

(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2005-537487

(P2005-537487A)

(43) 公表日 平成17年12月8日(2005.12.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D 2 G O 5 4
C 1 2 M 1/00	GO 1 N 33/53	M 4 B O 2 9
C 1 2 M 1/34	C 1 2 M 1/00	A 4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 M 1/34	A
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 M 1/34	Z
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2004-533419 (P2004-533419)
 (86) (22) 出願日 平成15年8月28日 (2003. 8. 28)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年4月27日 (2005. 4. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/009562
 (87) 国際公開番号 W02004/023143
 (87) 国際公開日 平成16年3月18日 (2004. 3. 18)
 (31) 優先権主張番号 1503/02
 (32) 優先日 平成14年9月3日 (2002. 9. 3)
 (33) 優先権主張国 スイス (CH)
 (31) 優先権主張番号 0115/03
 (32) 優先日 平成15年1月27日 (2003. 1. 27)
 (33) 優先権主張国 スイス (CH)

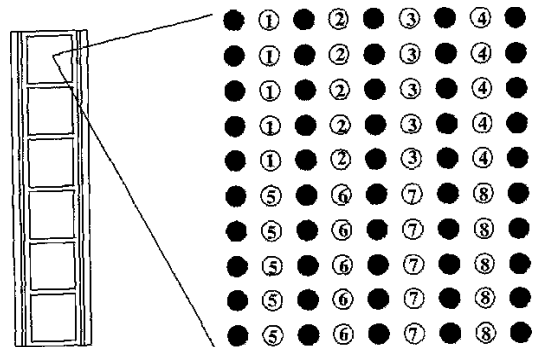
(71) 出願人 599116649
 ツェプトゼンス アクチエンゲゼルシャフト
 Z e p t o s e n s A G
 スイス国 4 1 0 8 ヴィッテルスヴィル
 ベンケンシュトラーセ 2 5 4
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100075225
 弁理士 篠田 文雄
 (72) 発明者 パウラク, ミヒヤエル
 ドイツ国、7 9 2 7 5 ローフェンブルク
 、アンデルスバッハシュトラーセ 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 試料中において任意には分画された後の試料中において、固定化特異的結合パートナーとして測定される分析対象物を用いる分析プラットフォーム及び検出法

(57) 【要約】

本発明は、多数の試料を、その試料に含まれる分析対象物と呼ばれる、特異的結合反応に関与する物質として生物学的に関連する化合物の存在に関して試験するための分析プラットフォームならびにそれを用いて実施される方法に関する。本発明は、前記試料又はそれらの試料の画分が、同定される、その中に含まれ、第一の多数の特異的結合パートナーとして働く分析対象物とともに、強固な支持体として働く減衰フィールドセンサプラットフォーム上の少なくとも一つの二次元又は二次元アレイ中の個別計測区域に直接又は試料もしくは画分のさらなる希釈ののち配置されることを特徴とする。異なる試料もしくは画分が、又は試料もしくは画分の異なる希釈物が、異なる個別計測区域に配設される。第二の多数の特異的結合パートナーとして働き、前記第一の多数の特異的結合パートナーからの試料に含まれる1種以上の分析対象物を特異的に同定するために設けられる1種以上の同定物質が、単一又は多数の特異的結合反応工程で、前記個別計測区域に配置された試料と又はその画分もしくはその希釈物と接触させられる。個別計測区域に含まれる



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多数の試料を、その中に含まれる、特異的結合反応における結合パートナーとして生物学的に関連する分析対象物に関して分析する方法であって、

前記試料又は前記試料の画分を、第一の複数の特異的結合パートナーとしてその中に含まれかつ測定される分析対象物とともに、直接又は前記画分のさらなる希釈ののち、強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォーム上の少なくとも一つの一又は二次元の計測区域アレイ中の個別計測区域に付着させ、異なる試料もしくは画分を又は試料もしくは画分の異なる希釈物を異なる個別計測区域に配設し、

試料又はその画分に含まれる第一の複数の特異的結合パートナーからの 1 種以上の分析対象物の特異的測定のために、1 種以上のトレーサ化合物を、第二の複数の特異的結合パートナーとして、前記個別計測区域に付着された試料と又はその画分もしくは希釈物と単一又は多数の特異的結合反応工程で接触させ、

減衰フィールドセンサプラットフォームの減衰フィールド中の個別計測区域において、試料に含まれる分析対象物へのトレーサ化合物の結合から生じる光電子シグナルの変化を横方向分解的に計測し、

対応する計測区域からの前記光電子シグナルの変化の相対量から、特異的に検出される分析対象物の存在を定性的に及び/又は定量的に測定する方法。

【請求項 2】

試料を前記画分に分けるための方法が、遠心分離と、「正常相」、「逆相」、イオン交換又は「疎水性相互作用」クロマトグラフィー（HIC）の方法による HPLC 及びマイクロ HPLC（「高圧液クロマトグラフィー」）と、サイズ排除クロマトグラフィーと、ゲルクロマトグラフィーと、電気泳動と、毛管電気泳動と、エレクトロクロマトグラフィーと、「フリーフロー電気泳動」などと、からなる方法の群より選択される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

試料の画分を、強固な支持体としての前記減衰フィールドセンサプラットフォームに付着させる前に、少なくとも 10 倍に希釈する、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

試料の画分を、強固な支持体としての前記減衰フィールドセンサプラットフォームに付着させる前に、少なくとも 30 倍に希釈する、請求項 1 ~ 3 のいずれか記載の方法。

【請求項 5】

試料が、健常な又は罹患した細胞の抽出物（たとえばヒト、動物、バクテリア又は植物細胞抽出物）と、ヒト又は動物組織、たとえば臓器、皮膚、毛髪もしくは骨組織の抽出物、又は植物組織の抽出物と、体液又はその成分、たとえば血液、血清もしくは血漿、滑液、涙液、尿、唾液、組織液、リンパ液と、からなる群より選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の方法。

【請求項 6】

前記「ネイチャーアイデンティカル」試料が、刺激（処理）された又は未処理の細胞の抽出物と、健常な又は罹患した組織の抽出物と、からなる群より選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の方法。

【請求項 7】

分析される試料が、組織スライシング、バイオプシー及びレーザキャプチャーマイクロダイセクションからなる群の方法によって生物又は組織又は細胞集合体又は細胞から採取されたものである、請求項 1 ~ 6 のいずれか記載の方法。

【請求項 8】

「固定化試料」が細胞 20000 個未満の材料を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の方法。

【請求項 9】

「固定化試料」が細胞 1000 個未満の材料を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか記載の方

10

20

30

40

50

法。

【請求項 10】

「固定化試料」に含まれる分析対象物が、すなわち特にバイオポリマー、たとえば核酸又はタンパク質が、天然の構造又は変性した構造で存在する、請求項 1 ~ 9 のいずれか記載の方法。

【請求項 11】

「固定化試料」に含まれる分析対象物が、すなわち特にバイオポリマー、たとえば核酸又はタンパク質が、尿素で処理されたのちの変性形態で存在し、含まれる分析対象物のエピトープが、対応する検出試薬への、たとえば抗体への結合のために自由に接触可能である、請求項 1 ~ 9 のいずれか記載の方法。

10

【請求項 12】

「固定化試料」に分析対象物として含まれる 1 種以上の化合物の相対合量を、リン酸化又は非リン酸化形態における、及び / 又はグリコール化及び / 又は非グリコール化形態におけるそれらの存在の和として測定する、請求項 1 ~ 11 のいずれか記載の方法。

【請求項 13】

「固定化試料」に分析対象物として含まれる 1 種以上の化合物の相対量を、リン酸化及び / 又は非リン酸化形態で、及び / 又はグリコール化及び / 又は非グリコール化形態でそれらが存在する場合に、前記形態の 1 種以上に関して測定する、請求項 1 ~ 11 のいずれか記載の方法。

【請求項 14】

「固定化試料」に含まれる 1 種以上の分析対象物の活性化度を測定する、請求項 1 ~ 11 のいずれか記載の方法。

20

【請求項 15】

「固定化試料」に含まれる 1 種以上の分析対象物のリン酸化度及び / 又はグリコール化度を測定する、請求項 1 ~ 11 のいずれか記載の方法。

【請求項 16】

「固定化試料」に分析対象物として含まれる 1 種以上の化合物の相対量と、1 種以上の比較試料に含まれる 1 種以上の化合物の相対量との 20 % 未満、好ましくは 10 % 未満の差を、分析対象物としてのリン酸化及び / 又は非リン酸化形態の、及び / 又はグリコール化及び / 又は非グリコール化形態の 1 種以上に関して分解する、請求項 1 ~ 15 のいずれか記載の方法。

30

【請求項 17】

前記「固定化試料」及び 1 種以上の比較試料が同じ供給源から異なる時期に採取されたものであり、これらの試料に分析対象物として含まれるリン酸化及び / 又は非リン酸化形態にある、及び / 又はグリコール化及び / 又は非グリコール化形態にある 1 種以上の化合物の相対量の時間変化を測定する、請求項 1 ~ 16 のいずれか記載の方法。

【請求項 18】

異なる試料が同じ生物から、又は同じ細胞培養物から採取されたものである、請求項 1 ~ 17 のいずれか記載の方法。

【請求項 19】

異なる試料が同じ生物の異なる位置から採取されたものである、請求項 18 記載の方法。

40

【請求項 20】

異なる試料が異なる生物から、又は異なる細胞培養物から採取されたものである、請求項 1 ~ 17 のいずれか記載の方法。

【請求項 21】

個別計測区域に付着される「固定化試料」の付着を改善するために、減衰フィールドセンサプラットフォームが付着促進層を含み、その上に試料又はその画分もしくは希釈物が付着される、請求項 1 ~ 20 のいずれか記載の方法。

【請求項 22】

50

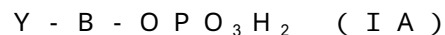
付着促進層が厚さ200nm未満、好ましくは20nm未満である、請求項21記載の方法。

【請求項23】

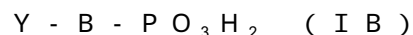
前記付着促進層が、シラン、官能化シラン、エポキシド、官能化、荷電又は極性ポリマー及び「自己組織化受動又は官能化単分子又は多分子層」、チオール、リン酸アルキル及びホスホン酸アルキル、多官能価ブロックコポリマー、たとえばポリ(L)リシン/ポリエチレングリコールの群の化合物を含む、請求項21又は22記載の方法。

【請求項24】

前記付着促進層が、一般式I(A)



の有機リン酸又は一般式I(B)



の有機ホスホン酸及びそれらの塩の群の化合物(式中、Bは、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、ヘタリール又はヘタリールアルキル残基であり、Yは、水素又は以下の系、たとえばヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、任意には低級アルキルによって置換されているモノ-もしくはジアルキルアミノ、チオールの官能基又は系、たとえばエステル、ホスフェート、ホスホネート、スルフェート、スルホネート、マレイミド、スクシンイミジル、エポキシ又はアクリレートの負の酸性基である)を含む、請求項21又は22記載の方法。

【請求項25】

1種以上の「固定化試料」を、強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォームに付着させる前に、任意には開始剤又は化学的架橋剤(たとえばグルタルアルデヒド)の存在で、ポリマー又は重合性モノマーの溶液と混合する(前記強固な支持体への付着を改善し、付着の均一さを改善するため)、請求項1~24のいずれか記載の方法。

【請求項26】

ポリマー、重合性モノマー又は化学的架橋剤の前記溶液が、多糖類、たとえばアガロース、アクリルアミド、グルタルアルデヒドなどの溶液からなる群より選択される、請求項25記載の方法。

【請求項27】

任意には開始剤又は化学的架橋剤(たとえばグルタルアルデヒド)の存在における1種以上の「固定化試料」とポリマー又は重合性モノマーの溶液との混合物が、バイオアフィニティー反応の連続工程でトレーサ試薬が接触することができる試料成分が中に埋め込まれている強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォームへの三次元ネットワーク構造の固定化につながる、請求項25又は26記載の方法。

【請求項28】

「固定化試料」を、インクジェットスポッティングと、ピン、ペンもしくは毛管による機械的スポッティングと、「マイクロコンタクトプリント」と、前記試料を平行な又は交差したマイクロチャンネルに供給し、圧力差又は電気もしくは電磁ポテンシャルを加えることによって計測区域と流体素子接触させることと、光化学的又は写真平版固定化法と、からなる方法の群から選択される方法により、横方向に選択的に、個別計測区域で、減衰フィールドセンサプラットフォームに直接又はその上に付着された付着促進層に付着させる、請求項1~27のいずれか記載の方法。

【請求項29】

トレーサ化合物の非特異的結合を最小限にするために個別計測区域の間の領域を「不動態化」する、すなわち、分析対象物に対して、及び付着された「固定化試料」の他の含有物に対して、ならびに前記分析対象物のためのトレーサ化合物に対して「化学的に中性」(すなわち非結合性)である化合物を、横方向に分けられた計測区域の間に付着させる、請求項1~28のいずれか記載の方法。

【請求項30】

分析対象物に対して、及び付着された「固定化試料」の他の含有物に対して、ならびに

10

20

30

40

50

前記分析対象物のためのトレーサ化合物に対して「化学的に中性」（すなわち非結合性）である前記化合物が、アルブミン、特にウシ血清アルブミンもしくはヒト血清アルブミン、カゼイン、非特異的ポリクロナルもしくはモノクロナルの異種もしくは実験的に非特異的な抗体（特にイムノアッセイのために測定される分析対象物の場合）、洗浄剤、たとえば Tween 20、分析されるポリヌクレオチドとでハイブリダイズしない断片化された天然もしくは合成 DNA、たとえばニシンもしくはサケ精子の抽出物又は非荷電であるが親水性のポリマー、たとえばポリエチレングリコールもしくはデキストランからなる群より選択される、請求項 29 記載の方法。

【請求項 31】

個別計測区域に付着される「固定化試料」に含まれかつ測定される分析対象物が、タンパク質、たとえばモノクロナル又はポリクロナル抗体及び抗体断片、ペプチド、酵素、グリコペプチド、オリゴ糖、レクチン、抗体に対する抗原、さらなる結合部位で官能化されたタンパク質（「タグタンパク質」、たとえば「ヒスチジンタグタンパク質」）及び核酸（たとえば DNA、RNA）からなる群の化合物である、請求項 1～30 のいずれか記載の方法。

10

【請求項 32】

個別計測区域に付着される「固定化試料」に含まれかつ測定される分析対象物が、サイトゾル又は膜結合細胞タンパク質からなる群の化合物、特に細胞におけるシグナル伝達の過程に参与するタンパク質、たとえばキナーゼである、請求項 31 記載の方法。

【請求項 33】

個別計測区域中の「固定化試料」に含まれる分析対象物へのトレーサ化合物の結合の結果として、前記減衰フィールドセンサプラットフォームの一部である薄い金属層で表面プラズモンを生成するための共振条件の局所変化により、横方向分解的に測定される光電子シグナルの変化を生じさせる、請求項 1～32 のいずれか記載の方法。

20

【請求項 34】

共振条件の前記変化が、前記減衰フィールドセンサプラットフォームの一部である薄い金属層で表面プラズモンを生成するための励起光の照射のための共振角の変化によって示される、請求項 33 記載の方法。

【請求項 35】

共振条件の前記変化が、前記減衰フィールドセンサプラットフォームの一部である薄い金属層で表面プラズモンを生成するための照射励起光の共振波長の変化によって示される、請求項 33 記載の方法。

30

【請求項 36】

個別計測区域中の「固定化試料」に含まれる分析対象物へのトレーサ化合物の結合の結果として、前記減衰フィールドセンサプラットフォーム上のこれらの領域の有効屈折率の局所変化により、横方向分解的に測定される光電子シグナルの変化を生じさせる、請求項 1～35 のいずれか記載の方法。

【請求項 37】

個別計測区域中の「固定化試料」に含まれる分析対象物へのトレーサ化合物の結合の結果として、前記減衰フィールドセンサプラットフォームの減衰フィールド内に位置する、ルミネセンス可能な分子からの一以上のルミネセンスの局所変化により、横方向分解的に測定される光電子シグナルの変化を生じさせる、請求項 1～32 のいずれか記載の方法。

40

【請求項 38】

一以上のルミネセンスの前記変化が、個別計測区域に含まれる分析対象物のための 1 種以上のトレーサ化合物にルミネセンス標識として結合している、ルミネセンス可能な分子又はナノ粒子から生じる、請求項 37 記載の方法。

【請求項 39】

異なる発光波長及び / 又は異なる励起スペクトル、好ましくは異なる発光波長及び同一の励起波長を有する 2 種以上のルミネセンス標識を分析対象物検出に適用する、請求項 38 記載の方法。

50

【請求項 40】

異なる発光減衰時間を有する2種以上のルミネセンス標識を分析対象物検出に適用する、請求項38又は39記載の方法。

【請求項 41】

「固定化試料」中の異なる分析対象物を検出するために2種以上のルミネセンス標識を適用する、請求項39又は40記載の方法。

【請求項 42】

計測区域中の異なる分析対象物を検出するために2種以上のルミネセンス標識を適用する、請求項39～41のいずれか記載の方法。

【請求項 43】

励起光を1 fs～10分の間隔のパルスで照射し、計測区域からの発光を時間分解的に計測する、請求項37～42のいずれか記載の方法。

【請求項 44】

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームが、一以上の層を含む光学導波管を含む、請求項36～43のいずれか記載の方法。

