことが明らかになった。更に、前記ポリマー鎖の柔軟性がセンサーチップの完全な被覆を許容するので、表面効果は、例えばレーザーの走査の間に避けられうる。

40

【0012】

用語「相互作用」は、本明細書で使用する場合、共有結合、並びにイオン誘引及びファンデルワールス力及び水素結合の形成を含む。相互作用の型を限定する、前記ポリマー鎖又

50

はプローブ分子内の各官能性部分は、本発明に従う表面の所望の適用に従って選択されるだろう。

【0013】

「固定化」の表現は、選択した条件下で持続性の結合の形成を生じる、分子とポリマーブラシとの相互作用について以後使用する。例えば、プローブ分子は、表面上でのそれらの適用の間に、ポリマーブラシによって固定化される。しかし、条件（例えば、pH値、イオン強度）を変えることによって、固定化はときに反転しうる。

【0014】

用語「試料分子」は、試料中に存在し、そして一時的又は持続的に、本発明に従うポリマー鎖にカップリングする分子について本明細書で使用されるだろう。本発明は、特許請求の範囲に記載のポリマーブラシと試料分子との相互作用のための、2つの一般的な原理を含む。第1の態様において、前記ポリマー鎖を含んで成る官能基は、前記鎖と試料分子との直接的な相互作用を許容するために選択される。第2の態様において、プローブ分子はポリマーブラシの官能基で固定化され、そして相互作用はそれらのプローブ分子と試料分子との間で起こる。

【0015】

適当なプローブ分子は、多官能性ポリマー鎖へのそれらのカップリングの後、新規な相互作用部位が、試料との相互作用を許容する、本発明に従うポリマー単層に存在する様に少なくとも二官能性な分子である。好ましくは、前記プローブ分子は試料分子にとって高度に特異的な相互作用部位を提供する。それらは天然又は非天然の供給源に由来していてもよい。特に好ましいプローブ分子は、生体分子、例えば核酸であり、これはDNA、RNA又はPNA（ペプチド核酸）を含み、最も好ましくはオリゴヌクレオチド又はアプタマー、多糖、タンパク質であり、これはグリコシド修飾タンパク質又は抗体、酵素、サイトカイン、ケモカイン、ペプチドホルモン又は抗生物質、及びペプチドを含む。十分な安定性を、例えばセンサーの適用の間保証するために、前記プローブ分子は好ましくはポリマーブラシに共有結合する。

【0016】

使用に依存して、多くの同一なプローブ分子又は2若しくはそれ以上の異なるプローブの混合物が固定化されうる。例えば、同一なプローブ分子対はアフィニティマトリックスとしてのポリマーブラシの適用に好ましい。

【0017】

本発明に従うポリマー単層は、表面に結合している多数の単一なポリマー鎖を含んで成る。好ましくは、前記ポリマー鎖と表面との間の結合は共有結合である。前記ポリマー鎖がそれらの一方の末端で表面に結合するのも好ましい。分枝ポリマーの誘導は、所望ならば可能である。

【0018】

図2は、官能性ポリマーブラシに基づくDNAセンサーの設計の略図（一定に比例していない）を示す。プローブ分子を務める一本鎖のオリゴヌクレオチドは、表面に固定しているポリマー鎖に結合する。試料オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションを介して検出される。この反応は追加の材料を層に組み込むことによって生じる層の厚さの有意な増大を測定することによって検出されうる。

【0019】

本発明のポリマー鎖は、所望の適用に依存して、ホモ又はコポリマーであってもよい。ホモポリマーは、重合に使用されるそれぞれのモノマー単位が試料又はプローブ分子と相互作用しうる少なくとも1つの官能基を有するポリマーを表すだろう。しかし、ある有利な特性を前記ポリマー単層に与えるために、試料又はプローブ分子との相互作用のための特異的な官能基を有するこれらのモノマー（以後、「官能化モノマー」として言及する）から、他のコモノマーと一緒に形成されるコポリマーが使用されうる。

【0020】

例えば、前記試料又はプローブ分子と前記ポリマーとの反応は、前記ポリマーがこれらの

10

20

30

40

50

分子を含む溶媒中で膨潤可能ならば、問題の溶媒との強い相互作用を示すコポリマーが好ましくは選択される様に有意に促進される。本発明の多くの好ましい態様において、水溶液中で通常存在する生体分子がポリマー鎖と相互作用するので、前記ポリマー鎖は好ましくは水膨潤性である。

【0021】

従って、極性、又は水において更に可溶性の、例えば1又は複数のコモノマーは、官能化モノマーのホモポリマーが、官能基によって検出される前記分子の素速い反応を許容する、水との十分な反応を示さないならば使用されうる。コモノマーと同様に官能化されているモノマーの両方の型は、ラジカル重合反応において反応しうるC-C二重結合を含む。水膨潤性ポリマーを生成する適当なコモノマーの例は、アクリル酸、メタクリル酸及びそれらの誘導体であり、例えばこれらの酸と、好ましくは1～12の炭素原子を含んで成るアルコール又はアミンとのエステル及びアミドである。

