

(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2004-531390

(P2004-531390A)

(43) 公表日 平成16年10月14日(2004.10.14)

(51) Int.Cl.⁷

B05D 7/24
G01N 33/53
G01N 33/543
G01N 33/547
G01N 37/00

F I

B05D 7/24 302Z
 G01N 33/53 M
 G01N 33/53 U
 G01N 33/543 501J
 G01N 33/543 525U

テーマコード (参考)

4D075

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 117 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-506665 (P2003-506665)
 (86) (22) 出願日 平成14年6月26日 (2002.6.26)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年12月26日 (2003.12.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/020408
 (87) 国際公開番号 W02003/000433
 (87) 国際公開日 平成15年1月3日 (2003.1.3)
 (31) 優先権主張番号 60/301, 223
 (32) 優先日 平成13年6月26日 (2001.6.26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 10/180, 199
 (32) 優先日 平成14年6月25日 (2002.6.25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

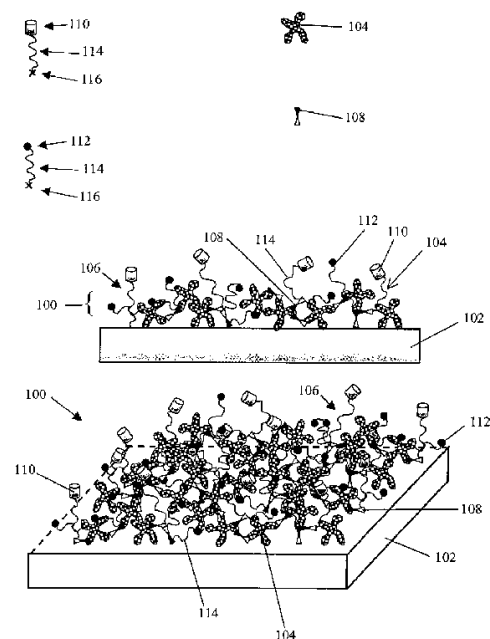
(71) 出願人 504002931
 アクセルレイト・テクノロジー・コーポレーション
 ACCEL R8 TECHNOLOGY CORPORATION
 アメリカ合衆国コロラド州80203-1253, デンバー, イースト・セブンティーンズ・アベニュー 303, ナンバー108
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100076691
 弁理士 増井 忠式
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 機能性表面コーティング

(57) 【要約】

低い非特異的結合を示す機能性薄膜又は機能性表面コーティング(100)を製造する上での組成物と、前記薄膜又は表面コーティングの製造法が説明されている。本発明の薄膜は、特殊化された官能基と非特異的結合をはねつける成分を含有している。本発明の薄膜は、種々の固体支持体(102)に共有結合しているか、又は化合していない状態で吸着されている。特殊化された官能基(110)が、薄膜により変性された固体表面に対して特殊な作用をもたらす、また非特異的結合反発成分が、薄膜により変性された固体表面への非特異的結合を大幅に減少させる。非特異的結合反発成分は、薄膜中において、特殊化された官能基の作用に影響を及ぼさない。これらの方法においては、特殊化された官能基が、スパーサー(114)を介して固体支持体に繋ぎとめられる。非特異的タンパク質結合特性と、特異的結合作用のための官能基とを併せ持った表面コーティングも説明されており、これによって標的タンパク質を特異的に認識するが、非特異的なタンパク質結合を制限するような表面コーティングが得られる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

支持体を供給すること；
 有効量の活性成分を供給すること；
 有効量の架橋用成分を供給すること；
 有効量のマトリックス形成用成分を供給すること；
 前記活性成分、前記架橋用成分、及び前記マトリックス形成用成分を前記支持体上に固定し、これによって機能性表面を形成させること；
 を含む、機能性表面の製造法。

【請求項 2】

前記固定処理がさらに、前記活性成分、前記架橋用成分、及び前記マトリックス形成用成分を前記支持体上に塗被すること、被覆された支持体を作製すること、並びに前記被覆支持体を硬化させることを含む、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 3】

前記硬化処理が、熱による活性化、光による活性化、又は化学的活性化からなる群から選択される、請求項 2 記載の製造法。

【請求項 4】

前記活性成分が、官能基、スペーサー基、及び結合基を含む、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 5】

前記官能基が、ビオチン、メトキシ - ポリエチレングリコール、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、ニトロフェニルエステル、カルボキシレート、ビニル、ナイトレン、アルデヒド基、フェニルボロン酸、サリチルヒドロキサム酸、ヒドロキシル基、アミン基、イミン基、カルボン酸、アルデヒド、ケトン、エステル、エーテル、アミド基、イミド、シアニド、ヒドラジド、スクシンイミド、マレイミド、チオール、ハロゲン化物、アジド基、フェニル基、スルホネート、イソチオシアネート、イソシアネート、オキサゾリン、エポキシド、ニトロベンジル、オキサゾリン、酸塩化物、クロロホルメート、ジスルフィドピリジル、アズラクトン、臭化シアノゲン、フルオロアレーン、フルオロカーボン、ジスルフィド、イソシアニド、サルフェート、ヘパリン、ペプチド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、有機ケイ素化合物、有機ホスフェート化合物、エチレングリコールオリゴマー、アクリルアミド、ピロリドン、ポリサッカライド、及び極性の合成ポリマーからなる群から選択される、請求項 4 記載の製造法。

【請求項 6】

前記官能基が、ビオチン、メトキシ - ポリエチレングリコール、ビニル - スルホン、スクシンイミジルプロピオネート、又はストレプトタビジンである、請求項 4 記載の製造法。

【請求項 7】

前記官能基がビオチンである、請求項 4 記載の製造法。

【請求項 8】

前記官能基がスクシンイミジル誘導体である、請求項 4 記載の製造法。

【請求項 9】

前記スペーサー基が、二官能性で直鎖のポリエチレングリコール、ポリエチレンイミン、ポリスチレン、ポリシロキサン、ポリウレタン、タンパク質、ポリ(アミノ酸)、ポリホスファゼン、テレケリックブロックコポリマー、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、ポリサッカライド、デンドリマー、及び高分岐ポリマー；二官能性で星形のポリエチレングリコール、ポリエチレンイミン、ポリスチレン、ポリシロキサン、ポリウレタン、タンパク質、ポリ(アミノ酸)、ポリホスファゼン、テレケリックブロックコポリマー、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、ポリサッカライド、デンドリマー、及び高分岐ポリマー；並びに二官能性で櫛状のポリエチレングリコール、ポリエチレンイミン、ポリスチレン、ポリシロキサン、ポリウレタン、タンパク質、ポリ(アミノ酸)、ポリホスファゼン、テレケリックブロックコポリマー、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、ポリサッカライド、デンド

10

20

30

40

50

リマー、及び高分岐ポリマー；からなる群から選択される、請求項 4 記載の製造法。

【請求項 10】

前記スパーサー基が、直鎖の PEG 分子、星形の PEG 分子、又は櫛状の PEG 分子である、請求項 4 記載の製造法。

【請求項 11】

前記スパーサー基が直鎖の PEG 分子である、請求項 4 記載の製造法。

【請求項 12】

前記結合基が、シラン、メタクリレート、ジスルフィド、ジシラザン、スルフヒドリル、アクリレート、カルボキシレート、イソニトリル、イソシアネート、ホスホアミダイト、ナイトレン、エポキシド、ヒドロシリル、エステル、アレーン、アジド、ニトリル、キノ 10
ン、及びビニル基からなる群から選択される、請求項 4 記載の製造法。

【請求項 13】

前記結合基がアルコキシシラン又はクロロシランである、請求項 4 記載の製造法。

【請求項 14】

前記結合基がアルコキシシランである、請求項 4 記載の製造法。

【請求項 15】

前記結合基がスクシンイミジル誘導体である、請求項 4 記載の製造法。

【請求項 16】

前記架橋用成分が、メタクリレート、アクリレート、エポキシド、シラン、ペルフルオロ 20
フェニルアジド、アリールアジド、アシルアジド、アジドホルメート、スルホニルアジド、ホスホリルアジド、ジアゾアルカン、ジアゾケトン、ジアゾアセテート、 β -ケト- α -ジアゾアセテート、脂肪族アゾ、ジアジリン、ケテン、光活性化ケトン、ジアルキルペルオキシダーゼ、ジアシルペルオキシダーゼ、及びキノンからなる群から選択される少なくとも 2 種の反応性基を含む分子である、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 17】

前記架橋用成分がアジドシランである、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 18】

前記マトリックス形成用成分が、ポリオキシエチレンソルビタンテトラオレエート、ポリ 30
オキシエチレンソルビトールヘキサオレエート、ポリオキシエチレン 6 トリデシルエーテル、ポリオキシエチレン 12 トリデシルエーテル、ポリオキシエチレン 18 トリデシルエーテルを含めたポリオキシエチレンベースの界面活性物質；ツイーン (Tween) (登録商標) 界面活性剤；トリトン (Triton) (登録商標) 界面活性剤；ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマー；直鎖の PEG 分子、星形の PEG 分子、櫛形の高分岐 PEG 分子、及び樹枝状の高分岐 PEG 分子；カーボンネート化界面活性剤、ペルフッ素化界面活性剤、及びケイ素化界面活性剤；カゼイン；血清希釈物；ウシ血清アルブミン；糖脂質及び脂質；ヘパリンもしくは他のグリコサミノグリカン；マスシン (mucin)；プロテオグリカン；並びにポリサッカライド；からなる群から選択される分子の 1 種以上で構成されている、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 19】

前記マトリックス形成用成分が、ポリオキシエチレンソルビタンテトラオレエート、ツイ 40
ーン (Tween) (商標) 界面活性剤、プルロニック (Pluronic) (商標) ブロックコポリマー、又は極性で非イオン性の類似した化学組成を有する合成コポリマーである、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 20】

前記マトリックス形成用成分が、ポリオキシエチレンソルビタンテトラオレエートである、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 21】

有効量の活性成分を有する支持体；

有効量の架橋用成分；及び

有効量のマトリックス形成用成分；

を含み、前記活性成分、前記架橋用成分、及び前記マトリックス形成用成分が、外部環境における非標的分子に対して低い非特異的結合特性を有する機能化された表面をもたらす一体になって網の目状に絡み合ったマトリックスを形成する、非標的検体に対して低い非特異的結合特性を有する機能性表面。

【請求項 2 2】

前記活性成分が、官能基、スペーサー基、及び結合基を含む、請求項 2 1 記載の機能性表面。

【請求項 2 3】

前記官能基が標的検体への選択的結合を容易にし、前記官能基が、ビオチン、メトキシ - ポリエチレングリコール、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、ニトロフェニルエステル、カルボキシレート、ビニル、ナイトレン、アルデヒド基、フェニル硼酸、サリチルヒドロキサム酸、ヒドロキシル基、アミン基、イミン基、カルボン酸、酸塩化物、ハロアルデヒド、ケトン、エステル、エーテル、アミド基、イミド、シアニド、ヒドラジド、スクシンイミド、マレイミド、チオール、ハロゲン化物、アジド基、フェニル基、スルホネート、イソチオシアネート、イソシアネート、エポキシド、ニトロベンジル、オキサゾリン、酸塩化物、クロロホルメート、ジスルフィドピリジル、アズラクトン、臭化シアノゲン、フルオロアレーン、フルオロカーボン、ジスルフィド、イソシアニド、サルフェート、ヘパリン、ペプチド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、有機ケイ素化合物、有機ホスフェート化合物、エチレングリコールオリゴマー、アクリルアミド、ピロリドン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、ポリサッカライド、及び極性の合成ポリマーからなる群から選択される、請求項 2 2 記載の機能性表面。

10

20

【請求項 2 4】

前記官能基が標的検体への選択的結合を容易にし、前記官能基が、ビオチン、メトキシ - ポリエチレングリコール、スクシンイミジルプロピオネート、ストレプトタビジン、又はアルデヒドである、請求項 2 2 記載の機能性表面。

【請求項 2 5】

前記官能基が標的検定への選択的結合を容易にし、前記官能基がビオチンである、請求項 2 2 記載の機能性表面。

【請求項 2 6】

前記スペーサー基が、二官能性で直鎖のポリエチレングリコール、ポリエチレンイミン、ポリスチレン、ポリシロキサン、ポリウレタン、タンパク質、ポリ(アミノ酸)、ポリホスファゼン、テレケリックブロックコポリマー、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、ポリサッカライド、デンドリマー、及び高分岐ポリマー；二官能性で星形のポリエチレングリコール、ポリエチレンイミン、ポリスチレン、ポリシロキサン、ポリウレタン、タンパク質、ポリ(アミノ酸)、ポリホスファゼン、テレケリックブロックコポリマー、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、ポリサッカライド、デンドリマー、及び高分岐ポリマー；並びに二官能性で櫛状のポリエチレングリコール、ポリエチレンイミン、ポリスチレン、ポリシロキサン、ポリウレタン、タンパク質、ポリ(アミノ酸)、ポリホスファゼン、テレケリックブロックコポリマー、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、ポリサッカライド、デンドリマー、及び高分岐ポリマー；からなる群から選択される、請求項 2 2 記載の機能性表面。

30

40

【請求項 2 7】

前記スペーサー基が、直鎖のポリエチレングリコール、星形の PEG 分子、又は櫛状の PEG 分子である、請求項 2 2 記載の機能性表面。

【請求項 2 8】

前記スペーサー基が直鎖の PEG 分子である、請求項 2 2 記載の機能性表面。

【請求項 2 9】

前記結合基が、シラン、メタクリレート、ジスルフィド、ジシラザン、スルフヒドリル、アクリレート、カルボキシレート、イソニトリル、イソシアネート、ホスホアミダイト、

50

ナイトレン、エポキシド、ヒドロシリル、エステル、アレーン、アジド、ニトリル、キリン、及びビニル基からなる群から選択される、請求項 2 2 記載の機能性表面。

【請求項 3 0】

前記結合基がアルコキシシラン又はクロロシランである、請求項 2 2 記載の機能性表面。

【請求項 3 1】

前記結合基がアルコキシシランである、請求項 2 2 記載の機能性表面。

【請求項 3 2】

前記架橋用成分が、メタクリレート、アクリレート、エポキシド、シラン、ペルフルオロフェニルアジド、アリアルアジド、アシルアジド、アジドホルメート、スルホニルアジド、ホスホリルアジド、ジアゾアルカン、ジアゾケトン、ジアゾアセテート、 β -ケト- α -ジアゾアセテート、脂肪族アゾ、ジアジリン、ケテン、光活性化ケトン、ジアルキルペルオキシダーゼ、ジアシルペルオキシダーゼ、及びキノンからなる群から選択される少なくとも 2 種の反応性基で構成されている分子である、請求項 2 1 記載の機能性表面。

10

【請求項 3 3】

前記架橋用成分がアジドシランである、請求項 2 1 記載の機能性表面。

【請求項 3 4】

前記マトリックス形成用成分が、ポリオキシエチレンソルビタンテトラオレエート、ポリオキシエチレンソルビトールヘキサオレエート、ポリオキシエチレン 6 トリデシルエーテル、ポリオキシエチレン 1 2 トリデシルエーテル、ポリオキシエチレン 1 8 トリデシルエーテルを含めたポリオキシエチレンベースの界面活性物質；ツイーン (T w e e n) (登録商標) 界面活性剤；トリトン (T r i t o n) (登録商標) 界面活性剤；ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマー；直鎖の P E G 分子、星形の P E G 分子、櫛形の高分岐 P E G 分子、及び樹枝状の高分岐 P E G 分子；直鎖のポリアミンポリマー、星形のポリアミンポリマー、櫛形のポリアミンポリマー、及び樹枝状のポリアミンポリマー；カーボネート化界面活性剤、ペルフッ素化界面活性剤、及びケイ素化界面活性剤；カゼイン；血清希釈物；ウシ血清アルブミン；糖脂質及び脂質；ヘパリンもしくは他のグリコサミノグリカン；m u s c i n；並びにポリサッカライド；からなる群から選択される、請求項 2 1 記載の機能性表面。

20

【請求項 3 5】

前記マトリックス形成用成分が、ポリオキシエチレンソルビタンテトラオレエート、ツイーン (T w e e n) (商標) 界面活性剤、プルロニック (P l u r o n i c) (商標) ブロックコポリマー、又は極性で非イオン性の類似した化学組成を有する親水性合成コポリマーである、請求項 2 1 記載の機能性表面。

30

【請求項 3 6】

前記マトリックス形成用成分がポリオキシエチレンソルビタンテトラオレエートである、請求項 2 1 記載の機能性表面。

【請求項 3 7】

前記活性成分がビオチン - P E G - シランである、請求項 2 1 記載の機能性表面。

【請求項 3 8】

前記支持体が $S i O_2 / S i$ で構成されている、請求項 3 7 記載の機能性表面。

40

【請求項 3 9】

前記支持体が熱可塑性ポリマー又は熱硬化性ポリマーで構成されている、請求項 3 7 記載の機能性表面。

【請求項 4 0】

前記支持体が金属 / 金属酸化物で構成されている、請求項 3 7 記載の機能性表面。

【請求項 4 1】

前記活性成分がメトキシ - P E G - シランである、請求項 2 1 記載の機能性表面。

【請求項 4 2】

前記活性成分がメトキシ - P E G - シランとビオチン - P E G - シランとの組み合わせ物である、請求項 2 1 記載の機能性表面。

50

【請求項 4 3】

網の目に絡み合ったマトリックス内に固定化されたストレプトタビジンを含み、請求項 4 2 記載の機能性表面。

【請求項 4 4】

前記活性成分がビニルスルホン - PEG - シランである、請求項 2 1 記載の機能性表面。

【請求項 4 5】

前記支持体がガラスで構成されている、請求項 4 4 記載の機能性表面。

【請求項 4 6】

前記活性成分が NHS - PEG - シランである、請求項 2 1 記載の機能性表面。

【請求項 4 7】

前記活性成分が COOH - PEG - シランである、請求項 2 1 記載の機能性表面。

【請求項 4 8】

前記活性成分が SPA - PEG - SPA である、請求項 2 1 記載の機能性表面。

【請求項 4 9】

支持体；

前記支持体に固定された非特異的結合性マトリックス；及び

前記非特異的結合性マトリックスに固定された活性成分、これにより生化学的結合アッセイのための機能性表面が形成される；

を含む、生化学的結合アッセイを実施するための機能性表面。

【請求項 5 0】

前記非特異的結合性マトリックスが、前記機能性表面の架橋安定化と前記支持体への結合をもたらす架橋用成分とマトリックス形成用成分とを含み、請求項 4 9 記載の機能性表面。

【請求項 5 1】

前記活性成分が、官能基、スパーサー基、及び結合基を含み、前記結合基が前記非特異的結合性マトリックスに固定されている、請求項 4 9 記載の機能性表面。

【請求項 5 2】

前記官能基が前記活性成分への標的タンパク質の特異的結合を容易にする、請求項 5 1 記載の機能性表面。

【請求項 5 3】

前記活性成分がビオチンである、請求項 5 2 記載の機能性表面。

【請求項 5 4】

前記活性成分がビニルスルホンである、請求項 5 2 記載の機能性表面。

【請求項 5 5】

前記活性成分が NHS である、請求項 5 2 記載の機能性表面。

【請求項 5 6】

前記活性成分が SPA である、請求項 5 2 記載の機能性表面。

【請求項 5 7】

前記非特異的結合性マトリックスが、有効量のアジド - シラン及びポリオキシエチレンソルビタンテトラオレエートで構成されている、請求項 4 9 記載の機能性表面。

【請求項 5 8】

前記支持体が、シリカベースの支持体、金属支持体、金属酸化物支持体、ヒドロゲル支持体、ガラス支持体、及びポリマー支持体からなる群から選択され、請求項 4 9 記載の機能性表面。

【請求項 5 9】

前記架橋用成分がアジド - シランである、請求項 4 9 記載の機能性表面。

【請求項 6 0】

前記マトリックス形成用成分がポリオキシエチレンソルビタンテトラオレエートである、請求項 4 9 記載の機能性表面。

【請求項 6 1】

10

20

30

40

50

有効量の活性成分、有効量の架橋用成分、及び有効量のマトリックス形成用成分を含み、前記活性成分、前記架橋用成分、及び前記マトリックス形成用成分が、低い非特異的結合特性を有する機能化された表面をもたらし一体になって網の目状に絡み合ったマトリックスを形成する、支持体に施すのに適した、低い非特異的結合特性を有する機能化された表面を作製するためのパッケージ配合物；及び前記成分を支持体表面上に施すための使用説明書。

【請求項 6 2】

前記活性成分が、官能基、スペーサー基、及び結合基を含む、請求項 6 1 記載のパッケージ配合物。

【請求項 6 3】

前記官能基が特定の検体の結合を容易にし、前記官能基が、ビオチン、メトキシ - ポリエチレングリコール、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、ニトロフェニルエステル、カルボキシレート、ビニル、ナイトレン、アルデヒド基、フェニル硼酸、サリチルヒドロキサム酸、ヒドロキシル基、アミン基、イミン基、カルボン酸、アルデヒド、ケトン、エステル、エーテル、アミド基、イミド、シアニド、ヒドラジド、スクシンイミド、マレイミド、チオール、ハロゲン化物、アジド基、フェニル基、スルホネート、イソチオシアネート、イソシアネート、エポキシド、ニトロベンジル、オキサゾリン、酸塩化物、クロロホルメート、ジスルフィドピリジル、アズラクトン、臭化シアノゲン、フルオロアレーン、フルオロカーボン、ジスルフィド、イソシアニド、サルフェート、ヘパリン、ペプチド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、有機ケイ素化合物、有機ホスフェート化合物、エチレングリコールオリゴマー、アクリルアミド、ピロリドン、ポリサッカライド、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、及び極性の水溶性合成ポリマーからなる群から選択される、請求項 6 2 記載のパッケージ配合物。

【請求項 6 4】

前記官能基が特定の検体の結合を容易にし、前記官能基が、ビオチン、メトキシ - ポリエチレングリコール、スクシンイミド、スクシンイミジルプロピオネート、ストレプトタビジン、又はアルデヒドである、請求項 6 2 記載のパッケージ配合物。

【請求項 6 5】

前記官能基が特定の検体の結合を容易にし、前記官能基がビオチンである、請求項 6 2 記載のパッケージ配合物。

【請求項 6 6】

前記スペーサー基が、二官能性で直鎖のポリエチレングリコールすなわち PEG オリゴマーもしくは PEG ポリマー、ポリエチレンイミン、ポリスチレン、ポリシロキサン、ポリウレタン、タンパク質、ポリ(アミノ酸)、ポリピロリドン、ポリホスファゼン、表面活性のテレケリックブロックコポリマー、例えばプルロニック (Pluronic) (商標)、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、ポリサッカライド、サッカライドモノマー、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、デンドリマー、又は高分岐ポリマー；二官能性で星形のポリエチレングリコールすなわち PEG オリゴマーもしくは PEG ポリマー、ポリエチレンイミン、ポリスチレン、ポリシロキサン、ポリウレタン、タンパク質、ポリ(アミノ酸)、ポリピロリドン、ポリホスファゼン、表面活性のテレケリックブロックコポリマー、例えばプルロニック、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、ポリサッカライド、サッカライドモノマー、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、デンドリマー、又は高分岐ポリマー；及び二官能性で櫛状のポリエチレングリコールすなわち PEG オリゴマーもしくは PEG ポリマー、ポリエチレンイミン、ポリスチレン、ポリシロキサン、ポリウレタン、タンパク質、ポリ(アミノ酸)、ポリピロリドン、ポリホスファゼン、表面活性のテレケリックブロックコポリマー、例えばプルロニック、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、ポリサッカライド、サッカライドモノマー、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、デンドリマー、又は高分岐ポリマー；からなる群から選択される、請求項 6 2 記載のパッケージ配合物。