【請求項 45】

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームが、一以上の層を含む平面光学導波管を含み、この導波管が、連続的であるか、個別の導波領域に分割されている、請求項44記載の方法。

【請求項 46】

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームが、本質的に光学的に透明な導波層(a)を、層(a)よりも低い屈折率を有する第二の同じく本質的に光学的に透明な層(b)の上に有し、任意には層(a)と(b)との間に、同じく層(a)よりも低い屈折率を有する同じく本質的に光学的に透明な中間層(b)を有する平面光学薄膜導波管を含む、請求項45記載の方法。

【請求項 47】

1個以上の光源からの励起光を、プリズムカプラと、重複する減衰フィールドを有する光学導波管を連結したものを有する減衰カプラと、導波層の前面(末端)の正面に配設された合焦レンズ、好ましくは円柱レンズを有する前面(バット)カプラと、格子カプラと、からなる群からの1個以上の光学内結合要素を使用して、減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層に内結合する、請求項1～46のいずれか記載の方法。

【請求項 48】

減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層への励起光の内結合を、前記導波層中に形成される1個以上の格子構造(c)を使用して実施する、請求項47記載の方法。

【請求項 49】

減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層中を誘導された光の外結合を、前記導波層中に形成されかつ格子構造(c)と類似した又は異なる格子周期及び格子深さを有する1個以上の格子構造(c)を使用して実施する、請求項1～48のいずれか記載の方法。

【請求項 50】

1個以上の光源からの励起光を、1個以上の格子構造(c)を使用して前記減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層に内結合し、誘導波として減衰フィールドセンサプラットフォーム上に位置する計測区域に向けて送り、さらに、前記誘導波の減衰フィールドで発生する、ルミネセンス可能な分子からのルミネセンスを、1個以上の検出器を使用して時間分解的に計測し、1種以上の分析対象物の相対濃度をこれらのルミネセンスシグナルの相対強度から測定する、請求項48又は49記載の方法。

【請求項 51】

一以上のルミネセンスの測定に加えて、計測区域における有効屈折率の変化を測定する、請求項37～50のいずれか記載の方法。

【請求項 52】

10

20

30

40

50

ー以上のルミネセンスの測定及び/又は励起波長における光シグナルの測定を偏光選択的な計測として実施する、請求項 3 3 ~ 5 1 のいずれか記載の方法。

【請求項 5 3】

ー以上のルミネセンスを励起光の偏光とは異なる偏光で計測する、請求項 4 7 ~ 5 2 のいずれか記載の方法。

【請求項 5 4】

多数の試料を、その中に含まれかつバイオアフィニティー反応における結合パートナーとして生物学的に関連する分析対象物に関して分析するための分析プラットフォームであって、

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームと、

減衰フィールドセンサプラットフォーム上の、バイオアフィニティー反応で前記分析対象物を測定するための固定化された結合パートナーを有する少なくとも一つの一又は二次元の個別計測区域アレイと

を含み、

前記個別計測区域が、測定される分析対象物を第一の複数の特異的結合パートナーとして含有する前記試料又は前記試料の画分を、直接又は前記試料又はその画分のさらなる希釈ののち、付着することによって生成され、

異なる試料もしくは画分又は試料もしくはそれらの希釈物の異なる希釈物が異なる個別計測区域に配設され、

第一の複数の特異的結合パートナーを形成する 1 種以上の固定化結合パートナーが、分析される試料に含まれる 1 種以上の分析対象物そのものである分析プラットフォーム。

【請求項 5 5】

1 種以上の試料又は試料の画分が、強固な支持体としての前記減衰フィールドセンサプラットフォームに付着される前に、少なくとも 10 倍に希釈され、画分の異なる希釈物が、前記減衰フィールドセンサプラットフォーム上の異なる個別計測区域に付着される、請求項 5 4 記載の分析プラットフォーム。

【請求項 5 6】

1 種以上の試料又は試料の画分が、強固な支持体としての前記減衰フィールドセンサプラットフォームに付着される前に、少なくとも 30 倍に希釈され、画分の異なる希釈物が、前記減衰フィールドセンサプラットフォーム上の異なる個別計測区域に付着される、請求項 5 4 記載の分析プラットフォーム。

【請求項 5 7】

試料が、健常な又は罹患した細胞の抽出物（たとえばヒト、動物、バクテリア又は植物細胞抽出物）と、ヒト又は動物組織、たとえば臓器、皮膚、毛髪もしくは骨組織の抽出物又は植物組織の抽出物と、体液又はそれらの成分、たとえば血液、血清もしくは血漿、滑液、涙液、尿、唾液、組織液、リンパ液と、からなる群より選択される、請求項 5 4 ~ 5 6 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項 5 8】

前記試料が、刺激（処理）された又は未処理の細胞の抽出物と、健常な又は罹患した組織の抽出物と、からなる群より選択される、請求項 5 4 ~ 5 6 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項 5 9】

分析される試料が、組織スライシング、バイオプシー及びレーザ捕捉式顕微解剖の群の方法によって生物又は組織又は細胞集合体又は細胞から採取されたものである、請求項 5 4 ~ 5 8 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項 6 0】

「固定化試料」が細胞 2 0 0 0 0 個未満の材料を含む、請求項 5 4 ~ 5 9 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項 6 1】

「固定化試料」が細胞 1 0 0 0 個未満の材料を含む、請求項 5 4 ~ 6 0 のいずれか記載

10

20

30

40

50

の分析プラットフォーム。

【請求項 6 2】

「固定化試料」に含まれる分析対象物、すなわち特にバイオポリマー、たとえば核酸及びタンパク質が天然の構造又は変性した構造で存在する、請求項 5 4 ~ 6 1 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項 6 3】

「固定化試料」に含まれる分析対象物、すなわち特にバイオポリマー、たとえば核酸及びタンパク質が、尿素で処理されたのちの変性形態で存在し、前記分析対象物のエピトープが、対応する検出試薬、たとえば抗体への結合のために自由に接触可能である、請求項 5 4 ~ 6 1 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

10

【請求項 6 4】

異なる付着試料が同じ生物から又は同じ細胞培養物から採取されたものである、請求項 5 4 ~ 6 3 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項 6 5】

異なる付着試料が同じ生物の異なる位置から採取されたものである、請求項 6 4 記載の分析プラットフォーム。

【請求項 6 6】

異なる付着試料が異なる生物から又は異なる細胞培養物から採取されたものである、請求項 5 4 ~ 6 3 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項 6 7】

個別計測区域に付着される「固定化試料」の付着を改善するために、減衰フィールドセンサプラットフォームが付着促進層を含み、その上に試料又はその画分もしくは希釈物が付着される、請求項 5 4 ~ 6 6 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

20

【請求項 6 8】

付着促進層が厚さ 2 0 0 nm 未満、好ましくは 2 0 nm 未満である、請求項 6 7 記載の分析プラットフォーム。

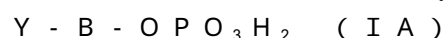
【請求項 6 9】

前記付着促進層が、シラン、官能化シラン、エポキシド、官能化、荷電又は極性ポリマー及び「自己組織化受動又は官能化単分子又は多分子層」、チオール、リン酸アルキル及びホスホン酸アルキル、多官能価ブロックコポリマー、たとえばポリ(L)リシン/ポリエチレングリコールの群の化合物を含む、請求項 6 7 又は 6 8 記載の分析プラットフォーム。

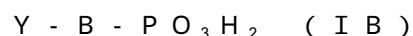
30

【請求項 7 0】

前記付着促進層が、一般式 I (A)



の有機リン酸又は一般式 I (B)



の有機ホスホン酸及びそれらの塩の群の化合物(式中、B は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、ヘタリール又はヘタリールアルキル残基であり、Y は、水素又は以下の系、たとえばヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、任意には低級アルキルによって置換されているモノ-もしくはジアルキルアミノ、チオールの官能基又は系、たとえばエステル、ホスフェート、ホスホネート、スルフェート、スルホネート、マレイミド、スクシンイミジル、エポキシ又はアクリレートの負の酸性基である)を含む、請求項 6 7 又は 6 8 記載の分析プラットフォーム。

40

【請求項 7 1】

1 種以上の「固定化試料」が、強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォームに付着される前に、任意には開始剤又は化学的架橋剤(たとえばグルタルアルデヒド)の存在で、ポリマー又は重合性モノマーの溶液と混合される(前記強固な支持体への付着を改善し、付着の均一さを改善するため)、請求項 5 4 ~ 7 0 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

50

【請求項 7 2】

ポリマー、重合性モノマー又は化学的架橋剤の前記溶液が、多糖類、たとえばアガロース又はアクリルアミド又はグルタルアルデヒドなどの溶液からなる群より選択される、請求項 7 1 記載の分析プラットフォーム。

【請求項 7 3】

任意には開始剤又は化学的架橋剤（たとえばグルタルアルデヒド）の存在における 1 種以上の「固定化試料」とポリマー又は重合性モノマーの溶液との混合物が、バイオアフィニティー反応の連続工程でトレーサ試薬が接触することができる試料成分が中に埋め込まれている強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームへの三次元ネットワーク構造の固定化につながる、請求項 7 1 又は 7 2 記載の分析プラットフォーム。

10

【請求項 7 4】

アレイが、50 個を超える、好ましくは 500 個を超える、もっとも好ましくは 5000 個を超える計測区域を含む、請求項 5 4 ~ 7 3 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項 7 5】

アレイの計測区域が、1 平方センチメートルあたり 10 個を超える、好ましくは 100 個を超える、もっとも好ましくは 1000 個を超える密度で配設されている、請求項 5 4 ~ 7 4 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項 7 6】

多数の計測区域アレイが強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォーム上に設けられている、請求項 5 4 ~ 7 5 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

20

【請求項 7 7】

少なくとも 5 個、好ましくは少なくとも 50 個の計測区域アレイが強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォーム上に設けられている、請求項 7 6 記載の分析プラットフォーム。

【請求項 7 8】

トレーサ化合物の非特異的結合を最小限にするために個別計測区域の間の領域が「不動態化」されている、すなわち、分析対象物に対して、及び付着された「固定化試料」の他の含有物に対して、ならびに前記分析対象物のためのトレーサ化合物に対して、「化学的に中性」（すなわち非結合性）である化合物が、横方向に分けられた計測区域の間に付着されている、請求項 5 4 ~ 7 7 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

30

【請求項 7 9】

分析対象物に対して、及び付着された「固定化試料」の他の含有物に対して、ならびに前記分析対象物のためのトレーサ化合物に対して、「化学的に中性」（すなわち非結合性）である前記化合物が、アルブミン、特にウシ血清アルブミンもしくはヒト血清アルブミン、カゼイン、非特異的ポリクロナールもしくはモノクロナールの異種もしくは実験的に非特異的な抗体（特にイムノアッセイのために測定される分析対象物の場合）、洗浄剤、たとえば Tween 20、分析されるポリヌクレオチドとでハイブリダイズしない断片化された天然もしくは合成 DNA、たとえばニシンもしくはサケ精子の抽出物又は非荷電であるが親水性のポリマー、たとえばポリエチレングリコールもしくはデキストランからなる群より選択される、請求項 7 8 記載の分析プラットフォーム。

40

【請求項 8 0】

個別計測区域に付着される「固定化試料」に含まれかつ測定される分析対象物が、タンパク質、たとえばモノクロナール又はポリクロナール抗体及び抗体断片、ペプチド、酵素、グリコペプチド、オリゴ糖、レクチン、抗体に対する抗原、さらなる結合部位で官能化されたタンパク質（「タグタンパク質」、たとえば「ヒスチジンタグタンパク質」）及び核酸（たとえば DNA、RNA）からなる群の化合物である、請求項 5 4 ~ 7 9 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項 8 1】

個別計測区域に付着される「固定化試料」に含まれかつ測定される分析対象物が、サイ

50

トゾル又は膜結合細胞タンパク質からなる群の化合物、特に細胞におけるシグナル伝達の過程に關与するタンパク質、たとえばキナーゼである、請求項54～79のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項82】

減衰フィールドセンサプラットフォームが、薄い金属層と、任意にはその下に位置する、好ましくは < 1.5 の屈折率の中間層、たとえば二酸化ケイ素又はフッ化マグネシウムとを含み、金属層及び任意に設けられる中間層の厚さが、照射される励起光及び/又は生成されるルミネセンスの波長で表面プラズモンを励起することができるように選択されている、請求項54～81のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項83】

金属が、金及び銀からなる群より選択される、請求項82記載の分析プラットフォーム。

10

【請求項84】

金属層が厚さ $10\text{ nm} \sim 1000\text{ nm}$ 、好ましくは $30\text{ nm} \sim 200\text{ nm}$ である、請求項82記載の分析プラットフォーム。

【請求項85】

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームが、一以上の層を含む光学導波管を含む、請求項54～84のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項86】

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームが、一以上の層を含む平面光学導波管を含み、この導波管が、連続的であるか、個別の導波領域に分割されている、請求項85記載の分析プラットフォーム。

20

【請求項87】

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームが、本質的に光学的に透明な導波層(a)を、層(a)よりも低い屈折率を有する第二の同じく本質的に光学的に透明な層(b)の上に有し、任意には層(a)と(b)との間に、同じく層(a)よりも低い屈折率を有する同じく本質的に光学的に透明な中間層(b)を有する平面光学薄膜導波管を含む、請求項86記載の分析プラットフォーム。

【請求項88】

減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層が1個以上の光学結合要素と光学的に接触して、1個以上の光源からの励起光を前記導波層に内結合することを可能にし、前記光学結合要素が、プリズムカプラと、重複する減衰フィールドを有する光学導波管を連結したものを含む減衰カプラと、導波層の前面(末端)の正面に配設された合焦レンズ、好ましくは円柱レンズを有する前面(バット)カプラと、格子カプラと、からなる群より選択される、請求項54～87のいずれか記載の分析プラットフォーム。

30

【請求項89】

1個以上の格子構造(c)が減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層に設けられて、1個以上の光源からの励起光の内結合を可能にする、請求項88記載の分析プラットフォーム。

【請求項90】

格子構造(c)と類似した又は異なる格子周期及び格子深さを有する格子構造(c)が減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層に設けられて、前記導波層中を誘導された光の外結合を可能にする、請求項54～88のいずれか記載の分析プラットフォーム。

40

【請求項91】

薬学的研究、コンビナトリアルケミストリー、臨床及び臨床前開発におけるスクリーニング法での化学的、生化学的又は生物学的分析対象物の測定のための定量及び/又は定性分析のための、アフィニティスクリーニング及び研究における運動パラメータのリアルタイム結合研究及び測定のための、特にDNA及びRNA分析学のための分析対象物の定性的及び定量的測定ならびにゲノムにおけるゲノム又はプロテオーム差、たとえば単一ヌク

50

レオチド多形の測定のための、タンパク質 - DNA相互作用の計測のための、mRNA発現及びタンパク質(生)合成の制御機構の測定のための、毒性発生研究及び発現プロフィールの決定、特に生物学的及び化学的マーカー化合物、たとえばmRNA、タンパク質、ペプチド又は小分子有機(メッセンジャ)化合物の測定のための、ならびに医薬品研究開発、ヒト及び動物の診断、農薬製品研究開発における抗体、抗原、病原体又はバクテリアの決定のための、症候性及び前症候性植物診断のための、医薬品開発及び治療薬選択における患者層別化のための、特に食品及び環境分析学における病原体、有害薬剤及び細菌、特にサルモネラ、プリオン及びバクテリアの決定のための、請求項1~53のいずれか記載の方法及び/又は請求項54~90のいずれか記載の分析プラットフォームの使用。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、多数の試料を、その中に含まれる、特異的結合反応における結合パートナーとして生物学的に関連する分析対象物に関して分析するための分析プラットフォーム及びそれを用いて実施される、

前記試料又は前記試料の画分を、第一の複数の特異的結合パートナーとしてその中に含まれる、測定される分析対象物とともに、直接又は前記試料もしくは画分のさらなる希釈ののち、強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォーム上の少なくとも一つの一又は二次元の計測区域アレイ中の個別計測区域に付着させ、異なる試料もしくは画分又は試料もしくは画分の異なる希釈物を異なる個別計測区域に配設し、

20

試料に含まれる第一の複数の特異的結合パートナーから1種以上の分析対象物の特異的測定のために、1種以上のトレーサ化合物を、第二の複数の特異的結合パートナーとして、前記個別計測区域に付着された試料又はその画分もしくは希釈物と単一又は多数の特異的結合反応工程で接触させ、

減衰フィールドセンサプラットフォームの減衰フィールド中の個別計測区域において、試料に含まれる分析対象物へのトレーサ化合物の結合から生じる光電子シグナルの変化を横方向分解的に計測し、