10

【0022】

このモノマーの基の一般的な例は、ヒドロキシエチルメタクリラート、アクリルアミド及びジメチルアクリルアミドである。別の適当なモノマーはビニルピロリドンである。最初に水不溶性ポリマーを生成し、続いて水溶性誘導体に移行しうるモノマーを使用することも可能である。このポリマーの基の適当な例は、例えばポリビニルアセテートのけん化によって得られうるポリビニルアルコールである。

【0023】

コポリマーを使用するならば、官能化モノマーに対するコモノマーの比率は、生じるポリマー鎖の組成を限定するために、重合過程の前に決定される。好ましくは、官能化モノマーに対するコモノマーの比率は、50/1～1/1、更に好ましくは20/1～2/1に及ぶ。

20

【0024】

ポリマー層と試料又はプローブ分子との相互作用を許容するのに必要な官能基は、好ましくはポリマー鎖の側鎖に存在する。本発明の単層のポリマー鎖が含んで成る「多数」の官能基は、ポリマー鎖当たり少なくとも2つ、しかし好ましくは2つ以上の基を意味する。関連する官能基が好ましくはポリマーブラシを形成するモノマーに含まれるので、固定化されうるプローブ又は試料分子に依存して、一本鎖に存在するこれらの基は最大数千、例えば最大10000に達しうる。好ましくは、各鎖は20～1000のこれらの官能基を含んで成る。

30

【0025】

ポリマーブラシに存在する適当な官能化モノマーは、重合可能なC-C二重結合、及び重合過程に加わらない更なる官能性部分を含んで成るモノマーである。好ましくは、この官能基はC₂-C₁₀、更に好ましくはC₃-C₇アルキル鎖をスペーサーとして介して、主なポリマー鎖に連結する。

【0026】

スペーサー分子は、官能化モノマーの一部であってもよい。このアプローチに適したモノマーは、C₂-C₁₀アルコール又はC₂-C₁₀アミンのアクリル及びメタクリルエステル又はアミドを含む。スペーサーを務めるために、これらのアルコール又はアミンは、エステル又はアミド結合を形成する方と反対の末端に追加の官能基を有する。この官能基は、試料又はプローブ分子との相互作用に必要なものを表すか、又はその後の段階において前記の適当な官能基に変換されうるか、そのいずれかである。

40

【0027】

あるいは、これらのスペーサー分子を、その形成の後にポリマー単層内の適当な反応性セグメントに結合させることも可能である。この場合、反応性モノマーは重合の間存在していなければならず、例えばアクリル酸又はメタクリル酸塩化物あるいはそれらのエステル、N-ヒドロキシスクシンイミド又は他のモノマー、例えば無水マレイン酸である。これらの好ましい反応性モノマーは、スペーサーとして使用されうる二官能性アルコール又はアミンへの共有結合を形成しうる。

50

【0028】

スパーサー単位を有するモノマーは、それぞれのアクリル又はメタクリル酸塩化物又は無水物及びω-アミノ又はヒドロキシカルボン酸から容易に合成されうる。生じた生成物は、例えばN-ヒドロキシスクシンイミドを用いることによって、活性エステル誘導体に変換されうる。複数の例のその様なモノマーの合成のための詳細な方法は、文献、例えばH.-G.Batz, J.Koldehoff, Macromol. Chem. 177 (1976) 683 において見出すことができる。

【0029】

上文で概説した様に、本発明に従う多官能性ポリマー単層を直接生成する反応性モノマーを使用することは可能である。あるいは、最終的な表面上で使用されうる官能基の前駆体、例えば酸塩化物又は酸無水物を有するモノマーが選択されうる。それらは、引き続いて所望の条件下での試料又はプローブ分子とポリマーとの相互作用を許容する反応基、例えばNHSEステル又はグリシジルエステル基に変換されうる。

10

【0030】

従って、全ての重合可能なモノマーが、それらがポリマーと試料分子又はプローブ分子との相互作用を許容するのに必要な官能基と組み合わせられるか、又はそれらを含んで成る限り、本発明の目的に適している。

【0031】

本発明の目的に使用されうる官能基は、好ましくは相互作用が達成されうる分子に従い選択される。相互作用は、ある単一の型の試料分子又は様々な試料分子に対して向けられうる。本発明の1つの重要な適用は生物学的試料中での特異的分子の検出であり、ポリマーブラシ内に存在する官能基は、好ましくは生物学的試料中の分子と特異的に相互作用し、それらの検出を導くことができる天然又は合成の生体分子と相互作用するだろう。適当な官能性部分は、好ましくは核酸及びその誘導体；例えばDNA、RNA又はPNA、例えばオリゴヌクレオチド又はアプタマー、多糖、タンパク質と相互作用することができ、これはグリコシド修飾タンパク質又は抗体、酵素、サイトカイン、ケモカイン、ペプチドホルモン又は抗生物質又はペプチド又はそれらの標識誘導体を含む。

20

【0032】

更に、検出されうる分子又は合成オリゴヌクレオチドと、ポリマー鎖との間で、試料又はプローブ分子に有害でない条件下でカップリング反応を行うことは可能だろう。従って、核酸センサーの適用において、前記反応は水溶液中で行われるべきであり、そして温度は95℃を超えるべきではない。