【請求項 67】

前記スパーサー基が、直鎖のポリエチレングリコールすなわち PEG オリゴマーもしくは PEG ポリマー、星形の PEG 分子、又は櫛状の PEG 分子である、請求項 62 記載のパッケージ配合物。

【請求項 68】

前記スパーサー基が直鎖の PEG 分子である、請求項 62 記載のパッケージ配合物。

【請求項 69】

前記結合基が、シラン、メタクリレート、SPA、ジスルフィド、ジシラザン、スルフヒドリル、アクリレート、カルボキシレート、イソニトリル、イソシアネート、ホスホアミダイト、ナイトレン、エポキシド、ヒドロシリル、エステル、アレーン、アジド、ニトリル、キノン、及びビニル基からなる群から選択される、請求項 62 記載のパッケージ配合物。

10

【請求項 70】

前記結合基がアルコキシシラン又はクロロシランである、請求項 62 記載のパッケージ配合物。

【請求項 71】

前記結合基がアルコキシシランである、請求項 62 記載のパッケージ配合物。

【請求項 72】

前記結合基が SPA である、請求項 62 記載のパッケージ配合物。

【請求項 73】

前記架橋用成分が、メタクリレート、アクリレート、エポキシド、シラン、ペルフルオロフェニルアジド、アリアルアジド、アシルアジド、アジドホルメート、スルホニルアジド、ホスホリルアジド、ジアゾアルカン、ジアゾケトン、ジアゾアセテート、 β -ケト- α -ジアゾアセテート、脂肪族アゾ、ジアジリン、ケテン、光活性化ケトン、ジアルキルペルオキシダーゼ、ジアシルペルオキシダーゼ、及びキノンからなる群から選択される少なくとも 2 種の反応性基で構成される分子である、請求項 62 記載のパッケージ配合物。

20

【請求項 74】

前記架橋用成分がアジドシランである、請求項 62 記載のパッケージ配合物。

【請求項 75】

前記マトリックス形成用成分が、ポリオキシエチレンソルビタンテトラオレエート、ポリオキシエチレンソルビトールヘキサオレエート、ポリオキシエチレン 6 トリデシルエーテル、ポリオキシエチレン 12 トリデシルエーテル、ポリオキシエチレン 18 トリデシルエーテルを含めたポリオキシエチレンベースの界面活性物質；ツイーン界面活性剤；トリトン界面活性剤；ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマー；直鎖の PEG 分子、星形の PEG 分子、櫛状の高分岐 PEG 分子、及び樹枝状の高分岐 PEG 分子；直鎖のポリアミンポリマー、星形のポリアミンポリマー、及び樹枝状のポリアミンポリマー；カーボネート化界面活性剤、ペルフルオロ化界面活性剤、及びケイ素化界面活性剤；カゼイン；血清希釈物；ウシ血清アルブミン；糖脂質及び脂質；ヘパリン；m u s c i n；並びにポリサッカライド；からなる群から選択される、請求項 62 記載のパッケージ配合物。

30

【請求項 76】

前記マトリックス形成用成分が、ポリオキシエチレンソルビタンテトラオレエート、ツイーン界面活性剤、又はプルロニックブロックコポリマーである、請求項 62 記載のパッケージ配合物。

40

【請求項 77】

前記マトリックス形成用成分がポリオキシエチレンソルビタンテトラオレエートである、請求項 62 記載のパッケージ配合物。

【請求項 78】

生体分析アッセイにおいて標的検体を検出するのに使用するための機能性表面であって、生体分析アッセイを行うための支持体；及び

前記標的検体の検出時に非特異的結合を制限するための、前記支持体上に被覆される手段

50

;

を含む前記機能性表面。

【請求項 79】

前記生体分析アッセイがマイクロアレイである、請求項 78 記載の機能性表面。

【請求項 80】

前記マイクロアレイがオリゴヌクレオチドのマイクロアレイである、請求項 79 記載の機能性表面。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願に対するクロス・リファレンス)

10

本出願は、「非特異的結合特性の低い機能性表面コーティング」と題する、2001年6月26日付け出願の米国暫定特許出願(該特許出願を参照により本明細書に含める)の優先権の恩典を特許請求する。

【発明の分野】

【0002】

本発明は、一般には、支持体物質に望ましい化学的、物理的、及び生物学的特性を付与する表面コーティングの分野に関する。さらに詳細には、本発明は、分子、粒子、もしくは細胞の、表面への非特異的な吸着又は結合を阻害すると共に、特定の分子、捕捉剤、薬物、粒子、もしくは細胞を当該表面又は当該表面内に固定化あるいは取り込むための手段をもたらしように意図された表面化学品(s u r f a c e c h e m i s t r i e s)に関する。本発明はさらに、化学的に異なった種々の支持体物質に施すための被覆物に関する。

20

【発明の背景】

【0003】

天然もしくは合成物質と生体分子含有流体との間の相互作用を抑制することが、種々の分野において益々重要になりつつある。例えば、種々の支持体物質(すなわち表面)と生体分子との相互作用が、免疫診断、遺伝子マイクロアレイとタンパク質マイクロアレイ、及びマイクロ流体“l a b - o n - a - c h i p”デバイスを含めた多くの分析システムの主流になっている。キャピラリー電気泳動法(C E)、表面プラズモン共鳴法(S P R)、及び水晶天秤法(Q C M)等の分析法も、本質的に生体分子-表面の相互作用に依存している。心血管代替物(例えばカテーテル、弁、ステント)、コンタクト・レンズと眼内レンズ、シャント、フィルター、ダイヤフラム、ポンプ、膜、ドラッグデリバリーデバイス、及び外科用部品を含めた生物医学デバイスの性能も、生体分子-表面相互作用の抑制に依存している。熱交換ユニット、船上部材(例えば、船体や上部構造物)、設備(ポンプ・デリック)、ドック、及び環境的に曝露されている計器を含めた海上表面も、それらの表面への生体分子の付着(藻、真菌、微生物の滲出物)を抑制する必要がある。

30

【0004】

これらの分野における共通した大きな関心事は、標的 support 及びデバイス support への非特異的な生体分子(例えばタンパク質、有機体、核酸)結合のレベルがどの程度かという点にある。非感知応用品(n o n - s e n s i n g a p p l i c a t i o n s)又は非診断応用品(n o n - d i a g n o s t i c a p p l i c a t i o n s)においては、こうした関心は、表面誘起による生物付着(機能を低下させる生物学的物質の付着)に集中する。表面誘起による生物付着は、生物医学デバイスや海上応用品において特に問題となる。医療、食品、環境感知、及び環境診断においては、標的検体(例えばポリサッカライド、核酸、薬物、ペプチド、又はタンパク質)の特異性、シグナル-ノイズ比、及び検出限界は、しばしば非標的生体分子(例えば血清タンパク質)の環境での限定された濃度において、support への表面非特異的な非標的(例えばタンパク質)結合によって抑えられる。こうした非特異的な結合ノイズを減少もしくは除去できれば、デバイスの性能が高まり、多くの分析システムのシグナル-ノイズ比、検出感度、及び特異性が向上する。

40

【0005】

50

分析システムに対し、多くの生物医学デバイスの適切な機能を発揮させるには、合成物質 - 生物学的界面が重要である。例えば、医療インプラントの表面におけるタンパク質の非特異的結合が、異物に対する反応を引き起こす上で少なくともある程度の原因になっており、このためデバイスの機能不全や拒絶反応を引き起こすことがある、と考えられている。こうした生物付着はさらに、生体内での長期間経過後における、デバイスによる感染発病、血栓症、及びセンサー劣化の原因にもなっている。これとは別に、特定の仕方で標的の生体分子と相互作用するインプラント表面を使用して自然治癒を促し、これによって生物付着による多くの好ましくない反応を避けることができる、という仮説も立てられている。さらに、多くの非分析の応用分野 (non-analytical applications) と非医療の応用分野 (non-medical applications) も、表面 - 生物学的流体の相互作用の直接的な抑制を必要とする。例としては、工業設備、コロイドと無機質のハンドリングシステム、冷却システム、海洋構造物、及び生物学的成分を使用してインビトロにて生物学的生成物を得るのに使用されるバイオリアクターのための非汚染型ペイントや抗菌性コーティングが挙げられる。

10

【0006】

これらの重要な分野における改良はいずれも、特異的な標的結合、標的拘束、又は標的捕捉を、望ましくない成分の非特異的な付着に対して制御することができる、という改良された表面化学品の進歩から恩恵を受けている。これら表面化学品の必須要件は、合成表面 (synthetic surfaces) が、非標的、生体分子、粒子、もしくは細胞に対して減少した非特異的結合 (NSB) 又は限定された非特異的結合を示す、ということである。NSBは、静電結合相互作用、水和結合相互作用、疎水結合相互作用、酸 - 塩基結合相互作用、分散結合相互作用、及び水素結合相互作用のあらゆる組み合わせを含めた、種々の基本的な分子レベルの付着メカニズムによって起こる。例えば、可溶性のタンパク質は一般に、これらの非特異的相互作用の組み合わせを介して表面の至る所に付着し、除去するのが困難な生物学的物質の付着層を形成する (生物付着の決定的な段階)。タンパク質のNSBの結果、さらなるNSB事象 (変性タンパク質の露出内部への、他のタンパク質、細胞、又は微生物等のさらなる付着) のカスケードを誘発しうる表面上においてタンパク質の変性 (天然構造の消失) が起こることが多い。この生物付着によるNSBカスケードは、生物医学インプラントに対しては望ましくない感染、凝固作用、又は炎症反応; 診断アッセイと診断センサーに対しては減少したシグナル - ノイズ比; 海上構造物及び環境的に曝露されている構造物に対しては腐食と劣化; 海上輸送に対しては乱流と推進効率の低下; 並びにキャピラリー、チューブ、及びマイクロ流体チャンバーにおいては望ましくない圧力降下と流れ特性; を引き起こす。したがって、タンパク質と生体分子のNSBを抑制できることは、生物学的流体と接触し、生物学的流体と共に機能し、そして生物学的流体中にて作用する改良された合成物質を設計する上で重要な性能特長である。

20

30

【0007】

表面へのNSBは望ましくない場合がほとんどであるが、標的表面上において結合させることによって、指定された生体分子、粒子、薬物、又は細胞を特異的に捕捉することは望ましいことが多い。例としては、イムノアッセイ用の表面上での生物活性抗体の特異的な結合、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 又は遺伝子アッセイ (マイクロアレイ) 用の表面上での核酸プライマーの特異的結合、及びそれぞれ細胞の増殖を促進もしくは阻害するための、表面への増殖因子又は抗生物質の特異的結合などがある。表面へのこのような特異的結合の目標は、指定したタイプの分子、粒子、もしくは細胞だけを標的表面上に結合させること、並びに特異的に結合した分子、粒子、もしくは細胞の認識活性 (recognition activity)、天然構造、及び機能を保持するような仕方で結合させることにある。

40

【0008】

したがって、(1) 処理された表面への、望ましくない分子、粒子、又は細胞の非特異的な結合を阻害するか; (2) 処理された表面への、特定の生体分子、粒子、又は細胞の結合を促進しつつ、当該表面への、望ましくない分子、粒子、又は細胞の非特異的な結合

50

を阻害するか；あるいは（３）処理された表面への、機能的もしくは生物学的に活性な特定の生体分子、粒子、又は細胞の結合を促進しつつ、当該表面への、望ましくない分子、粒子、又は細胞の非特異的な結合を阻害する、というような機能性表面化学品が求められている。

【０００９】

非特異的結合が少ないという望ましい特性を有する表面を作製するために、幾つかの方法が試みられた。これらの方法は一般に、低いNSBを示すコーティング化学品又は表面官能基を選定すること、次いで表面官能基を下側の支持体に固定することを含む。この固定工程は、物理的吸着に基づくものであってもよいし、あるいは直接的な共有結合（化学的カップリング）に基づくものであってもよい。性能上の観点から、層は、環境に対する低NSB特性を保持しつつ、下側の支持体に対して強固な結合を示さなければならない。

10

【００１０】

合成ポリマーをベースにした表面コーティングの検討は、ほとんどが非汚染型コーティングの開発に主眼を置いている。A. S. Hoffman, "非汚染表面技術," *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition* 10, No. 10 (1999): 1011-1014; ポリ（エチレングリコール）：化学的及び生物学的応用, ACSシンポジウムシリーズ680, J. Milton Harris と Samuel Zalipsky による編集, 米国化学会, 1997。ポリエチレングリコール（PEG）誘導体のような、親水性で、極性で、電氣的に中性のポリマーが、塗被方式において、溶液からのタンパク質のNSBを少なくする能力のあることが以前から知られていることから大きな関心を受けている。問題は、これらの水溶性ポリマーや他の類似の水溶性ポリマーを、連続的なコーティングによって効果的なNSBをもたらすに足る密度にて、有用な支持体物質に効果的に固定することである。1つのアプローチは、親水性-疎水性ブロックコポリマーを疎水性の支持体に物理的に吸着させることである。支持体と疎水性ポリマーブロックとの間の疎水性相互作用は、親水性の低NSBブロックを水性環境に与えつつ、コーティングポリマー分子を支持体に結びつけるのに充分である（米国特許第5,075,400号と第6,093,559号）。しかしながら、こうした物理的吸着による皮膜は、ポリマーの脱着が可逆性である〔特に、厳しい液体環境（例えば、高い塩含量、非中性のpH、高温、剪断流れ状態など）において〕という点において、及びNSBを抑えるのに効果的な再現性のある吸着密度を達成する能力という点において問題がある。

20

30

【００１１】

低い非特異的結合特性を有する表面を作製する上での別のアプローチは、低NSBコーティングポリマーの標的表面への共有カップリング（covalent coupling）に関する。例えば、PEGは、PEG分子に導入された反応性末端基を介して、共有結合によって支持体にグラフトすることができる（米国特許第5,512,329号）。アジド化学とキノン化学は、ポリマー支持体へのこのような固定に対する２種の光反応性末端基の例である。このアプローチの欠点は、こうしたカップリング化学が効果的で且つ利用可能である場合の、特定のタイプのポリマー支持体を被覆することに限定されるという点である。興味ある無機支持体（例えば、ガラスや金属）に結びつけるには、ある中間の支持体結合層が必要となり、これはコストの上昇をきたし、時間の消費量が増え、コーティング手順の全体的な効率性の低下を招く。この方法の1つの特定の例は、PEG-シランを使用して、活性な金属酸化物表面上にコーティングを作製するというものである。このシステムにおいては、PEG分子が、アルコキシシラン末端反応性基又はクロロシラン末端反応性基で誘導体化される。おそらく、反応性シランの加水分解や化学縮合が、露出された表面シラノール基でPEG分子を酸化物支持体（例えば、ガラスや酸化ケイ素）に繋ぎとめるように作用するものと思われる。最初は有望であるにもかかわらず、PEG-シラン表面は実際には再生するのが困難である。末端アルキルシラン反応性基が溶液中で加水分解し、支持体に結びつく前にバルク溶液中で互いに反応し、あまりはっきりしない皮膜を生成し（反応性基は、PEG-シランを表面に繋ぎとめるよりむしろ互いに交差反応

40

50

する)、これにより、幾らかの化学的付着と混じり合った、ある程度は物理的に吸着されたポリマーコーティングが形成される、と考えられる。信頼性の高いコーティングと低NSBが得られるようにこれを制御することは困難である。

【0012】

支持体上への非特異的結合を妨げるためのポリマー皮膜を作成する別のアプローチは、生体分子-阻止工程(マスキング)を組み込んで支持体に対する非特異的結合を阻害することである。この点に関して最も普通のやり方は、可溶性のウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、又は血清を支持体に予備吸着させるというものである。これらのタンパク質(あるいは血清中のタンパク質)は水溶液からほとんどの表面に強固に吸着し、それに続く他の生体分子の非特異的結合を最小限に抑える吸着タンパク質層がもたらされる。この
10
ようなタンパク質による阻止は、機能面から効果的であることが判明しているけれども、阻止工程は多大な時間を必要とし、労働集約的であり、再現性の点で問題がある。さらに、安全性の理由から、表面化学品の用途においては動物や血清から誘導される物質の使用は避けたいという要望がある。

【0013】

したがって当業界において認識されている改良物は、ばらつきがなく強固に、しかも直接的で効果的に種々の支持体物質に結びつくことのできる固相表面コーティングである。この表面コーティングは、低い非特異的結合特性を確実に示さなければならず、また使用する
20
のが簡単でなければならない(すなわち、阻止工程を必要としないものでなければならない)。理想的には、表面化学品は、化学反応性のカップラーすなわち官能基を表面上に固定化するための手段を提供しなければならず、これらのカップラーすなわち官能基が、所望する標的の表面への固定化に対して高い特異的結合特性を示す。技術的な困難さと現時点での限界という背景に抗して本発明が開発された。

【発明の概要】

【0014】

本発明の実施態様は、機能性固相コーティングを製造する新規の表面化学品と方法、及びNSBを抑え、且つ特異的結合を可能にする改良された特性を有する表面に関する。本発明は、酸化物支持体、金属支持体、複合材料支持体、セラミック支持体、及びポリマー支持体を含めた種々の支持体上への強固なコーティング結合をもたらすと共に、外部環境からの溶質の非特異的結合を実質的に阻害する表面特性を付与する。
30

【0015】

特定の理論に拘束されるつもりはないが、本発明の表面化学品における種々の成分間の相互作用(後記にてより詳細に説明する)が、化学的に異なった種々の固相支持体への強固な結びつきを伴って新規表面コーティングの強度と利点をもたらす、と考えられる。本発明のコーティングの化学品は、単一の結びつきメカニズム(すなわち、シランカップリング、物理的吸着、光化学反応、又は化学的付着など)への依存性を実質的に減少させる。その代わりに、本発明のコーティング化学品の多機能特性は、酸化物支持体、セラミック支持体、及びポリマー支持体への共有結合による結びつき;コーティング内での架橋;並びに疎水性相互作用、酸-塩基化学、又は水素結合などを介した吸着;を含めた多くの結びつきメカニズムをもたらす、これらが組み合わせられて、あるいは相乗的に作用して支持
40
体上のコーティングを安定化させ、所望の表面特性を確実にもたらす。重要なのは、塗被したコーティング自体内での化学架橋が、コーティングの凝集特性とコーティング-支持体相互作用を増大させ、支持体への結びつきの強固さを高めるということである。

【0016】

本発明は、機能性表面コーティングの形成を促進する。“機能性”という用語は、特定の化学的もしくは分析的作用を果たす能力を表わすのに使用されている。例えば、ある種類の機能性表面は、指定された溶質に対して、特定の親和性結合能力又は特定のリガンド-受容体結合能力を示すことができる。例えば、表面に均一にビオチン基を有する表面を
50
作製することができる。ビオチン基は、ストレプトアビジンタンパク質分子とそれらの突然変異体に対して、高度に特異的で高い親和性結合の相互作用を示す。したがって、この例に

おける機能性表面は、その機能がストレプトタビジンを特異的に結びつけるという能力で定義される、バイオチン化された低バックグラウンドのNSBコーティングである。

【0017】

本発明の他の実施態様においては、機能性表面は、コーティングに対するあらゆる分子の結合相互作用を阻害するように設計される。この場合、特異的な機能作用は界面的には不活性である。こうした“不活性”機能の表面の具体的なものとしては、有効密度のメトキシキャップされたエチレンオキシドオリゴマー又はエチレンオキシドポリマーを有する表面がある。このような表面基は、一般には共有結合を形成せず、一般にはタンパク質、細胞、又は粒子に対して親和性結合特性を示さず、また一般には生体分子や他の可溶性化学種の吸着を起こしにくい。本発明においては、これらの不活性基が、下側の低バックグラウンドNSBコーティング中に直接導入される。

【0018】

本発明は、低NSBで塗被可能な架橋したマトリックスと一体の指定された機能性表面基（例えば、メトキシ-PEG又はバイオチン）を含むコーティング構造物を具現する。表面官能基は、立体配座のフレキシビリティを与えるように、且つ非特異的吸着に対して不活性であるように選択されるスペーサー分子を介してコーティングマトリックスに共有結合されている。低NSBマトリックスは、これらのスペーサーと他のいわゆるマトリックス形成分子とを含んでいて、これらが架橋して塗被可能なフィルムになっている。代表的なマトリックス形成分子としては、ポリサッカライド（デキストラン）、エチレンオキシド含有オリゴマー（直鎖状、ブロック状、樹枝状、又は星形のポリマー形態）、ブロックコポリマー〔ポロキサマー（Poloxamer）（登録商標）、プルロニック（Pluronic）（登録商標）〕、及び非イオン界面活性剤〔ツイーン（Tween）（登録商標）、トリトン（Triton）（登録商標）〕などがある。本発明のコーティング構造物は、物理的架橋メカニズムと化学的架橋メカニズムとの組み合わせに基づくものと考えられる。マトリックス中での大きな分子のもつれ合いに加えて、ヘテロ官能性又は二官能性の反応性架橋剤分子も含まれていて、これらがコーティング中にて化学的に活性化される。共有結合の架橋は、コーティングマトリックス中においても、支持体に対しても起こると考えられる。本発明においてヘテロ官能性架橋剤や二官能性架橋剤を使用することの利点は、化学的に異なった種々の支持体物質にコーティングを効果的に施して架橋させることができる（特定の表面結合がある場合もない場合も）という点にある。本発明において説明されているコーティングは、それ自体内においても、また種々の支持体に対しても強固な結合をもたらす。

本発明は、上記の機能を有する成分を使用して機能性表面コーティングを製造する方法を提供する。本発明の方法は、有効量の活性成分を含んだ支持体を供給すること、有効量の架橋用成分を供給すること、及び有効量のマトリックス形成用成分を供給することを含む。活性成分、架橋用成分、及びマトリックス形成用成分を支持体上に混和し、互いに一体化させて、安定で堅牢な機能性表面改良物を作製する。

【0019】

本発明はさらに、免疫検体、遺伝子検体、微生物検体、細胞検体、粒子検体、及び他の生物化学的もしくは標的検体の結合システムを実施するための機能性表面を提供する。したがって、非特異的結合性マトリックスを支持体に取り付け、その非特異的結合性マトリックス中に活性成分を混和して一体化させて、種々のアッセイフォーマット用にコーティングの選択性を付与する。

【0020】

本発明の実施態様はさらに、リガンドの付着、薬物の取り込み、及び生体内もしくは生体外における医療用インプラントデバイスの生物付着の原因となるNSBの減少による医療用インプラントデバイスに対する宿主の拒絶反応を効果的に抑えるための、医療用インプラントデバイス用の機能的に不活性な表面コーティングを提供する。

【0021】

本発明の上記特徴と他の特徴、及び本発明を特徴づける種々の利点は、以下に記載の詳細

な説明を読み、特許請求の範囲を見直せば明らかとなるであろう。

(好ましい実施態様の詳細な説明)

本発明の好ましい実施態様の特徴と他の詳細について、以下により具体的に説明する。理解しておかなければならないのは、本発明の特定の実施態様が例示のために示されているのであって、本発明がこれらに限定されないという点である。本発明の主要な特徴は、本発明の範囲を逸脱することなく種々の実施態様において使用することができる。