対応する計測区域からの前記光電子シグナルの変化の相対量から、特異的に検出される分析対象物の存在を定性的及び/又は定量的に測定する方法に関する。

【0002】

30

このようにして、センサプラットフォームの減衰フィールド中の個別計測区域において、試料に含まれる分析対象物へのトレーサ化合物の結合から生じる光電子シグナルの変化を、たとえば、測定される分析対象物(既知又は未知の濃度及び/又は量)を含む異なる計測区域から同時に計測されるシグナルと、測定される対応する分析対象物を含まない計測区域からのシグナルとの比較から測定することができる。また、前記シグナル変化の測定には、未知の濃度の分析対象物を含む計測区域からのシグナルと、既知の濃度の分析対象物を含む計測区域からのシグナルとを使用することもできる。また、対応するトレーサ化合物が適用され、それが計測区域に含まれる対応する分析対象物に結合する間及びその後で連続的にシグナルを取得する場合には、対応する計測区域からのシグナルの時間変化から、対応するシグナル変化を測定することもできる。

40

【0003】

また、以下(特に本特許出願の請求の範囲に関して)(「ネイチャーアイデンティカル」)試料とは、明示的に断らない限り、常に2種以上、すなわち多数の(「ネイチャーアイデンティカル」)試料をいう。

【0004】

多くの応用分野では、たとえば、個人の健康状態を判定するための診断法においては、又は生物学的に活性な化合物の投与が生物に及びその複雑な機能形態に及ぼす影響を判定するための医薬品研究もしくは開発においては、多数の生物学的に関連する分析対象物を複雑な試料中で測定しなければならない。

【0005】

50

公知の分析分離法は一般に、所与の物理化学的パラメータにしたがって、たとえば分子量又は分子電荷と質量との比にしたがって、所与の試料に含まれる可能な最大数の化合物を可能な最短時間内で分離するように最適化されているが、バイオアフィニティー関連の測定法は、可能な最大の特異性を有する生物学的又は生化学的又は合成認識要素により、複雑な含有物の試料の中の対象となっている対応する（単一の）分析対象物を高い選択性で認識し、それと結合することに基づく。したがって、多くの異なる化合物の測定は、相応に多数の異なる特異的認識要素の適用を要する。

【 0 0 0 6 】

バイオアフィニティー反応に基づく測定法は、均質溶液中で実施することもできるし、強固な支持体の表面で実施することもできる。特定の方法に依存して、分析対象物が認識要素に及び任意にはさらなるトレーサ化合物に結合したのち、また、任意には異なる処理工程の合間に、認識要素と、測定される分析対象物と、試料及び任意に適用されるさらなる指示試薬の残留部分から任意に得られるさらなるトレーサ化合物と、の間で形成した複合体を分離するために、洗浄工程が必要であるかもしれない。

10

【 0 0 0 7 】

今日、強固な支持体上の横方向に分けられた個別計測区域に固定化された認識要素として対応する相補的核酸を使用することにより、試料中の多くの異なる核酸を同時に測定する方法が比較的広く使用されている。たとえば、非常に高いフィーチャ密度（共通の強固な支持体上の計測区域の密度）を有する認識要素として、簡単なガラス又は顕微鏡プレートに基づくオリゴヌクレオチドのアレイが公知である。たとえば、米国特許第 5, 4 4 5, 9 3 4 号（Affymax Technologies）には、1 平方センチメートルあたり 1 0 0 0 個を超えるフィーチャ密度を有するオリゴヌクレオチドのアレイが記載され、特許請求されている。

20

【 0 0 0 8 】

最近、多数のタンパク質の同時測定のための、類似したアレイ及びそれに基づく方法が頻繁に、たとえば米国特許第 6, 3 6 5, 4 1 8 号で記載されている。

【 0 0 0 9 】

核酸及び他のバイオポリマー、たとえばタンパク質の両方を測定するためのこのようないわゆる「マイクロアレイ」の開示は、分析対象物認識のためのアレイを生成するために多数の特異的認識要素を個別計測区域に固定化し、次いで、おそらくは複雑な混合物中に分析対象物を含む分析される試料と接触させる方法を記載している。この公知の開示によると、異なる特異的認識要素をできるだけ純粋な形態で独立した個別計測区域に設けて、一般に異なる分析対象物が異なる認識要素を有する計測区域に結合するようにしている。

30

【 0 0 1 0 】

この種の公知の検定の場合、できるだけ純粋な質で固定化される特異的認識要素を、任意には非常に労を要するものである工程によって富化することが求められる。異なる認識要素はそれらの物理化学的性質（たとえば極性）に関しても多少なりとも異なるため、それらを、任意には付着促進層、吸着又は共有結合を介して共通の支持体上の個別計測区域に最適に固定化するための条件にも相応の違いがある。したがって、多数の異なる認識要素を固定化するために選択される条件（たとえば付着促進層の性質）は、固定化されるすべての認識要素にとって最適であることはほとんどなく、一般には、異なる対象の認識要素の固定化特質の間での妥協である。

40

【 0 0 1 1 】

さらには、この種の検定に伴う欠点は、一定数の試料中の分析対象物を測定する場合に、相応の数の個別アレイを、異なる試料が適用される共通の支持体又は個別の支持体上に設ける必要があるということである。多数の異なる試料の分析の場合、これは、製造が比較的複雑である多数の個別アレイの必要性を暗示する。

【 0 0 1 2 】

適当な解離条件下、固定化されたオリゴヌクレオチドと、試料中に供給される相補的オリゴヌクレオチドと、の間で形成されるハイブリッドを高い効率で解離させ、ひいては認

50

識面を「再生」することができる」と記載されているが、100%の再生を保証することはほとんどできない。タンパク質とのバイオアフィニティー複合体の場合、多くの場合、複合体生成工程は可逆性ではない。すなわち、認識面を再生することはできない。

【0013】

したがって、共通の支持体上の単一のアレイで多数の試料を前記試料に含まれる分析対象物に関して同時に分析することを可能にする改変された検定アーキテクチャが要望されている。このためには、異なる特異的認識要素だけでなく、分析される試料そのものをも、可能ならばさらなる前処理なしで直接又はできるだけ少ない前処理工程ののち、支持体上に固定化することが有用であろう。以下、このタイプの検定アーキテクチャを「逆転検定アーキテクチャ」と呼ぶ。

10

【0014】

米国特許第6,316,267号には、ポリアミノ酸(おそらくは複雑な試料混合物中)をたとえば固体又は「半固体」試料マトリックスに適用する方法が記載されている。しかし、検出工程は、バイオアフィニティー検定で実施されるのではなく、前記開示で例示されている特定の金属錯体を含む試薬の混合物を使用する染色法によって実施されている。これは、明らかに、特異的分析対象物検出の方法ではない。

【0015】

米国特許第6,287,768号には、測定される異なるRNA分子を生物学的試料から単離し、サイズによって分け、強固な支持体に付着させたのち、その上で、たとえば公知の相補的ポリヌクレオチドとハイブリダイゼーションさせることによるハイブリダイゼーション検定で測定する方法が記載されている。この特許の開示によると、生物から単離された測定されるRNA分子は、豊富に存在するならば、直接さらなる測定法に付すことができるが、そうでなければ、公知の増幅法(たとえばポリメラーゼ連鎖反応「PCR」)によって事前に増幅されなければならない。これは、記載された方法では、生成される異なる画分の完全な分析は、さらなる増幅法なしでは不可能であることを意味する。

20

【0016】

この特許で提案されている方法は異なる試料からのRNAを同時に測定する機会を開くが、なおも、多数の入念な試料準備工程を、特に生物学的試料マトリックスからの単離、次いで分子サイズによる試料の分離を要する。RNAの例を参照してしか記載されていない特許請求された方法が、少なくとも、元の試料マトリックスからの単離及びサイズによるバイオポリマーの分離を要するという事実を考慮すると、この分離工程の後及び分析工程の前の相対分子組成が元の試料(たとえば血液又は血清)の相対分子組成と異なるということが予想されなければならない。

30

【0017】

現在最高の技術水準の一部としての上記方法の感度が、試料に含まれる多数の試料を「逆転検定アーキテクチャ」を使用して十分な検出限界で測定するには不十分であるということは明白である。

【0018】

記載したような分析対象物検出とアレイからのシグナルの読み出しとに適用される「トレーサ化合物」(たとえば、特徴的な吸収及び/又はルミネセンスもしくは蛍光を有する放射性同位元素又はクロモフォア)の励起は、従来の光学構造及び検出法に基づく。従来の計測法、たとえば吸収又は蛍光の計測は一般に、試料区画中の試料容積の直接照射に又は液体試料の試料区画の内壁の計測フィールドの直接照射に基づく。このような構造の欠点は、分析対象物測定のためのシグナルが生成される励起容積又は励起区域からシグナルを収集することの他に、周囲環境のかなりの部分が一般に励起光に暴露され、それが、かく乱性のバックグラウンドシグナルの不都合な生成を招きかねないということである。

40

【0019】

より低い検出限界を達成するため、分析対象物の測定が、光学導波管中を誘導される光と対応する減衰フィールドとの相互作用に基づく数多くの計測構造が開発されている。

50

【0020】

光波が、光学的により希薄な媒体、すなわちより低い屈折率の媒体によって包囲された光学導波管の中に結合すると、その光波は、導波層の界面における全反射によって誘導される。このような構造では、電磁エネルギーの一部が低屈折率媒体に浸透する。この一部が減衰フィールドと呼ばれる。減衰フィールドの強度は、導波層そのものの厚さに、及び導波層の屈折率とそれを包囲する媒体の屈折率との比に、非常に大きく依存する。薄い導波管の場合、すなわち、誘導される光の波長と同じ又はそれよりも小さい層厚さの導波管の場合、誘導される光の個別モードを区別することができる。このような方法には、分析対象物との相互作用が隣接媒体中への減衰フィールドの浸透深さ（数百ナノメートルかのオーダー）に限られ、（バルク）媒体の深さからの干渉性シグナルをおおむね避けることができるという利点がある。最初に提案されたこのタイプの計測構造は、厚さ数百マイクロメートルから数ミリメートルまでの高次のマルチモードで自立性の単層導波管に、たとえば透明なプラスチック又はガラスのファイバ又はプレートに基づくものであった。

10

【0021】

感度を改善すると同時に製造を簡素化するために、平面薄膜導波管が提案された。もっとも簡単な場合、平面薄膜導波管は、支持材料（基材）、導波層、スーパストレート（分析される試料）からなる三層系であり、導波層がもっとも高い屈折率を有している。

【0022】

励起光を平面導波管に内結合する方法がいくつか公知である。もっとも初期に使用された方法は、エアギャップから生じる反射を減らすため、一般に液体がプリズムと導波管との間に導入される、バット結合又はプリズム結合に基づくものであった。これら二つの方法は、特に、比較的大きな層厚さの導波管とで、すなわち、特に自立性の導波管及び屈折率が2よりも実質的に小さい導波管とで適している。しかし、励起光を高い屈折率の非常に薄い導波層に内結合するためには、結合格子の使用がそれよりもかなり洗練された方法である。

20

【0023】

光学膜導波管中を誘導される光波の減衰フィールドにおける分析対象物測定の種類の方法を区別することができる。たとえば、使用される計測原理にしたがって、一方で蛍光法又はより一般的なルミネセンス法と、他方には屈折法とに区別することができる。これに関して、表面プラズモン共振の発生のために投射される励起光の共振角が計測される量とみなされるならば、より低い屈折率の誘電層の上の薄い金属層中に表面プラズモン共振を発生させる方法を屈折法の群に含めることができる。また、表面プラズモン共振は、ルミネセンス計測で、ルミネセンスを増幅するために、又はシグナル対バックグラウンド比を改善するために使用することができる。表面プラズモン共振を発生させ、それをルミネセンス計測及び導波構造と組み合わせるための条件は、文献、たとえば米国特許第5,478,755号、第5,841,143号、第5,006,716号及び第4,649,280号に記載されている。

30

【0024】

本出願では、「ルミネセンス」とは、光学的又は非光学的な励起、たとえば電氣的又は化学的又は生化学的又は熱的な励起ののちの、紫外線から赤外線までの範囲の光子の自発的放出をいう。たとえば、ケミルミネセンス、バイオルミネセンス、エレクトロルミネセンス、特に蛍光及びリン光が「ルミネセンス」の下に含まれる。

40

【0025】

屈折計測法の場合、導波管への分子吸着又は導波管からの分子脱着から生じる、いわゆる有効屈折率の変化が分析対象物検出に使用される。この有効屈折率の変化は、格子カプラセンサの場合には、格子カプラセンサへの光の内結合の結合角又は格子カプラセンサからの光の外結合の結合角の変化から測定され、干渉計センサの場合には、干渉計の感知アーム中を誘導される計測光と参照アーム中を誘導される計測光との位相差の変化から測定される。

【0026】

50

前述の屈折法には、さらなるマーカ分子、いわゆる分子標識を使用することなく適用することができるという利点がある。しかし、これらの無標識法の欠点は、より低い計測原理の感度のせいで、これらの方法で達成することができる検出限界が、分析対象物の分子濃度に依存してピコ～ナノモル濃度範囲に限定され、これが、最新の微量分析の多くの用途、たとえば診断用途にとって十分ではないということである。

【0027】

さらに低い検出限界を達成するためには、ルミネセンスベースの方法が、シグナル生成のより高い選択性のおかげで、より適当であると思われる。この構造では、ルミネセンス励起は、より低い屈折率の媒体への減衰フィールドの浸透深さに、すなわち、媒体への浸透深さが数百ナノメートルかのオーダーである場合で、導波区域のすぐ近くに限られる。この原理は減衰ルミネセンス励起と呼ばれる。

10

【0028】

近年、ルミネセンス検出と組み合わせて、透明な支持材上の厚さわずか数百ナノメートルの導波膜に基づく高屈折薄膜導波管によって感度が相当に高められた。たとえばW095/33197には、回折光学要素としてのレリーフ格子によって励起光を導波膜中に結合する方法が記載されている。減衰フィールドの浸透深さ内に位置する、ルミネセンス可能な物質から等方的に発せられるルミネセンスを、適切な計測構造、たとえばフォトダイオード、光電子増倍管又はCCDカメラを使用して計測する。また、減衰的に励起された放射線のうち導波管中に逆結合した部分を、格子のような回折光学要素によって外結合し、計測することができる。この方法は、たとえばW095/33198に記載されている。

20

【0029】

過去数年間、任意には適切に適合された流体素子構造と組み合わせた「マイクロアレイ」のための感知プラットフォームとしての平面薄膜導波管の新たな開発が、たとえば、本出願にすべてを取り込む国際特許出願W000/75644、W000/113096、W000/143875で知られるようになった。W001/79821には、導波管の表面の2光子励起を可能にする薄膜導波構造が記載されている。W001/88511には、屈折計測法に基づく分析対象物測定の方法を提供する格子導波構造及びそれに基づく計測法が記載されている。同じく両開示を本特許出願の一部として取り込む。多数の分析対象物を測定するための生物学的又は生化学的又は合成認識要素が、支持基材上の既知の場所の個別計測区域上に、一以上の計測区域アレイの一部として固定化されるということが上述の各構造に共通である。

30

【0030】

驚くことに今、減衰フィールドセンサプラットフォームの物理化学的パラメータ（たとえば関与する層の厚さ、屈折率）の適切な選択により、減衰フィールドセンサプラットフォーム表面での分子相互作用の検出のために達成可能な感度が、その表面における高い励起光強度及び同時にその強い励起フィールドの、隣接媒体への減衰フィールドの浸透深さへの制限の結果として、多数の試料を、任意には分画ののち及び任意にこれらの試料又はそれらの画分のさらなる希釈ののち、残留試料マトリックスからのそれらの単離又は測定される分析対象物の増幅（量に関して）のさらなる工程なしに、前記画分又は前記画分の希釈物を前記減衰フィールドセンサプラットフォームに直接付着させたのち、その中に含まれる分析対象物に関して分析するのに十分な高さになるということがわかった。したがって、分画又は分離の工程ののち試料の相対的分子組成のさらなる変化を生じさせることなく、試料中の多数の分析対象物を測定することを可能にする「逆転検定アーキテクチャ」を用いる簡単な方法が提供される。

40

【0031】

検査される試料は、たとえば、より多量の細胞から、たとえば遠心分離、ろ過又はレーザー捕捉式顕微解剖によって、事前に選択される1個以上の細胞であることができる（以下をも参照）。

【0032】

以下、明示的に断らない限り、実施される試料準備工程のための（単一の）細胞の呼称

50

は多数の細胞をも指す。同様に、「試料」の命名は、その試料から適当な分離法によって生成された画分をも含むことができる。

【0033】

通常はさらなる分析工程のために必要である第一の準備工程で、細胞を溶解させることができる。溶解産物は、適当な溶媒、たとえば緩衝液に溶解させることができ、その中に含まれるバイオポリマーの消化を防ぐため、公知の添加物、たとえば酵素阻害剤のような安定剤を含有することができる。試料はまた、クロマトグラフィーにおける試料の「スパイキング」と比較しうる、測定される分析対象物に類似した既知の濃度の化合物（標準物質として）を添加物として含有することができる。このような添加物は、たとえば較正のために使用することができる。さらには、「ネイチャーアイデンティカル」試料は、たとえば計測区域に固定化された分析対象物分子の制御された表面密度を確立するために使用することができる、試料マトリックスに、たとえばウシ血清アルブミン（BSA）に類似するが、測定される分析対象物とは異なる化合物の添加物を含有することができる。試料に又はその画分もしくはその希釈物に含まれる分析対象物、すなわち特にバイオポリマー、たとえば核酸又はタンパク質は、天然の組成で存在してもよいし、たとえば尿素又は界面活性剤（たとえばSDS）での処理ののちの変性組成で存在してもよい。