30

【0033】

また、前記カップリング反応は、検出が好ましくは溶液中で極端なpH値を必要とすることなく、24時間以内に達成することができる様に適当な速度で進むべきである。合成オリゴヌクレオチドの一本鎖の固定化のために、pHは7~11、好ましくは7~10に及ぶべきである。核酸試料分子とプローブ分子とのハイブリダイゼーション反応の間、官能基と合成オリゴヌクレオチドの一本鎖との間の結合、及びポリマー鎖から基質への結合は、65℃以上の温度、及び6~9のpHに耐えられなければならない。DNAが試料分子として使用される場合、温度は、ハイブリダイゼーションに必要なDNA鎖の分離に作用するために約95℃まで上昇されねばならないであろう。

40

【0034】

多くのプローブ分子が、特に生物学的又は医学的適用において、立体障害を受けていない求核部分を含んで成り、ポリマーブラシとの好ましい相互作用は、求核置換又はポリマー鎖と試料若しくはプローブ分子との間の共有結合を導く追加の反応を含んで成る。例えば、合成オリゴヌクレオチドは、通常一方の末端(5'又は3')で遊離アミン基が提供される。従って、例示的な官能基は、例えば反応性二重結合、二重結合の等価物(例えばエポキシ基)又は反応性脱離基を提供する。しかし、イオン結合又はファンデルワールス力及び水素結合も、それらの官能基が結果として選択されるならば、試料分子をポリマーブラシにカップリングさせるのに使用されうる。

50

【0035】

ポリマーブラシに存在する適当な官能基を用いて、本発明のポリマー単層は、分離方法、例えばクロマトグラフィーへの適用における固定担としても使用されうる。

【0036】

好ましい官能基は、固定化されうる分子のクラスに関する従来技術の文献から、そして上述した他の必要なもの（反応時間、温度、pH値）に従い選択されうる。一般的な列挙は、例えば教科書「Bioconjugate Techniques」by G.T.Hermanson, Academic Press, 1996において見出すことができる。アミノ末端のオリゴヌクレオチドの結合の場合、適当な基の例は、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド（NHSEステル）、エポキシド、好ましくはグリシジル誘導体、イソチオシアネート、イソシアネート、アジド、カルボン酸基又はマレインイミドなどのいわゆる活性又は反応性エステルである。

10

【0037】

多官能性ポリマー単層を直接生じる好ましい官能性モノマーとして、以下の化合物が本発明の目的のために利用されうる：

- －アクリル又はメタクリル酸N-ヒドロキシスクシンイミド、
- －N-メタクリロイル－6-アミノプロパン酸ヒドロキシスクシンイミドエステル、
- －N-メタクリロイル－6-アミノカプロン酸ヒドロキシスクシンイミドエステル又は
- －アクリル若しくはメタクリル酸グリシジルエステル。

【0038】

適用に応じて、2又はそれ以上の異なる官能基の組み合わせを有するポリマーブラシを提供する可能性が存在しており、これは、例えば異なる型の官能化モノマーの存在下でポリマー鎖へと導く重合を行うことによる。あるいは、官能基は同一であってもよい。

20

【0039】

本発明に従う多官能性ポリマー単層の製造のための好ましい方法を以下に記載する：

【0040】

第1段階において、表面は重合開始剤又は開始分子の単層によって覆われる。重合の開始を許容するこれらの開始剤中の基は、例えば、熱で開始するラジカル機構が使用されるならば、ペルオキシ基又はアゾ基から通常選択される。芳香族ケトン、例えばベンゾイン、ベンジル又はベンゾフェノン誘導体は、ポリマーが光化学的な開始によって形成されるならば、好ましくは使用される。硫黄を含んで成る芳香族ケトンは、所望ならば、光による開始に適した波長をより長波長な領域へと移動させるために同様に使用されうる。その様な不安定な基に加えて、本発明に従う好ましい方法に適した開始剤は、ポリマー鎖によって覆われうる表面への結合に適した1又は複数の基を有する。

30

【0041】

本発明に従うポリマー鎖は、通常連鎖反応を介して表面から伸長する。ラジカル機構は現実的な理由で好ましいが、イオン性重合技術の適用も可能である。

【0042】

表面への結合のための開始剤分子に含まれる官能基は使用するセンサー表面に適合しなければならない。酸化金属上での開始剤単層の製造のために、特に酸化ケイ素表面（蒸発又はスパッタリングした SiO_x 層、シリコンウエハー、ガラス、クォーツの SiO_2 表面）、クロロシラン部分又はアルコキシシランが使用される。チオール又はジスルフィド基は金表面の修飾に適用されうる。しかし、表面上での増大した安定性により、シランが通常好ましい。更に、本発明は無機性表面に限定されない。有機性ポリマー表面も、ポリマー単層を有する基質として使用されることがあり、そして前記の表面を形成するポリマーへの直接的な重合のための開始剤を含む可能性も存在する。