【0022】

本発明は、種々の支持体102に塗被され、支持体上に安定化された多成分・多機能性薄膜コーティング100を製造するための方法と組成物を提供する(図1を参照)。これらのコーティング100は、非標的タンパク質〔例えば、フィブリノゲン、望ましくない酵素と抗体、望ましくない核酸、ポリサッカライド、粒子、溶質、微生物、細胞、及びコロイド等(これらを総称して非標的検体と呼ぶ)〕の塗被支持体への非特異的結合又は非特異的吸着を実質的に阻害する。本発明はさらに、極めて低い非特異的結合を、そして必要であれば、高い特異的結合及び増大したアッセイ選択性とアッセイ感度を与えるような、種々の支持体102上に安定化されたこのような表面についても説明する。

10

【0023】

本発明の1つの実施態様による多成分・多機能性表面コーティング100の概略図を図1に示す。図1は、本発明の方法と装置の構成成分、及び考えられる相互作用を示している。図1に示すように、支持体102には、支持体102上に固定された低い非特異的結合性のマトリックス、及び塗被した非特異的結合性マトリックス104内で物理的に絡み合

20

【0024】

本発明の方法は、標的 support 102 への、特異的結合と減少した非特異的結合のどちらか又は両方を果たすことができる機能性表面100の製造に関する。塗被方法は、有効量の活性成分106、有効量の架橋成分108、及び有効量のマトリックス形成成分を供給することを含む。これら3つの一般的な成分を支持体上に組み込み、機能性表面コーティング100を作製し、本発明によって説明されている特性を付与する。

【0025】

“機能性表面”100という用語は、所望の標的分子、標的粒子、及び標的細胞など(これらを総称して標的検体と呼ぶ)を外環境から選択的に結びつけるために、及び/又は望ましくない分子、粒子、及び細胞(これらの総称して非標的検体と呼ぶ)を表面からまとめて拒絶するために特定の化学基を使用する表面を表わすのに使用されている。この定義によれば、ある種類の機能性表面は、特定の官能基110を表面に取り入れることによって特異的な結合能力を示すようになる。ある1つの例は、高いアビジン結合活性(一般には、アビジン1cm²当たり300~500ngの範囲において)と、他の生物製剤、粒子、及び溶質に対する低NSB(一般には、1cm²当たり0.01~50ngの範囲において)を示すビオチン化された表面である。“機能性表面”という用語はさらに、特定の範囲(一般には、1cm²当たり約0.01~50ng)にて本質的に低いタンパク

30

40

【0026】

本出願の目的に適うように、“有効量”とは、他のコーティング成分と混合したときに、

50

所望の用途（例えば、アッセイコーティングやインプラントコーティング）に対する特定の性能基準に適合したコーティングマトリックスを生成する、当該コーティング成分の量であると定義される。これらの性能基準は、“低い非特異的結合又は非特異的吸着”（“低NSB”）と“高度に選択的な特異的結合”（下記にて説明する）との両方に関して規定される。

【0027】

本出願の目的に適うように、“低い非特異的結合”、“低い非特異的吸着”、及び“低NSB”という用語は、ウシ血清アルブミン（BSA）ブロッキング（すなわちマスキング）の現在の方法に関連して定義される。BSA-ブロッキングは、生物学的流体のセッティングにおいて支持体を使用する前に、可溶性の血清タンパク質であるウシ血清アルブミンを溶液から支持体物質に物理的に吸着させるプロセスである。この予備吸着させたBSA層は、支持体上への溶質又は粒子のさらなる吸着を阻害するように作用する。BSAブロッキング法は、特に生物化学的アッセイとの関連において、種々の支持体への非特異的結合又は非特異的吸着を阻害するための最新の實用プロセスを表わしている。したがって、本発明の目的に適うためには、BSA-予備吸着あるいは同等のブロッキング工程を必要とすることなく、BSA-ブロッキングと類似の仕方で、又はBSA-ブロッキングより優れた仕方でNSBを阻害するコーティング構造物（a coating formulation）は、ここでは低NSB表面であると考えられる。

10

【0028】

“高度に選択的な特異的結合”の性能基準も、相対的な仕方で定義される。本出願の目的に適うよう、表面に取り込まれた特定の結合基が、複雑な環境から標的（検体）化学種を選択的に結合できるときに、またこのような特定の結合基が存在しない類似の表面が、標的化学種（検体）を特異的に結合する能力をほとんど又は全く示さないときに、表面は高度に選択的であると考えられる。例えば、適度な量のアビジンまたはストレプトアビジンが、ビオチン化された表面に結合され、同じ結合条件下においてビオチン化されていない表面には結合されないとき、ビオチン化された表面は、ビオチン化されていない表面と比較して高度に選択的であると言われる。

20

【0029】

最後の性能基準は、“非選択性”と低NSBとが組み合わさったものである。この場合には、特異的であろうと非特異的であろうと、いかなる結合もしくは吸着も必要とされない。このときも、性能は、競合する方法（例えばBSA-ブロッキング）に関して規定される。

30

【0030】

支持体102上に表面コーティング100を取り込む工程又は固定する工程は、有効量の活性成分106、有効量の架橋用成分108、及び有効量のマトリックス形成用成分104を混合して塗被可能な混合物にすることを含むのが好ましい。この塗被可能な混合物を支持体に施し、硬化させて安定で堅牢な表面を生成させる。塗被混合物はさらに、マトリックス内で絡み合うようになる他の非共有結合的に結びついた官能基（例えばストレプトアビジン）を含んでもよい。

【0031】

本発明の方法は、活性成分、マトリックス形成用成分、及び架橋用成分をキャリア溶媒又はキャリア溶媒混合物中に混合することを含むのが好ましい。使用する成分濃度の範囲は、選択する個々の塗被方法に依存する。溶媒の選択も、成分の化学、塗被方法、及び支持体物質の選択に依存し、溶媒の表面張力、溶解性パラメーター、粘度、選択した支持体との反応性等のファクターが溶媒の選択に影響を及ぼす。

40

【0032】

本発明において使用するための活性成分

一般には、本発明の活性成分106の実施態様は、官能基110、スペーサー基114、及び結合基116を含む（図1を参照）。非特異的結合が必要とされる場合は、官能基110の代わりに不活性官能基112を組み込むことができる、という点に留意のこと。

50

【 0 0 3 3 】

より詳細に言えば、“ 活性成分 ” という用語は、

分子の一端に少なくとも 1 つの反応性基（例えば 1 1 6）を、そして分子の両端に少なくとも 1 つの官能基（例えば 1 1 0 又は 1 1 2）を含む二官能の反応性分子を表わすように意図されている。2 つの基の間の距離は、当業者が必要とする最終製品によって規定される所望の特性が得られるようにスペーサー基 1 1 4 の長さを変えることによって変えることができる。前述したように、活性成分 1 0 6 は、官能基、スペーサー基、及び結合基を示す特定の化学的部分を含むのが好ましい。これらの用語の特定の定義を下記に示す。活性成分 1 0 6 は、これらの基が組み合わさったものであるのが好ましい。しかしながら、理解しておかねばならないのは、活性成分は、必ずしも 3 つの異なった基を含む必要はない、という点である。例えば、1 つ基が官能基としてもスペーサー基としても作用することが可能である。例えば、官能基（例えば 1 1 0 又は 1 1 2）と反応性基 1 1 6 が同じ化学構造（例えば、二官能性のホモ活性成分）を有することも可能である。活性成分は、下記に記載のように、活性成分のそれぞれの基に関して記載の機能を果たすことだけが必要であり、これらの目的を果たすのに必要とされる部分はごくわずかである。

10

【 0 0 3 4 】

本明細書で使用している“ 官能基 ” 1 1 0 という用語は、一般に非標的化学種とは結びつかないで、表面に対して外部の標的化学種と一般的に相互作用して結合（共有結合と非共有結合の両方）を形成するような基を含むように意図されている。“ 官能基 ” という用語はさらに、不活性官能基 1 1 2 と呼ばれる、外部環境におけるあらゆる化学種の結合及び吸着に対して本質的に不活性であるような基を表わしてよい。

20

【 0 0 3 5 】

特異的結合用に設計された表面の場合、官能基 1 1 0 としては、化学的に活性な基、受容体基、リガンド基、及び所望する標的化学種を選択的に結合することのできるキレーターなどがあるが、これらに限定されない。官能基 1 1 0 のさらに具体的な例としては、例えば、ビオチン、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、ニトロフェニルエステル、カルボキシレート、ビニル、ビニルスルホン、金属キレート、グルタチオン、ストレプトアビジン、ナイトレン、アクリレート基、フェニルボロン酸、ニトロトリ酢酸（NTA）、イミドジアセテート（IDA）、サリチルヒドロキシサム酸、ヒドロキシル基（- OH）、アミン基（- NH₂）、イミン基（- NHR）、カルボン酸（- COOH）、アルデヒド（- CHO）、ケトン（C = O）、エステル（- COOR）、エーテル（- C - O - C）、アミド基（- CONH₂）、イミド（- CONHR）、シアニド（- CN）、ヒドラジド（- NHNH₂）、スクシンイミド（- ONC₄O₂）、マレイミド、チオール（- SH）、ハロゲン化物（- X）、シリル（- SiH）、アジド基（- N₃）、フェニル基、スルホネート（SO₃⁻）、イソチオシアネート、イソシアネート、エポキシド、ニトロベンジル、オキサゾリン、酸塩化物、クロロホルメート、ジスルフィドピリジル、アズラクトン、臭化シアノゲン、フルオロアレーン、フルオロカーボン、ジスルフィド、イソシアニド、スルファアミド、サルフェート、ヘパリン、ペプチド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、有機ケイ素化合物、及び有機ホスフェート（ホスホアミダイト）化合物などがあるが、これらに限定されない。

30

40

【 0 0 3 6 】

特異的な表面結合がほとんど又は全く要求されない表面の場合、不活性官能基 1 1 2 は、エチレングリコールオリゴマー、アクリルアミド、ピロリドン、ポリサッカライド、モノサッカライド、及び極性の合成ポリマー等の非反応性化学基を含む。

【 0 0 3 7 】

官能基の選択は、それぞれの用途に適した官能基を有する誘導体の既知の結合パラメータに基づいて当業者が行う。したがって、外部環境からの選定された標的検体の特異的もしくは非特異的に選択し、そして前記標的検体と結合するように活性成分を設計することができる。

【 0 0 3 8 】

50

本明細書で使用している“スパーサー”という用語は、官能基 110 又は不活性官能基 112 を活性成分 106 の結合基 116 から隔離すべく作用する部分を含むように意図されている。スパーサー基 114 の長さは通常、官能基と結合基が、物理的もしくは化学的に互いに干渉することなくそれぞれの機能を果たすことができるだけの十分な長さである。スパーサーは官能基を結合基に連結し、そしてさらに、塗被した固体支持体 102 から官能基をある距離だけ隔離するのが好ましい。このスパーサー 114 は、標的化学種への官能基 110 の接近しやすさを増し、固体支持体 102 からの立体傷害、あるいは固体支持体 102 との結合干渉を少なくする。

【0039】

スパーサー 114 は、全ての官能基に同じ作用を与えるある一定の長さであるのが好ましいが、このことは必ず必要とされるわけではない。スパーサーの例としては、ヘテロ官能性、二官能性、もしくは多官能性の小さな分子又はポリマーなどがあるが、これらに限定されない。これらの分子は、固体支持体上に共有結合又は安定な皮膜を形成することができ、そして同時に、外部環境から標的化学種を特異的に結合するための官能基をもたすことができる。例えば、二官能性で直鎖の PEG（オリゴマー又はポリマー）、ポリエチレンイミン、ポリスチレン、ポリシロキサン、ポリウレタン、タンパク質、ポリ（アミノ酸）、ポリホスファゼン、テレケリックブロックコポリマー〔プルロニック（Pluronic）（登録商標）〕、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、ポリサッカライド、デンドリマー、高分岐ポリマー、マクロモノマー、架橋用のアルキル連結カップリング剤、及びヘテロ二官能性のアルキル連結カップリング剤；二官能性で星形の PEG（オリゴマー又はポリマー）、ポリエチレンイミン、ポリスチレン、ポリシロキサン、ポリウレタン、タンパク質、ポリ（アミノ酸）、ポリホスファゼン、テレケリックブロックコポリマー（プルロニック）、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、ポリサッカライド、デンドリマー、高分岐ポリマー、マクロモノマー、架橋用のアルキル連結カップリング剤、及びヘテロ二官能性のアルキル連結カップリング剤；並びに二官能性で櫛状の PEG（オリゴマー又はポリマー）、ポリエチレンイミン、ポリスチレン、ポリシロキサン、ポリウレタン、タンパク質、ポリ（アミノ酸）、ポリホスファゼン、テレケリックブロックコポリマー（プルロニック）、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、ポリサッカライド、デンドリマー、高分岐ポリマー、マクロモノマー、架橋用のアルキル連結カップリング剤、及びヘテロ二官能性のアルキル連結カップリング剤；が適切なスパーサーである。

【0040】

本明細書で使用している“結合基” 116 という用語は、活性成分 106 をコーティングマトリックス 100 及び / 又は下側の支持体 102 に結びつけることのできる部分を含むように意図されている。結合基 116 は、活性成分をコーティングマトリックス又は支持体に共有結合で結びつけるように選択するのが好ましい。結合基は、架橋の形でそれ自身と反応してもよい。本発明において使用するための結合基の例としては、シラン、メタクリレート、ジスルフィド、ジシラザン、スルフヒドリル、アクリレート、カルボキシレート、活性化エステル、他の活性離脱基、イソニトリル、イソシアネート、ホスホアミダイト、ナイトレン、エポキシド、ヒドロシリル、エステル、アレーン、アジド、アミン、ニトリル、ビニル基、アルキルホスホネート、及び表面への化学カップリングに関連した当業者に公知の表面カップリング用反応性化学種などがあるが、これらに限定されない。

【0041】

好ましい実施態様においては、活性成分 106 は、結合基部分を有するある量の反応性化学種（例えば、アミノ末端アルキルシラン）と末端官能基を有するスパーサー〔例えば、ビオチン - PEG - CO₂ - N - ヒドロキシスクシンイミジル（NHS - PEG - ビオチン）〕とを化合させることによって生成される。この化合の結果、反応性基もしくは結合基として作用させるのに利用できる末端シラン、スパーサー基として作用する PEG 部分、及び官能基として作用するビオチンを有する活性成分が得られる。活性成分は、X - PEG - Y という一般的な分子式を有し、このとき X は官能基であり、Y は結合基である。

一連の可能な官能基を前記したが、好ましい官能基の例としては、ビオチン、N - ヒドロキシスクシンイミド、ビニルスルホン、金属イオンキレート（例えば、 Ni^{2+} - NTA）、グルタチオン結合基、アミノ、アルデヒド、エポキシ、メルカプト、マレイミド、ヘパリン、メトキシ、及びスルホネートなどが挙げられる（但し、これらに限定されない）。好ましい結合基の例としては、シラン、アジド、アクリレート、アルデヒド、イソシアネート、ホスホネート、及びエポキシなどがあるが、これらに限定されない。

【0042】

本発明の方法は、ある溶媒中への活性成分106の0.001モル/リットル～0.1モル/リットル溶液を作製することを含むのが好ましく、0.05モル/リットル～0.02モル/リットル溶液を作製することを含むのがさらに好ましく、0.01モル/リットル溶液を作製することを含むのが最も好ましい。前述したように、活性成分106は、式X - PEG - シランの分子であるのが好ましく、このときXは官能基（例えば、ビオチン、ビニルスルホン、又はN - ヒドロキシスクシンイミジルエステル）であり；PEGはポリエチレングリコールポリマー（2000～5000原子質量単位の分子量を有するのが好ましい）であり；シランは加水分解可能なシラン前駆体基（例えば、トリアルコキシシランやトリクロロシラン）である。

10

【0043】

好ましい実施態様においては、活性成分106は、ビオチン - PEG - CO_2 - N - ヒドロキシスクシンイミド〔ビオチン - PEG - NHS、分子量3400、例えばシェアウォーター社（Shearwater Corp.）のOH2Z0F02〕とアミノ末端アルコキシシラン〔（3 - トリメトキシシリルプロピル） - ジエチレントリアミン、例えばゲレスト社（Gelest）のSIT8398.0〕とを選定された溶媒中にて1：1のモル比で反応させることによって形成されるビオチン - PEG - シラン分子である。この反応は、室温で2時間行うのが好ましい。ビオチン - PEG - NHS上のN - ヒドロキシスクシンイミド基がアミノシラン上の末端アミンと確実に反応して、ビオチン - PEG - シラン活性成分を生成する。活性成分のための溶媒の例としては、N, N - ジメチルアセトアミド（DMAC、アルドリッチ27, 055 - 5）がある。

20

【0044】

他の好ましい実施態様においては、2種の活性成分（ビオチン - PEG - シランとメトキシ - PEG - シラン）をコーティング混合物中に混ぜ合わせる。ビオチン官能基を“不活性”のメトキシ基中に希釈することによって、結びつけられたストレプトタビジンのビオチン結合活性を増大させることができる。第1の活性成分は、上記パラグラフに記載のビオチン - PEG - シラン（分子量3400）である。第2の活性成分はメトキシ - PEG - シランであり、メトキシ - PEG - $\text{OCH}_2\text{CH}_2 - \text{CO}_2$ - N - ヒドロキシスクシンイミド（メトキシ - PEG - NHS）〔3400未満の分子量であるのが好ましく、2000の分子量であるのが最も好ましい（例えば、シェアウォーター社の2M4M0D01）〕とアミノ末端アルコキシシラン〔（3 - トリメトキシシリルプロピル） - ジエチレントリアミン、例えばゲレスト社のSIT8398.0〕とを選定された溶媒中にて1：1のモル比で反応させることによって形成される。

30

【0045】

他の好ましい実施態様においては、活性成分はメトキシ - PEG - シランであり、メトキシ - PEG - $\text{OCH}_2\text{CH}_2 - \text{CO}_2$ - N - ヒドロキシスクインイミド（分子量5000、例えばシェアウォーター社の2M4M0H01）とアミノ末端アルコキシシラン〔（3 - トリメトキシシリルプロピル） - ジエチレントリアミン、例えばゲレスト社のSIT8398.0〕とを選定された溶媒中にて1：1のモル比で反応させることによって形成されるのが好ましい。

40

【0046】

他の好ましい実施態様においては、活性成分106はビニルスルホン - PEG - シランであり、ビニルスルホン - PEG - CO_2 - N - ヒドロキシスクインイミド（分子量3400、例えばシェアウォーター社の2Z5B0F02）とアミノ末端アルコキシシラン〔（

50

3 - トリメトキシシリルプロピル) - ジエチレントリアミン、例えばゲレスト社の S I T 8 3 9 8 . 0) とを選定された溶媒中にて 1 : 1 のモル比で反応させることによって形成されるのが好ましい。

【0047】

他の好ましい実施態様においては、活性成分 106 は N H S - P E G - シランであり、P E G の二官能性 N - ヒドロキシスクシンイミジルエステル (S P A - P E G - S P A 、分子量 3400、例えばシェアウォーター社の 4 M 4 M 0 F 0 2) とアミノ末端アルコキシシラン ((3 - トリメトキシシリルプロピル) - ジエチレントリアミン、例えばゲレスト社の S I T 8 3 9 8 . 0) とを選定された溶媒中にて 2 : 1 のモル比で反応させることによって形成されるのが好ましい。他の実施態様においては、活性成分 106 は C O O H - P E G - シランであり、C O O H - P E G - N - ヒドロキシスクシンイミド (分子量 3400、例えばシェアウォーター社の 0 Z 2 Z 0 F 1 2) とアミノ末端アルコキシシラン ((3 - トリメトキシシリルプロピル) - ジエチレントリアミン、例えばゲレスト社の S I T 8 3 9 8 . 0) とを選定された溶媒中にて 1 : 1 のモル比で反応させることによって形成されるのが好ましい。

10

【0048】

本発明において使用するための架橋用成分とマトリックス形成用成分

本発明の“架橋用成分”108とはここでは、適切な刺激によって活性化されると、皮膜 100 内での架橋による安定化だけでなく、種々の固体支持体 102 への共有結合もしくは皮膜の吸着的な結びつきをもたらす、複数の反応性部分を含んだ反応性分子と定義される。

20

【0049】

ある実施態様においては、架橋用成分 108 は、アルキルシラン反応性末端基とスルホニルアジド反応性末端基を含み、これらが組み合わさると 2 元の反応性官能価 (d u a l r e a c t i v e f u n c t i o n a i l i t i e s) が生じ、これをキャアールすると反応が進行して、コーティング内において及び種々の支持体 102 に対して自発的な架橋を形成する。代表的な架橋基としては、下記の物質からの基と化合する分子が挙げられる：メタクリレート、アクリレート、エポキシド、シラン、ペルフルオロフェニルアジド、アリールアジド、ビス - ナイトレン、アシルアジド、アジドホルメート、スルホニルアジド、ホスホリルアジド、ジアゾアルカン、ジアゾケトン、ジアゾアセテート、 β - ケト - α - ジアゾアセテート、脂肪族アゾ、ジアジリン、ケテン、光活性化ケトン、ジアルキルペルオキシダーゼ、ジアシルペルオキシダーゼ、又はキノン。1つの例としては 6 - アジドスルホニルヘキシルトリエトキシシランを挙げることができ、この物質は、支持体 (例えば、酸化ポリマー、金属酸化物、シリコンウエハー、ケイ酸塩、チタン酸塩、アルミン酸塩、又はガラス) の表面上に存在する反応性のヒドロキシル基と共有結合を形成することができるシラン基を含む。これらのシラン基はさらに、互いに架橋することも、あるいは他のシラン基と架橋することもでき、三次元の架橋マトリックスを形成する。アジドスルホニル基は、支持体 102 上にて、及び / 又は塗被可能な多成分マトリックス 104 内にて、脂肪族化合物及び芳香族化合物と共有結合を形成することができる。

30

【0050】

本明細書で使用している“マトリックス形成用成分”104という用語は、生物学的物質 (例えば、タンパク質、ポリサッカライド、細胞、及びバクテリア) 及び非生物学的物質 (例えば、粒子、コロイド物質、イオン性物質、シリカ含有物質、及び炭素質物質) に対して低い非特異的結合特性を与える物理的特性を有することが当業界に知られている分子を含むように意図されている。O s t u n i , E . ; C h a p m a n , R . G . ; H o l m l i n , R . E . ; T a k a y a m a , S . ; W h i t e s i d e s , G . M . L a n g m u i r , 17 : 5605 - 5620 (2001)。このようなマトリックス形成用分子は一般に下記の特性の 1 つ以上を含む：このような分子は、極性、親水性、及び電氣的に中性であり、水素結合受容体であり、一般には立体配座上のフレキシビリティを示す。