10

【0034】

試料にもしくはその画分に、又は前記試料もしくは画分の希釈物に、含まれる分析対象物、すなわち特にバイオポリマー、たとえば核酸又はタンパク質は、好ましくは、尿素で処理されたのちの変性形態で存在するが、含まれる分析対象物のエピトープは、対応する検出試薬への、たとえば抗体への結合のために自由に接触可能である。これは、尿素での処理による第三級及び第四級構造の破壊によって可能になる。

20

【0035】

驚くことに、本発明の方法の感度は、試料を、任意に実施される分画の前又は後で高度に希釈することさえでき、混合物に含まれる化合物を、任意には非常に低い濃度及び単一の計測区域で利用可能な相応に少ない量にもかかわらず、公知の従来法では不可能である高い精度で測定することができるような感度である。

【0036】

本発明の本質において、分析される試料に含まれる種々の化合物から区別することができる、このために適用される特異的検出試薬とで結合することができる分子種又は化合物を「分析対象物」と呼ぶ。たとえば、適当なトレーサ化合物の結合が、検出される化合物又は種のリン酸化形態に対してだけ起こり、非リン酸化形態に対しては起こらないならば、この定義によると、化合物又は種のこれら二つの形態は2種の異なる分析対象物に相当する。リン酸化化合物又は種が別の検出試薬によって認識され、それと結合するならば、これらの条件下、対応するリン酸化化合物又は種はともに1種の分析対象物である。この定義によると、分析対象物のためのトレーサ化合物としての特異的結合パートナーは、たとえば、検出される化合物のリン酸化又はグリコシル化（又は相応に非リン酸化及び/又は非グリコシル化）形態を排他的に認識し、それに結合するように選択することができる。細胞又は生物中の生物学的シグナル経路の活性は、対応するシグナル経路を制御するリン酸化又はグリコール化化合物（シグナル経路の性質に依存）の画分に相関することができる。以下、対応する化合物の合計量のうちリン酸化形態とグリコール化形態との相対的画分、すなわち、そのリン酸化及びそのグリコール化形態で存在する化合物との量と、この化合物の、リン酸化及び非リン酸化形態又はグリコール化及び非グリコール化形態で存在する合計量との比を、試料中の対応する化合物のリン酸化度及びグリコール化度と呼ぶ。リン酸化度及びグリコール化度をまとめて化合物の「活性化度」と総称する。しかし、化合物の活性化度は、化合物の他の化学的に改変された形態をも意味することができる。

30

40

【0037】

トレーサ化合物としての特異的結合パートナーはまた、検出される化合物が一定の三次元構造で存在するならばその化合物だけに結合するように選択することもできる。たとえば、多くの抗体は、測定される化合物の特異的部分領域（エピトープ）が特殊な三次元構

50

造で提供されている場合、それらの領域だけを認識し、それらに結合する。測定される化合物の構造状態に依存して、これらの部分的領域（エピトープ）は、対応するトレーサ化合物の結合のために接触可能であってもよいし、隠蔽されていてもよい。特異的結合パートナーはまた、検出される化合物の、接触性が対応する化合物の三次元構造から独立している領域だけに結合するように選択してもよい。したがって、適切に選択されたトレーサ化合物の使用により、試料中で検出され、特定の構造状態を示す化合物の合計量の相対量を決定することが可能である。

【0038】

生物学的起源の分子もしくは化合物との、又は合成的に製造されたそれらの類似体との特異的結合反応に関与することが知られるこのような化合物を「生物学的に関連する」と呼ぶ。したがって、「生物学的に関連する」化合物の例は、天然由来のタンパク質、たとえば抗体もしくは受容体又は核酸だけでなく、非常に低い分子量の合成化合物であってもよいそれらの結合パートナー、たとえば抗原でもある。

10

【0039】

本発明の本質においては、空間的に分けられた又は個別の計測区域は、バイオアフィニティー検定における1種以上の試料中の1種以上の分析対象物の測定のための、そこに固定化された結合パートナーによって占有される閉鎖区域によって画定される。これらの区域は、任意の幾何学形状、たとえば円、矩形、三角形、楕円などの形状であることができる。

【0040】

種々のこのような計測区域は、たとえば、異なる試料又は一つの分けられた試料の異なる画分を含むこともできるし、異なる試料の画分を含むこともできるし、画分の種々の異なる希釈物を含むこともできる。画分に分けられた試料の場合、分離は、公知の分離法、たとえば遠心分離、液クロマトグラフィー（LC）、HPLC、薄層クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、毛管電気泳動などによって実施することもできるし、これらの分離法の組み合わせによって実施することもできる。また、個別計測区域に付着させる材料は、たとえば、選択的微視的準備によって、たとえば「レーザキャプチャーマイクロダイセクション」による細胞集合体からの個々の細胞の選択的捕捉によって用意することができる。

20

【0041】

より一般的には、測定される分析対象物を中に有する元の試料は、健常な又は罹患した細胞の抽出物（たとえばヒト、動物、バクテリア又は植物細胞抽出物）と、ヒト又は動物組織、たとえば臓器、皮膚、毛髪もしくは骨組織の抽出物又は植物組織の抽出物と、体液又はその成分、たとえば血液、血清もしくは血漿、滑液、涙液、尿、唾液、組織液、リンパ液と、からなる群より選択することができる。元の試料はまた、特に、刺激（処理）された細胞又は未処理の細胞の抽出物ならびに健常な組織及び罹患した組織の抽出物からなる群より選択することができる。

30

【0042】

したがって、「元の試料」はまた、組織スライシング又はバイオプシー及びレーザキャプチャーマイクロダイセクションの群の方法によって生物又は組織又は細胞集合体又は細胞から採取することができる。

40

【0043】

一般に、いくつかの異なる結合パートナーが一般に一つの計測区域に同時に固定化される。通常、多数の、すなわち数百又は数千の異なる分析対象物が一つの計測区域に固定化される。

【0044】

本発明の第一の主題は、多数の試料を、その中に含まれる、特異的結合反応における結合パートナーとして生物学的に関連する分析対象物に関して分析する方法であって、

前記試料又は前記試料の画分を、第一の複数の特異的結合パートナーとしてその中に含まれる、測定される分析対象物とともに、直接又は前記画分のさらなる希釈ののち、強固

50

な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォーム上の一以上の一又は二次元の計測区域アレイ中の個別計測区域に付着させ、異なる試料もしくは画分又は試料もしくは画分の異なる希釈物を異なる個別計測区域に配設し、

試料又はその画分に含まれる第一の複数の特異的結合パートナーからの1種以上の分析対象物の特異的測定のために、1種以上のトレーサ化合物を、第二の複数の特異的結合パートナーとして、前記個別計測区域に付着された試料又はその画分もしくは希釈物と単一又は多数の特異的結合反応工程で接触させ、

減衰フィールドセンサプラットフォームの減衰フィールド中の個別計測区域において、試料に含まれる分析対象物へのトレーサ化合物の結合から生じる光電子シグナルの変化を横方向分解的に計測し、

対応する計測区域からの前記光電子シグナルの変化の相対的大きさから、特異的に検出される分析対象物の存在を定性的及び/又は定量的に測定する方法である。

【0045】

試料を前記画分に分けるための方法は、遠心分離と、「正常相」、「逆相」、イオン交換又は「疎水性相互作用」クロマトグラフィー(HIC)の方法によるHPLC及びマイクロHPLC(「高圧液クロマトグラフィー」と、サイズ排除クロマトグラフィーと、ゲルクロマトグラフィーと、電気泳動と、毛管電気泳動と、エレクトロクロマトグラフィーと、「フリーフロー電気泳動」などと、からなる方法の群より選択することができる。

【0046】

本発明の方法の感度は、試料又は試料の画分を、強固な支持体としての前記減衰フィールドセンサプラットフォームに付着させる前に、少なくとも10倍に希釈することが可能であるような感度である。分析される試料又は試料の画分を30倍又は100倍に希釈し、それでもなお、このような高度に希釈された試料又はその画分の付着によって生成される単一の計測区域内で多数の分析対象物の定量を達成することが可能である。

【0047】

以下、個別計測区域に付着される試料又はその画分を、及び付着される試料又は試料の画分の希釈物を「固定化試料」の名称でまとめる。

【0048】

任意には分画ののち測定される分析対象物を含有する分析される試料は、健全な又は罹患した細胞の抽出物(たとえばヒト、動物、バクテリア又は植物細胞抽出物)と、ヒト又は動物組織、たとえば臓器、皮膚、毛髪もしくは骨組織の抽出物、又は植物組織の抽出物と、体液又はその成分、たとえば血液、血清もしくは血漿、滑液、涙液、尿、唾液、組織液、リンパ液と、からなる群より選択することができる。

【0049】

トレーサ試薬と接触させるのための分析対象物としての第一の複数の固定化特異的結合パートナーの最適な接触性を提供するためには、計測区域に付着させる「固定化試料」の物質量が、強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォーム上に単分子層を形成するのに必要な物質等に等しい又はそれ未満であるならば、それは有利である。事前に付着される付着促進層(以下に説明する)が方向づけられた固定化につながるならば、たとえば付着される試料に含まれる抗体がそのF₂部分で結合して固定化されて、その特異的結合エピトープの接触性を生じさせるならば、接触性をさらに改善することができる。

【0050】

本発明の方法の高い感度のおかげで、使用される試料の非常に小さな量でさえ高い精度で分析することが可能である。ここでいう試料の量とは、個別計測区域に付着される材料の合計量をいうものと解釈されなければならない。「固定化試料」は、たとえば、細胞20000個未満の材料を含むことができ、それでも高い精度で分析することができる。付着される「固定化試料」は、細胞1000個未満の材料を含むことさえできる。必要な細胞の量は、細胞100個未満の材料又は細胞わずか1~10個の材料を含むことさえでき、それでも確実に分析することができる。また、細胞1個の含有に相当する材料を細胞当

10

20

30

40

50

量と呼ぶ。検出される分析対象物が比較的高い濃度で存在する成分である場合、分析のためにこのような少量の細胞当量の必要性が与えられる。また、「固定化試料」が1 µl未満の量を有することが可能である。付着される「固定化試料」は、10 nl未満又は1 nl未満の量を有することさえできる。

【0051】

本発明の方法は、「固定化試料」に分析対象物として含まれる1種以上の化合物の相対合量を、リン酸化又は非リン酸化形態における、及び/又はグリコール化及び/又は非グリコール化形態におけるそれらの存在の和として測定することを可能にする。分析対象物として「固定化試料」に含まれる1種以上の化合物の相対量が、リン酸化及び/又は非リン酸化形態で、及び/又はグリコール化及び/又は非グリコール化形態でそれらが存在する場合、好ましくは1種以上の前記形態に関して測定されるならば、それは好ましい。

10

【0052】

本発明の方法は、「固定化試料」に含まれる1種以上の分析対象物の先に定義した活性化度を測定することを可能にする。特に、本発明の方法は、「固定化試料」に含まれる1種以上の分析対象物のリン酸化度及び/又はグリコール化度を測定することを可能にする。また、本発明の方法に特徴的であることは、高い感度ならびに高い精度及び再現精度の結果として、特に同時又は交互に適用することができる多数の独立した参照及び較正法の結果として、「固定化試料」に分析対象物としてリン酸化及び/又は非リン酸化及び/又はグリコール化及び/又は非グリコール化形態で含まれる1種以上の化合物の相対量と、1種以上の比較試料に含まれる1種以上の化合物の相対量との20%未満、好ましくは10%未満の差を前記形態の1種以上に関して測定することができるということである。

20

【0053】

固有の方法特定の高い感度ならびに1個の同じ分析プラットフォーム(減衰フィールドセンサプラットフォーム)を使用する参照及び/又は較正の多様な可能性の結果として、この方法で得られる計測結果のばらつきが非常に低いということが本発明の方法の重要な利点である。したがって、本発明の方法は、生物もしくは細胞培養物の疾病によって及び/又は生物もしくは細胞培養物の外部操作によって影響を受ける生物学的に関連する化合物の相対量又は濃度の時間的変化(すなわち変化)を検査するのにも適している。

【0054】

したがって、本発明の方法のもう一つの実施態様に特徴的であることは、前記「ネイチャーアイデンティカル」試料及び1種以上の比較試料が同じ供給源から異なる時期に採取されたものであり、これらの試料に分析対象物として含まれるリン酸化及び/又は非リン酸化形態にある及び/又はグリコール化及び/又は非グリコール化形態にある1種以上の化合物の相対量の時間変化が測定されるということである。ここでいう「同じ供給源」は、同じ生物もしくは類似したタイプの生物又は同じ細胞培養物もしくは類似したタイプの細胞培養物(いずれも、類似した疾病又は異なる期間の操作ののち)をいう。本発明の方法が前記分析対象物の相対濃度及び/又は量における20%未満、好ましくは10%未満の時間変化を測定することを可能にするならば、それは好ましい。

30

【0055】

異なる試料は、同じ生物又は同じ細胞培養物から採取することができる。そして、たとえば、異なる計測区域に付着された試料の相対分子組成の再現精度に関する統計的情報を、これらの計測区域に含まれる、同じ生物(又は類似した生物)に又は同じ細胞培養物(又は類似した細胞培養物)に由来する物質の分析を通じて得ることができる。

40

【0056】

異なる試料は、特に、同じ生物の異なる位置から採取することができる。そして、たとえば、前記試料が採取された生物中で測定される分析対象物の相対分子組成の不均一性に関する情報を、対応する個別計測区域における分析から得ることができる。このような手法は、たとえば、ガン性生物の調査にとって非常に重要である。

【0057】

しかし、異なる試料を異なる生物又は異なる細胞培養物から採取することもできる。た

50

たとえば、試料は、医薬品で処理された生物及び処理されていない生物から採取することができる。そして、試料の相対分子組成に対する当該医薬品の影響を、核酸分析学における発現分析の方法に類似した方法で調査することができる。

【0058】

特異的結合反応において分析対象物測定のために特異的結合パートナーを固定化するもっとも簡単な方法は、たとえば固定化される特異的結合パートナーと強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォームとの間の疎水性相互作用に基づく物理的吸着である。しかし、これらの相互作用の強度は、媒体の組成及びその物理的/化学的性質、たとえば極性及びイオン強度によって顕著に変化することがある。特に、多工程検定で種々の試薬を順次に供給する場合、認識要素の付着は、表面への純粹に吸着的な固定化の後ではしばしば不十分である。したがって、個別計測区域に付着される「固定化試料」の付着又はその希釈物の付着を改善するために、減衰フィールドセンサプラットフォームが付着促進層を含み、その上に試料又はその画分もしくは希釈物が付着されるならば、それは好ましい。

10

【0059】

付着促進層は、厚さが好ましくは200nm未満、特に好ましくは20nm未満である。

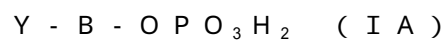
【0060】

種々の材料が付着促進層の生成に適している。たとえば、付着促進層は、シラン、官能化シラン、エポキシド、官能化、荷電又は極性ポリマー及び「自己組織化受動又は官能化単分子又は多分子層」、チオール、リン酸アルキル及びホスホン酸アルキル、多官能価ブロックコポリマー、たとえばポリ(L)リシン/ポリエチレングリコールの群の化合物を含むことができる。

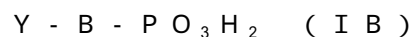
20

【0061】

前記付着促進層はまた、一般式 I (A)



の有機リン酸又は一般式 I (B)



の有機ホスホン酸及びそれらの塩の群の化合物(式中、Bは、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、ヘタリール又はヘタリールアルキル残基であり、Yは、水素又は以下の系、たとえばヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、任意には低級アルキルによって置換されているモノ-もしくはジアルキルアミノ、チオールの官能基又は以下の系、たとえばエステル、ホスフェート、ホスホネート、スルフェート、スルホネート、マレイミド、スクシンイミジル、エポキシ又はアクリレートの負の酸性基である)を含むことができる。これらの化合物は、全体を本開示に取り込む国際特許出願PCT/EP01/10077でさらに詳細に記載されている。

30

【0062】

本発明の方法の特殊な実施態様は、1種以上の「固定化試料」を、強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォームに付着させる前に、任意には開始剤又は化学的架橋剤(たとえばグルタルアルデヒド)の存在で、ポリマー又は重合性モノマーの溶液と混合することを含む(前記強固な支持体への付着を改善し、付着の均一さを改善するため)。方法のこの実施態様は、たとえば、試料液体の蒸発工程中に計測区域内の試料の材料の分布の不均一さの形成を回避させて、より良好な「スポット形態」を生じさせ、ひいては結果の分析を容易にするのを支援することができる。ポリマー、重合性モノマー又は化学的架橋剤の前記溶液が、多糖類、たとえばアガロース又はアクリルアミド又はグルタルアルデヒドなどの溶液からなる群より選択されるならば、それは好ましい。