40

【0043】

本発明の目的のために使用されうる開始剤にとって好ましい例を、それらの構造式を一緒に以下に列記する：

- －4, 4'-アゾビス（4-シアノペンタン酸（3'-クロロジメチルシリル）プロピルエステル）、化合物1又はそれぞれのジ及びトリクロロ若しくはモノ、ジ及びトリアル

50

コキシシラン類似体；

－2，4'－アゾー（4－シアノペンタン酸（3''－クロロジメチルシリル）プロピルエステル）、化合物2又はそれぞれのジ及びトリクロロ若しくはモノ、ジ及びトリアルコキシシラン類似体；あるいはプロピルスパーサーよりもウンデシルスパーサーを有するそれぞれの化合物；あるいはこの一般的なアゾ化合物型のジスルフィド又はチオール誘導体；
 －4－（3'－クロロジメチルシリル）プロピルオキシ）ベンゾフェノン、化合物3又はそれぞれのジ及びトリクロロ若しくはモノ、ジ及びトリアルコキシシラン類似体；
 －アリールアゾマロジニトリルのシラン及びジスルフィド／チオール誘導体、例えば化合物4。

【化1】

化合物番号	構造
1	
2	
3	
4	

【0044】

重合反応の開始時に、好ましくは重合可能なモノマーの存在下、加熱段階（熱開始）又は放射線に対する暴露（光開始）によって、ポリマー鎖は表面から伸長しうる。重合は、当業界で知られている標準的な反応条件下で行われうる。この技術を適用するならば、生じるポリマー単層のグラフト密度は広い範囲に及んで、例えば重合時間の変化によって調節されうる。更に、他の方法によって到達不可能なグラフト密度が達成された。従って、ポリマーは、表面上の固定されている部位までの平均距離が5 nm又はそれ未満、例えば2～5 nmである様に結合されうる。その様なグラフト密度は結合した鎖の分子量に依存しないで、例えば100000 g/mol 又はそれ以上の分子量であっても有利に達成されうる。

【0045】

更に、本発明に従う表面上でのポリマー鎖の好ましい *in-situ* 形成は、結合したポリマー鎖の平均分子量、特にそれらの長さの調節を、グラフト密度から独立して許容する。例えば、重合がモノマー濃度を調節しうる溶媒中で行われるならば、より高いモノマー濃度が、生じるポリマーのより高い分子量を直接導くだろう。

【0046】

パラメータグラフト密度及び分子量の正確な調節に従い、各ポリマー層の特性を、様々な適用に適合させることが可能である。例えば、異なる厚さの層が、数ナノメートルから数マイクロメートルまでの広い範囲に及んで製造されうる。例えば、サイズ及び構造においてかなり変化しうる、次にカップリングされるプローブ及び試料分子についての官能基の接触性に関して、生じる層の特性を微調整することも可能である。

10

【0047】

上述の好ましい方法を介して得られるポリマー鎖は、それらを表面上に固定化する自身の構造において、開始剤のフラグメント、すなわち固定する部位より開始し、そしてあらかじめ決定されている開始点まで導く、全ての型の開始剤、特にこの明細書で言及したもののために当業界で知られている部分を保持する。

【0048】

開始分子の合成、表面とそれらの反応及び重合の好ましい条件についての詳細な情報は、
—O.Prucker, J.Ruehe, *Macromolecules*, 1998, 31, 592;
—O.Prucker, J.Ruehe, *Macromolecules*, 1998, 31, 602 及び
—O.Prucker, J.Ruehe, *Langmuir*, 1998, 24 (14), 6893、
に記載されている。

20

【0049】

重合の後、適当な溶媒を用いて未反応のモノマー及び未結合のポリマー鎖を除去するのには注意を払うべきである。

【0050】

この方法に従い製造したポリマー層は、それらの形状から独立して、広範な様々な表面に適用されうる。従来の表面修飾方法で到達不可能な、平らな表面（例えば内部表面）が、本発明に従うポリマー単層で提供されうるのは、かさ高いポリマー分子が表面に向かって分散しなければならないためである。

【0051】

また、様々な手段によってポリマー単層のパターンアレイを作製することが可能である。1つの方法は標準的な写真平板法であり、これは重合の後（マスクを介するポリマーの光アブレーション）、この段階の前（開始剤モノマーマスクの光分解又は光アブレーション）又はマスクを介する重合手段による重合の間のいずれかに適用されうる。パターンポリマー単層の作製のための他の可能な技術は、マイクロコンタクトプリンティング又は関連する方法であり、これは開始層の形成の間又は重合の間に適用されうる。最終的に、インクジェット技術又は他のマイクロプロットング方法が、パターンポリマー単層に続いて移行しうるパターン開始単層を作製するのに使用されうる。これらの技術のいずれかを用いて、マイクロメートルの範囲の寸法を有する表面構造が作製されうる。シグナル発生の高度なパラレルモード及び解析データの統合における有意な向上は、その様な技術の最も有望な形態であり、これは結果として自動解析方法の最適化を許容する。

30

40

【0052】

ポリマー単層上での試料又はプローブ分子の連続的な固定化の検出のために、様々な技術が適用されうる。特に、本発明のポリマー層が、適当な方法、例えば偏光解析法で検出されうるそれらの厚さの有意な増大を経験することが見出された。質量感度法も適用されうる。