40

50

【0051】

マトリックス形成用成分104の例としては、ポリオキシエチレンソルビタンテトラオレエート（PST）、ポリオキシエチレンソルビトールヘキサオレエート（PSH）、ポリオキシエチレン6トリデシルエーテル、ポリオキシエチレン12トリデシルエーテル、ポリオキシエチレン18トリデシルエーテル、ツイーン（Tween）（登録商標）界面活性剤、トリトン（Triton）（登録商標）界面活性剤、及びポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマー〔例えば、BASF社から市販のプルロニック（Pluronic）（登録商標）製品シリーズやポロキサマー（Poloxamer）（登録商標）製品シリーズ〕を含めたポリエチレンベースの界面活性物質があるが、これらに限定されない。他のマトリックス形成用成分としては、デキストラン、直鎖のPEG分子（MW 500～5,000,000）、星形のPEG分子、櫛形の高分岐PEG分子、及び樹枝状の高分岐PEG分子、類似の直鎖ポリアミンポリマー、類似の星形ポリアミンポリマー、類似の樹枝状ポリアミンポリマー、種々のカーボネート化界面活性剤、種々のペルフルオロ素化界面活性剤〔例えば、デュポン社のゾニル（Zonyl）（登録商標）フルオロ界面活性剤〕、及び種々のケイ素化界面活性剤（例えば、ジメチルシロキサン-エチレンオキシドブロックコポリマー）などがある。生物学的物質由来のマトリックス形成用成分104としては、カゼイン、血清希釈物、ウシ血清アルブミン、糖脂質と脂質、ヘパリンとそれに関連したグリコサミノグリカン、muscin、及びポリサッカライド（デキストラン、ヒアルロン、セファローズ、セルロース、アガロース、コンドロイチン、キトサン）などがある。

10

20

【0052】

架橋用成分108とマトリックス形成用成分104との溶液はキャリアー溶媒中にて形成される。前述したように、マトリックス形成用成分104は、直鎖もしくは分岐鎖のポリオキシエチレン含有界面活性剤であるのが好ましい。マトリックス形成用成分104は、ポリオキシエチレンソルビタンテトラオレエート（PST、例えばアルドリッチ46,639-5）であるのが最も好ましい。マトリックス形成用成分は、最終的なコーティング混合物において0.01～5%（vol/vol）の溶液が得られるように溶解するのが好ましい。マトリックス形成用成分は、最終的なコーティング混合物において0.5～2%の濃度を有するのがさらに好ましい。マトリックス形成用成分104の濃度は、最終的なコーティング混合物において1%（vol/vol）であるのが最も好ましい。

30

【0053】

前述したように、架橋用成分108は二官能性の化学反応性化合物であるのが好ましく、分子の一端にアジド官能性を、そして分子の他端にアルキルシラン官能性を有する二官能性のヘテロ分子であるのがさらに好ましい。架橋用成分108はアジドシラン（6-アジドスルホニルヘキシル-トリエトキシシラン、95%；例えばゲレスト社のSIA0780.0）であるのが最も好ましい。架橋用成分は、0.001～0.5モル/リットルの溶液が得られるように溶解するのが好ましく、0.005～0.1モル/リットルの溶液が得られるように溶解するのがさらに好ましい。架橋用成分108は、0.02モル/リットルの溶液が得られるように溶解するのが最も好ましい。架橋用成分/マトリックス形成用成分混合物のための好ましい溶媒はジメチルスルホキシド（DMSO、例えばアルドリッチ47,230-1）であるが、他の溶媒も使用可能であると考えられる。

40

【0054】

本発明において使用するためのコーティング溶液

使用に関して説明すると、本発明のコーティング溶液100は、本発明の活性成分溶液と、本発明の架橋用成分108/マトリックス形成用成分104の混合物とを種々の異なった体積比にて混合することによって得られる。最も好ましい体積比は、活性成分溶液と架橋用成分/マトリックス形成用成分溶液との比が約1：4である。コーティング溶液における最も好ましい最終成分濃度は、活性成分（例えば、ビオチン-PEG-シラン）が0.002モル/リットル、マトリックス形成用成分（ポリオキシエチレンソルビタンテトラオレエート）が0.009モル/リットル、及び反応性成分（アジドシラン）が0.0

50

【 0 0 5 5 】

10

【 0 0 5 6 】

20

30

【 0 0 5 7 】

40

【 0 0 5 8 】

50

ねばならないことは、特定の用途に対しては第2の、そして場合によっては第3の、支持体へのコーティング混合物の塗り又は塗被が行われる、という点である。これらの追加塗被によって、コーティング混合物層の厚さを変えることができる。標的 support 体上のコーティングの厚さは、一般には約 5 ~ 200 nm であり、好ましくは約 20 ~ 30 nm である。しかしながらコーティングは、本明細書に記載の機能を果たすのに充分である限り他の厚さであってもよい。

【0059】

留意しておかねばならないことは、上記成分の組み合わせ物が、当該成分のサブセットを含んだ同じコーティングより優れた性能を示すコーティング 100 をもたらす、という点である。後述の実施例 XV に示すように、本発明の実施態様は、上記の全ての成分（活性成分 106、架橋用成分 108、及びマトリックス形成剤 104）がコーティング表面 100 に存在するときに最適に機能する。しかしながら、本発明の実施態様は、上記成分のうちの1つを除外してもよく、最適とは思われない仕方での機能（特異的結合と非特異的結合）ではあるものの、それでもあるレベルの機能を維持する。

10

【0060】

表面塗被した標的 support 体の硬化

いったん塗被した後に、公知の方法を使用して硬化することにより、支持体にコーティングが安定化される。硬化工程は、減圧オープン中における熱的活性化であるのが好ましい。硬化工程は、減圧オープン内の圧力を真空ポンプにより 30 分で 150 mmHg（絶対）の圧力に低下させる室温排気工程を含むのがさらに好ましく、その後オープン 40 ~ 140 に（最も好ましくは 70 に）加熱する。この方法では、熱硬化工程全体に約 1 時間かかる。硬化温度と硬化時間は、ある程度は支持体物質の物理的特性に依存する。したがって、支持体 102 の温度と物理的特性に応じて、より短い硬化時間又はより長い硬化時間が必要とされる。次いで塗被した表面を室温に自然冷却する。この複数工程からなる硬化プロセスは有益である。なぜなら、溶媒の除去を可能にし、堅牢で密着性の機能性コーティング 100 を形成させるための充分な反応時間と反応温度をもたらすからである。

20

【0061】

硬化工程は本発明の機能性表面を安定化させる。留意しておかねばならないことは、硬化工程は、熱による活性化（前述）、光による活性化、化学的活性化、あるいは支持体への結合だけでなく機能性表面内において架橋を生成する他のいかなるタイプの硬化であってもよい。熱活性化としては、例えばオープン中での加熱があり、光活性化としては、例えば紫外線照射があり、化学的活性化としては、例えば架橋を化学的に起こしやすくする水中浸漬などがある。化学的架橋はさらに、外部からの刺激（例えば、縮合のようなエージングプロセス）がなくても進行してよい。他のいかなる態様の化学的・物理的な変形あるいは硬化も、当業者が周知しているように使用することができる。

30

【0062】

本発明において使用するための結合アッセイの例

本発明のある実施態様においては、生化学的もしくは生体分析的な結合アッセイを行うための機能性表面 100 が提供される。この機能性表面は、コーティングベース配合物中の適切な官能基化学を変えることによって特定の用途に適用可能な一般的なベース組成物を、幾つかの異なった種類の界面特性に容易に適合しうるカセットスタイルのフォーマットにて含む。表面コーティングは、多くの用途にまたがったプラットフォーム化学（platform chemistry）の、容易でカスタマイズされた調整を可能にする下記のような成分を含んだ状態で作製される：支持体上及び/又は支持体に固定された非特異的結合マトリックス；並びに非特異的結合マトリックスに固定された活性成分。

40

【0063】

活性成分 106 は、機能性表面 100 の製造法に関して前述したものと同一であるのが好ましい。非特異的結合マトリックスは、支持体上及び/又は支持体への活性成分の付着を容易にする。非特異的結合マトリックスは、マトリックス形成用成分と架橋用成分を含む

50

のが好ましい。マトリックス形成成分と反応性成分は、機能性の選択的結合表面を形成するための方法に関して前述したものと同一である。下側支持体上及び／又は下側支持体へのコーティングの付着は、化学反応を介しての支持体への直接的な共有結合に加えて、架橋した不溶性の皮膜マトリックスと支持体との間の複数の非共有結合的相互作用（non-covalent interactions）（例えば、物理的な絡み合いや非共有結合）によって促進されると考えられる。

【0064】

本発明の表面化学品は、免疫診断、遺伝子マイクロアレイとタンパク質マイクロアレイ、及びマイクロ流体“lab-on-a-chip”デバイスを含めた多くの分析システムにおいて使用することができる。これらの分析セッティング（analytical settings）への表面化学品の適用は、本発明の組成と方法を使用して当業者に公知の仕方で行われる。本発明において使用するための分析アッセイの例としては、TMB-マイクロウェルアッセイ（後述の実施例において説明する）、スタフィロコッカス・エンテロトキシンBサンドイッチアッセイ（後述の実施例において説明する）、オリゴヌクレオチドマイクロアレイアッセイ（後述の実施例において説明する）、並びに抗原、病原体、粒子、薬物、毒素、及び代謝産物の存在を定量化する他の捕捉アッセイなどがあるが、これらに限定されない。

【0065】

留意しておかなければならないことは、本発明の表面コーティング100の異なった実施態様を、適合性のある有用な標的アッセイ成分を含んだ多くの表面コーティングと一緒にパッケージ化して、分析アッセイを行うのに適したキットを得ることができる、という点である。例えば、キットは、作製される表面コーティングの溶液、標的支持体（例えば、下塗りしてあるスライドガラス又は下塗りしていないスライドガラス）、アッセイ成分（例えば、標識付けした抗体）、及び他の有用なツール（ピペット、フィルター、チューブなど）を含んでよい。さらに留意しておかなければならないことは、キットは、目的とする特定のアッセイに対して使用するための標的表面コーティングを予備塗被した支持体と一緒にパッケージ化することもできる、という点である。

【0066】

さらに、本発明の表面化学品を医療デバイスのインプラントの分野で利用して、埋め込まれたデバイスへの非特異的結合を抑制するか又は起こさせないようにすることができる。例としては、現行デバイス（例えば、カテーテル、シャント、ポンプ、濾過膜、ステント、弁、膜、及び他のデバイス）の表面へのコーティングが挙げられる。このようなコーティングは通常、生物学的成分、細胞、及び微生物の非特異的吸着を少なくするために使用される。

【0067】

他の有用と思われる実施態様においては、本発明の表面化学品を医療デバイスのインプラントの分野で利用して、活性な機能をもたらすコーティングを得ることができる。例えば、本発明の表面化学品を使用して、制御放出用の薬物を捕捉することができる。他の例においては、本発明の表面化学品を使用して、薬物、治療用タンパク質、又は抗菌性化合物などをデバイスの表面に拘束することができる。

【0068】

本発明を一般的に説明してきたが、下記の実施例を参照すれば本発明の理解がより深まるであろう。これらの実施例は例示のために記載されており、本発明がこれらの実施例によって限定されることはない。

【0069】

（実施例I）

SiO₂/Si支持体に対する低い非特異的結合（NSB）のビオチン化表面コーティング化学品

本実施例は、処理されたSiO₂/Si支持体へのタンパク質のNSBを制限する上での、本発明の実施態様の有用性を説明している。コーティング溶液を調製し、これを使用し

10

20

30

40

50

て、フラットの SiO_2/Si 支持体上に低 NSB のビオチン化表面コーティングを形成させた。本実験では、未処理の SiO_2/Si 支持体に対する、又は低 NSB でビオチン化された、表面塗被した SiO_2/Si 支持体に対する非特異的結合のレベルを調べた。

【0070】

コーティング溶液の調製： ポリプロピレンのバイアル中にて、 $26.5\mu\text{l}$ の (3 - トリメトキシシリルプロピル) - ジエチレントリアミン (ゲレスト社) を 10ml の有機溶媒中に加えることによって、アミノシランの有機溶媒溶液を調製した。ジメチルスルホキシド (DMSO) 又は N, N - ジメチルアセトアミド (DMAC) を溶媒として使用することができる (どちらもアルドリッチ社から市販)。次いで、この溶液の 1.0ml を 40mg の量のビオチン - PEG - $\text{CO}_2\text{-N}$ - ヒドロキシスクシンイミジル (ビオチン - PEG - NHS、シェアウォーターポリマー社) (PEG は分子量 3400 のポリエチレングリコールである) に加えた。ビオチン - PEG - NHS の NHS 基がアミノシラン上の末端アミンと反応してビオチン - PEG - シラン分子を形成する。ビオチン - PEG - シラン / DMAC 溶液を溶液 A と呼ぶ。

10

【0071】

別のバイアルにおいて、 $70.6\mu\text{l}$ の 6 - アジドスルホニルヘキシル - トリエトキシシランを 10ml の DMSO に加えた。この溶液に $125\mu\text{l}$ のマトリックス形成剤 (ポリオキシエチレンソルビタンテトラオレエート、PST、アルドリッチ) を加えて溶液 B を得た。溶液 A と溶液 B とを 1 : 4 の体積比で混合 (1ml の溶液 A を 4ml の溶液 B に加える) して、標的支持体上へのスピンコーティングに使用するための最終的なコーティング溶液混合物を得た。

20

【0072】

スピンコーティング： 5 インチのシリコンウエハー (p 型又は n 型、片面研磨の試験グレードウエハー) をスピンコーター (ローレル・テクノロジー社) に設置し、 5000rpm で回転させた。回転しているウエハー上にコーティング溶液 (0.5ml) を施し、ウエハーを 90 秒回転させた。

【0073】

塗被したシリコンウエハーを、真空ポンプにて 30 分で 150mmHg (絶対) の減圧に下げた減圧オープン中に 30 分置いた。オープンのスイッチを入れ、約 140°C に加熱した。熱処理 (加熱の傾斜と加熱の保持) の合計は 2 時間であった。次いで、ウエハーを周囲空気中にて室温に自然冷却した。

30

【0074】

シリコン接着剤のボーダー・パターン (border pattern) を表面上にスタンピングすることによって、ウエハー上に直径 6mm のサンプルスポットを限定した。ウエハーを、当業界によく知られているようにさいの目に切断し、種々のアッセイにおいて使用した。

【0075】

非特異的タンパク質結合 (NSB) アッセイ： 下記のアッセイは、コーティング溶液で処理したウエハー表面上への、可溶性球状血清タンパク質モデルの非特異的結合のレベルを示している。非特異的結合タンパク質のモデルとしては、免疫グロブリン G (IgG) 抗体 (160kDa) を使用した。具体的には、ウサギの抗ヒツジ IgG (KPL ラボラトリーズ) のホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ接合体をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に溶解して、一連の IgG 濃度 ($0.1 \sim 10\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲) を得た。アッセイしようとするサンプル ("試験片") を先ず高純度水で 3 回すすぎ洗いし、 N_2 ガスの流れで吹きつけ乾燥した。 $20\mu\text{l}$ の種々の濃度の IgG - PBS 溶液をテストスポット上に置き、 100% (公称) 湿度のチャンバー中にて 37°C で 30 分インキュベートした。種々の IgG 試験濃度を下記のように使用した。インキュベーション後、テストスポットを再び高純度水で 3 回すすぎ洗いし、 N_2 ガスで吹きつけ乾燥した。次いで、 $20\mu\text{l}$ 小滴の市販のテトラメチルベンジジン (TMB) ペルオキシダーゼ基質をそれぞれのテストスポットに加えた。各試験片を、 100% (公称) 湿度のチャンバー中にて 37°C で

40

50

30分インキュベートした。

【0076】

このアッセイにおいては、HRPが不溶性の表面付着膜の形成を触媒し、こうした形成は比色分析によって、あるいは偏光解析法によって検知することができる。したがって、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼに結合したIgGの試験片へのNSBのレベルが高くなるほど、表面付着膜のレベルが高くなる。

【0077】

対照標準実験：ベース支持体とBSAブロッキング 上記のコーティング溶液で処理した支持体の他に、2つのNSB対照標準実験も並行して行った：(1)裸のSiO₂/Siウエハー支持体；及び(2)ウシ血清アルブミン(BSA)でブロックしたSiO₂/Siウエハー。BSA-ブロッキングは、バイオアッセイ表面上への非特異的なタンパク質結合を阻害するための、現在最も広く使用されている方法である。短時間にて、未処理のシリコンウエハー片を高純度水で3回すすぎ洗いし、N₂ガスで吹きつけ乾燥した。PBS中に溶解して得た1%BSA溶液の40μl小滴を、6mmの各テストスポット上に置いた。小滴がテストスポット全体を覆い、次いでこれを、37℃の温度及び100%(公称)の相対湿度にて1時間インキュベートした。BSA溶液を高純度水ですすぎ洗いし、N₂ガスで吹きつけ乾燥し、BSAブロックのSiO₂/Si支持体に対して上記のNSBアッセイを行った。

10

【0078】

図2のデータから、本実施例の塗被又は処理されたSiO₂/Si支持体が、いずれの試験濃度においても検出可能なIgG非特異的結合を殆どもしくは全く示さなかったことがわかる(ぬりつぶした棒線)。これとは対照的に、BSAブロックのウエハーは、はるかに高いレベルのIgG NSBを示した(ぬりつぶしていない棒線)。留意しておかなければならないことは、BSAブロック表面のデータには大きな誤差棒線が示されており、このことはブロッキング法の場合には、一般にIgG NSBにばらつきが生じることを示している。裸のSiO₂/Siウエハーの場合にはNSBがかなり高く、1μg/mlと10μg/mlのIgGタンパク質の負荷に対してはオフスケール(off-scale)を増した(データは図示せず)。

20

【0079】

このデータから、SiO₂/Si支持体へのタンパク質のNSBを抑制するか又は起こさせないようにするのに本発明のビオチン機能性表面が効果的である、という結論が支持される。これとは対照的に、裸のSiO₂/Si支持体とBSAブロックのSiO₂/Si支持体(より程度は小さい)は、より高いレベルの非特異的タンパク質結合を示し、この点からも、本発明の機能性表面が効果的であることがわかった。

30

【0080】

(実施例II)

SiO₂/Si支持体に対する、低い非特異的結合(NSB)でチオール反応性の表面コーティング化学品

本実施例は、処理されたSiO₂/Si支持体へのタンパク質のNSBを制限する上で、本発明の他の実施態様が有用であることを示す。コーティング溶液を調製し、これを使用して、SiO₂/Si支持体上に低NSBでチオール反応性の表面コーティングを形成させた。未処理のSiO₂/Si支持体への、又は低NSBでチオール反応性の表面塗被したSiO₂/Si支持体への非特異的結合のレベルを調べるために実験を行った。

40

【0081】

コーティング溶液の調製： 実質的に実施例Iに記載のようにコーティング溶液を調製した。但し、ビオチン-PEG-NHSをビニルスルホン-PEG-NHS(シェアウオーター)で置き換えた。スピンコーティングも、実質的に実施例Iに記載のように行った。

【0082】

スピンコーティングしたウエハーを、真空ポンプにて30分で150mmHg(絶対)の減圧にした真空オープン中に置いた。オープンのスイッチをいれ、約70℃に加熱した。

50

熱処理（加熱の傾斜と加熱の保持）の合計時間は4時間であった。次いで、ウエハーを周囲空気中にて室温に冷却した。

【0083】

シリコン接着剤のボーダー・パターンを表面上にスタンピングすることによって、ウエハー上に直径6mmのサンプルスポットを限定した。ウエハーをさいの目に切断し、種々のアッセイにおいて使用した。

【0084】

非特異的タンパク質結合（NSB）アッセイ：可溶性のTMB - マイクロウェルアッセイを使用して非特異的タンパク質結合を評価した。簡単に言えば、実施例1に記載のように、各試験片を高純度水ですすぎ洗いし、乾燥し、ウサギの抗ヒツジIgGのホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ接合体の溶液を使用してインキュベートした。留意しておかなければならないことは、本実施例のPBS溶液が0.1%のツイーン20界面活性剤を含んでいたという点である。タンパク質のインキュベーションとすすぎ洗いの後、市販のテトラメチルベンジジン（TMB）の可溶性ペルオキシダーゼ基質溶液の20μl小滴を、それぞれのテストスポットに加えた。37℃の温度と100%（公称）の相対湿度で30分インキュベーションした後、それぞれのTMB小滴に20μlの停止液を加えた。この停止液により、酵素反応が停止し、小滴の色の変化が固定される。マイクロピペットを使用して小滴を合わせ、80μlのサンプルを試験片からマイクロタイタープレートに移した。450nmでの光学濃度をモニターするプレートリーダーを使用して、ペルオキシダーゼ反応（この反応は、各試験片に非特異的に結合したIgG - HRPの量に直接関係している）の程度を定量化した。

10

20

【0085】

対照標準実験：裸の支持体とBSAブロッキング 上記のコーティング溶液で処理した支持体の他に、2つのNSB対照標準実験も並行して行った：（1）裸のSiO₂/Siウエハー支持体；及び（2）ウシ血清アルブミン（BSA）でブロックしたSiO₂/Siウエハー。実施例1に記載のように、BSA - ブロッキングは、バイオアッセイ表面上への非特異的なタンパク質結合を阻害するための、現在最も広く使用されている方法である。BSAブロッキングのプロトコルは、実施例Iに記載のものと実質的に同じである。試験片を高純度水で3回すすぎ洗いし、N₂ガスで吹きつけ乾燥した。PBS中に溶解して得た1%BSA溶液の40μl小滴を、6mmの各テストスポット上に置いた。小滴がテストスポット全体を覆い、次いでこれを室温及び100%（公称）の相対湿度にて1時間インキュベートした。BSA溶液を高純度水ですすぎ洗いし、N₂ガスで吹きつけ乾燥した。

30

【0086】

NSBの結果 図3のデータから、本実施例の塗被又は処理されたSiO₂/Si支持体が、試験したIgG濃度のいずれにおいても検出可能なIgG結合を殆どもしくは全く示さなかったことがわかる（ぬりつぶした棒線）。これとは対照的に、BSAブロックのウエハーは、はるかに高いレベルのIgG NSBを示した（斜線入り棒線）。留意しておかなければならないことは、BSAブロック表面のデータには大きな誤差棒線が示されており、このことはブロッキング法の場合には、一般にIgG NSBにばらつきが生じることを示している。裸のSiO₂/Siウエハーの場合にはNSBがかなり高く（ぬりつぶしていない棒線）、1μg/mlと10μg/mlのIgGタンパク質の負荷に対してはオフスケールを増した（データは図示せず）。

40

【0087】

このデータから、SiO₂/Si支持体へのタンパク質のNSBを抑制するか又は起こさせないようにするのに本発明のチオール反応性の機能性表面が効果的である、という結論が支持される。これとは対照的に、裸のSiO₂/Si支持体とBSAブロックのSiO₂/Si支持体（より程度は小さい）は、より高いレベルの非特異的タンパク質結合を示し、この点からも、本発明の機能性表面が効果的であることがわかった。

【0088】

50

(実施例 I I I)

プラスチック (ポリマー) 支持体に対する、低い非特異的結合 (N S B) のビオチン化表面コーティング化学品

本実施例は、プラスチック (ポリマー) 支持体へのタンパク質の N S B を制限する上で、本発明の他の実施態様が有用であることを示す。コーティング溶液を調製し、これを使用して、プラスチック支持体 (例えば、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリエーテルイミド、及びポリエーテルスルホン) 上に低 N S B でビオチン化された表面コーティングを形成させた。未処理のプラスチック支持体への、又は低 N S B でビオチン化・表面塗被したプラスチック支持体への非特異的結合のレベルを調べるために実験を行った。