40

【0063】

また、本発明の方法のこの特殊な変形態様に特徴的であることは、任意には開始剤又は化学的架橋剤(たとえばグルタルアルデヒド)の存在における1種以上の試料とポリマー又は重合性モノマーの溶液との混合物が、特異的結合反応の連続工程でトレーサ試薬が接触することができる試料成分が中に埋め込まれている強固な基材としての減衰フィールド

50

センサプラットフォームへの三次元ネットワーク構造の固定化につながるということである。したがって、単分子層よりも高い減衰フィールドセンサプラットフォームの表面被度を達成することができ、それが、分析対象物検出工程での計測可能なシグナルのさらなる増強につながるができる。ここで、生成されるポリマーネットワーク構造が媒体中への減衰フィールドの浸透深さを超えないということが重要である。理由は、減衰フィールドセンサプラットフォームの表面からこの距離を超えると、分析対象物検出は不可能であるからである。

【 0 0 6 4 】

「固定化試料」は、インクジェットスポッティングと、ピン、ペンもしくは毛管による機械的スポッティング、「マイクロコンタクトプリント」と、試料を平行な又は交差したマイクロチャンネルに供給し、圧力差又は電気もしくは電磁ポテンシャルを加えることによって計測区域と流体素子接触させることと、光化学的又は写真平版固定化法と、からなる方法の群から選択される方法により、個別計測区域で横方向に選択的に、減衰フィールドセンサプラットフォームに直接又はその上に付着された付着促進層に付着させることができる。

10

【 0 0 6 5 】

トレーサ化合物の非特異的結合を最小限にするために個別計測区域の間の領域が「不動態化」される、すなわち、分析対象物に対して及び付着された試料の他の含有物に対してならびに前記分析対象物のためのトレーサ化合物に対して「化学的に中性」（すなわち非結合性）である化合物が、横方向に分けられた計測区域の間に付着されるならば、それは有利である。

20

【 0 0 6 6 】

分析対象物に対して及び付着された「固定化試料」の他の含有物に対してならびに前記分析対象物のためのトレーサ化合物に対して「化学的に中性」（すなわち非結合性）である前記化合物は、アルブミン、特にウシ血清アルブミンもしくはヒト血清アルブミン、カゼイン、非特異的ポリクロナルもしくはモノクロナルの異種もしくは実験的に非特異的な抗体（特にイムノアッセイのために測定される分析対象物の場合）、洗浄剤、たとえば Tween 20、分析されるポリヌクレオチドとでハイブリダイズしない断片化された天然もしくは合成 DNA、たとえばニシンもしくはサケ精子の抽出物又は非荷電であるが親水性のポリマー、たとえばポリエチレングリコールもしくはデキストランからなる群より選択することができる。

30

【 0 0 6 7 】

一般性を失うことなく、個別計測区域に付着される「固定化試料」に含まれかつ測定される分析対象物は、たとえば、タンパク質、たとえばモノクロナル又はポリクロナル抗体及び抗体断片、ペプチド、酵素、グリコペプチド、オリゴ糖、レクチン、抗体に対する抗原、さらなる結合部位で官能化されたタンパク質（「タグタンパク質」、たとえば「ヒスチジンタグタンパク質」）及び核酸（たとえば DNA、RNA）からなる群の化合物であることができる。個別計測区域に付着される試料に含まれかつ測定される分析対象物はまた、サイトゾル又は膜結合細胞タンパク質からなる群の化合物、特に細胞におけるシグナル伝達の過程に関与するタンパク質、たとえばキナーゼであってもよい。分析対象物はまた、生物工学的に改変されたポリマー、たとえば、発光基又は蛍光基を含む生物学的に発現させたバイオポリマー、たとえば「青色蛍光タンパク質」（BFP）、「緑色蛍光タンパク質」（GFP）又は「赤色蛍光タンパク質」（RFP）であってもよい。

40

【 0 0 6 8 】

減衰フィールドセンサプラットフォームの物理的設計に依存して、分析対象物測定におけるシグナル生成の度量衡学的タイプに関していくつかの可能性がある。一つの可能な態様の特徴は、個別計測区域中の「固定化試料」に含まれる分析対象物へのトレーサ化合物の結合の結果として、前記減衰フィールドセンサプラットフォームの一部としての薄い金属層で表面プラズモンを生成するための共振条件の局所変化により、横方向分解的に測定される光電子シグナルの変化が生じるということである。

50

【0069】

計測の技術として、共振条件の変化の測定のために、共振角（一定の波長で照射される光の入射角の変化による）及び共振波長（一定の入射角で照射される励起波長の変化による）を計測することができる。その結果、共振条件の前記変化は、前記減衰フィールドセンサプラットフォームの一部としての薄い金属層で表面プラズモンを生成するための励起光の照射のための共振角の変化によって示すことができる。したがって、共振条件の前記変化はまた、前記減衰フィールドセンサプラットフォームの一部としての薄い金属層で表面プラズモンを生成するための照射励起光の共振波長の変化によって示すことができる。

【0070】

個別計測区域中の試料に含まれる分析対象物へのトレーサ化合物の結合の結果として、前記減衰フィールドセンサプラットフォーム上のこれらの領域の有効屈折率の局所変化により、横方向分解的に測定される光電子シグナルの変化を生じさせることができる。 10

【0071】

本発明の方法のもう一つの重要な実施態様は、個別計測区域中の「固定化試料」に含まれる分析対象物へのトレーサ化合物の結合の結果として、前記減衰フィールドセンサプラットフォームの減衰フィールド内に位置する、ルミネセンス可能な分子からの一以上のルミネセンスの局所変化により、横方向分解的に測定される光電子シグナルの変化を生じさせることを含む。

【0072】

一以上のルミネセンスの前記変化が、個別計測区域に含まれる分析対象物のための1種以上のトレーサ化合物にルミネセンス標識として結合している、ルミネセンス可能な分子又はナノ粒子から生じるならば、それは好ましい。 20

【0073】

異なる発光波長及び/又は異なる励起スペクトルを、好ましくは異なる発光波長及び同一の励起波長を有する2種以上のルミネセンス標識が分析対象物検出に適用されるならば、それは特に有利である。たとえば、異なるスペクトル特性、特に異なる発光波長を有するいくつかのルミネセンス標識が、計測区域と接触させられる第二の複数の特異的結合パートナーの異なる検出試薬に結合されるならば、すなわち、計測区域を前記検出試薬と接触させ、生成されたルミネセンスを同時又は順次に検出すると、異なる分析対象物を一回の検出工程で測定することができる。 30

【0074】

たとえば、本発明の方法のこのような変形態様は、たとえば化合物のリン酸化及び非リン酸化形態を、特に一つの（共通の）計測区域内で、この場合は直接標識されている（たとえば緑色及び赤色発光ルミネセンス標識で）2種の対応する異なる特異的結合パートナーをトレーサ化合物として使用することにより、同時に検出するのに特に適している。

【0075】

同様な方法で、異なる発光減衰時間を有する2種以上のルミネセンス標識が分析対象物検出に適用されるならば、2種以上の分析対象物を同時に検出することができる。

【0076】

したがって、本発明の方法に関して、「固定化試料」中の異なる分析対象物を検出するために2種以上のルミネセンス標識が適用されるならば、それは好ましい。また、計測区域中の異なる分析対象物を検出するために2種以上のルミネセンス標識が適用されるならば、それは好ましい。 40

【0077】

また、励起光が1 fs ~ 10分の間隔のパルスで照射され、計測区域からの発光が時間分解的に計測されるならば、それは利点である。

【0078】

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームは、好ましくは、一以上の層を含む光学導波管を含む。これは、たとえば、いくつかの層を含む光ファイバ導波管であってもよい。しかし、好ましくは、それは、減衰フィールドセンサプラットフォームの 50

連続面として設けられるか、あるいはまた、たとえば、全体を本出願に取り込む特許出願 W O 9 6 / 3 5 9 4 0 に記載されているように、個別の導波領域に分割されていてもよい平面光学導波管である。

【0079】

本発明の方法の特に好ましい実施態様は、本質的に光学的に透明な導波層 (a) を、層 (a) よりも低い屈折率を有する第二の同じく本質的に光学的に透明な層 (b) の上に有し、任意には層 (a) と (b) との間に、同じく層 (a) よりも低い屈折率を有する同じく本質的に光学的に透明な中間層 (b) を有する平面光学薄膜導波管を含む減衰フィールドセンサプラットフォームを強固な基材として含む。

【0080】

1 個以上の光源からの励起光は、プリズムカップラと、重複する減衰フィールドを有する光学導波管を連結したものを有する減衰カップラと、導波層の前面 (末端) の正面に配設された合焦レンズ、好ましくは円柱レンズを有する前面 (バット) カップラと、格子カップラと、からなる群からの 1 個以上の光学内結合要素を使用して、減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層に内結合することができる。

【0081】

減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層への励起光の内結合が、前記導波層中に形成される 1 個以上の格子構造 (c) を使用して実施されるならば、それは好ましい。

【0082】

また、減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層中を誘導された光の外結合が、前記導波層中に形成されかつ格子構造 (c) と類似した又は異なる格子周期及び格子深さを有する 1 個以上の格子構造 (c) を使用して実施されるならば、それは好ましい。

【0083】

本発明の方法の特に好ましい実施態様は、1 個以上の光源からの励起光を、1 個以上の格子構造 (c) を使用して前記減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層に内結合し、誘導波として減衰フィールドセンサプラットフォーム上に位置する計測区域に向けて送り、さらに、前記誘導波の減衰フィールドで発生する、ルミネセンス可能な分子からのルミネセンスを 1 個以上の検出器を使用して局所分解的に計測し、1 種以上の分析対象物の相対濃度をこれらのルミネセンスシグナルの相対強度から測定することを含む。

【0084】

特別な変形態様は、一以上のルミネセンスの測定に加えて、計測区域における有効屈折率の変化を測定することにある。

【0085】

ここで、感度のさらなる改善のために、一以上のルミネセンスの測定及び / 又は励起波長における光シグナルの測定が偏光選択的な計測として実施されるならば、それは有利であることができる。ここで、一以上のルミネセンスが励起光の偏光とは異なる偏光で計測されるならば、それは好ましい。

【0086】

本発明のもう一つの主題は、多数の試料を、その中に含まれる、バイオアフィニティー反応における結合パートナーとして生物学的に関連する分析対象物に関して分析するための分析プラットフォームであって、

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームと、

減衰フィールドセンサプラットフォーム上の、バイオアフィニティー反応で前記分析対象物を測定するための固定化された結合パートナーを有する少なくとも一つの又は二次元の個別計測区域アレイと

を含み、

前記個別計測区域が、測定される分析対象物を第一の複数の特異的結合パートナーとして含有する前記試料又は前記試料の画分を、直接又は前記試料又はその画分のさらなる希釈ののち、付着することによって生成され、

異なる試料もしくは画分が、又は試料もしくはその希釈物の異なる希釈物が、異なる個

10

20

30

40

50

別計測区域に配設され、

第一の複数の特異的結合パートナーを形成する1種以上の固定化結合パートナーが、分析される試料に含まれる1種以上の分析対象物そのものである分析プラットフォームである。

【0087】

この場合、分析され、前記画分に分けられる試料は、遠心分離と、「正常相」、「逆相」、イオン交換又は「疎水性相互作用」クロマトグラフィー(HIC)の方法によるHPLC及びマイクロHPLC(「高圧液クロマトグラフィー」と、サイズ排除クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、電気泳動、毛管電気泳動、エレクトロクロマトグラフィー、「フリーフロー電気泳動」などと、からなる方法の群より選択される方法によって分画されていてもよい。

10

【0088】

前記試料の1種以上は、生物又は組織又は細胞集合体又は細胞から採取し、さらなる希釈なしに前記強固な支持体に直接(すなわち細胞の溶解ののち)付着させることができる。

【0089】

本発明の分析プラットフォームは、試料又は試料の画分を強固な支持体としての前記減衰フィールドセンサプラットフォームに付着させる前に少なくとも10倍に希釈することが可能であるような高い感度を特徴とする。分析される試料又は試料の画分を30倍又は100倍に希釈し、それでもなお、そのような高度に希釈された試料又はその画分の付着によって生成される計測区域中で多数の分析対象物を定量的に測定することが可能である。

20

【0090】

以下、個別計測区域に付着される試料又はその画分を、及び付着される試料又は試料の画分の希釈物を再び「固定化試料」と命名してまとめる。

【0091】

任意には分画ののち測定される分析対象物を中に有する分析される試料は、健全な又は罹患した細胞の抽出物(たとえばヒト、動物、バクテリア又は植物細胞抽出物)と、ヒト又は動物組織、たとえば臓器、皮膚、毛髪もしくは骨組織の抽出物又は植物組織の抽出物と、体液又はその成分、たとえば血液、血清もしくは血漿、滑液、涙液、尿、唾液、組織液、リンパ液と、からなる群より選択することができる。

30

【0092】

特に、検査される試料(「固定化試料」)はまた、刺激(処理)された細胞又は未処理の細胞の抽出物及び健全組織又は患部組織の抽出物からなる群より選択することができる。

【0093】

試料又はその画分もしくは希釈物に含まれる分析対象物、すなわち、特に、バイオポリマー、たとえば核酸及びタンパク質は、天然の組成物として存在することもできるし、たとえば、「元の試料」を尿素又は界面活性剤(たとえばSDS)で処理したのちの変性組成物として存在することもできる。

40

【0094】

「固定化試料」に含まれる分析対象物、すなわち、特に、バイオポリマー、たとえば核酸及びタンパク質は、好ましくは、尿素で処理したのちの変性形態で存在することができる、その中に含まれる分析対象物のエピトープは、対応する検出試薬、たとえば抗体への結合のために自由に接触可能である。これは、尿素での処理による第三級及び第四級構造の破壊によって可能になる。

【0095】

したがって、試料はまた、レーザキャプチャーマイクロダイセクションの他にも、組織スライシング又はバイオプシーの群の方法により、生物又は組織又は細胞集合体又は細胞から採取することができる。

50

【0096】

付着された試料は、細胞20000個未満又は細胞1000個未満の材料を含むことができる。試料はまた、1 μ l未満又は10nl未満の量を有することができる。

【0097】

必要な試料の量は、細胞100個未満の材料を含むことさえでき、それでも確実に分析することができる。これは、検出される分析対象物が比較的高い濃度で存在する成分である場合に当てはまる。

【0098】

異なる付着試料は、同じ生物から採取されたものであってもよい。この場合、試料は、同じ生物の異なる位置から採取されたものであってもよい。

10

【0099】

異なる付着試料はまた、同じ又は類似した細胞培養物から採取されたものであってもよい。

【0100】

異なる付着試料はまた、異なる生物又は異なる細胞培養物から採取されたものであってもよい。

【0101】

個別計測区域に付着される「固定化試料」の付着を改善するために、減衰フィールドセンサプラットフォームが付着促進層を含み、その上に試料又はその画分もしくは希釈物が付着されるならば、それは好ましい。

20

【0102】

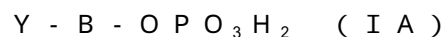
ここで、付着促進層の厚さは、好ましくは200nm未満、特に好ましくは20nm未満である。

【0103】

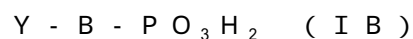
付着促進層は、シラン、官能化シラン、エポキシド、官能化、荷電又は極性ポリマー及び「自己組織化受動又は官能化単分子又は多分子層」、チオール、リン酸アルキル及びホスホン酸アルキル、多官能価ブロックコポリマー、たとえばポリ(L)リシン/ポリエチレングリコールの群の化合物を含むことができる。

【0104】

前記付着促進層が、一般式 I (A)



の有機リン酸又は一般式 I (B)



の有機ホスホン酸及びそれらの塩の群の化合物(式中、Bは、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、ヘタリール又はヘタリールアルキル残基であり、Yは、水素又は以下の系、たとえばヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、任意には低級アルキルによって置換されているモノ-もしくはジアルキルアミノ、チオールの官能基又は系エステル、ホスフェート、ホスホネート、スルフェート、スルホネート、マレイミド、スクシンイミジル、エポキシ又はアクリレートの負の酸性基を意味する)を含むならば、特に有利であることがわかった。

30

40

【0105】

本発明の分析プラットフォームの特殊な実施態様は、1種以上の「固定化試料」が、強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォームに付着される前に、任意には開始剤又は化学的架橋剤(たとえばグルタルアルデヒド)の存在で、ポリマー又は重合性モノマーの溶液と混合される(前記強固な支持体への付着を改善し、付着の均一さを改善するため)ことを含む。方法のこの実施態様は、たとえば、試料液体の蒸発過程中に計測区域内の試料の材料の分布の不均一さの形成を回避させて、より良好な「スポット形態」を生じさせ、ひいては結果の分析を容易にするのを支援することができる。ポリマー、重合性モノマー又は化学的架橋剤の前記溶液が、多糖類、たとえばアガロース又はアクリルアミド又はグルタルアルデヒドなどの溶液からなる群より選択されるならば、それは好ま