【0053】

生物学的試料中の核酸、例えば所望のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド又はDNA分子が解析されうるならば、合成オリゴヌクレオチドの一本鎖はポリマー単層と反応しうる。前記反応は高い湿度のもと、好ましくは緩衝水溶液中で行われる。反応温度は

50

、それがオリゴヌクレオチドに有害でない限り、室温以上に上げられうる。好ましい温度は、40～60℃の範囲内である。この明細書において、多数の同一な合成オリゴヌクレオチド鎖又は異なる鎖の混合物も使用されうる。異なる鎖を使用するならば、それらの配列は好ましくは知られているはずである。

【0054】

この様に製造した表面をハイブリダイゼーション反応に使用する前に、未反応の官能基は適当な求核試薬、好ましくはC₁－C₄アミン、例えば単純な第1級アルキルアミン（例えば、プロピル又はブチルアミン）、第2級アミン（ジエチルアミン）又はアミノ酸（グリシン）の添加を介して不活性化される。

【0055】

例えばPCRから得られる様な、標識されているオリゴヌクレオチドの一本鎖の混合物への暴露により、合成鎖をPCR生成物に相補的なプローブとして提供する表面積のみが、ハイブリダイゼーションによる走査時の検出可能なシグナルを示すだろう。異なるオリゴヌクレオチド配列の平行する検出を容易にするために、異なる型の合成オリゴヌクレオチドプローブを試験溶液に提示する領域へのセンサー表面の分離を許容するプリンティング技術が使用されうる。

【0056】

用語「ハイブリダイゼーション」は、本明細書に従い使用される場合、ストリンジェント又は非ストリンジェントな条件を言及しうる。更に具体的に述べられていなければ、前記条件は、好ましくは非ストリンジェントである。前記のハイブリダイゼーション条件は、例えば、Sambrook, “Molecular Cloning, A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989), Ausubel, “Current Protocols in Molecular Biology”, Green Publishing Associates and Willey Interscience, N.Y. (1989)、又はHiggins and Hames (Eds) “Nucleic acid hybridization, a practical approach” IRL Press Oxford, Washington DC, (1985)に記載の常用のプロトコルに従い確立されうる。条件の設定は当業者の技術の範囲内にあり、そして当業界に記載されているプロトコルに従い決定されうる。従って、特異的にハイブリダイズする配列のみの検出は、通常ストリンジェントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件を必要とし、例えば65℃で0.1×SSC、0.1% SDSである。相同な又は正確に相補的でない配列の検出のための例示的な非ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、65℃で6×SSC、1% SDSで設定されうる。公知の様に、プローブの長さ及び決定されうる核酸の組成は、ハイブリダイゼーション条件の更なるパラメーターを構成する。

【0057】

解析されうる核酸は、合成及び半合成核酸ライブラリーを含むDNAライブラリー又はゲノムライブラリーから生じうる。好ましくは、核酸ライブラリーはオリゴヌクレオチドを含んで成る。

【0058】

固定化されていない状態でのそれらの検出を容易にするために、核酸分子は好ましくは標識されるべきである。適当な標識は、放射性、蛍光、リン光、生物発光又は化学発光標識、酵素、抗体又はその機能的フラグメント若しくは機能的誘導体、ビオチン、アビジン又はストレプトアビジンを含む。

【0059】

抗体は、限定しないがポリクローナル、モノクローナル、キメラ様又は単鎖抗体又はその様な抗体の機能的フラグメント若しくは誘導体を含みうる。

【0060】

抗体を製造するための一般的な方法論は公知であり、そして例えばKoehler and Milstein, Nature 256 (1975), 494に記載され、そしてJ.G.R.Hurrell, ed., “Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications”, CRC Press Inc., Boca Raton, FL (1982)に概説され、そしてL.T.Mimms et al., Virology 176 (1990), 604-619で教示されてきた。上文で述べた様に、本発明に従い、用語「抗体」はモノクローナル又はポリクロー

10

20

30

40

50

ナル抗体に関する。機能的抗体フラグメント又は誘導体は、元の抗体と同一の特異性を提供し、そして $F(a b')_2$ 、 $F a b$ 、 $F v$ 又は $s c F v$ フラグメントを含んで成る；例えば、Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual," CSH Press 1988, Cold Spring Harbor, NYを参照のこと。好ましくは、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。更に、本発明に従う誘導体はペプチド模倣物によって製造されうる。その様な製造方法は当業界で公知であり、そして当業者によって更なる苦勞無しに適用されうる。

【0061】

適用した標識方法に依存して、検出は当業界で知られている方法によって、例えばレーザー走査又はCCDカメラの使用を介して達成されうる。

【0062】

検出が間接的に達成される方法も本発明は含んで成る。その様な間接的な検出の例は、1次化合物、例えば注目の生物学的分子（試料分子）に結合する抗体に向けられる2次標識抗体の使用である。