【0089】

ポリスチレン (P S) ポリスチレン支持体は、厚さが約 2 mm で 3 インチの親水性ディスクで構成された。細菌学的グレードのポリスチレンペトリ皿 (V W R) からディスクを切断した。コーティング溶液の調製は、実施例 I に記載の手順と同じであった。ポリスチレンペトリ皿にコーティング溶液を塗被する前に、疎水性のポリスチレン表面に酸化工程を施した。ディスクを濃硫酸 (95% H_2SO_4 、マリンクロット) 中に 2 分浸漬することによって、表面の酸化を行った。ディスクを高純度水で十分にすすぎ洗いし、 N_2 ガスで吹きつけ乾燥した。ディスクをスピコーターに据え付け、5000 rpm で回転させた。回転しているディスク上にコーティング溶液 (0.5 ml) を分与し、90 秒間回転させた。この時点でさらに 0.5 ml のコーティング溶液を分与し、90 秒間回転させた。このようにして、P S 表面に対し、回転プロセス中にコーティング溶液を 2 回塗被した。

【0090】

塗被した P S ディスクを、150 mm Hg (絶対) に排気した真空オーブン中に室温にて 30 分置いた。ポンプで 30 分引いた後、オーブンのスイッチを入れ、減圧下にてサンプルを 90 に加熱した。熱処理の合計時間 (加熱の傾斜と加熱の保持) は 4 時間であった。次いで各サンプルを、周囲雰囲気にて室温に自然冷却した。冷却後、シリコーン接着剤のボーダー・パターンをスタンピングすることによって、表面上に 6 mm のサンプルスポットを限定した。

【0091】

ポリスルホン (P S U)、ポリエーテルイミド (P E I)、及びポリエーテルスルホン (P E S) これらの支持体は、0.02 インチ厚さの市販のフィルム素材から切断した 2 インチの正方形クーポンから構成された。これらのクーポンを、非イオン性洗剤 (トリトン X - 100) の浴中で 15 分超音波処理することによって清浄化した。高純度水で充分すすぎ洗いした後、クーポンをエタノール / 水 (50 / 50) 溶液中でさらに 15 分超音波処理し、水ですすぎ洗いし、 N_2 ガスで吹きつけ乾燥した。

【0092】

コーティング溶液の調製は、実施例 I に記載の手順と実質的に同じであった。クーポンをスピコーターに据え付け、5000 rpm で回転させた。0.3 ml のコーティング溶液を分与し、90 秒間回転させた。真空ポンプにより 30 分で 150 mm Hg (絶対) の減圧にした真空オーブン中にクーポンを配置した。次いでオーブンのスイッチを入れ、約 140 に加熱した。熱処理の合計時間 (加熱の傾斜と加熱の保持) は 2 時間であった。クーポンを周囲空気にて室温に冷却した。表面上にシリコーン接着剤をスタンピングすることによって、ウェハー上に直径 6 mm のサンプルスポットを限定した。

【0093】

非特異的結合 (N S B) アッセイ 可溶性の T M B - マイクロウェルアッセイを使用して、非特異的タンパク質結合を評価した。最初に、塗被した P S 表面、P S U 表面、P E I 表面、又は P E S 表面をすすぎ洗いし、ウサギの抗ヒツジ Ig G のホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ接合体 (実施例 I に記載) と共にインキュベートした (但し、リン酸緩衝生理食塩水も 0.1% のツイーン 20 界面活性剤を含有した)。タンパク質のインキュベーションとすすぎ洗いの後、市販のテトラメチルベンジジン (T M B) の可溶性ペルオキシダーゼ基質溶液の 20 μ l 小滴を、それぞれのテストスポットに加えた。37 の温

10

20

30

40

50

度と100%（公称）の相対湿度で30分インキュベーションした後、それぞれのTMB小滴に20 μ lの停止液を加えた。この停止液により、酵素反応が停止し、小滴の色の変化が固定される。マイクロピペットを使用して小滴を合わせ、80 μ lのサンプルを試験片からマイクロタイタープレートに移した。450nmでの光学濃度をモニターするプレートリーダーを使用して、ペルオキシダーゼ反応（この反応は、各試験片に非特異的に結合したIgG-HRPの量に直接関係している）の程度を定量化した。

【0094】

NSBの結果 図4は、代表的な非特異的タンパク質（IgG）結合の結果を示している。これらのデータは、従来のウシ血清アルブミン（BSA）によるブロッキング（ぬりつぶしていない棒線）に対する我々の表面コーティング（ぬりつぶした棒線）の性能を比較している。これらのデータは、それぞれのプラスチック支持体に対する10 μ g/mlでのインキュベーションに対応しており、これらの広く使用されているプラスチック支持体に対し、NSBを阻害する上ではBSAブロッキングよりも我々の表面コーティングのほうがより効果的であることを示している。

10

【0095】

（実施例IV）

金属/金属酸化物支持体に対する、低い非特異的結合（NSB）のビオチン化表面コーティング化学品

本実施例は、金属/金属酸化物支持体へのタンパク質のNSBを制限する上で、本発明の実施態様が有用であることを示す。コーティング溶液を調製し、これを使用して、金属/金属酸化物支持体上に低NSBでビオチン化された表面コーティングを形成させた。BSAブロックされた金属/金属酸化物支持体への、又は低NSBでビオチン化・表面塗被した金属/金属酸化物支持体への非特異的結合のレベルを調べるために実験を行った。

20

【0096】

金属支持体は、5インチのシリコンウエハー上に蒸着させた30nmの金フィルムで構成された。金と酸化ケイ素との間に、約5nmのクロムの密着中間層を使用した。コーティング溶液の調製は、実施例Iに記載の手順と同じであった。金で被覆されたウエハーをスピンコーター中に据え付け、5000rpmで回転させた。0.5mlのコーティング溶液をウエハー上に分与し、90秒回転させた。0.5mlのコーティング溶液をウエハー上にもう一度分与し、さらに90秒回転させた。したがって、金属/金属酸化物支持体表面に対し、回転プロセス中にコーティング溶液を2回塗被した。

30

【0097】

塗被したウエハーを、ポンプで150mmHg（絶対）の減圧にした真空オープン中に30分置いた。オープンのスイッチを入れ、約140℃に加熱した。熱処理の合計時間（加熱の傾斜と加熱の保持）は2時間であった。次いでウエハーを、周囲雰囲気にて室温に自然冷却した。シリコン接着剤のボーダー・パターンを表面上にスタンピングすることによって、ウエハー上に直径6mmのサンプルスポットを限定した。実施例IIに記載の可溶性TMB比色分析法を使用して、タンパク質の非特異的結合を評価した。

【0098】

NSBの結果 図5は、代表的な非特異的タンパク質（IgG）結合の結果を示している。これらのデータは、従来のウシ血清アルブミン（BSA）によるブロッキングに対する我々の表面コーティングの性能を比較している。これらのデータは、10 μ g/mlのIgGタンパク質溶液の負荷においては、塗被した表面（ぬりつぶした棒線）のほうが従来のBSAブロッキング法（ぬりつぶしていない棒線）より優れている、ということを示している。より低いタンパク質濃度においては、どちらの表面もNSBを阻害するのに効果的である。

40

【0099】

このデータから、本発明のビオチン化された反応性機能性表面は、金属/金属酸化物支持体へのタンパク質のNSBを制限するか又は起こさせないようにするのに効果的である、という結論が支持される。これとは対照的に、BSAでブロックした金属/金属酸化物支

50

持体は、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度においては、より高いレベルの非特異的タンパク質結合を示しており、このことから本発明が有用であることがわかる。

【0100】

(実施例V)

顕微鏡用スライドガラスに対する、低い非特異的結合 (NSB) のチオール反応性表面コーティング化学品

本実施例は、顕微鏡用スライドガラスへのタンパク質のNSBを制限する上で本発明の実施例が有用であることを示す。コーティング溶液を調製し、これを使用して、スライドガラス支持体上に低NSBでチオール反応性の表面コーティングを形成させた。

裸のスライドガラス、BSAでブロックしたスライドガラス、又は低NSBでチオール反応性の表面コーティングを施したスライドガラスへの非特異的結合のレベルを調べるために実験を行った。

【0101】

本実施態様において使用した支持体 (スライドガラス) は、供給メーカー [テレケム・スーパークリーン (TeleChem SuperClean) (商標)] から入手した研磨済みの $25 \times 75 \text{ mm}$ 顕微鏡用スライドガラスであり、受け入れたままの状態を使用した。しかしながら、留意しておかなければならないことは、普通のソーダ石灰スライドガラスを含めて、幾つかの顕微鏡用スライドガラス支持体も適切に使用できた、という点である。

【0102】

コーティングの前に、下記のプロトコルに従ってスライドガラスを清浄化した。まず、スライドガラスを高純度 ($18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) 水ですすぎ洗いした。スライドガラスをガラス・ステイニング・ラック (glass staining rack) 中に入れ、60 の1%アルコノックス (Alconox) 溶液 (アルカリ性のガラスクリーナー) 中に浸漬し、15分超音波処理した。次いでスライドガラスを多量の高純度水ですすぎ洗いし、高純度水中でさらに15分超音波処理した。次いでスライドガラスを新鮮な超純水中に浸漬した。最後に、スライドガラスを N_2 ガスで吹きつけ乾燥した。清浄化から2時間以内に、スライドガラスに塗被を行った。

【0103】

予備下塗りしたスライドガラスに対する塗被も適切に行われた。下塗りは、蒸着させた SiO_2 層とスピノンガラス配合物 [例えば、セラミック (Ceramic) (商標) (ゲレスト)] を含む。

【0104】

コーティング溶液を実施例IIに記載のように調製した。スピンコーティングは次のように行った：スピンコーターの真空チャック上にスライドガラスを据え付け、静止状態のスライドガラス上に 0.5 ml のコーティング溶液を分与し、スピナーのスイッチを入れ、 3500 rpm に加速して90秒回転させた。

【0105】

減圧プロセスと熱硬化プロセスは、実施例IIに記載の手順と同じであった。NSBアッセイ実験と対照標準実験を、以下のような点を変えて、実施例IVに記載のように行った。TMBペルオキシダーゼ基質のインキュベーションを5分行った後、テストスポットに $20 \mu\text{l}$ のTMB停止液を加えて比色反応を停止させた。96ウェルプレートホルダー上に据え付けたスライドガラスについて光学濃度を直接読み取った (マイクロタイタープレートへの液の移動は認められなかった)。

【0106】

結合結果： 得られた結果を図6に示す。これらの結果から、塗被したガラス表面 (ぬりつぶした棒線) が、BSAでブロックした支持体 (斜線入り棒線) 及び裸のガラス支持体 (ぬりつぶしていない棒線) よりかなり低い非特異的タンパク質結合を示していることがわかる。

【0107】

10

20

30

40

50

このデータは、本発明のチオール反応性の機能性表面が、スライドガラス支持体へのタンパク質のNSBを制限するか又は起こさせないようにする上で効果的である、という結論を支持する。これとは対照的に、裸のスライドガラスとBSAでブロックしたスライドガラスはより高いレベルの非特異的タンパク質結合を示しており、したがって本発明の機能性表面が効果的であることがわかる。

【0108】

(実施例V I)

塗被した表面へのフィブリノゲンの低い非特異的結合 (NSB)

本実施例は、本発明の塗被表面へのフィブリノゲンのNSBを制限する上で、本発明の実施態様が有用であることを示す。コーティング溶液を調製し、これを使用して、SiO₂/Si支持体上に低NSBでチオール反応性の表面コーティングを形成させた。裸の支持体、BSAでブロックした支持体、又は低NSBでチオール反応性の表面塗被支持体への、フィブリノゲンの非特異的結合のレベルを調べるために実験を行った。

10

【0109】

塗被表面は実施例I Iに記載のように調製した。

フィブリノゲンの非特異的タンパク質結合アッセイ 非特異的なフィブリノゲン結合を、可溶性のTMB-マイクロウェルアッセイを使用して次のように評価した：試験片をすすぎ洗いし、ヒトフィブリノゲン〔Sigma (シグマ)〕のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中への連続的希釈物を含んだ試験ウェルを30分インキュベートした。タンパク質をインキュベーションした後、支持体をPBST(0.01%のツイーン20を含んだPBS)で3回、及び清浄水で1回すすぎ洗いし、次いで吹きつけ乾燥した。ペルオキシダーゼで標識付けした抗ヒトフィブリノゲン〔アブカム (Abcam)〕をPBST中に1:8000の比で希釈し、得られた希釈物の20μl小滴を含んだ各試験ウェルを30分インキュベートした。スライドガラスを前述のようにすすぎ洗いし、市販のテトラメチルベンジジン(TMB)可溶性ペルオキシダーゼ基質溶液の20μl小滴を塗被した。TMBアッセイと光学濃度の測定を、実施例I Vに記載のように行った。

20

【0110】

対照標準実験：裸の支持体とBSAブロッキング 塗被した支持体のほかに、2つのNSB対照標準実験を、実施例I Iの場合と実質的に同様の手順で並行して行った。

NSBの結果 非特異的結合の結果を図7に示す。塗被した表面(ぬりつぶした棒線)は、裸の表面(ぬりつぶしていない棒線)及びBSAでブロックした表面(斜線入り棒線)と比較して極めて低い非特異的フィブリノゲン結合を示している。

30

【0111】

このデータから、本発明のチオール反応性の機能性表面が、標的 support 体へのフィブリノゲンのNSBを制限するか又は起こさせないようにする上で効果的である、という結論が支持される。これとは対照的に、処理していない支持体及びBSAでブロックした支持体は、より高いレベルの非特異的フィブリノゲン結合を示しており、特に、血清タンパク質としてフィブリノゲンが比較的豊富に存在していることを考慮すると、本発明が有用であることがわかる。

【0112】

(実施例V I I)

塗被した表面に対する選択的タンパク質結合と非特異的タンパク質結合の実証

本実施例は、ビオチン化コーティング上への選択的タンパク質(ストレプトタビジン)結合と非特異的タンパク質結合との状況を実証する上で本発明の実施態様が有用であることを示す。本実験での試験片はフィルムコートしたシリコンウエハーであり、このときビオチン化コーティングは実施例Iに記載のように作製した。対照標準の試験片も、前述のように作製した。但し対照標準表面は、ビオチンの代わりにメトキシキャップの非反応性PEG分子を使用して作製した。具体的には、これらのコーティングは、実施例Iにおけるビオチン-PEG-NHS分子をメトキシ-PEG-スクシンイミジルプロピオネートで置き換えることによって作製した。その他の点では、プロセス工程は全て実施例Iの場合と

40

50

同じであった。

【0113】

実施例 I I に記載のホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ - ストレプトタビジン接合体〔S A - H R P、ピアース (P i e r c e)〕と可溶性 T M B - マイクロウェルアッセイを使用して、これらの表面へのストレプトタビジン結合を評価した。0.01%のツイーン20界面活性剤を含んだリン酸緩衝生理食塩水中に加えて、種々の濃度の S A - H R P を調製した。20 μ l 小滴の S A - H R P 溶液をテストスポット上に置き、これを37の温度及び100% (公称) の相対湿度で30分インキュベートした。次いでテストスポットを高純度水ですすぎ洗いした。実施例 I I に記載の可溶性 T M B - マイクロウェルアッセイを使用して結合を評価した。

10

【0114】

結合の結果： 図8は代表的な結果を示している。これらの結果は、ビオチン化機能性表面 (ぬりつぶしていない棒線) が、メトキシ - P E G 対照標準表面 (“ 不活性 ” 表面) (ぬりつぶした棒線) と比較してストレプトタビジンをはるかに多く結びつける、ということを示している。前述の特異的タンパク質結合アッセイの結果を考慮して (実施例 I を参照)、S A がビオチン化コーティングと特異的に結合している、と我々は結論を下している。10 μ g / m l の S A 負荷量に対してメトキシキャップの P E G サンプル上に観察される小さなシグナルは、少量の非特異的ストレプトタビジン結合の結果によるものと思われる。

【0115】

このデータから、本発明の機能性表面が、塗被した支持体上への選択的な結合部位もたらずのに効果的であり、一方、本発明の不活性機能性表面が、塗被した表面上への非特異的結合を制限するのに効果的である、という結論が支持される。

20

【0116】

(実施例 V I I I)

ストレプトタビジン - ビオチン塗被表面へのビオチン化分子結合の実証

本実施例は、ストレプトタビジン - ビオチン表面の作製と、それに引き続いたこの表面へのビオチン化分子の選択的結合を実証する上で、本発明の実施態様が有用であることを示す。

【0117】

コーティング溶液の調製 ポリプロピレン製のバイアル中にて、26.5 μ l の (3 - トリメトキシシリルプロピル) - ジエチレントリアミン (ゲレスト) を10 m l の N , N - ジメチルアセトアミド (D M A C) に加えることによって、第1のアミノシラン溶液を調製した。次いでこの溶液1.0 m l を40 m g のビオチン - P E G - C O ₂ - N - ヒドロキシスクシンイミジルエステル (ビオチン - P E G - N H S、シェアウォーター社) に加えた。このとき P E G は分子量3400のポリエチレングリコールである。N H S 基がアミノシラン上の末端アミンと反応してビオチン - P E G - シラン分子を形成する。このビオチン - P E G - シラン / D M A C 溶液を溶液 A と呼ぶ。別のバイアルにおいて、70.6 μ l の6 - アジドスルホニルヘキシル - トリエトキシシランを10 m l の D M S O に加えた。次いでこの溶液に、125 μ l のマトリックス形成剤 (ポリオキシエチレンソルビタンテトラオレート、P S T、アルドリッチ) を加えた。こうして得られた溶液を溶液 B と呼ぶ。溶液 A と溶液 B とを1 : 4 の体積比 (1 m l の溶液 A を4 m l の溶液 B に加える) で混合して、ビオチン - P E G - 溶液と呼ぶ最終混合物を得た。

30

40

【0118】

ポリプロピレン製のバイアル中にて、48.4 μ l の (3 - トリメトキシシリルプロピル) - ジエチレントリアミン (ゲレスト) を10 m l の N , N - ジメチルアセトアミド (D M A C) に加えることによって、第2のアミノシラン溶液を調製した。次いでこの溶液1.0 m l を40 m g のメトキシ - P E G - スクシンイミジルプロピオネート (m P E G - S P A、シェアウォーター社) に加えた。このとき P E G は分子量2000のポリエチレングリコールである。N H S 基がアミノシラン上の末端アミンと反応してメトキシ - P E

50

G - シラン分子を形成する。このメトキシ - P E G - シラン / D M A C 溶液を溶液 C と呼ぶ。溶液 C と溶液 B (上記) とを 1 : 4 の体積比 (1 m l の溶液 A を 4 m l の溶液 B に加える) で混合して、メトキシ - P E G - 溶液と呼ぶ最終混合物を得た。

【 0 1 1 9 】

次いで、ビオチン - P E G - 溶液とメトキシ - P E G 溶液を 1 : 4 の体積比で混合した。この最終混合物を使用してシリコン支持体を塗被した。

スピンコーティング スピンコーティングと熱硬化を実施例 I に記載のように行った。シリコン接着剤のボダーパターンを表面上にスタンピングすることによって、直径 6 m m のサンプルスポットをウエハー上に限定した。次いでウエハーをさいの目に切断し、種々のアッセイに対して使用した。

10

【 0 1 2 0 】

ストレプトタビジン層の形成 ストレプトタビジン〔プロザイム社 (P r o z y m e , I n c .) 〕をリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 中に希釈して 1 0 0 μ g / m l の濃度にした。次いで 4 0 μ l の小滴をサンプルスポット中に置き、室温で 1 時間インキュベートした。ウエハー上の幾つかのスポットを、P B S だけを使用してインキュベートした。これらは“ストレプトタビジンなし”の対照標準スポットである。インキュベーション後、ウエハーを P B S - ツイーン 2 0 (P B S T) で 3 回と超純水で 1 回すすぎ洗いし、次いで吹きつけ乾燥した。このプロセスの結果、ストレプトタビジンがコーティングマトリックス内に固定された。

【 0 1 2 1 】

特異的結合アッセイと非特異的結合アッセイ ビオチン化したホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (ビオチン - H R P 、ピアース) を P B S T 中に希釈して 1 0 μ g / m l の濃度にした。次いで 2 0 μ l 小滴をテストスポットに置き、室温で 3 0 分インキュベートした。ペルオキシダーゼで標識付けしたウサギの抗ヒツジ I g G (I g G - H R P) を非ビオチン化対照標準分子として使用した。I g G - H R P を P B S (ツイーン 2 0 なし) 中に希釈して 1 0 μ g / m l の濃度にし、2 0 μ l 小滴をテストスポット上に置いて室温で 3 0 分インキュベートした。

20

【 0 1 2 2 】

得られた結果を図 9 に示す。ストレプトタビジン - ビオチン表面は、非ビオチン化 I g G - H R P (ぬりつぶしていない棒線) に対してより、ビオチン - H R P (ぬりつぶした棒線) に対してかなり高いシグナルを示している。ストレプトタビジン表面と比較して、ストレプトタビジンなしの対照標準に対しては、ビオチン - H R P も I g G - H R P もそれほどの結合を示していない。ストレプトタビジンなしの表面に関して、I g G - H R P に対するシグナルのほうが幾分高いのは、異なったインキュベーション緩衝液によるものと考えられる。緩衝液中にツイーン 2 0 が存在しない場合、I g G - H R P は、幾分かはより高い非特異的結合を示す。

30

【 0 1 2 3 】

このデータから、ビオチン化分子が本発明のストレプトタビジン - ビオチン表面に特異的に結合し、これとは逆に、非特異的結合性のタンパク質が、これらの同じ塗被表面には限定された結合を示す、という結論が支持される。本実施例も、本発明の有用性を強く示している。

40

【 0 1 2 4 】

(実施例 I X)

ポリマー支持体上のチオール反応性コーティングへのチオール化タンパク質結合の実証

本実施例は、チオール化タンパク質を、チオール反応性コーティング化学品に従ってプラスチック支持体上に選択的に結びつける上で、本発明の実施態様が有用であることを示す。プラスチック支持体上への、不活性対照標準表面化学品に対するチオール化タンパク質の結合について、結果が比較されている。

【 0 1 2 5 】

コーティング溶液の調製 コーティング溶液は実施例 I に記載のように調製した。但し、

50

ビオチン - P E G - N H S をビニルスルホン - P E G - N H S (シェアウォーター) で置き換えた。組織培養用ポリスチレン (T C P S) 上へのスピンコーティングを実施例 I I I に記載のように行った。

【 0 1 2 6 】

塗被したウエハーを真空オーブン中に置き、引き続き 3 0 分にわたって 1 5 0 m m H g (絶対) の減圧になるまでポンプで引いた。次いでオーブンのスイッチを入れ、約 7 0 ° に加熱した。熱処理の合計時間 (加熱の傾斜と加熱の保持) は 4 時間であった。支持体を周囲空気中にて室温に自然冷却した。シリコン接着剤のボダー・パターンを表面上にスタンピングすることによって、直径 6 m m のサンプルスポットを表面上に限定した。