50

しい。

【0106】

また、本発明の分析プラットフォームのこのような特殊な実施態様に特徴的であることは、任意には開始剤又は化学的架橋剤（たとえばグルタルアルデヒド）の存在における1種以上の「固定化試料」とポリマー又は重合性モノマーの溶液との混合物が、特異的結合反応の連続工程でトレーサ試薬が接触することができる試料成分が中に埋め込まれている強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームへの三次元ネットワーク構造の固定化につながるということである。したがって、単分子層よりも高い減衰フィールドセンサプラットフォームの表面被度を達成することができ、それが、分析対象物検出工程で計測可能なシグナルのさらなる増強につながるることができる。ここで、生成されるポリマーネットワーク構造は媒体中への減衰フィールドの浸透深さを超えないことは重要である。理由は、減衰フィールドセンサプラットフォームの表面からこの距離を超えると、分析対象物検出は不可能であるからである。

10

【0107】

本発明の分析プラットフォームの有利な実施態様は、アレイが、50個を超える、好ましくは500個を超える、もっとも好ましくは5000個を超える計測区域を含む実施態様である。

【0108】

ここで、各計測区域は、他の計測区域に固定化された試料と類似している又は異なる固定化試料を含むことができる。

20

【0109】

アレイの計測区域は、1平方センチメートルあたり10個を超える、好ましくは100個を超える、もっとも好ましくは1000個を超える密度で配設することができる。

【0110】

本発明の分析プラットフォームのさらなる有利な実施態様は、強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォーム上に設けられた多数の計測区域アレイを含む。特に、少なくとも5個、好ましくは少なくとも50個の計測区域アレイが強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォーム上に設けられる。本発明の分析プラットフォームのこのような実施態様の異なる計測区域アレイが異なる試料区画に設けられるならば、それは特に有利である。たとえば、国際特許出願W000/75644、W000/113096及びW000/143875は、本発明の分析プラットフォームに適した減衰フィールドセンサプラットフォームを、ベースプレートとして、それぞれが計測アレイのアレイを収容するために割り当てられた適当な試料区画アレイを形成するのに適した取り付けボディと組み合わせる方法を記載している。

30

【0111】

本発明の分析プラットフォームのこのような実施態様は、「多次元」と呼ぶことができる実験構造を可能にする。たとえば、アレイの行及び列に、たとえば異なる生物からの異なる試料（たとえば列に対応）を異なる希釈度（たとえば行に対応）で付着させることができる。そして、異なる分析対象物の測定のため、異なる試料区画中の異なる計測区域アレイを異なるアレイ中の異なる第二の複数の特異的結合パートナーと接触させることができる。明らかに、本発明の分析プラットフォームのこのような変形態様は、ほぼ無限数の異なる実験を実施することを可能にする。

40

【0112】

また、トレーサ化合物の非特異的結合を最小限にするために個別計測区域の間の領域が「不動態化」されている、すなわち、分析対象物に対して、及び付着された「固定化試料」の他の含有物に対して、ならびに前記分析対象物のためのトレーサ化合物に対して「化学的に中性」（すなわち非結合性）である化合物が、横方向に分けられた計測区域の間に付着されているならば、それは有利である。

【0113】

分析対象物に対して、及び付着された「固定化試料」の他の含有物に対して、ならびに

50

前記分析対象物のためのトレーサ化合物に対して「化学的に中性」（すなわち非結合性）である前記化合物は、アルブミン、特にウシ血清アルブミンもしくはヒト血清アルブミン、カゼイン、非特異的ポリクロナルもしくはモノクロナルの異種もしくは実験的に非特異的な抗体（特にイムノアッセイのために測定される分析対象物の場合）、洗浄剤、たとえばTween 20、分析されるポリヌクレオチドとでハイブリダイズしない断片化された天然もしくは合成DNA、たとえばニシンもしくはサケ精子の抽出物又は非荷電であるが親水性のポリマー、たとえばポリエチレングリコールもしくはデキストランからなる群より選択することができる。

【0114】

一般性を失うことなく、個別計測区域に付着される「固定化試料」に含まれかつ測定される分析対象物は、タンパク質、たとえばモノクロナル又はポリクロナル抗体及び抗体断片、ペプチド、酵素、グリコペプチド、オリゴ糖、レクチン、抗体に対する抗原、さらなる結合部位で官能化されたタンパク質（「タグタンパク質」、たとえば「ヒスチジンタグタンパク質」）及び核酸（たとえばDNA、RNA）からなる群の化合物であることができる。

10

【0115】

特に、個別計測区域に付着される試料に含まれかつ測定される分析対象物はまた、サイトゾル又は膜結合細胞タンパク質からなる群の化合物、特に細胞におけるシグナル伝達の過程に関与するタンパク質、たとえばキナーゼであってもよい。分析対象物はまた、生物工学的に改変されたポリマー、たとえば、発光基又は蛍光基を含む生物工学的に発現させたバイオポリマー、たとえば「青色蛍光タンパク質」（BFP）、「緑色蛍光タンパク質」（GFP）又は「赤色蛍光タンパク質」（RFP）であってもよい。

20

【0116】

本発明の分析プラットフォームの特殊な変形態様は、分析プラットフォームの一部として、薄い金属層と、任意にはその下に位置する、好ましくは < 1.5 の屈折率の中間層、たとえば二酸化ケイ素又はフッ化マグネシウムとを含む減衰フィールドセンサプラットフォームを含み、金属層の厚さ及び任意に設けられる中間層の厚さは、照射される励起光及び/又は生成されるルミネセンスの波長で表面プラズモンを励起することができるように選択される。

【0117】

ここで、金属が、金及び銀からなる群より選択されるならば、それは好ましい。また、金属層が厚さ $10\text{ nm} \sim 1000\text{ nm}$ 、好ましくは $30\text{ nm} \sim 200\text{ nm}$ であるならば、それは好ましい。

30

【0118】

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームは、好ましくは、一以上の層を含む光学導波管を含む。これは、たとえば、いくつかの層を含む光ファイバ導波管であってもよい。しかし、好ましくは、それは、減衰フィールドセンサプラットフォームの連続面として設けられるか、あるいはまた、たとえば、特許出願W096/35940に記載されているように、個別の導波領域に分割されていてもよい平面光学導波管である。

【0119】

特に好ましいものは、強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームが、本質的に光学的に透明な導波層（a）を、層（a）よりも低い屈折率を有する第二の同じく本質的に光学的に透明な層（b）の上に有し、任意には層（a）と（b）との間に、同じく層（a）よりも低い屈折率を有する同じく本質的に光学的に透明な中間層（b）を有する平面光学薄膜導波管を含む、本発明の分析プラットフォームの実施態様である。

40

【0120】

本発明の分析プラットフォームは、好ましくは、減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層が1個以上の光学結合要素と光学的に接触して、1個以上の光源からの励起光を前記導波層に内結合することを可能にするように設計されており、前記光学結合要素は、プリズムカプラと、重複する減衰フィールドを有する光学導波管を連結したものを含む

50

減衰カプラと、導波層の前面（末端）の正面に配設された合焦レンズ、好ましくは円柱レンズを有する前面（バット）カプラ及び格子カプラからなる群より選択される。

【0121】

格子構造（c）と類似した又は異なる格子周期及び格子深さを有する1個以上の格子構造（c）が減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層に設けられて、前記導波層中を誘導された光の外結合を可能にするならば、それは特に好ましい。

【0122】

本発明の分析プラットフォームとして適している減衰フィールドセンサプラットフォームのさらなる実施態様は、たとえば、全体を本発明に取り込む特許出願WO95/33197、WO95/33198及びWO96/35940に記載されている。

10

【0123】

本発明のさらなる主題は、薬学的研究、コンビナトリアルケミストリー、臨床及び臨床前開発におけるスクリーニング法での化学的、生化学的又は生物学的分析対象物の測定のための定量及び/又は定性分析のための、アフィニティスクリーニング及び研究における運動パラメータのリアルタイム結合研究及び測定のための、特にDNA及びRNA分析学のための分析対象物の定性的及び定量的測定ならびにゲノムにおけるゲノム又はプロテオーム差、たとえば単一ヌクレオチド多形の測定のための、タンパク質-DNA相互作用の計測のための、mRNA発現及びタンパク質（生）合成の制御機構の測定のための、毒性発生研究及び発現プロファイルの決定、特に生物学的及び化学的マーカ化合物、たとえばmRNA、タンパク質、ペプチド又は小分子有機（メッセンジャ）化合物の測定のための、ならびに医薬品研究開発、ヒト及び動物の診断、農薬製品研究開発における抗体、抗原、病原体又はバクテリアの決定のための、症候性及び前症候性植物診断のための、医薬品開発及び治療薬選択における患者層別化のための、特に食品及び環境分析学における病原体、有害薬剤及び細菌、特にサルモネラ、プリオン及びバクテリアの決定のための、本発明の方法及び/又は本発明の分析プラットフォームの使用である。

20

【0124】

以下、適用例によって本発明をさらに説明する。本明細書の実施態様は汎用性の欠失を暗示するものではない。

【0125】

実施例

30

1. 分析プラットフォーム

1.1. 減衰フィールドセンサプラットフォーム

分析プラットフォームとして、減衰フィールドセンサプラットフォームを、幅14mm×長さ57mm×厚さ0.7mmの寸法の強固な支持体として使用した。この減衰フィールドセンサプラットフォームを、ガラス基材（AF45）と、その上に付着された150nmの薄い高屈折五酸化タンタル層と、を含む薄膜導波管として設けた。減衰フィールドセンサプラットフォームの長手と平行に、2枚の表面レリーフ格子をガラス基材中で互いに9mmの距離で変調した（格子周期318nm、格子深さ12±2nm）。光を高屈折層に内結合するための回折格子として働くこれらの構造を、その後の高屈折層の付着の際に、五酸化タンタル層の表面に被着した。

40

【0126】

減衰フィールドセンサプラットフォームを入念に清浄したのち、付着促進層としてのモノドシルホスフェート（DDP）の単分子層を、水溶液（0.5mM DDP）からの沈降により、自発性自己組織化によって金属酸化層の表面に生成した。はじめは親水性であった金属酸化層のこの表面改質により、多数の「ネイチャーアイデンティカル」試料が上に付着される疎水面（水に対して約100°の接触角）を得て、分析対象物を含有する「ネイチャーアイデンティカル」試料を特異的結合反応における分析対象物検出のための特異的結合パートナーとして付着させた。

【0127】

10行×9列に配設された90個の計測区域（スポット）をそれぞれが有する6個の同

50

一のマイクロアレイを、インクジェットスポットタ（モデルBCA1、Perkin Elmer、米マサチューセッツ州ボストン）を使用して、疎水性付着促進層が設けられた減衰フィールドセンサプラットフォームに付着させた。各スポットは、容量280 plの小滴1個をチップ面に付着させることによって生成した。

【0128】

1.2. 試薬及び計測区域アレイの生成

「固定化試料」中の生物学的に関連するタンパク質分析対象物の検出のために、ヒトT細胞培養物（ジャーカット、DMZ#ACC282）を使用した。これらの細胞を、RPMI1640、10%FCS（ウシ胎児血清）、2mMグルタミン、50U/mlペニシリン、50µg/mlストレプトマイシン（細胞密度、約 $0.5 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^6$ 個/ml）を含有する溶液中37℃で培養した。次いで、細胞を、表面受容体に対する抗体、すなわち「マウス抗ヒトCD3」（マウスヒトCD3）及び「マウス抗ヒトCD28」（マウスヒトCD28）それぞれCD3及びCD28（各1µg/ml溶液）とともにインキュベートした（10分間）。上記の細胞培養物と類似するが、抗体で処理していない細胞培養物を比較試料として使用し、分析検出法で陰性コントロールとして使用した。抗体での処理を除いて最初に記載した細胞培養物と類似するさらなる細胞培養物を、強力なプロテアーゼ阻害剤であるスタウロスポリン（濃度10µM）で180分間処理した。

10

【0129】

次いで、上記のように処理した細胞培養物及び未処理の細胞培養物を、それぞれ4℃に冷却し、350Gの遠心力での遠心処理によってペレットに成形した（細胞数約 10^7 個）。ここで、細胞を、損傷することなく、媒体から簡単に分離した。次いで、上澄み液をデカントし、溶解緩衝液（7M尿素、2Mチオ尿素、4%CHAPS、1%DTT、4mMスペルミジン及びComplete（プロテアーゼ阻害剤、Roche社、1錠/50ml））を加え、総タンパク質濃度を約10mg/mlに調節した。これにより、すべてのタンパク質含有細胞成分を自発的かつ完全に変性させ、可溶化した。

20

【0130】

次いで、DNAを含有する材料を13,000Gの遠心処理によって分離した。もう一度10倍に希釈したのち（以下参照）、上澄み液を「固定化試料」として使用した。

【0131】

前述の抗体での処理を、ヒトT細胞の共刺激性活性化のためのモデル系として使用した（M. Diehn et al., "Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation", Proceedings of the National Academy of Sciences 99 (2002) 11796-11801）。細胞膜結合受容体への前記抗体の結合が、影響を受けた細胞内の異なる関連のシグナル経路でのリン酸化カスケードを生じさせた。ここで、本発明の分析プラットフォームを使用して実施される、対応する主要タンパク質（いわゆる「マーカタンパク質」として）又はその基質のリン酸化度の測定により、ある特定のシグナル経路の活性を検出した。

30

【0132】

上記の準備工程によって得られた試料を、再び約1mg/mlの総タンパク質濃度まで10倍希釈したのち、個別計測区域に付着させて、付着促進層が設けられた減衰フィールドセンサプラットフォーム上に計測区域アレイを生成した。

40

【0133】

付着された試料を含む計測区域に加えて、各マイクロアレイは、励起光強度の局所差及び/又は時間変化を参照するために使用される、Cy5で蛍光標識された固定化ウシ血清アルブミン（Cy5-BSA）を含有するさらなる計測（「参照スポット」）を含むものであった。Cy5-BSA（標識レート、BSA分子1個あたりCy5分子3個）は、リン酸緩衝塩化ナトリウム溶液（リン酸緩衝塩水、PBS、pH7.4）中1.0nMの濃度で付着させた。

【0134】

「固定化試料」及びCy5-BSAの付着ののち、分析プラットフォームを周囲温度及

50

び相対湿度100%で2時間貯蔵し、次いで周囲空気中で乾燥させた。次いで、タンパク質でコーティングされていない減衰センサプラットフォーム上の自由な疎水領域を、50 mMイミダゾール/100 mM NaCl (pH 7.4) 中BSA (30 mg/ml) の溶液とで、表面のインキュベーションによってウシ血清アルブミン (BSA) で飽和させた。そして、生成された計測区域を有する減衰フィールドセンサプラットフォームを水洗し、窒素流中で乾燥させ、4 で貯蔵したのち、本発明の検出法を実施した。

【0135】

減衰フィールドセンサプラットフォーム上の、計測区域の典型的な二次元アレイ配設及び原文のまま (同一) アレイの線形配設の形状が図1に示されている (図3A/B及び図4A/Bに関してそれぞれさらに詳細に説明する例の場合)。600 μmの距離 (中心間) で配設されたスポットの直径は約90 μmである。これらの例の場合、計測区域アレイは、5個ずつ複製された8種の異なる付着試料の配設を含み、5個の類似した計測区域が、それぞれ、検出工程中に分析プラットフォームの導波層中を誘導される光の伝搬方向に対して垂直に向く共通の列に設けられている。計測区域アレイ内の計測シグナルの再現精度は5個の類似した計測区域によってそれぞれ決定される。付着されたCy5-BSAを含有する計測区域の列が、分析される付着試料を含有する計測区域の列と列との間にかつそれらの脇に配設されている (参照のため)。この例では、本発明の分析プラットフォームは、図1に示すように、この種の類似した計測区域アレイ6個を含む。

10

【0136】

2. 分析検出法

20

2.1. 検定アーキテクチャ

個別計測区域に付着された「固定化試料」としての固定化細胞溶解産物中の通常の形態 (すなわち、たとえばリン酸化されている又はされていない) の特定のタンパク質及び/又は特に活性化 (たとえばリン酸化) された形態の特定のタンパク質の検出を、対応する検出試薬を検定工程として順次に適用することによって実施したのち、得られた蛍光シグナルを計測した。第一の検定工程の準備として、ポリクロナール分析対象物特異的ウサギ抗体 (抗体A1 (#2261) : ホスホ (Ser) PKC基質、抗体A2 (#9611) : ホスホ (Ser/Thr) Akt基質、抗体A3 (#9101) : ホスホp44/42 MAPキナーゼ (Thr202/Tyr204)、抗体A4 (#9102) : p44/42 MAPキナーゼ (Thr202/Tyr204) (すべての抗体は、Cell Signaling Technology社、米マサチューセッツ州Beverlyから得た) を通常、検定緩衝液 (50 mMイミダゾール、100 mM NaCl、0.1% BSA、0.05% Tween 20、pH 7.4) 中に1:500の比に希釈した。これら4種の異なる抗体溶液それぞれ30 μlを計測区域の6個の同一アレイの1個に適用したのち、周囲温度で一夜インキュベートした (第一検定工程)。各アレイを検定緩衝液で洗浄することにより (5 × 100 μl)、特異的に結合していない過剰な抗体を除去した。