【0063】

本発明に従うポリマー単層の更なる適用は、例えば物質の精製のための、アフィニティークロマトグラフィーの分野にある。この目的のために、試料と接触する、同一の官能基又はプローブ分子を有するポリマーブラシが好ましくは使用される。所望の物質がポリマーブラシによって固定化された後、未結合の材料が、例えば洗浄段階で除去されうる。適当な溶出液を用いて、精製した物質は続いてアフィニティマトリックスから分離されうる。

【0064】

その様なマトリックス上に固定化されうる好ましい物質は核酸分子、ペプチド又はポリペプチド（又はその複合体、例えば抗体、その機能的フラグメント若しくは誘導体）、糖又は多糖である。

【0065】

固定化が起きた後の表面の再生は可能であるが、結果の質を保証するために、1回の使用が好ましい。

【0066】

本発明により、異なる型の試料は連続及び平行の検出方法における増大した正確性及び／又は低下した空間の必要性で解析されうる。従って、本発明に従うセンサー表面は診断機具又は他の医学的適用において、例えば生理学的な体液、例えば血液、血清、痰等の中の成分の検出のために役割を果たしうる。

【0067】

本発明に従う表面は、合成的な適用のために、特に固層合成において、例えばオリゴ又はポリマーの *i n - s i t u* 形成の間、開始分子も固定しうる。好ましくは、前記オリゴ又はポリマーは生体分子であり、そしてペプチド、タンパク質、オリゴ又は多糖あるいはオリゴ又はポリ核酸を含んで成る。開始剤を固定するとき、これら高分子のモノマーが使用されうる。

【0068】

更に、本発明のポリマー層は、電場における分子、好ましくは生体分子の分離においてゲルとして使用されうる。

【0069】

通常、本発明は優れたグラフト密度を有する均一に修飾された表面の提供を許容する。適当な重合条件を選択することによって、グラフト密度及び鎖長、並びにそれによるポリマー層の厚さが調節されうる。更に、構築した表面は、例えば、開始分子のパターンアレイから重合を開始することによって提供されうる。結果として、前記ポリマー単層はそれぞれの適用に対して最適に調節されうる。

【0070】

本明細書を通じて引用されている文書の開示内容は、引用によって本明細書に組み入れられる。

【0071】

本発明の態様は、次の項目において更に例示される：

【0072】

本発明に従うポリマー層を用いる、試料核酸分子、好ましくは一本鎖核酸分子の検出のための好ましい方法は：

- a) 本発明に従う多官能性ポリマー単層で覆った表面を提供し、
 - b) 適当なプローブ分子、好ましくはオリゴヌクレオチドの一本鎖を、ポリマー鎖に存在する官能基による反応を介してポリマー単層上に固定化し、
 - c) オリゴヌクレオチドの一本鎖と試料核酸分子との間にハイブリダイゼーション反応を起こし、
 - d) 洗浄段階においてハイブリダイズしなかった核酸分子を除去し、そして
 - e) ハイブリダイズした核酸分子を、好ましくは蛍光定量的に検出する、
- 段階を含んで成る。

10

【0073】

本発明に従うポリマー層を用いて、試料から化合物を精製するための好ましい方法は：

- a) 本発明に従うポリマー単層で覆った表面を提供し、
 - b) 多数の同一なプローブ分子をポリマー層上に固定化し、
 - c) 前記化合物をプローブ分子に結合させる条件下で、試料と生じたポリマー層とを接触させ、
 - d) そしてプローブ分子に結合しなかった試料から材料を除去する、
- 段階を含んで成る。