【 0 1 2 7 】

不活性コーティングの調製 不活性の対照標準表面を実施例 I I に記載の手順と全く同じ手順で調製した。

特異的結合アッセイは室温にて次のように行った：先ず表面を超純水 (1 8 M Ω - c m) で 3 回すすぎ洗いし、次いで N₂ ガスで吹きつけ乾燥した。チオール化ストレプトタビジンをホウ酸塩緩衝溶液 (5 0 m M のホウ酸塩、1 m M の E D T A、p H 9 . 0、0 . 0 1 % のツイーン 2 0) 中に混合して得た混合物の 2 0 μ l 小滴を置いた各テストスポットをインキュベートした。インキュベーションは室温にて 3 0 分であった、いかなるブロッキング工程も使用していないという点に留意しておかねばならない。インキュベーション後、表面を P B S T (0 . 1 M のリン酸ナトリウム、0 . 1 5 M の塩化ナトリウム、p H 7 . 2、0 . 0 1 % のツイーン 2 0) で 3 回すすぎ洗いし、吹きつけ乾燥した。ビオチン化ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (ピアース) の 1 : 1 0 0 希釈物を置いたテストスポットを 3 0 分インキュベートし、P B S T ですすぎ洗いし、次いで吹きつけ乾燥した。次いで T M B 基質の 2 0 μ l 小滴を置いたテストスポットをインキュベートした。酵素触媒作用による比色 T M B 反応を 5 分進行させ、この時点で、2 0 μ l 小滴の停止液を施すことによって反応を停止させた。標準的なプレートリーダーを使用して、4 5 0 n m での光学濃度を読み取った。

【 0 1 2 8 】

結合の結果： 塗被した組織培養用ポリスチレン支持体に対する特異的結合の結果を図 1 0 に示す (留意しておかなければならないのは、それぞれの濃度について実験を 3 回行い、誤差バーはこのセットにおける 1 つの標準偏差を示している、という点である)。チオール反応性コーティングへのチオール化ストレプトタビジンの結合が実証されている (ぬりつぶしていない棒線)。チオール反応性コーティングの目盛に関して見ると、チオール化ストレプトタビジン濃度の増大と共に結合量が増えている。不活性表面に及ぼすペルオキシダーゼの活性はごくわずかである。不活性表面上への非特異的結合があまり起こらないということは、チオール反応性コーティングへのストレプトタビジンの結びつきが共有結合によるものであるということの確実な証拠となる。

【 0 1 2 9 】

(実施例 X)

顕微鏡用スライドガラス上のアミン反応性コーティングに対するタンパク質結合の実証

本実施例は、アミン含有タンパク質を、アミン反応性コーティング化学品に従って顕微鏡用スライドガラス上に選択的に結びつける上で、本発明の実施態様が有用であることを示す (不活性化された対照標準表面と比較している)。

【 0 1 3 0 】

コーティング溶液の調製 コーティング溶液は実施例 I に記載のよう調製した。但し、ビオチン - P E G - N H S を 8 0 m g の S P A - P E G - S P A (シェアウォーター) で置き換えた (S P A は、アミン基に対して反応性を示す、プロピオン酸のスクシンイミジル誘導体である)。2 5 × 7 5 m m の顕微鏡用スライドガラスフォーマットのガラス支持体を高周波スパッタリングによる約 4 0 0 オングストロームの酸化ケイ素層で被覆し、次いで以下のようなプロトコルに従って清浄化した。先ずスライドガラスを高純度水 (1 8 M Ω - c m) ですすぎ洗いして、大体の不純物を除去した。スライドガラスをガラス・ス

10

20

30

40

50

テイニング・ラック中に入れ、60 の脱気した1%アルコノックス溶液（アルカリ性のガラスクリーナー）中に浸漬し、15分超音波処理した。次いでスライドガラスを多量の高純度水ですすぎ洗いし、60 の高純度水中でさらに15分超音波処理した。次いでスライドガラスを多量の高純度水ですすぎ洗いし、乾燥工程にかけるまで新鮮な超純水中に浸漬した。スライドガラスを圧縮N₂ガスで十分に吹きつけ乾燥し、使用するまで乾燥状態のまま保存した。清浄化し、予備処理したスライドガラスをスピンコーター中に据え付け、3500rpmで回転させた。予備処理したスライドガラス上に0.5mlのコーティング溶液を分与し、90秒回転させた。

【0131】

塗被した25×75mmのスライドガラスを真空オーブン中に入れ、引き続き真空ポンプで150mmHg（絶対）の圧力になるまで30分減圧した。オーブンのスイッチを入れ、約70 に加熱した。熱処理の合計時間（加熱の傾斜と加熱の保持）は1時間であった。次いで支持体を周囲空気中にて室温に自然冷却した。表面上にシリコン接着剤のボーダー・パターンをスタンピングすることによって、直径6mmのサンプルスポットを限定した。

10

【0132】

特異的結合アッセイ： 特異的結合アッセイを室温にて以下のように行った。まず表面を超純水（18MΩ・cm）で3回すすぎ洗いし、N₂ガスで吹きつけ乾燥した。50mMのホウ酸塩緩衝液中50mMエタノールアミン溶液（pH9.0）を使用して、1時間にわたってアミン反応性コーティングを化学的に不活性化させることによって不活性の対照標準表面を作製した。次いで、50mMのホウ酸塩緩衝液中ストレプトタビジン溶液（pH7.0）の20μl小滴を置いた各テストスポットをインキュベートした。インキュベーションは室温で60分行った。いかなるブロッキング工程も使用しなかった。インキュベーション後、表面をPBST（0.1Mのリン酸ナトリウム、0.15Mの塩化ナトリウム、pH7.2、0.01%のツイーン20）で3回すすぎ洗いし、吹きつけ乾燥した。ビオチン化ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ（ピアース）の1:100希釈物を置いたテストスポットを30分インキュベートし、PBST（0.1Mのリン酸ナトリウム、0.15Mの塩化ナトリウム、pH7.2）ですすぎ洗いし、吹きつけ乾燥した。次いでTMB基質の20μl小滴を置いたテストスポットをインキュベートした。酵素触媒作用による比色TMB反応を5分進行させ、この時点で、20μl小滴の停止液を施すことによって反応を停止させた。標準的なプレートリーダーを使用して、450nmでの光学濃度を読み取った。

20

30

【0133】

結合の結果： アミン反応性コーティングに対する特異的結合の結果を表11に示す。アミン反応性コーティングへのストレプトタビジンの固定化が示されている（ぬりつぶしていない棒線）。アミン反応性コーティングの目盛に関して見ると、ストレプトタビン濃度の増大と共に結合量が増えている。不活性化された表面に及ぼすペルオキシダーゼの活性はごくわずかである（ぬりつぶした棒線）。不活性化されたコーティング上への非特異的結合が殆ど起こらないということは、アミン反応性コーティングへのストレプトタビジンの結びつきが共有結合によるものであるということの確実な証拠となる。

40

【0134】

（実施例XI）

ストレプトタビン塗被表面へのビオチン化抗体の選択的結合の実証

本実施例は、本発明の塗被表面へのビオチン化抗体の選択的結合を実証する上で、本発明の実施態様が有用であることを示す。

【0135】

表面の作製 アミン反応性の表面化学品を含んだ顕微鏡用スライドガラスを実施例Xに記載のように調製した。表面上にシリコン接着剤のボーダー・パターンをスタンピングすることによって、直径6mmのサンプルスポットをウェハー上に限定した。下記の手順を使用して、表面のアミンによりストレプトタビンを共有結合させた。ストレプトタビン（

50

プロザイム社)をリン酸緩衝液(50 mMのリン酸ナトリウム、pH 7.0)中に希釈して100 µg/mlの濃度にした。本溶液の40 µl小滴を、サンプルスポット中にて室温で1時間インキュベートした。スライドガラスをすすぎ洗いし、50 mMリン酸塩緩衝液中に50 mMのエタノールアミンを混合してなる不活性化溶液(pH 7)中に浸漬した。不活性化を1時間進行させ、この時点で溶液からスライドガラスを取り出し、水ですすぎ洗いし、そして乾燥した。

【0136】

アッセイ ビオチン化ヤギ抗体(ヤギ抗マウスIgG、ビオチンで標識付け、ピアース)をポジティブサンプルとして使用した。対照標準は非ビオチン化ヤギ抗体(ヤギ抗ヒトミオグロビン、ICN)であった。どちらの抗体も、0.005%のツイーン20を含有するリン酸緩衝生理食塩水(PBST)中に希釈して100 µg/mlの濃度にした。各抗体溶液の20 µl小滴を、サンプルスポット中にて室温で30分インキュベートした。PBSTだけ(抗体なし)を置いた幾つかの対照標準スポットもインキュベートした。スライドガラスをPBSTで3回と超純水で1回すすぎ洗いし、そして乾燥した。表面に固定化されたヤギ抗体を、免疫化学を使用して評価した。具体的には、ペルオキシダーゼで標識付けした抗ヤギ抗体(ウサギ抗ヤギIgG-HRP、KPL社、PBST中への1:100希釈物)の20 µl小滴を、全てのテストスポット上にて室温で30分インキュベートした。スライドガラスを上記のようにすすぎ洗いし、ペルオキシダーゼ基質(TMB、HPL社)の20 µl小滴を使用して5分インキュベートし、この時点で、TMB停止液を使用して比色反応を停止させた。小滴を96ウェルマイクロタイタープレートに移し、プレートリーダー〔オブシス(Opsys)MR、サーモ・ラブシステムズ(Thermo Labsystems)〕を使用して450 nmでの光学濃度を測定した。

10

20

【0137】

結合の結果: 得られた結果を表12に示す。このデータから、第1の層の捕捉抗体が存在しない場合(捕捉抗体濃度=0)、検出抗体(抗ヤギ、HRP)の非特異的結合は極めて少ない(ぬりつぶしていない棒線)。ヤギ抗体を使用してインキュベートした表面に対する結果は、ビオチン化抗体だけがかなり大きなシグナルを与えることを示している(ぬりつぶした棒線)。これらの結果から、本発明の表面実施態様はビオチン化抗体に対して選択的である、ということがわかる。

【0138】

30

(実施例XII)

塗被表面に関する改良されたイムノアッセイ性能の実証

下記の実施例は、標準的な診断アッセイに関して、本発明のコーティング化学品のアッセイ性能と検出限界とを比較することによって、本発明の実施態様が有用であることを示す。この比較は、スタフィロコッカス・エンテロトキシンB(SEB)に対するサンドイッチ酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)に基づいている。

【0139】

塗被した支持体に対するSEBサンドイッチアッセイのプロトコル 本アッセイに対する支持体は、低NSBのビオチン化表面コーティングで被覆されたSiO₂/Siウエハーで構成された。25 mg/ml(ストレプトタビジン)をPBST中に溶解)の小滴(20 µl)を、それぞれ6 mmのテストスポット中にてインキュベートすることによって、ストレプトタビジンを表面に結合させた。インキュベーションは37 °Cで30分行った。各試験片を高純度水(18 MΩ-cm)で3回すすぎ洗いし、N₂ガスで吹きつけ乾燥した。20 µl小滴のビオチン抗SEB(トキシノテクノロジー)を使用してインキュベートすることによって、捕捉抗体を各テストスポットに結合させた。インキュベーションを37 °Cで30分行い、次いで高純度水で3回すすぎ洗いし、N₂ガスで吹きつけ乾燥した。0.01 ng/ml~1.0 ng/mlの濃度範囲のSEB抗原溶液の20 µl小滴を使用して、テストスポットをインキュベートした。この場合も、インキュベーションは37 °Cで30分行った。試験片を高純度水で3回すすぎ洗いし、吹きつけ乾燥した。検出抗体(抗SEB-HRPをPBST中に溶解、20 µl小滴、トキシノテクノロジー)を37 °Cで3

40

50

0分インキュベートし、高純度水で3回すすぎ洗いし、吹きつけ乾燥した。市販のプレシピテートTMBアッセイ(a commercial, precipitate TMB assay)を使用して最終的なインキュベーションを行った。TMB-膜基質(KPL社)の20 μ l小滴を各テストスポットに加え、37で30分インキュベートした。前述したように、HRPは、表面上への不溶性付着物の形成を触媒する。試験片に乾燥N₂を吹きつけた後、特注の偏光解析器(表面における抗原の間接的・定量的な測定を可能にする)を使用して付着層の厚さを定量化した。

【0140】

SEBサンドイッチELISAプロトコル 上記の塗被表面に対し、SEBサンドイッチアッセイと比較するために標準的なELISAフォーマットのアッセイを行った。簡単に説明すると、捕捉抗体(ピオチン抗-SEB、トキシノテクノロジー)をPBS-ツイーン(0.01%)中に溶解して得た溶液100 μ lを96ウェルマイクロタイタープレート〔ダイネックス・テクノロジーズ(Dynex Technologies)、イムロン(Immulon)2HB〕のウェルに加え、37で120分インキュベートした。ウェルをPBS溶液で3回すすぎ洗いし、それぞれのすすぎ洗いの後に、プレートを軽くたたいて液を除去した。次いで、PBST中に1%のウシ血清アルブミン(BSA)を溶解して得た溶液200 μ lをウェルに加え、37で1時間インキュベートすることによってウェルをBSAでブロックした。SEB抗原溶液(トキシノテクノロジー、PBST中0.01ng/ml~1.0ng/mlの範囲の濃度を有する溶液100 μ l)をマイクロウェルに加え、37で60分インキュベートした。ウェルをPBSTですすぎ洗いし、プレートを逆さにして軽くたたいて液を除去した。検出抗体は、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼが接合した抗-SEB(トキシノテクノロジー)であった。各ウェル中の100ml容量を37で60分インキュベートした。再びウェルをPBSTで洗浄した。市販のTMBペルオキシダーゼ基質(TMB-マイクロウェル、KPL社)を加えることによって、ウェル中に色を発生させた。100 μ l容量の顕色剤をウェルに加え、37で60分インキュベートした。60分後、100mlのTMB停止液を各ウェルに加え、マイクロプレートリーダーを使用して、450nmでの光学濃度を読み取った。

10

20

【0141】

結合の結果 代表的なアッセイ結果を図13Aに、そして標準的なマイクロタイタープレートELISAアッセイの結果を図13Bに示す(ELISAアッセイに対する結果は、本発明の機能性塗被表面に対して行ったものである)。観察で得られる重要な点は、本発明の塗被表面(サンドイッチアッセイに対しては、特異的に結合されたストレプトアビジンをもたらす)が、従来のサンドイッチELISAと比較して、アッセイの感度において相当程度の向上を可能にする、ということである。具体的には、マイクロタイタープレートELISAアッセイにおけるより低い検出限界は約1.0ng/ml SEBであった。本発明の塗被表面の場合、より低い検出限界は0.1ng/ml SEBであった。

30

【0142】

(実施例XIII)

オリゴヌクレオチドマイクロアレイフォーマットにおける表面化学品の比較

本実施例は、オリゴヌクレオチドマイクロアレイフォーマットにおいて使用するための表面化学品として本発明の実施態様が有用であることを示す。本実施例に記載の実験は、本発明の1つのコーティング化学品実施態様を、現在の“最新の”市販ポリマー化学品及びシラン化学品と並行して評価する。特に、アミンで標識付けしたオリゴヌクレオチドを使用するマイクロアレイフォーマットにおける化学品に関して、シグナルレベル、ノイズレベル、及びシグナル対ノイズレベルを比較する。

40

【0143】

コーティングの調製 本発明のコーティング化学品は、実施例Xに記載の通りに調製した。現時点における最新の市販のポリマー化学品は、アミン標識のオリゴヌクレオチドに対して高い負荷容量を有する、スライドガラス支持体上への三次元ポリマーコーティングとして宣伝されている。市販のシラン化学品は、スライドガラス支持体上への低バックグ

50

ラウンドのシランコーティングとして宣伝されている。市販の化学品は、メーカーが指示するプロトコル（これらのタイプの支持体に対して公知であり、一定の方式に従っている）に従って処理した。このような2つのメーカーとしては...がある。

【0144】

マイクロアレイプリンティング： 5'アミン結合及び3'ビオチン標識のオリゴヌクレオチド〔オペロン（Operon）〕を300mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH8.5）中に20μMの濃度にて懸濁させた。コーティング化学品を超純水（18MΩ・cm）で3回すすぎ洗いし、N₂ガスで吹きつけ乾燥してからアレイング（arraying）を行った。市販の化学品を箱から出して使用した。SMP3Bピン〔テレケム（Telechem）〕を取り付けたスポット・ボット（Spot Bot）マイクロアレイヤー（テレケム）を使用して、市販の化学品上に一連のスポットをプリントした。市販のポリマー化学品とコーティング化学品を75%の相対湿度で5時間インキュベートした。ポリマー化学品、シラン化学品、及びコーティング化学品を、使用する前に室温で72時間乾燥保存した。リン酸塩緩衝液（pH7.0）中50mMエタノールアミンを使用して、コーティング化学品を1時間不活性化した。

10

【0145】

特異的結合アッセイ： 0.1M Tris（pH9.0）中50mMエタノールアミン及び1%SDS溶液を使用して、市販のポリマー化学品を50で20分不活性化した。市販のシラン化学品を80で2時間ベークし、次いでウシ血清アルブミンで1時間ブロックした。特異的結合アッセイを室温で次のように行った：PBST（0.1Mのリン酸ナトリウム、0.15Mの塩化ナトリウム、pH7.2、0.01%のツイーン20）中に10μg/mlのCy5標識ストレプトタビジン〔アマーシャム（Amersham）〕を溶解して得た溶液を140μl使用して化学品をインキュベートした。40mmのリフター・スリップ（Lifter Slip）〔エリー（Erie）〕を使用して、スライドガラス化学品の表面上に液体を均一に広げた。化学品をハイブリダイゼーション・チャンバー中に30分置いた。スライドガラス化学品からリフター・スリップを取り除き、スライドガラスをPBSTで3回、次いで超純水（18MΩ・cm）ですすぎ洗いし、乾燥した。スライドガラス化学品をジェネピックス（GenePix）4000Bスキャナー〔アクソン（Axon）〕中に配置し、市販のポリマースライドガラス化学品に対して設定を最適にした。最終的なスキャナーのセッティングは、光電子増倍管に対して100%のレーザー出力及び500ボルトの設定であった。

20

30

【0146】

結合の結果： 本発明のコーティング化学品と市販化学品に対する特異的結合の結果を図14Aに示す。シグナルの強度が相対蛍光単位にて示されている。図14Aは、本実験においては、本発明のコーティング化学品（ぬりつぶしていない棒線）が、ポリマー化学品（斜線入り棒線）及びシラン化学品（ぬりつぶした棒線）より高いシグナル強度を有する、ということを示している。

【0147】

Cy5チャンネルにおいてバックグラウンドをモニターした。ノイズのレベルが相対蛍光単位にて示されている。スキャンした画像の代表的な斑点なしエリアを使用して、グローバルバックグラウンド値を算出した。Cy5チャンネルのシグナルは、バックグラウンドシグナルに対する非特異的結合の寄与の大きさを示している。図14Bは、本発明のコーティング化学品（ぬりつぶしていない棒線）が、ポリマー化学品（斜線入り棒線）及びシラン化学品（ぬりつぶした棒線）より大幅に低いCy5バックグラウンドを有する、ということを示している。本発明のコーティング化学品は、Cy5ストレプトタビジンの表面非特異的結合が少ないのでより低いバックグラウンドシグナルを有する。

40

【0148】

Cy5チャンネルにおけるシグナル対ノイズ比をスライドガラス化学品に対して算出し、得られたデータが図14Cに示されている。本発明のコーティング化学品（ぬりつぶしていない棒線）は、市販のポリマー化学品（斜線入り棒線）より約3倍大きいシグナル対ノ

50

イズ比を、そして市販のシラン化学品（ぬりつぶした棒線）より約6倍大きいシグナル対ノイズ比を示している。

【0149】

（実施例XIV）

タンパク質マイクロアレイにおける抗体 - 抗体相互作用の実証

本実施例は、本発明の塗被表面上への一連のビオチン化抗体の作製、及び抗体 - 抗体認識を使用するその後のビオチン化抗体の検出を明示する上で、本発明の実施態様が有用であることを示す。

【0150】

表面の作製 アミン反応性の表面化学品を含んだ顕微鏡用スライドガラスを実施例Xに記載のように調製した。下記の手順を使用して、ストレプトタビジン（プロザイム社）をリン酸塩緩衝液（50mMのリン酸ナトリウム、pH7.0）中に希釈して100μg/mlの濃度にし、約700μlをハイブリダイゼーションチャンバーにに加え、反応を1時間にわたって進行させた。チャンバーを取り出し、スライドガラスをすすぎ洗いし、次いで50mMリン酸塩緩衝液（pH7）中に50mMのエタノールアミンを含んだ不活性化溶液中にスライドガラスを浸漬した。不活性化を1時間進行させ、この時点で溶液からスライドガラスを取り出し、水ですすぎ洗いし、乾燥した。

【0151】

マイクロアレイプリンティング： 凍結乾燥したビオチン化ヤギ抗体（ヤギ抗マウスIgG、ビオチンで標識付け、ピアース）を、15mg/mlのウシ血清アルブミンを含んだリン酸緩衝生理食塩水（再構成用緩衝液）中にて1mg/mlの濃度にて再構成した。この原液を、種々の濃度のツイーン20界面活性剤を含んだリン酸緩衝生理食塩水中に希釈して100μg/ml抗体の濃度にした。20μl小滴の抗体溶液を使用して384ウェルのソースプレート（テレケム）を調製し、このときツイーン20の含量が、0、0.0001、0.0005、0.001、0.005、0.01、及び0.05容量%になるように調製した。コーティング化学品を超純水（18MΩ・cm）で3回すすぎ洗いし、N₂ガスで吹きつけ乾燥してからアレイングを行った。SMP3Bピン（テレケム）を取り付けたスポット・ボット・マイクロアレイヤー（テレケム）を使用して、コーティング化学品上に一連のスポットをプリントした。スポットがプリントされたスライドガラスを、75%の相対湿度にて1.5時間インキュベートした。

【0152】

特異的結合アッセイ： 特異的結合アッセイを、室温にて次のように行った： 接着性のハイブリダイゼーションチャンバー（前述）を使用し、10μg/mlのCy3標識したウサギ抗ヤギIgG（シグマ）をPBS（0.1Mのリン酸ナトリウム、0.15Mの塩化ナトリウム、pH7.2）中に溶解して得た溶液700μlを使用してコーティング化学品をインキュベートした。スライドガラスを30分インキュベートした。ハイブリダイゼーションチャンバーを取り出し、スライドガラスをPBST（0.1Mのリン酸ナトリウム、0.15Mの塩化ナトリウム、pH7.2、0.05%のツイーン20）で3回、次いで超純水（18MΩ・cm）ですすぎ洗いし、そして乾燥した。スライドガラス化学品をジェネピックス4000Bスキャナー（アクソン）中に配置し、最良のシグナル対ノイズ性能が得られるように設定を最適にした。最終的なスキャナーのセッティングは、光電子増倍管に対して100%のレーザー出力及び460ボルトの設定であった。

【0153】

結合の結果： 代表的なアレイ画像を図15に示す。画像中のスポットは全て、同じ抗体濃度（100μg/ml）を使用してプリントした。各行は緩衝液中のツイーン20の濃度が異なっていて、ツイーン20の濃度は、一番上の行の0%から一番下の行の0.05%まで増大している。各行には5つのスポットがプリントされている。先ず最初に観察されるのは、配列された抗体が蛍光標識の検出抗体によって認識されるということであり、

10

20

30

40

50

このことはプリントされた抗体が表面に固定されていることを示している。プリント用緩衝液にツイーン20を加えると、プリントされたスポットの大きさと強度が増大する。一番下の行のスポットは約9000相対蛍光単位(RFU)の特異的結合シグナルを有しており、このときローカルバックグラウンドは約1000RFUである。

【0154】

(実施例XV)

塗被された支持体の非特異的結合特性を改良する上での、コーティング成分の相乗効果の実証

本実施例は、本発明において具現化されている成分の組合わせが、これらの成分のサブセットで構成されるコーティングより優れた性能をもたらす、ということを示すように意図されている。 10