30

【0137】

この検定に使用した4種の異なる抗体は基本的に性質が異なるものであった。抗体A1及びA2は、セリン又はセリン/トレオニンでリン酸化されている異なるタンパク質を認識し、それに結合し、それぞれこれらのタンパク質キナーゼは基質として働く。これは、ウェスタンブロットの多数のバンドから認めることができる (図2A及び「2.4. 結果」)。抗体A3及びA4は、同じ種の化合物、すなわちp44/42 MAPキナーゼ (Erk2とも呼ぶ) を認識し、それに結合するが、抗体A3はそのリン酸化「活性化」形態 (pErk2) だけを認識し、抗体A4は、両形態 (非リン酸化形態Erk2及びリン酸化形態pErk2) を認識し、それらに結合する。

40

【0138】

第二の検定工程は、前述の抗体A1~A4すべてに結合するCy5標識抗ウサギ抗体 (Amersham Biosciences、スイスDubendorf) を使用して、固定化試料を含む個別計測区域に含まれる結合した分析対象物特異的抗体の検出のために実施した。このCy5標識抗体を、通常は検定緩衝液中10 nMの濃度でアレイに適用し (各30 μl)、次いで、周囲温

50

度の暗所で2時間インキュベートした。次いで、アレイを検定緩衝液で洗浄して(100 μ lずつで5回)特異的に結合していないCy5抗ウサギ抗体を除去した。そして、このようにして準備した分析プラットフォームを貯蔵したのち、励起によって検出工程を実施し、得られた蛍光シグナルをZeptoREADER(商標)を使用して検出した(以下参照)。

【0139】

2.2. 計測区域アレイからの蛍光シグナルの検出

異なる計測区域アレイからの蛍光シグナルを、ZeptoREADER(商標)(Zeptosens社、Benkenstrasse 254, CH-4108 Witterswil)を使用する自動連続計測に付した。計測区域アレイごとに、本発明の分析プラットフォームを、光を五酸化タンタル導波層に内結合し、計測区域で利用可能な励起光を最大にするための共振条件とのマッチングに関して調節した。次いで、アレイごとに、対応するアレイからの蛍光シグナルのイメージを生成し、異なる露光時間及び生成するイメージの数を選択した。本例の計測の場合、励起波長は633 nmであり、Cy5の蛍光波長における蛍光の検出は、冷却したカメラと、カメラのレンズの正面に配置した、散乱光を抑制するための干渉フィルタ(透過670 \pm 20 nm)とを使用して実施した。生成された蛍光イメージを制御コンピュータのディスクに自動的に保存した。光学システム(ZeptoREADER(商標))のさらなる詳細は、全体を本出願に取り込む国際特許出願PCT/EP01/10012に記載されている。

10

【0140】

2.3. 評価及び参照

多数の計測区域アレイからの蛍光イメージの半自動分析を可能にするイメージ解析ソフトウェア(ZeptoVIEW、Zeptosens社、CH-4108 Witterswil)を使用して、計測区域(スポット)からのシグナルの平均強度を測定した。

20

【0141】

カメラの個々のピクセルからの未加工データは、センサプラットフォーム上の画像化区域に対応する、デジタル化計測データの二次元マトリックスに対応した。データ分析のために、まず、二次元座標格子を手作業でイメージ点(ピクセル)に重畳して、各スポットのイメージ画分が個々の二次元グリッド要素に含まれるようにした。この格子要素の中で、ユーザ指定可能な半径(通常は90 μ m)を有する調節可能な円形の「対象区域」(AOI)を各スポットに割り当てた。異なるAOIの場所は、イメージ解析ソフトウェアによるピクセルのシグナル強度の関数として個々に決定した。ユーザがはじめに指定したAOIの半径は保存される。選択した分析区域内のピクセル値(シグナル強度)の算術平均をスポットごとの平均総シグナル強度として測定した。

30

【0142】

スポット間で計測されたシグナル強度からバックグラウンドシグナルを測定した。このために、4個のさらなる円形区域(通常はスポットの分析区域と同じ半径を有する)を、好ましくは隣接するスポット間の中心に位置する、スポットごとのバックグラウンドシグナル測定のための分析区域として画定した。平均バックグラウンドシグナル強度は、たとえば、4個の円形区域ごとの画定されたAOI内のピクセル値(シグナル強度)の算術平均として測定した。そして、計測区域(スポット)からの平均正味シグナル強度を、対応するスポットの、平均局所総シグナル強度とバックグラウンドシグナル強度との差として計算した。

40

【0143】

すべてのスポットの正味シグナル強度の参照を各計測区域アレイの参照スポット(Cy5-BSA)によって実施した。このために、各スポットの正味シグナル強度を、同じ行の計測区域(減衰フィールドセンサプラットフォーム中を誘導される光の伝搬方向と平行に配設)内の隣接する参照スポットの正味シグナル強度の平均値によって割った。この参照法は、各マイクロアレイ内及び異なるマイクロアレイ間の両方で、光伝搬方向に対して垂直な方向で利用可能な励起光強度の局所差を補償する。

【0144】

2.4. 結果

50

本発明の分析プラットフォームを使用して本発明の方法によって得られた結果が図 2 に示されている。棒グラフは、比較のため、表面受容体に対する抗体 CD 2 3 (「CD 3」) 及び CD 2 8 (「CD 2 8」) で処理された細胞培養物を用いて得られた結果 (塗りつぶした棒) と、未処理の培養物 (「陰性コントロール」) を用いて得られた結果とを示す。それらから生成された「ネイチャーアイデンティカル」試料それぞれを、上記のように減衰フィールドセンサプラットフォーム上の 6 個の類似した計測区域アレイに付着させたのち、異なる抗体 A 1 ~ A 4 の溶液と接触させた。前述の 4 種の抗体 A 1 ~ A 4 の 1 種をそれぞれが含有する異なる溶液を、共通の減衰フィールドセンサプラットフォーム上の異なる試料区画に配設された 4 個の類似したアレイに適用したのち、2 . 1 で記載したように Cy 5 標識抗ウサギ抗体を加えた。各場合に、上記方法にしたがって参照され、アレイ内の 5 個の類似した計測区域から導出されたシグナル強度の平均値がその標準偏差とともに図 2 に示されている。

10

【0145】

得られたシグナル強度は、考慮した特定の分析対象物の濃度と相関していた (高いシグナル強度が高い濃度に対応)。表面受容体に対する抗体 CD 3 (「CD 3」) 及び CD 2 8 (「CD 2 8」) でジャーカット細胞培養物を処理 (「刺激」) した結果、ホスホ (Ser) PKC 基質及びホスホ (Ser / Thre) Akt 基質の相対細胞内濃度が、いずれも陰性コントロールと比較して、どちらの場合も当初値のほぼ 2 倍に増したということがはっきりと見てとれる。pErk 2 の濃度はそれよりも大きく、すなわち 5 倍に増したが、Erk 2 の含量及び pErk 2 の含量 (抗体 A 4 を使用して検出) の和は、計測の精度の範囲内で一定のままであった。この観察は、Erk 2 の全含量が 10 分の刺激期間内での発現の増加によっては増大せず、pErk 2 の含量だけがリン酸化によって増大したことを示す。

20

【0146】

計測区域に付着された試料中、すなわち個々の計測区域に固定化されたプロテオーム中の個々の対象「マーカタンパク質」を検出する場合の本発明の方法の感度を評価するため、事前に実施した検定の結果 (図 2 に示す結果) によるとごく少量の pErk 2 (図 2 の三番目の棒の対) しか含有しないことが明白である未処理の細胞溶解産物 (陰性コントロール) を個々のアリコート溶液に分割し、それに対してこの「マーカタンパク質」を異なる濃度 (0 ~ 3645 ng/ml) で加えた。そして、これらの溶液を前記のように平面導波管チップ上に固定化し、2 . 1 で記載した検定を実施した (抗体 A 3 を使用)。

30

【0147】

計測区域アレイからのシグナルの典型的な分布が図 3 A に示され、マーキングされた長方形が、所定濃度の pErk 2 を加えた未処理の細胞溶解産物に関して 5 個の複製スポットを常に示す (濃度 1 . 8 倍増、図 1 に示す幾何学的配設)。

【0148】

pErk 2 をその添加濃度の関数として検出するためのこの計測の結果は、ヒル関数を濃度依存性シグナル値に当てはめることにより、典型的な結合曲線によって記述することができる (図 3 B)。図 3 B 中の各データ点は、5 個の複製分析対象物スポットからの参照された正味シグナル強度の平均値を、エラーバーによって表される標準偏差とともに表す。図 3 B の拡大挿入部は、値の増大が全濃度範囲の図形表示では分解不可能である、低い濃度でのシグナルの濃度依存性を示す。「0 値」 (「ブランク」、すなわち pErk 2 を加えていない試料) のシグナルとその 2 倍標準偏差との和に基づき、1 g 総タンパク質中 2.3×10^{-6} g の pErk 2 重量分率に相当する 2 . 0 ng/ml の値を検定の感度 (検出限界) として測定した。

40

【0149】

図 4 A 及び 4 B は、第二の検定と本質的に類似する第三の検定の結果を示す。結果が図 3 A 及び 3 B に示されている上記第二の検定とは対照的に、この第三の検定は、2 . 1 に記載したように、抗体 A 4 を使用して (すなわち、第二の検定に使用したアレイと類似したアレイにこの抗体を適用して) 実施した。したがって、異なる pErk 2 添加量に対応

50

する、この化合物のリン酸化形態及び非リン酸化形態 (p E r k 2 及び E r k 2) の合計量をこの検定で測定した。計測区域アレイからのシグナルの典型的な分布が図 4 A に示され、マーキングされた長方形それぞれが、所定濃度の p E r k 2 を加えた未処理の細胞溶解産物に関して 5 個の複製スポットを表している (濃度 1 . 8 倍増、図 1 に示す幾何学的配設) 。この場合、1 g 総タンパク質中 $1 . 1 \times 10^{-4}$ g の p E r k 2 重量分率に相当する 1 2 0 ng/ml の検定感度 (検出限界) を測定した。

【 0 1 5 0 】

さらに、異なる長さの刺激期間中の C D 3 / C D 2 8 によるジャーカット細胞の共刺激から生じる p E r k 2 濃度の異なる変化を測定することができるかどうか、また、これらの変化の差を本発明の方法によって分解することができるかどうかを決定するため、第四の実験を実施した。このために、いずれの場合も、ジャーカット細胞培養物を 1 μ g/ml C D 3 / C D 2 8 とともに異なる長さの期間 (分単位) インキュベートしたのち溶解させた。さらに、一つのジャーカット細胞培養物をスタウロスポリン (タンパク質キナーゼ阻害剤) で処理した。最後に述べた細胞培養物は、すべてのタンパク質キナーゼの阻害のせいでこの試料中には p E r k 2 が存在しないはずであったため、陰性コントロールとして使用した。したがって、この試料に関して計測されたシグナルは、p E r k 2 を含まない試料からのシグナルに相当する。次いで、上記のように処理した細胞溶解産物を減衰フィールドセンサプラットフォーム上にスポットティングし、抗体 A 3 を使用して 2 . 1 に記載したような検定を実施して p E r k 2 の濃度の変化を測定した。

【 0 1 5 1 】

この計測の結果が図 5 A に示されている。このグラフに示す各棒は、5 個の複製分析対象物スポットからの正味シグナル強度の参照平均値を、対応する標準偏差とともに表す。抗体 A > 3 を使用して検出された p E r k 2 濃度の変化を容易に分解することができることははっきりと見てとれる。時間経過依存性、すなわち、刺激期間の長さに対する依存性は、p E r k 2 濃度が急激に上昇して約 1 0 分後に濃度最大値に達したのち、6 0 分の刺激期間ののち初期濃度のレベルまで低下することを特徴としている。非刺激コントロール試料からのシグナルは、スタウロスポリンで処理された試料からのシグナルよりわずかに高いだけであり、その差は、刺激なしでの p E r k 2 の自然な含有を表している。

【 0 1 5 2 】

コントロール計測として、先に記載した方法と同様にして、ただし抗体 A 3 ではなく抗体 A 4 を使用して検定及び検出法を実施して、対応するリン酸化及び非リン酸化タンパク質形態の合計量、すなわち E r k 2 / p E r k 2 の相対合計含量を測定した。この実験は、6 0 分までの異なる刺激期間では大きなシグナル差を示さない、すなわち濃度の変化を示さず、また、実験精度の範囲内では、未処理のコントロール試料及びスタウロスポリンで処理された試料との比較でも差を示さなかった (図 5 B) 。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 5 3 】

【 図 1 】本発明の減衰フィールドセンサプラットフォーム上の、計測区域の典型的な二次元アレイ配設及びアレイの線形配設の形状を示す図である。

【 図 2 】本発明の分析プラットフォームを使用して本発明の方法によって得られた結果を示す図である。

【 図 3 A 】計測区域アレイからのシグナルの典型的な分布を示す図である。

【 図 3 B 】 p E r k 2 をその添加濃度の関数として検出するための計測の結果を示す図である。

【 図 4 A 】計測区域アレイからのシグナルの典型的な分布を示す図である。

【 図 4 B 】 p E r k 2 をその添加濃度の関数として検出するための計測の結果を示す図である。

【 図 5 A 】細胞溶解産物を減衰フィールドセンサプラットフォーム上にスポットティングし、抗体 A 3 を使用して検定を実施し、p E r k 2 の濃度の変化を測定した結果を示す図である。

10

20

30

40

50

【図5B】抗体A4を使用して検定を実施し、Erk2/pErk2の相対合計含量を測定した結果を示す図である。

【図1】

Fig. 1:

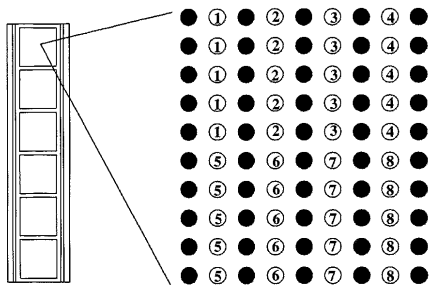
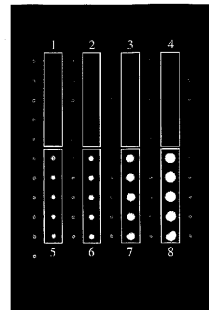


Fig. 3A:



【図2】

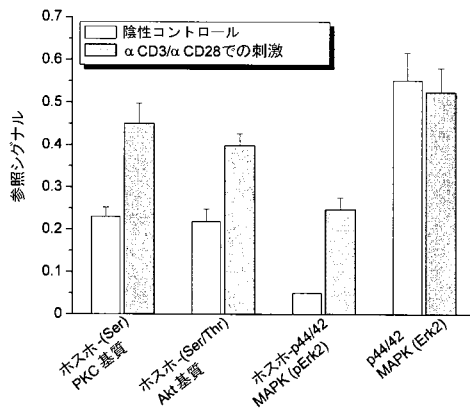
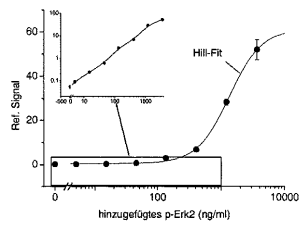


Fig. 3B:



【 図 3 B 】

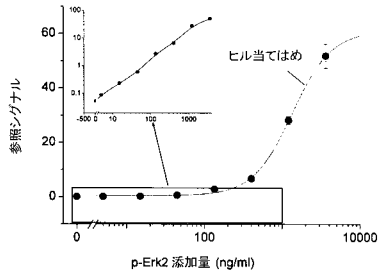


Fig. 4A:

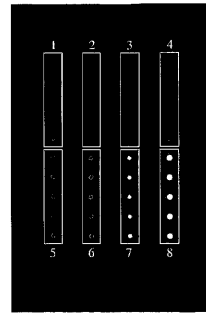
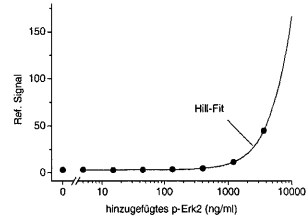
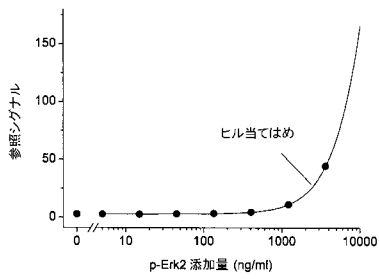


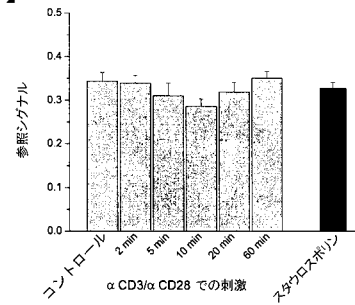
Fig. 4B



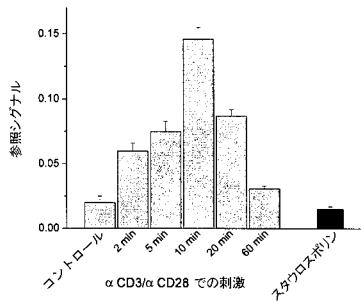
【 図 4 B 】



【 図 5 B 】



【 図 5 A 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 03/09562
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/543 G01N21/77		
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 G01N		
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, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO 03/020488 A (BOPP MARTIN A ; GMUER MAX (CH); CALLENBACH TILO (CH); EHRAT MARKUS) 13 March 2003 (2003-03-13) claims 69-97	1-91
A	WO 02/46756 A (ABEL ANDREAS P ; ZEPTOSENS AG (CH); SCHUERMAN MADER EVELINE (CH)) 13 June 2002 (2002-06-13) claims	1-91
A	WO 02/20873 A (TEXTOR MARCUS ; EHRAT MARKUS (CH); HOFER ROLF (CH); TOSATTI SAMUELE) 14 March 2002 (2002-03-14) cited in the application claims figures 1,2	1-91