20

【0074】

この方法は更に、

- e) 適当な溶出液の使用によって、プローブ分子から前記化合物を分離する、
- 段階を含む。

【0075】

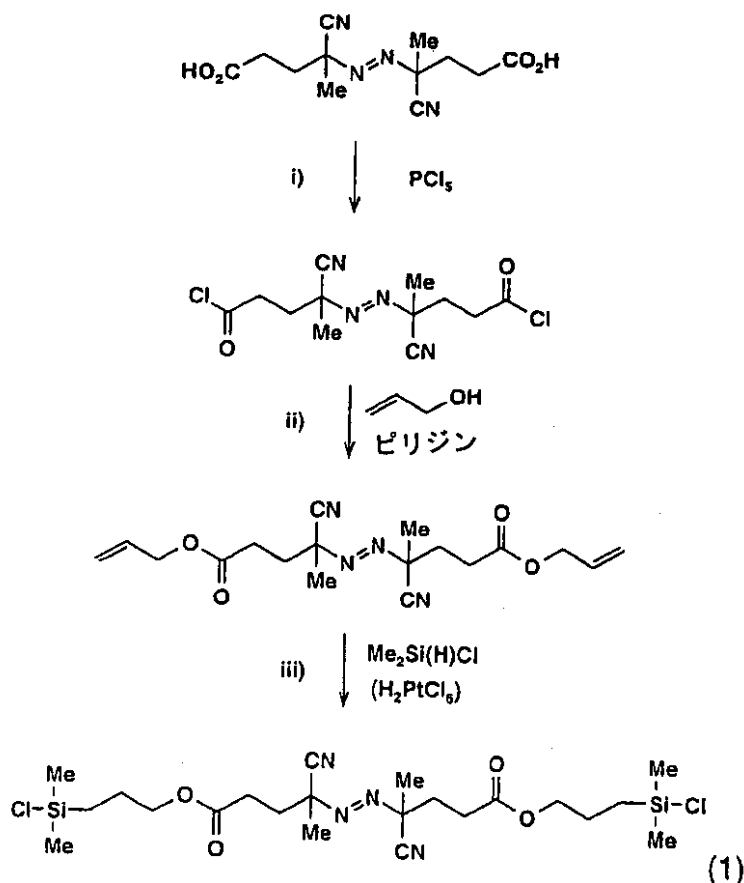
以下の例は本発明を例示している：

(1) 開始剤の合成

例として、化合物1の製造を記載する。反応経路を以下に例示する。図中の索引 i ~ iii は本文の様々な段階の記載を言及する。

30

【化2】



【0076】

i) 氷冷槽中で冷却した、50mlの塩化メチレン中の40gの五塩化リン (PCl_5) の懸濁液に、50mlの塩化メチレン中の10gの4,4'-アゾビス(4-シアノペンタン酸)の懸濁液を一滴ずつ加えた。混合物を室温まで暖め、そして一晩攪拌した。過剰な PCl_5 を濾過し、そして残りの溶液を PCl_5 がこれ以上分離されなくなるまで濃縮した。混合物を再び濾過し、そして濾液を300mlの冷却したヘキサンに加え、白色固体として酸塩化物の分離をもたらした(収率90%)。

【0077】

ii) 50mlの塩化メチレン中の2.7mlのアリルアルコール及び6.5mlのピリジンの溶液に、0℃で50mlの塩化メチレン中の10gの酸塩化物の溶液を一滴ずつ加えた。混合物を室温まで暖め、そして一晩攪拌した。次に、溶液は2N H_2SO_4 、 NaHCO_3 溶液及び水で2回洗浄した。有機層は Na_2SO_4 上で脱水し、そして有機媒を蒸発させた。生じたビスアリルエステルは、メタノールから再結晶化した(収率90%)。

【0078】

iii) 30mlのジメチルクロロシラン中の3gのビスアリルエステルの懸濁液に、0.5mlのジメチルエーテル/エタノール(1/1 v/v)中の30mgのヘキサクロロ白金酸の溶液を加え、そして混合物を還流するまで3時間加熱した。過剰なシランを蒸発させて、定量的な収率で淡い緑色の油として化合物を生成した。残査の白金触媒は、無水 Na_2SO_4 上での生成物の塩化メチレン溶液の濾過によって除去した。

【0079】

(2) 開始単層の形成

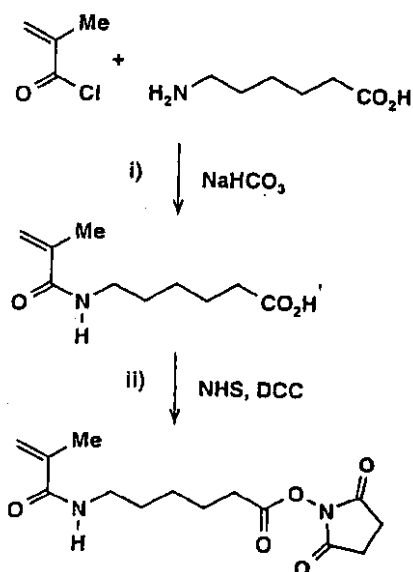
(1) のもとで合成される開始剤は、溶媒として無水トルエン及び触媒としてトリエチルアミンを用いて、不活性条件（乾燥窒素雰囲気）のもとでガラス表面上で室温で固定化される。トルエン溶液は約 50 mmol/l の開始剤の濃度を示し、トリエチルアミンは約 10 mmol/l の濃度まで加えられる。試料は前記溶液中で一晩保たれ、そして次にメタノール及びクロロホルムを用いる大規模なすすぎによって洗浄される。

【0080】

(3) 官能化モノマーの合成

例として、N-メタクリロイル-6-アミノカプロン酸ヒドロキシスクシンイミドエステルの合成を記載する。反応経路を以下に示す。この図の索引 i ~ iii は本文中の様々な段階の記載を言及する。

【化 3】



【0081】

i) 100 mlの水及び50 mlの1, 4-ジオキサン中の13.2 gの6-アミノカプロン酸及び20 gのNaHCO₃の溶液を、50 mlの1, 4-ジオキサン中の10.3 mlのメタクリル酸塩化物の溶液にゆっくりと加えた。溶液は一晩攪拌した。次に、50 mlの水を加え、そして混合物は、100 ml分の酢酸エチルを用いて3回洗浄した。水層は希釈塩酸で酸性化 (pH 2) し、そして次に100 ml分の酢酸エチルで3回抽出した。一緒の有機層はNa₂SO₄上で脱水し、約50 mlの量に濃縮し、そして350 mlの冷却したヘキサンに加えた。この混合物を-20 °Cに冷却し、そして生成物を白色結晶として一晩でゆっくりと分離した (収量約14 g)。