【0155】

“標準処方”のコーティング溶液中の成分は、以下のように略記することができる：

ピオチン-PEG ピオチンPEG-CO₂-N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル
(シェアウォーター社)

アミノシラン (3-トリメトキシシリルプロピル)-ジエチレントリアミン(ゲレスト)

アジドシラン 6-アジドスルホニルヘキシル-トリエトキシシラン(ゲレスト)

PST ポリオキシエチレンソルビタンテトラオレエート(アルドリッチ)

本実験の場合、コーティング溶液は、標準処方(実施例Iに記載)にて、並びにこれらの成分を種々除いたり、また種々組み合わせたりして調製した。いずれの場合も、キャリアー溶媒の容量と比(DMAC/DMSO=1/4)を一定に保持した。 20

【0156】

顕微鏡用スライドガラスを実施例Vに記載のように塗被した。次いで、実施例IIに記載の手順を使用して、表面を非特異的結合に関してアッセイした。

結合の結果： 得られた結果を図16に示す。これらの結果から、標準処方が、他の全ての成分組合わせ物と比較して最も良好なNSB性能をもたらすことがわかる〔但し、“アジドシランなし”処方(この処方は、本アッセイにおいては同等のNSBを示す)を除く〕。それに引き続く実験によれば、“アジドシランなし”処方のほうが、標準処方より保存寿命が劣るということが明らかになっている。具体的に言うと、いったん表面を水によるすすぎ洗いにさらすと、“アジドシランなし”処方の低NSB特性が、標準処方のそれよりはるかに急激に悪化する(日数対週数又は月数)。このことは、アジドシランが、表面コーティングにおいてある程度の架橋/安定化の役割を果たしている、という考え方と矛盾しない。 30

【0157】

本実施例からのデータは、表面コーティングの全ての成分が存在するときに、本発明の実施態様が最適の性能にて機能する、ということを示している。

(実施例XVI)

コーティング配合物中のさらなるマトリックス形成用成分の明示

本実施例では、ポリオキシエチレンソルビタンテトラオレエート(PST)と比較した場合の、代替のマトリックス形成用分子を使用した本発明の実施態様が有用であることを明らかにする。ここに記載の実験は本発明の他の実施態様を示しており、これらの実施態様においては、代替のマトリックス形成用分子が良好な非特異的結合・特異的結合性能をもたらしている。 40

【0158】

コーティング溶液は実施例IIに記載のように調製した。さらに、PSTを市販の界面活性剤(すなわち、トリトンX-100やツイーン20)で置き換えたコーティング溶液も調製した。対照標準として、配合物中のマトリックス形成用成分をグリセロールで置き換えた。グリセロールは同等のマトリックス形成能を示すとは考えられない、という点に留意しておかねばならない。

【0159】

コーティング溶液をシリコンウエハー上にキャストし、実施例ⅠⅠに記載のように硬化させた。非特異的結合アッセイを実施例ⅠⅠに記載のように行った。特異的結合アッセイは実施例ⅠⅩに記載のように行った。

【0160】

結合の結果： 得られた結果を図17に示す。図17Aは、3種の全てのマトリックス形成成分が、NSB実験においてBSAブロッキングより優れた性能を有することを示している。試験した3種のうち、PSTの性能が最も良く、次いでツイン20とトリトンX-100である。予想されたように、グリセロールを代替物として使用して調製したコーティングはかなり高いNSBを示した。

10

【0161】

図17Bは、特異的結合性能が3種の全てのマトリックス形成成分に対して同等であることを示している。グリセロールも高いシグナルを与えているが、これは、NSB実験によって示されているように、特異的結合よりむしろ非特異的結合の結果によるものと思われる。

【0162】

(実施例XVⅠⅠ)

塗被された表面上における細胞増殖の阻害

本実施例では、本発明の1つの実施態様に関して、培養組織からの哺乳類細胞増殖の阻害について説明する。コーティングは、組織培養用ポリスチレン支持体上に、実施例ⅠⅠⅠ

20

【0163】

細胞培養： 無菌処理法及び市販の細胞培養基と細胞株を使用する通常の細胞培養法を使用した。2種の細胞株を使用した〔L929線維芽細胞であるATCCとヒトの臍静脈内皮細胞であるHUVEC (Bio Whittaker)〕。L929培養のための細胞培養基(3日ごとに変えた)は、抗生物質サプリメントを含んだDMEM塩水中に市販の10%ウシ胎仔血清を混合して得た。対照標準表面は、同一の条件にさらされる細胞を含んだ、塗被されていない無菌の組織培養用ポリスチレンペトリ皿であった。培養された株細胞を市販の培養容器からトリプシン化(trypsinized)し、集密相に達した後に、ペトリ皿1つ当たり 10^5 の密度にて培養し、市販の細胞インキュベーター中において5%CO₂の雰囲気下にて37℃でインキュベートした。

30

【0164】

結果： 図18は、3日間の増殖後におけるL929線維芽細胞培養表面の顕微鏡画像を示している。塗被された表面である図18Aは、TCP S対照標準である図18Bと比較して細胞が少ないことがわかる。このことは、これら細胞の培養にとって一般的な付着性細胞単層による被覆が起きていることを示している。塗被表面上に存在している細胞は丸みを帯びていて、ゆるく結合したクラスターの状態になっているようであり、明らかに表面接触を避けていて、集密的細胞単層又は安定した細胞結合を生成させることができない。形状が丸いということは、これら結合依存性の細胞が圧力を受けている状態にあることを示している。対照標準表面は、生存可能な細胞の培養に対して通常観察される、広がった付着性細胞を示している。塗被表面への細胞外マトリックスタンパク質の付着を阻害すれば、線維芽細胞の増殖が抑制される、と考えられる。バクテリアの付着と増殖についても、予備実験にて詳細に調べた。シュウドモナス・アエルギノサ菌株PA01(ATCC、マナッサス、バージニア州)を、トリプシン大豆ブロス(TSB)中にて、通常の微生物学的方法に従って約 10^9 CFU/mlの培養密度になるように培養し、TSBを使用しているこの原液から、塗被されたポリスチレンペトリ皿上に種々の希釈度にて接種した。細菌学的グレードのポリスチレン(BD)を対照標準表面として使用した。培養インキュベーター中にて37℃で24時間インキュベーションし、TSBですすぎ洗いした後、位相差顕微鏡法を使用して調べたところ、塗被表面上には付着性の微生物が殆ど観察されなかった。これとは対照的に、対照標準表面には、付着性の生存有機体でコロニーが高密

40

50

度でつくられ、培養基によるすすぎ洗いでは除去できなかった（データは図示せず）。

【0165】

言うまでもないが、本発明は、これまでに説明してきた目的や利点だけでなく、本発明に固有の目的や利点を達成するように適切に適応させることができる。本発明の開示内容の目的に合うよう、現時点で好ましい実施態様について説明してきたが、本発明の範囲内において種々の変更や改良を行ってよいのはもちろんである。当業者にとって容易に想起しうる他の多くの変更、及び本明細書に開示の本発明の精神に包含され、特許請求の範囲において規定されている他の多くの変更も行ってよい。

【0166】

本明細書中に引用した全ての刊行物を参照により本明細書に含める。

10

【図面の簡単な説明】

【0167】

【図1】本発明の1つの実施態様による機能性表面の概略図である。活性成分、架橋用成分、及びマトリックス形成用成分を含んだ塗被可能な実施態様が、支持体上の一体化されたコーティング内におけるそれらの機能を表わすように概略的に示されている。本発明を構成している成分の概略的表示が上部に、推定されるコーティング構造の断面表示が中央部に、そして推定されるコーティング構造の三次元表示が下部に示されている。

【図2】 SiO_2 / Si ウエハー上の本発明の実施態様によるビオチン機能性表面上へのタンパク質の非特異的結合を、BSAでブロックされた SiO_2 / Si ウエハーの場合と比較して示している。

20

【図3】 SiO_2 / Si ウエハー上の本発明の実施態様によるチオール反応性機能性表面上へのタンパク質の非特異的結合を、BSAでブロックされた SiO_2 / Si ウエハー及び裸の SiO_2 / Si ウエハーの場合と比較して示している。

【図4】BSAでブロックされた支持体、及び種々のプラスチック支持体上の本発明の1つの実施態様による機能性表面への、タンパク質の非特異的結合を示している。

【図5】BSAでブロックされた支持体、及び金属支持体（特に金支持体）上の本発明の1つの実施態様による機能性表面への、タンパク質の非特異的結合を示している。

【図6】ガラス支持体上の本発明の1つの実施態様による機能性表面、BSAでブロックされたガラス支持体、及び裸のガラス支持体への、タンパク質の非特異的結合を示している。

30

【図7】裸のガラス、BSAでブロックされたガラス、及び本発明の1つの実施態様による機能性表面への、フィブリノゲンの非特異的結合を示している。

【図8】本発明の1つの実施態様によるビオチン機能性表面への、ストレプタビジンの特異的結合を示している。

【図9】ガラス支持体上の本発明の1つの実施態様によるストレプタビジン機能性表面への、ビオチン化ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼの特異的結合を示している。

【図10】プラスチック支持体上の本発明の1つの実施態様によるチオール反応性機能性表面への、チオール化ストレプタビジンの特異的結合を示している。それぞれの濃度について3回行い、誤差バーは当該セットにおける1つの標準偏差を示している。

【図11】下塗りしたガラス支持体上の本発明の1つの実施態様によるアミン反応性機能性表面への、ストレプタビジンの特異的結合を示している。それぞれの濃度について3回行い、誤差バーは1つの標準偏差を示している。

40

【図12】ガラス支持体上の本発明の1つの実施態様によるストレプタビジン機能性表面への、ビオチン化抗体の特異的結合を示している。

【図13A】本発明の1つの実施態様による機能性表面に関して、スタフィロコッカル・エンテロトキシンBに対する改良されたアッセイ感度を示している。図13Aは450nmでの光学濃度を示しており、図13Bは膜の厚さを示している、という点に留意のこと

【図13B】本発明の1つの実施態様による機能性表面に関して、スタフィロコッカル・エンテロトキシンBに対する改良されたアッセイ感度を示している。図13Aは450nm

50

mでの光学濃度を示しており、図13Bは膜の厚さを示している、という点に留意のこと。

【図14A】オリゴヌクレオチドマイクロアレイへの応用に対して本発明の1つの実施態様を使用することを示しており、特に、アミン反応性機能性表面にてオリゴヌクレオチドを使用することを、最新の市販のポリマー化学品およびシラン化学品と比較して示している。図14Aは、3'ビオチン標識されたオリゴヌクレオチドに結合したCy5ストレプトタビジンの蛍光検出を示している。シグナルの強度は、相対蛍光単位にて記載されている。データは3つの代表的な実験から得られており、誤差バーは1つの標準偏差を示している。図14Bは蛍光バックグラウンドの測定値を示しており、ノイズレベルは相対蛍光単位にて記載されている。ある1つのスライドガラスと誤差バーから得られたデータが1つの標準偏差を示している。図14Cは、本発明のコーティング化学品に対するシグナル対ノイズ比(S/N)を、ポリマースライドガラス化学品及びシランスライドガラス化学品の場合と比較して示している。データポイントに従って1つのスライドガラスを示した。

10

【図14B】オリゴヌクレオチドマイクロアレイへの応用に対して本発明の1つの実施態様を使用することを示しており、特に、アミン反応性機能性表面にてオリゴヌクレオチドを使用することを、最新の市販のポリマー化学品およびシラン化学品と比較して示している。図14Aは、3'ビオチン標識されたオリゴヌクレオチドに結合したCy5ストレプトタビジンの蛍光検出を示している。シグナルの強度は、相対蛍光単位にて記載されている。データは3つの代表的な実験から得られており、誤差バーは1つの標準偏差を示している。図14Bは蛍光バックグラウンドの測定値を示しており、ノイズレベルは相対蛍光単位にて記載されている。ある1つのスライドガラスと誤差バーから得られたデータが1つの標準偏差を示している。図14Cは、本発明のコーティング化学品に対するシグナル対ノイズ比(S/N)を、ポリマースライドガラス化学品及びシランスライドガラス化学品の場合と比較して示している。データポイントに従って1つのスライドガラスを示した。

20

【図14C】オリゴヌクレオチドマイクロアレイへの応用に対して本発明の1つの実施態様を使用することを示しており、特に、アミン反応性機能性表面にてオリゴヌクレオチドを使用することを、最新の市販のポリマー化学品およびシラン化学品と比較して示している。図14Aは、3'ビオチン標識されたオリゴヌクレオチドに結合したCy5ストレプトタビジンの蛍光検出を示している。シグナルの強度は、相対蛍光単位にて記載されている。データは3つの代表的な実験から得られており、誤差バーは1つの標準偏差を示している。図14Bは蛍光バックグラウンドの測定値を示しており、ノイズレベルは相対蛍光単位にて記載されている。ある1つのスライドガラスと誤差バーから得られたデータが1つの標準偏差を示している。図14Cは、本発明のコーティング化学品に対するシグナル対ノイズ比(S/N)を、ポリマースライドガラス化学品及びシランスライドガラス化学品の場合と比較して示している。データポイントに従って1つのスライドガラスを示した。

30

【図15】本発明の1つの実施態様をタンパク質マイクロアレイの用途に使用することを示しており、特に、ガラス支持体上へのビオチン化抗体の選択的捕捉に対してストレプトタビジン機能性表面を使用することを示している。

【図16】種々の塗被表面の非特異的結合を示しており、本発明の1つの実施態様による機能性表面の相乗効果を示している。

40

【図17A】低い非特異的タンパク質結合と高い特異的タンパク質結合を示す本発明の幾つかの実施態様において、異なったマトリックス形成用成分を使用していることを示している。

【図17B】低い非特異的タンパク質結合と高い特異的タンパク質結合を示す本発明の幾つかの実施態様において、異なったマトリックス形成用成分を使用していることを示している。

【図18A】本発明の塗被表面実施態様(A)での3日間培養後の線維芽細胞増殖の抑制を、組織培養ポリスチレン対照標準(B)の場合と比較して示している。

【図18B】本発明の塗被表面実施態様(A)での3日間培養後の線維芽細胞増殖の抑制を、組織培養ポリスチレン対照標準(B)の場合と比較して示している。

50

【 図 2 】

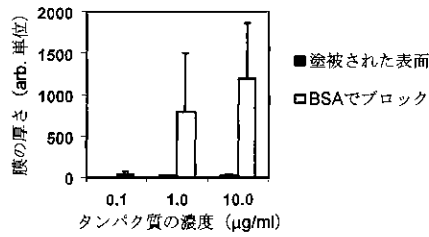


FIG. 2

【 図 3 】

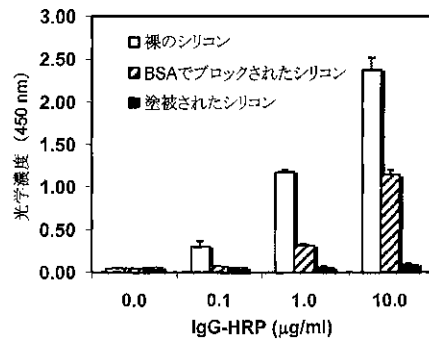


FIG. 3

【 図 4 】

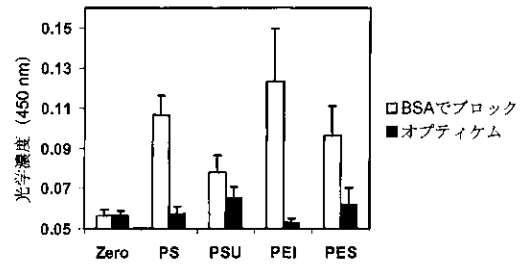


FIG. 4

【 図 5 】

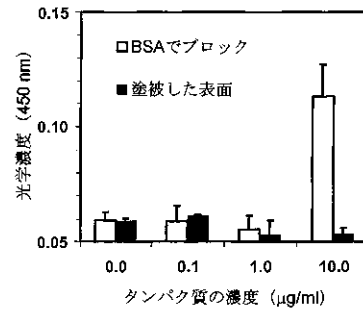


FIG. 5

【 図 6 】

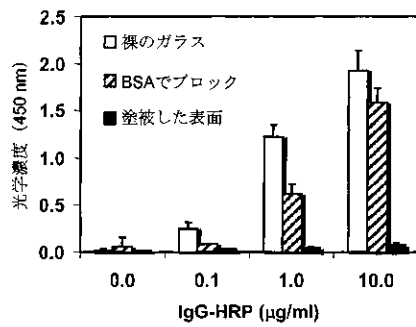


FIG. 6

【 図 8 】

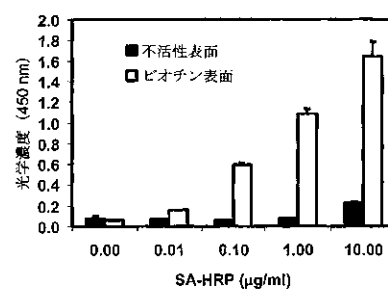


FIG. 8

【 図 7 】

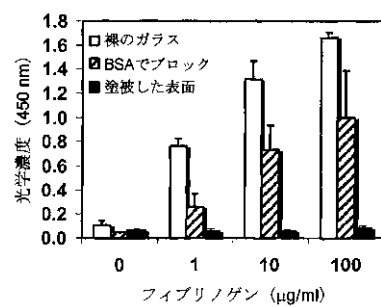


FIG. 7

【 図 9 】

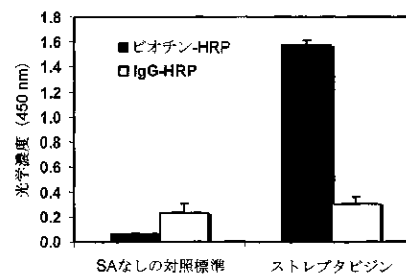


FIG. 9

【図 10】

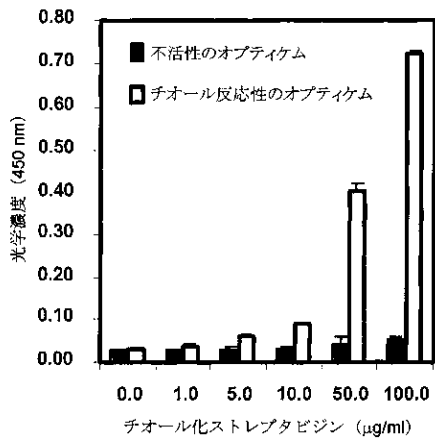


FIG. 10

【図 11】

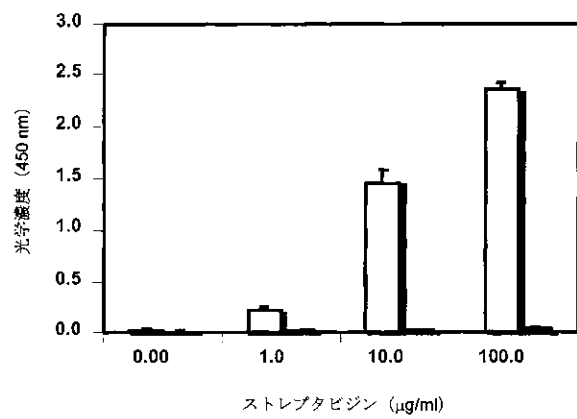


FIG. 11

【図 12】

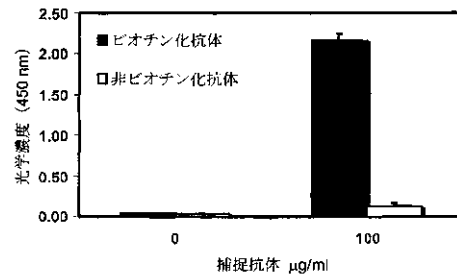


FIG. 12

【図 13 A】

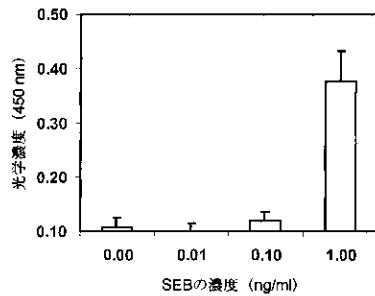


FIG. 13A

【図 13 B】

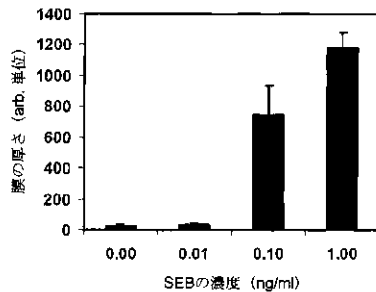


FIG. 13B

【図 14 A】

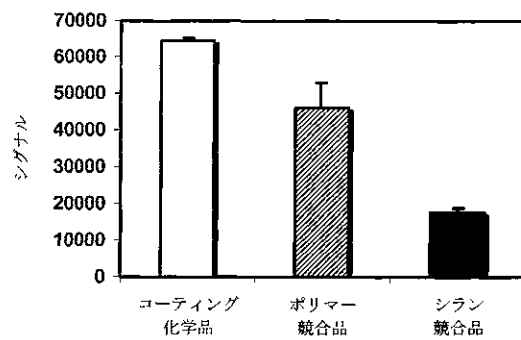


FIG. 14A

【図 14 B】

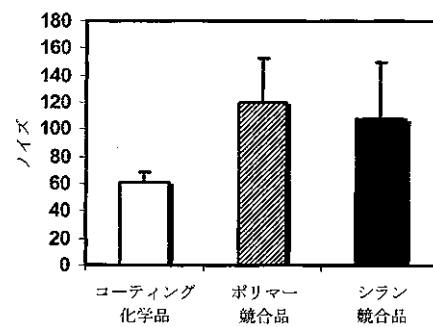


FIG. 14B

【図 14C】

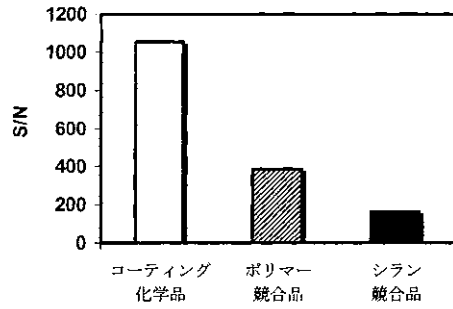


FIG. 14C

【図 16】

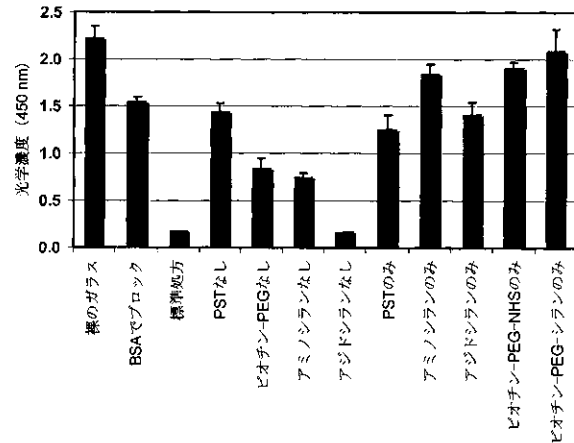


FIG. 16

【図 17A】

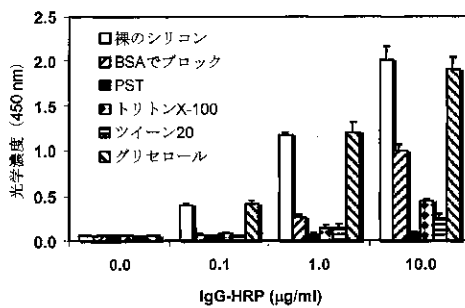


FIG. 17A

【図 17B】

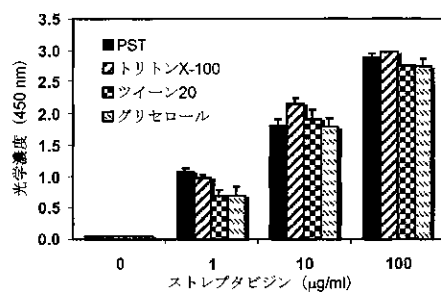


FIG. 17B

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/000433 A1

(51) International Patent Classification: B05D 5/06

(21) International Application Number: PCT/US02/06108

(22) International Filing Date: 26 June 2002 (26.06.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/301,223 26 June 2001 (26.06.2001) US
10/180,199 25 June 2002 (25.06.2002) US

(71) Applicant: ACCURE TECHNOLOGY CORPORATION (US/US); 303 East Seventeenth Avenue, #108, Denver, CO 80203 (US)

(72) Inventors: MAO, Guang, 4951 Darcy Walk, Smyrna, GA 30082 (US); METZGER, Steven, W. 3331 Colony

Drive, Fort Collins, CO 80526 (US); LOCKHEAD, Michael, J., 2399 Kalinda Avenue, Boulder, CO 80304 (US).