	-/--	
<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 citation 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		"I" 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. "A" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 20 April 2004		Date of mailing of the international search report 17 MAR 2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Routledge, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/09562

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/92870 A (BOPP MARTIN A ;ABEL ANDREAS P (CH); EHRAT MARKUS (CH); ZEPTOSENS A) 6 December 2001 (2001-12-06) claims page 27, paragraph 1 ---	1-91
A	WO 98/21571 A (BINDER ANDRES ;CIBA GEIGY AG (CH); EHRAT MARKUS (CH); OROSZLAN PET) 22 May 1998 (1998-05-22) claims figure 5A page 22 ---	1-91
A	WO 96/35940 A (CIBA GEIGY AG ;BUDACH WOLFGANG (CH); NEUSCHAEFER DIETER (CH); PAWL) 14 November 1996 (1996-11-14) cited in the application claims figure 4 ---	1-91
A	WO 95/33197 A (CIBA GEIGY AG ;DUVENECK GERT L (DE); NEUSCHAEFER DIETER (CH); EHRA) 7 December 1995 (1995-12-07) claims 1,10,11,17-21 ---	1-91
A	PAWLAK M ET AL: "Functional immobilization of biomembrane fragments on planar waveguides for the investigation of side-directed ligand binding by surface-confined fluorescence." FARADAY DISCUSSIONS. ENGLAND 1998, no. 111, 1998, pages 273-288;discussion 331-- 343, XP001156169 ISSN: 1359-6640 figures 1,3 abstract ---	1-91
A	PAWLAK M ET AL: "ZEPTOSENS' PROTEIN MICROARRAYS: A NOVEL HIGH PERFORMANCE MICROARRAY PLATFORM FOR LOW ABUNDANCE PROTEIN ANALYSIS" PROTEOMICS, XX, XX, vol. 2, no. 4, April 2002 (2002-04), pages 383-393, XP009021061 the whole document -----	1-91

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/09562

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. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.: 1-91
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:

see supplementary sheet
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(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:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. 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. 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

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/09562

Continuation of I.2

Claims: 1-91

The current claims 1-91 relate to a disproportionately large number of possible devices and methods, of which only a small portion are supported by the description (PCT Article 6) and/or can be regarded as having been disclosed in the application (PCT Article 5). In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought.

Moreover, the search initially yielded a very large number of documents detrimental to novelty. This number is so large that it becomes impossible to determine a subject matter in any of the claims for which protection might justifiably be sought (PCT Article 6). For these reasons a meaningful search covering the full scope of the claims appears impossible.

Therefore, the search was directed to the parts of the claims that appear to be supported and disclosed in the above sense, that is the subject matter of claims 21 and 67 (method as described in claim 1 and platform that uses an adhesive layer as described in claim 54).

The last nine documents in the search report are detrimental to novelty as regards the general concept of "use of an evanescent field sensor platform to identify a large number of analytes bound to specific binding partners in samples".

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 03/09562

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03020488	A	13-03-2003	WO 03020488 A1	13-03-2003
WO 0246756	A	13-06-2002	AU 1699702 A WO 0246756 A1	18-06-2002 13-06-2002
WO 0220873	A	14-03-2002	AU 8985901 A WO 0220873 A2 EP 1315968 A2 US 2003186914 A1	22-03-2002 14-03-2002 04-06-2003 02-10-2003
WO 0192870	A	06-12-2001	AU 7406801 A WO 0192870 A2 EP 1287360 A2 US 2003148542 A1	11-12-2001 06-12-2001 05-03-2003 07-08-2003
WO 9821571	A	22-05-1998	AU 5479998 A BR 9712934 A CA 2270665 A1 WO 9821571 A1 EP 1021708 A1 JP 2001504219 T US 2003104390 A1	03-06-1998 28-03-2000 22-05-1998 22-05-1998 26-07-2000 27-03-2001 05-06-2003
WO 9635940	A	14-11-1996	AU 5763296 A BR 9608503 A CA 2219769 A1 WO 9635940 A1 EP 0824684 A1 JP 11505610 T PL 323257 A1 US 6289144 B1 US 6078705 A ZA 9603731 A	29-11-1996 06-07-1999 14-11-1996 14-11-1996 25-02-1998 21-05-1999 16-03-1998 11-09-2001 20-06-2000 12-11-1996
WO 9533197	A	07-12-1995	AT 172300 T AT 216491 T AU 2317995 A AU 689604 B2 AU 2734695 A CA 2190362 A1 CA 2190643 A1 CN 1149335 A CN 1149336 A CZ 9603471 A3 CZ 9603472 A3 DE 69505370 D1 DE 69505370 T2 DE 69526438 D1 DE 69526438 T2 DK 760944 T3 WO 9533197 A1 EP 0759159 A1 EP 0760944 A1 ES 2174948 T3 FI 964664 A FI 964684 A HU 76407 A2 HU 76406 A2	15-10-1998 15-05-2002 21-12-1995 02-04-1998 21-12-1995 07-12-1995 07-12-1995 07-05-1997 07-05-1997 11-06-1997 12-03-1997 19-11-1998 01-04-1999 23-05-2002 31-10-2002 05-08-2002 07-12-1995 26-02-1997 12-03-1997 16-11-2002 24-01-1997 27-01-1997 28-08-1997 28-08-1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 03/09562

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9533197	A	WO 9533198 A1	07-12-1995
		JP 10501616 T	10-02-1998
		JP 10501617 T	10-02-1998
		PL 317379 A1	01-04-1997
		PL 317402 A1	14-04-1997
		SK 151296 A3	09-07-1997
		SK 151396 A3	09-07-1997
		US 5959292 A	28-09-1999
		US 5822472 A	13-10-1998
		ZA 9504325 A	27-11-1995
		ZA 9504327 A	27-11-1995

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/09562

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSBEGRIFFES IPK 7 G01N35/543 G01N21/77		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RESEARCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfstoß (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoß gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der (n Betracht kommenden Teile	Bez. Anspruch Nr.
P.A	WO 03/020488 A (BOPP MARTIN A ;GMUER MAX (CH); CALLENBACH TILO (CH); EHRAT MARKUS) 13. März 2003 (2003-03-13) Ansprüche 69-97	1-91
A	WO 02/46756 A (ABEL ANDREAS P ;ZEPTOSENS AG (CH); SCHIERMANN MADER EVELINE (CH)) 13. Juni 2002 (2002-06-13) Ansprüche	1-91
A	WO 02/20873 A (TEXTOR MARCUS ;EHRAT MARKUS (CH); HOFER ROLF (CH); TOSATTI SAMUELE) 14. März 2002 (2002-03-14) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche Abbildungen 1,2	1-91
	----- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/>	Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :		
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist		
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist		
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zu widerlegen oder zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausführt)		
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht		
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist		
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden		
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist		
"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
20. April 2004	17 MAR 2004	
Name und Postanschrift der internationalen Rechercherbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Beauftragter Routledge, B	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internationales Aktenzeichen
 PCT/EP 03/09562

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Behr. Anspruch Nr.
A	WO 01/92870 A (BOPP MARTIN A ;ABEL ANDREAS P (CH); EHRAT MARKUS (CH); ZEPTOSENS A) 6. Dezember 2001 (2001-12-06) Ansprüche Seite 27, Absatz 1 -----	1-91
A	WO 98/21571 A (BINDER ANDRES ;CIBA GEIGY AG (CH); EHRAT MARKUS (CH); OROSZLAN PET) 22. Mai 1998 (1998-05-22) Ansprüche Abbildung 5A Seite 22 -----	1-91
A	WO 96/35940 A (CIBA GEIGY AG ;BUDACH WOLFGANG (CH); NEUSCHAEFER DIETER (CH); PAWL) 14. November 1996 (1996-11-14) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche Abbildung 4 -----	1-91
A	WO 95/33197 A (CIBA GEIGY AG ;DUVENECK GERT L (DE); NEUSCHAEFER DIETER (CH); EHRA) 7. Dezember 1995 (1995-12-07) Ansprüche 1,10,11,17-21 -----	1-91
A	PAWLAK M ET AL: "Functional immobilization of biomembrane fragments on planar waveguides for the investigation of side-directed ligand binding by surface-confined fluorescence." FARADAY DISCUSSIONS. ENGLAND 1998, Nr. 111, 1998, Seiten 273-288;discussion 331 - 343, XP001156169 ISSN: 1359-6640 Abbildungen 1,3 Zusammenfassung -----	1-91
A	PAWLAK M ET AL: "ZEPTOSENS' PROTEIN MICROARRAYS: A NOVEL HIGH PERFORMANCE MICROARRAY PLATFORM FOR LOW ABUNDANCE PROTEIN ANALYSIS" PROTEOMICS, XX, XX, Bd. 2, Nr. 4, April 2002 (2002-04), Seiten 383-393, XP009021061 das ganze Dokument -----	1-91

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/09562

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. Ansprüche Nr. 1-91
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03 09562

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-91

Die geltenden Patentansprüche 1-91 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Vorrichtungen und Verfahren, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder als im Sinne von Art.5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint.

Außerdem ergab die Recherche in ihrer Anfangsphase eine sehr große Zahl neuheitsschädlicher Dokumente. Diese Zahl ist so groß, daß sich unmöglich feststellen läßt, für welchen Gegenstand in der Gesamtheit der Patentansprüche Schutz begehrt werden könnte (Art. 6 PCT). Aus diesen Gründen erscheint eine sinnvolle Recherche über den gesamten Bereich der Patentansprüche unmöglich.

Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich den Gegenstand der Ansprüche 21 und 67 (Verfahren, wie in Anspruch 1 beschrieben, oder Plattform; die eine Haftvermittlungsschicht verwendet, wie in Anspruch 54 beschrieben ist,).

Die letzten neun Dokumente auf dem Recherchebericht sind neuheitsschädlich für die allgemeinen Idee "Verwendung von einer Eveneszentfeld-Sensorplattform, um eine Vielzahl von mit spezifischen Bindungspartnern gebunden Analyten in Proben zu bestimmen."

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchebericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Rechercheberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/09562

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 03020488	A	13-03-2003	WO 03020488 A1	13-03-2003
			EP 1420929 A1	26-05-2004
WO 0246756	A	13-06-2002	AU 1699702 A	18-06-2002
			WO 0246756 A1	13-06-2002
WO 0220873	A	14-03-2002	AU 8985901 A	22-03-2002
			WO 0220873 A2	14-03-2002
			EP 1315968 A2	04-06-2003
			US 2003186914 A1	02-10-2003
WO 0192870	A	06-12-2001	AU 7406801 A	11-12-2001
			WO 0192870 A2	06-12-2001
			EP 1287360 A2	05-03-2003
			JP 2004510130 T	02-04-2004
			US 2003148542 A1	07-08-2003
WO 9821571	A	22-05-1998	AU 5479998 A	03-06-1998
			BR 9712934 A	28-03-2000
			CA 2270665 A1	22-05-1998
			WO 9821571 A1	22-05-1998
			EP 1021708 A1	26-07-2000
			JP 2001504219 T	27-03-2001
			US 2003104390 A1	05-06-2003
WO 9635940	A	14-11-1996	AU 5763296 A	29-11-1996
			BR 9608503 A	06-07-1999
			CA 2219769 A1	14-11-1996
			WO 9635940 A1	14-11-1996
			EP 0824684 A1	25-02-1998
			JP 11505610 T	21-05-1999
			PL 323257 A1	16-03-1998
			US 6289144 B1	11-09-2001
			US 6078705 A	20-06-2000
			ZA 9603731 A	12-11-1996
WO 9533197	A	07-12-1995	AT 172300 T	15-10-1998
			AT 216491 T	15-05-2002
			AU 2317995 A	21-12-1995
			AU 689604 B2	02-04-1998
			AU 2734695 A	21-12-1995
			CA 2190362 A1	07-12-1995
			CA 2190643 A1	07-12-1995
			CN 1149335 A	07-05-1997
			CN 1149336 A	07-05-1997
			CZ 9603471 A3	11-06-1997
			CZ 9603472 A3	12-03-1997
			DE 69505370 D1	19-11-1998
			DE 69505370 T2	01-04-1999
			DE 69526438 D1	23-05-2002
			DE 69526438 T2	31-10-2002
			DK 760944 T3	05-08-2002
			WO 9533197 A1	07-12-1995
			EP 0759159 A1	26-02-1997
			EP 0760944 A1	12-03-1997
			ES 2174948 T3	16-11-2002
FI 964664 A	24-01-1997			
FI 964684 A	27-01-1997			

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/09562

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9533197 A		HU 76407 A2	28-08-1997
		HU 76406 A2	28-08-1997
		WO 9533198 A1	07-12-1995
		JP 10501616 T	10-02-1998
		JP 10501617 T	10-02-1998
		PL 317379 A1	01-04-1997
		PL 317402 A1	14-04-1997
		SK 151296 A3	09-07-1997
		SK 151396 A3	09-07-1997
		US 5959292 A	28-09-1999
		US 5822472 A	13-10-1998
		ZA 9504325 A	27-11-1995
		ZA 9504327 A	27-11-1995

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 21/76	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 21/78	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 27/447	G 0 1 N 21/76	
G 0 1 N 30/88	G 0 1 N 21/78	C
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 30/88	Z
G 0 1 N 33/553	G 0 1 N 33/543	5 9 5
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/553	
	G 0 1 N 33/577	A
	G 0 1 N 27/26	3 1 5 K
	G 0 1 N 27/26	3 3 1 E

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 シック, エギンハルト

ドイツ国、7 9 6 1 8 ラインフェルデン、ノルドシュワベナー・シュトラッセ 8

(72)発明者 オロシュラン, ペーター

スイス国、ツェーハー - 4 0 5 4 バーゼル、ヴィーラントプラッツ 1 0

Fターム(参考) 2G054 AA10 CE02 EA01 EA03 GE07

4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC01 CC02 CC03 FA12 FA15

4B063 QA01 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR40 QR48

QR55 QR56 QR84 QS33 QS34 QS36 QS39 QX02

【要約の続き】

分析対象物に対する同定物質の結合による光電子シグナルの変化が、減衰フィールドセンサプラットフォームの減衰フィールドで局所分解的に計測され、それぞれの計測区域で特異的に同定される分析対象物の存在が、各計測区域からの前記光電子シグナルの変化の相対的大きさに基づいて定性的に及び/又は定量的に測定される。

专利名称(译)	一种分析平台和分析方法，使用分析物作为样品中固定的特异性结合配偶体进行测量，任选地在样品中分级后		
公开(公告)号	JP2005537487A	公开(公告)日	2005-12-08
申请号	JP2004533419	申请日	2003-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	ZEPTOSENS		
申请(专利权)人(译)	Tsueputozensu股份公司		
[标]发明人	パウラクミヒヤエル シックエギンハルト オロシユランペーター		
发明人	パウラク,ミヒヤエル シック,エギンハルト オロシユラン,ペーター		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12M1/34 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N21/25 G01N21/55 G01N21/64 G01N21/76 G01N21/78 G01N27/447 G01N30/88 G01N33/543 G01N33/553 G01N33/577		
CPC分类号	G01N21/6452 G01N21/553 G01N21/648 G01N33/54373 G01N2021/6441		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.M C12M1/00.A C12M1/34.A C12M1/34.Z C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N21/76 G01N21/78.C G01N30/88.Z G01N33/543.595 G01N33/553 G01N33/577.A G01N27/26.315.K G01N27/26.331.E		
F-TERM分类号	2G054/AA10 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/EA03 2G054/GE07 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029/FA12 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR84 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	2002001503 2002-09-03 CH 2003000115 2003-01-27 CH		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种分析平台，用于测试大量样品中是否存在生物相关化合物作为参与特定结合反应的物质，称为样品中包含的分析物，要进行的方法。本发明基于这样的观察结果：识别这些样品的样品或部分，以及其中包含的分析物，其作为第一大量特异性结合配偶体，以及衰减的场传感器。直接放置在平台上至少一个一维或二维阵列的单个测量区域中或进一步稀释样品或分数和特征。将不同的样品或级分，或不同稀释的样品或级分放置在不同的单独测量区域中。提供一种或多种鉴定以特异性鉴定来自第一多个特异性结合配偶体的样品中包含的一种或多种分析物，其充当第二多个特异性结合配偶体。使物质在单个或多个特异性结合反应步骤中与置于各个测量区中的样品或其部分或稀释液接触。通过结合剂识别用于测量包含在该区域的分析物的光电子信号的各个变化，局部地分解以测量的衰减场的渐逝场传感器平台，具体确定在每个测量区的分析物的有，定性和/或定量地基于来自的每个测量区域在光电子信号的变化相对幅度测量

2】