【0082】

ii) 300 mlの塩化メチレン中の14 gの前記酸の溶液を5 °Cに冷却し、そして8.2 gのN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) 及び14.6 gのN,N-ジシクロヘキシルカルボジイミドを加えた。混合物を5 °Cに一晩保った。沈澱 (ジシクロヘキシルウレア)

を濾過し、そして溶媒を蒸発させた。この段階の間、追加のウレアを時々分離し、そして再び濾過した。粗製生成物をイソプロパノールから再結晶化し、そして約 15 g の NHSEステルモノマーを生成せしめた。

【0083】

(4) 多官能性ポリマー単層の形成

(3) から得られる N, N-ジメチルアクリルアミド (DMAA) 及び N-メタクリロイル-6-アミノカプロン酸ヒドロキシスクシンイミドエステル (C₆AE) のモノマー混合物は、溶媒としてのジメチルホルムアミド (DMF) 中で重合する。モノマー濃度は、DMAA/C₆AE = 5/1 のモノマーのモル比で 4 mol/l である。重合は 60 °C で行う。重合の前に、溶液は、全ての微量酸素を除去するために少なくとも 3 回の凍結-融解周期を通して慎重に脱気される。重合の後、試料ごとに少なくとも 10 時間 DMF で抽出される。

10

【0084】

(5) オリゴヌクレオチド鎖の検出

得られた表面は、1 nl の 10 µM オリゴヌクレオチド溶液に暴露され、そしてカップリング反応は水溶液中で 2 時間、約 40 ~ 50 °C で進められる。

【0085】

合成オリゴヌクレオチドは 5-アミノ化修飾され、そして溶液は pH 8.0 の 100 nM リン酸ナトリウム緩衝液で緩衝化される。カップリング反応の後、センサー表面はリン酸ナトリウム緩衝液ですすがれる。平行検出のためのセンサー表面上での特異的な型のオリゴヌクレオチドの空間的な伸長を制限するために、反応物はポリマー層にプリントされる。

20

【0086】

この様に製造した表面は、2 × SSC、10 % 硫酸デキストラン及び 50 % ホルムアミドの緩衝液中で、28 °C で 12 時間、Cy5 標識した PCR 生成物と反応させられる。DNA 成分は 100 ng DNA/80 µl 試料とした。ハイブリダイゼーション反応が起きた後、表面は SSC 緩衝液中で洗浄され、そして結果は CCD カメラを用いるレーザー活性化を介して蛍光光度により検出した。蛍光シグナルは、PCR 生成物と相補的な合成オリゴヌクレオチドを有するそれらの領域でのみ検出されうる。

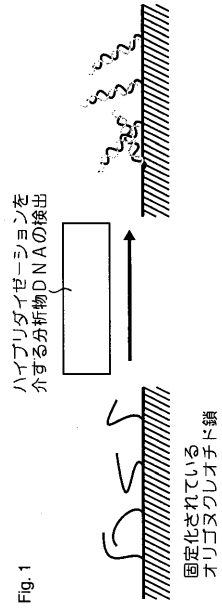
【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、従来の DNA センサーの設計の略図を示す。

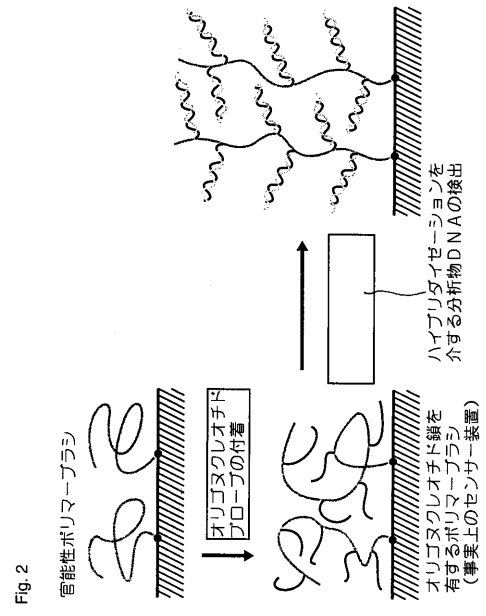
30

【図 2】 図 2 は、官能性ポリマーブラシに基づく DNA センサーの設計の略図を示す。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566 (2006.01)		G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)		G 0 1 N 37/00	1 0 2

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100082898
弁理士 西山 雅也

(72)発明者 クラップロット, ホルガー
ドイツ連邦共和国, デー 7 9 1 0 8 フライブルク, ケーラーシュトラッセ 1 2

(72)発明者 プルツカー, オスバルト
ドイツ連邦共和国, デー 5 5 1 2 6 マインツ, セルトリウスリンク 2 8 3

(72)発明者 リューヘ, ユルゲン
ドイツ連邦共和国, デー 5 5 1 2 8 マインツ, サトラーベーク 9 アー

審査官 久保田 英樹

(56)参考文献 特表平05-502585 (JP, A)
特表2001-508281 (JP, A)
特開2000-143705 (JP, A)
特開昭63-233360 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08F 2/00- 2/60

C08F 4/00- 4/82

C08F 20/00-22/40

C12N 15/00-15/09

CAplus(STN)

REGISTRY(STN)