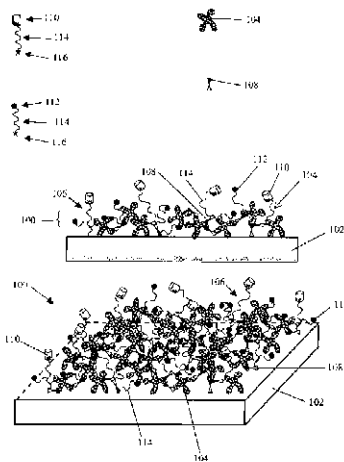
(74) Agents: PRENDERGAST, Paul, J. et al., DORSEY & WHITNEY LLP, Suite 1700, 370 17th Street, Denver, CO 80202 (US).

(81) Designated States (optional): A1, AG, AI, 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, GR, GU, GM, HT, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (optional): ARIPO patent (G1), GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW;

[Continued on next page]

(54) Title: FUNCTIONAL SURFACE COATING



(57) Abstract: Compositions and methods of preparing functional thin films or surface coatings (100) with low non specific binding are described. The thin films contain specified functional groups and non-specific binding repellent components. The thin films are either covalently bound to or passively adsorbed to various solid substrates (102). The specified functional group (110) provides specified activity for the thin film modified solid surfaces and non-specific binding repellent components (101) significantly reduce the non specific binding to the thin film modified solid surfaces. Non-specific binding repellent components do not affect specified functional group's activity in the thin films. In these methods, specified functional groups are anchored to the solid substrates through a spacer (114). Surface coatings are also described having both non specific protein binding properties combined with functional groups for specific binding activity thereby providing surface coating that specifically recognize target proteins but limit binding to non specific protein.

WO 03/000433 A1

WO 03/000433 A1



European patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
 European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
 GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
 NE, SN, TD, TG).

TR, TY, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO
 patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG,
 ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
 TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES,
 FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI
 patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
 MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:

as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i)) for the fol-
 lowing designations: 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, MU, MV, MZ, NO, NZ,
 OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,

Published:

with international search report

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

WO 03/00433

PCT/US02/20408

FUNCTIONAL SURFACE COATING**CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS**

- This application claims the benefit of priority of United States Provisional Patent Application Serial No. 60/301,223, filed on June 26, 2001, entitled FUNCTIONAL SURFACE COATINGS WITH LOW NON-SPECIFIC BINDING PROPERTIES, which is incorporated herein by reference.

FIELD OF THE INVENTION

- This invention relates generally to the field of surface coatings that impart desirable chemical, physical, and biological properties to a substrate material. In particular, this invention relates to surface chemistries designed to inhibit non-specific adsorption or binding of molecules, particles, or cells to a surface while also providing a means for immobilizing or entrapping specific molecules, capture agents, drugs, particles, or cells to or within that same surface. This invention further relates to coatings for application to a variety of chemically distinct substrate materials.

BACKGROUND OF THE INVENTION

- Controlling the interactions between naturally derived or synthetic materials and biomolecule-containing fluids is of increasing importance in a variety of fields. For example, biomolecule interactions with a variety of substrate materials, i.e., surfaces, are central to numerous analytical systems, including immunodiagnosics, gene and protein microarrays, and microfluidic "lab-on-a-chip" devices. Analytical techniques such as capillary electrophoresis (CE), surface plasmon resonance (SPR), and quartz crystal microbalance (QCM) also intimately depend on biomolecule-surface interactions. Performance of biomedical devices including cardiovascular replacements (e.g., catheters, valves, stents), contact and intraocular lenses, shunts, filters, diaphragms, pumps, membranes, drug delivery devices and surgical components also depend on control of biomolecule-surface interactions. Maritime surfaces, including heat exchange units, ship-board components (e.g., hulls, superstructure), installations (pump derricks), docks, and environmentally exposed instruments also require control of biomolecule deposition (algae, fungus, microbial exudates) on their surfaces.

Of major common concern within these fields is the level of non-specific biomolecule (e.g., protein, organismal, nucleic acid) binding to target and device substrates. In non-sensing or non-diagnostic applications, this concern general focuses on surface-induced biofouling (deposition of biological material that compromises function).

WO 03/00433

PCT/US02/20408

This is particularly problematic in biomedical devices and maritime applications. In medical, food, and environmental sensing and diagnostics, specificity, signal-to-noise ratios, and detection limits of a target analyte (e.g., polysaccharides, nucleic acid, drug, peptide or protein), often at limited concentrations in a milieu of non-target biomolecules (e.g., serum proteins), are limited by surface non-specific non-target (e.g., protein) binding on the substrate. Reduction or elimination of this non-specific binding noise will improve device performance, and enhance signal-to-noise ratios, detection sensitivity and specificity of many analytical systems.

Beyond analytical systems, the synthetic material-biological interface is central to the proper function of many biomedical devices. For example, non-specific binding of proteins at medical implant surfaces is believed to be at least partially responsible for triggering the foreign body response, which in turn can lead to device failure or rejection. This biofouling is also blamed for device infection incidence, thrombosis, and sensor deterioration over time in vivo. Alternatively, it has been hypothesized that implant surfaces that interact with target biomolecules in a specific manner can be used to stimulate natural healing, avoiding many adverse reactions from biofouling. In addition, numerous non-analytical and non-medical applications require direct control of surface-biological fluid interactions. Examples include non-fouling paints and anti-microbial coatings for industrial equipment, colloid and mineral handling systems, cooling systems, marine structures, and bioreactors used for production of biological products in vitro using biological components.

Improvements in these important fields all would benefit from development of improved surface chemistries where specific target binding, tethering or entrapment can be controlled versus non-specific deposition of undesired components. A core requirement of these surface chemistries is that the synthetic surfaces show reduced or limited non-specific binding (NSB) to non-targets, biomolecules, particles, or cells. NSB occurs through a variety of basic molecular-level adhesion mechanisms, including all combinations of electrostatic, hydration, hydrophobic, acid-base, dispersive and hydrogen bonding interactions. Soluble proteins, for example, generally ubiquitously and universally adsorb to a surface through combinations of these non-specific interactions, creating an adherent layer of biological material difficult to remove (a critical step in biofouling). Protein NSB often results in protein denaturation (loss of native structure) on surfaces that can prompt a cascade of additional NSB events (further adsorption of other proteins, cells, micro-organisms, etc., to the exposed interior of the denatured protein).

WO 03/00433

PCT/US02/20408

This biofouling NSB cascade produces undesired infection, coagulation, inflammatory responses for biomedical implants, reduced signal-noise ratios for diagnostic assays and sensors, corrosion and deterioration for maritime and environmentally exposed structures, turbulence and reduced propulsion efficiency for maritime shipping, and undesired

- 5 pressure drops and flow properties in capillaries, tubes and microfluidic chambers. Inhibition of protein and biomolecule NSB is thus an important performance feature in the design of improved synthetic materials that contact, function with, and operate in biological fluids.

- While NSB to surfaces is most often undesirable, specific capture of designated
10 biomolecules, particles, drugs or cells by binding at a target surface is often desirable. Examples include the specific binding of bioactive antibodies on a surface for immunoassay applications, specific binding of nucleic acid primers on a surface for polymerase chain reaction (PCR) or genetic assays (microarrays), and specific binding of growth factors or antibiotics to surfaces to promote or hinder cell growth, respectively.
15 The goal of such specific binding to a surface is to bind only one designated type of molecule, particle, or cell, to the target surface and to do so in a manner that preserves the recognition activity and native structure and function of the specifically bound molecule, particle or cell.

- Thus, functional surface chemistries are needed that (1) inhibit non-specific
20 binding of unwanted molecules, particles, or cells to a treated surface; (2) inhibit non-specific binding of unwanted molecules, particles, or cells to a treated surface while promoting specific biomolecule, particle, or cell binding, to that same surface; or (3) that inhibit non-specific binding of unwanted molecules, particles, or cells to a treated surface while promoting specific and functionally or biologically active biomolecule, particle, or
25 cell binding, to that same surface.

- Several strategies have been employed to create surfaces with these desired low non-specific binding properties. These strategies typically involve selection of coating chemistry or surface functional groups that exhibit low NSB and then fixing them to an underlying substrate. The fixing step may be based on physical adsorption or on direct
30 covalent linkage (chemical coupling). From a performance perspective, the layer must exhibit robust bonding to the underlying support while maintaining low-NSB properties to the environment.

Surface coating strategies based on synthetic polymers have been the focus for development of most non-fouling coating applications. A. S. Hoffman, "Non-Fouling

WO 03/00433

PCT/US02/20408

Surface Technologies," *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition* 10, no. 10 (1999): 1011-1014; Poly(ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications, ACS Symposium Series 680, J. Milton Harris and Samuel Zalipsky, Eds., American Chemical Society, 1997. Hydrophilic, polar, electrically neutral polymers such as polyethylene glycol (PEG) derivatives have received significant attention because of their long-

5 acknowledged abilities to reduce protein NSB from solutions in coated formats. The challenge has been to effectively fix these and other similar water-soluble polymers to useful substrate materials at densities sufficient to impart effective NSB through

10 contiguous coating. One approach has been to physically adsorb hydrophilic-hydrophobic block copolymers to hydrophobic supports. Hydrophobic interactions between the substrate and hydrophobic polymer block are sufficient to attach coating polymer molecules to the substrate while presenting the hydrophilic, low-NSB block to the aqueous surroundings. U.S. Patents 5,075,400 and 6,093,559.¹ Problems with these physically adsorbed films, however, include reversible polymer desorption, particularly in

15 challenging liquid environments (e.g., high salt, non-neutral pH, elevated temperature, shearing flow conditions, etc.), and the ability to achieve reproducible adsorbed densities effective to limit NSB.

Another approach to creating surfaces with low non-specific binding properties relates to the covalent coupling of low-NSB coating polymers to the target surface. PEG,

20 for example, can be covalently grafted to substrates through reactive end groups introduced to the PEG molecule. U.S. Patent 5,512,329. Azido chemistry and quinone chemistry are two photo-reactive end group examples for such fixation to polymer substrates. A disadvantage of this approach is that it is confined to coating particular types of polymer supports where this coupling chemistry is effective and available.

25 Attachment to interesting inorganic substrates such as glass or metals requires some intermediate substrate attachment layer, which adds to the cost, time consumption, and overall effectiveness of the coating procedure. One particular example of this procedure relies on PEG-silanes used to create coatings on active metal oxide surfaces (glass, silica, titania, alumina and others). In this system, a PEG molecule is derivatized with

30 alkoxysilane or chlorosilane terminal reactive groups. Hydrolysis and chemical condensation of the reactive silanes presumably serve to anchor the PEG molecules to oxide substrates such as glass or silicon oxide with exposed surface silanol groups. Despite their initial promise, PEG-silane surfaces are difficult to reproduce practically. It is believed that the terminal alkyl silane reactive groups hydrolyze in solution and then

WO 03/00433

PCT/US02/20408

react with each other in the bulk solution, prior to attachment to the substrate, yields poorly defined films (reactive groups cross-react with each other rather than to anchor the PEG-silane to the surface) allowing for a partial physically adsorbed polymer coating mixed with some fraction of chemical attachment. Control of this for reliable coating and low NSB is difficult.

An alternative to forming a polymer film for blocking non-specific binding on a substrate is to inhibit the non-specific binding to the substrate with a biomolecule-blocking step (masking). The most common practice in this respect is to pre-adsorb substrates with soluble bovine serum albumin (BSA), casein, or serum. These proteins (or proteins in the serum) adsorb strongly to most surfaces from aqueous solution, providing an adsorbed protein layer that minimizes subsequent non-specific binding of other biomolecules. While such protein blocking has proven to be functionally effective, the blocking step is time consuming, labor intensive, and subject to reproducibility problems. In addition, there is a general desire to move away from the use of animal and serum-derived products in surface chemistry applications for safety reasons.

Thus a perceived improvement in the art is a solid-phase surface coating capable of consistently strong, direct and effective attachment to a variety of substrate materials. The surface should reliably exhibit low non-specific binding properties and should be easy to use (i.e., should require no blocking steps). Ideally, the surface chemistry should also provide a means for immobilizing chemically reactive coupler or functional groups on the surface, which in turn exhibit strong specific attachment properties for desired target immobilization onto surfaces. Against this backdrop of technical challenges and current limitations in the field, the present invention has been developed.

SUMMARY OF THE INVENTION

Embodiments of the present invention are directed at novel surface chemistries and methods of preparing functional solid-phase coatings and surfaces with improved properties both limiting NSB and enabling specific binding. The present invention provides for robust coating bonding over various substrates, including oxide, metal, composite, ceramic, and polymer substrates while simultaneously imparting surface properties that substantially inhibit non-specific binding of solutes from external milieu.

Without wishing to be bound to a particular theory, it is considered that the interaction between the various components of the surface chemistry, described in more detail below, provide the strengths and benefits of a novel surface coating with robust attachment to a variety of chemically distinct solid phase substrates. The chemistry of the

WO 03/00433

PCT/US02/20408

coating substantially reduces dependence upon a single attachment mechanism (i.e., silane coupling, physical adsorption, photoreaction, chemical attachment, etc.). Instead, the multifunctional nature of the coating chemistry provides multiple likely attachment mechanisms, including covalent attachment to oxide, ceramic and polymer substrates, crosslinking within the coating, and adsorption via hydrophobic interactions, acid-base chemistry, hydrogen bonding, etc., which act in combination or synergistically to stabilize the coating on the substrate and reliably present the desired surface properties. Importantly, chemical cross-linking within the applied coating itself is believed to augment the coating cohesive character, coating-substrate interactions, and add to the robustness of substrate attachment.

The present invention promotes formation of a functional surface coating. The term "functional" is used herein to describe the ability to perform a specific chemical or analytical task. For example, one class of functional surfaces can provide specific affinity binding or ligand-receptor binding capabilities with designated solutes. For example, a surface can be created that presents biotin groups consistently at the surface. Biotin groups exhibit a highly specific, high affinity binding interaction with streptavidin protein molecules and their mutants. The functional surface in this example, therefore, is a biotinylated, low background NSB coating where function is defined by the ability to specifically bind streptavidin.

In another embodiment of the present invention, the functional surfaces are designed to inhibit all molecular binding interactions to the coating. In this case, the specific functional task is to be interfacially inert. A manifestation of such "inert" function could be a surface that presents effective densities of methoxy-capped ethylene oxide oligomers or polymers. Such surface groups generally do not form covalent linkages, generally do not show affinity binding properties to proteins, cells, or particles, and in general resist adsorption of biomolecules and other soluble species. In the context of the present invention, these inert groups are incorporated directly into the underlying low-background NSB coating invention.

The present invention embodies a coating architecture comprising designated functional surface groups (e.g., methoxy-PEG or biotin) integrated with a cross-linked, low-NSB coatable matrix. The surface functional groups are covalently coupled to the coating matrix through spacer molecules selected to provide conformational flexibility and to be inert to non-specific adsorption. The low-NSB matrix comprises these spacers and other so-called matrix-forming molecules that have been cross-linked into the

WO 03/00433

PCT/US02/0408

coatable film. Exemplary matrix-forming molecules include polysaccharides (dextran), ethylene oxide-containing oligomers (linear, block, dendritic or star polymer forms), block co-polymers (Poloxamer[®], Pluronic[®]), and non-ionic surfactants (Tween[®], Triton[®]). The coating architecture is believed to rely on a combination of both physical and chemical cross-linking mechanisms. In addition to physical entanglement of large molecules in the matrix, hetero- or bi-functional, reactive cross-linker molecules may also be included and chemically activated in the coatings. Covalent cross-linking is believed to occur both within the coating matrix and to the substrate. An advantage of using hetero- and bi-functional cross-linkers in this invention is that the coating can be effectively applied and cross-linked to a variety of chemically distinct substrate materials with or without specific surface attachment. The coating described in this invention provides robust attachment both within itself and also to various substrates.

The present invention provides methods of preparing a functional surface coating using the components with the described functions. The methods include providing a substrate with an effective amount of an active component, providing an effective amount of a cross-linking component and providing an effective amount of a matrix-forming component. The active component, the cross-linking component and the matrix-forming component are incorporated onto the substrate, and integrated with each other to create the stable, robust functional surface improvement.

The present invention also provides a functional surface for performance of immuno, genetic, microbial, cellular, particulate and other biochemical or target analyte binding assays. Thus, a non-specific binding matrix is attached to a substrate and an active component is integrated into the non-specific binding matrix to impart these coating selectivities for various assay formats.

In addition, embodiments of the present invention provide functionally inert surface coatings for medical implant devices for effectively limiting host rejection of the medical implant device through attached ligands, incorporated drugs, and reduced NSB responsible for biofouling of such devices in- or ex-vivo.

These and various other features as well as advantages which characterize the invention will be apparent from a reading of the following detailed description and a review of the appended claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 is a diagrammatic depiction of a functional surface, in accordance with one embodiment of the present invention. The coatable embodiment comprising an active

WO 03/00433

PCT/US02/20408

component, a cross-linking component, and a matrix-forming component are schematically depicted to represent their function within the integrated coating on the substrate. Note that a schematic representation of the components comprising the present invention is shown at top, a cross-sectional representation of possible coating architecture is shown in the middle, and a three-dimensional representation of possible coating architecture is shown at bottom.

Fig. 2 illustrates the non-specific binding of protein on biotin functional surfaces in accordance with one embodiment of the present invention on SiO_2/Si wafers, compared to BSA-blocked SiO_2/Si wafers.

Fig. 3 illustrates the non-specific binding of protein on thiol-reactive functional surfaces in accordance with one embodiment of the present invention on SiO_2/Si wafers, relative to BSA-blocked and bare SiO_2/Si wafers.

Fig. 4 illustrates the non-specific binding of protein on BSA-blocked substrates and functional surfaces according to one embodiment of the present invention on various plastic substrates.

Fig. 5 illustrates the non-specific binding of protein on a BSA-blocked substrate and functional surfaces in accordance with one embodiment of the present invention on a metal substrate, in particular a gold substrate.

Fig. 6 illustrates the non-specific binding of protein on functional surfaces in accordance with one embodiment of the present invention on glass substrate, BSA-blocked glass, and bare glass substrate.

Fig. 7 illustrates the non-specific binding of fibrinogen on bare glass, BSA-blocked glass, and functional surfaces in accordance with one embodiment of the present invention.

Fig. 8 illustrates the specific binding of streptavidin on biotin functional surfaces in accordance with one embodiment of the present invention.

Fig. 9 illustrates the specific binding of biotinylated horseradish peroxidase to streptavidin functional surfaces in accordance with one embodiment of the present invention on glass substrates.

Fig. 10 illustrates the specific binding of thiolated streptavidin to thiol-reactive functional surfaces in accordance with one embodiment of the present invention on plastic substrates. Each concentration was run in triplicate and error bars represent one standard deviation in the set.

WO 03/000433

PCT/US02/20408

Fig. 11 illustrates the specific binding of streptavidin to amine-reactive functional surfaces in accordance with one embodiment of the present invention on primed glass substrates. Each concentration was run in triplicate and error bars represent one standard deviation.

5 Fig. 12 illustrates the specific binding of biotinylated antibody to a streptavidin functional surface in accordance with one embodiment of the present invention on glass substrate.

Figs. 13A and B illustrate the improved assay sensitivity for staphylococcal enterotoxin B for a functional surface according to one embodiment of the present invention. Note that Fig. 13A shows optical density at 450 nm and Fig. 13B shows membrane thickness.

10 Figs. 14A, B and C illustrate the use of one embodiment of the present invention in an oligonucleotide microarray application, and specifically illustrates the use of oligonucleotides with amine-reactive functional surfaces in comparison to state-of-the-art commercial polymer and silane chemistries. Fig. 14A shows fluorescence detection of Cy 5 Streptavidin bound to 3' biotin labeled oligonucleotide. Signal intensities are reported in relative fluorescence units. Data were obtained from three representative runs and error bars represent one standard deviation. Fig. 14B shows fluorescence background determination where noise levels are reported in relative fluorescence units. Data 20 obtained from one slide and error bars represent one standard deviation. Fig. 14C shows the resulting signal-to-noise ratios (S/N) for the coating chemistry compared to the polymer and silane slide chemistries. One slide represented per data points.

Fig. 15 illustrates the use of one embodiment of the present invention in a protein microarray application, specifically illustrating the use of streptavidin functional surfaces 25 for selective capture of biotinylated antibodies on glass substrate.

Fig. 16 illustrates the non-specific binding of various coated surfaces demonstrating synergistic effects of the functional surface according to one embodiment of the present invention.

30 Figs. 17A and B illustrates the use of different matrix-forming components in several embodiments of the present invention that show low non-specific protein binding and high specific protein attachment.

Figs. 18A and B illustrates the inhibition of fibroblast cell proliferation after three days of culture on a coated surface embodiment of the present invention (A) relative to a tissue culture polystyrene control (B).

WO 03/00433

PCT/US02/20408

DETAILED DESCRIPTION OF PREFERRED EMBODIMENTS

The features and other details of the preferred embodiments of the present invention will now be more particularly described. It is to be understood that the particular embodiments of the invention are shown by way of illustration and not as limitations of the invention. The principle features of this invention can be employed in various embodiments without departing from the scope of the invention.

The present invention provides methods and compositions for the preparation of multi-component, multi-functional thin film coatings 100 applied to and stabilized upon a variety of substrates 102 (see Fig. 1). These coatings 100 substantially inhibit non-specific binding or adsorption of non-target proteins, e.g., fibrinogen, undesired enzymes and antibodies, undesired nucleic acids, polysaccharides, particulate solutes, microbes, cells, colloids, and the like (collectively termed non-target analytes), to the coated substrate. The present invention also describes such surfaces stabilized upon a variety of substrates 102 that provide for very low non-specific binding and, if desired, high specific binding and increased assay selectivity and sensitivity.

A diagrammatic depiction of a multi-component, multi-functional surface coating 100 according to one embodiment of the present invention is shown in Fig. 1. Fig. 1 illustrates the components of the method and apparatus of the present invention and their believed interactions. As shown in Fig. 1, a substrate 102 is provided with a low non-specific binding matrix 104 affixed upon the substrate 102 and an active component 106 physically entangled and covalently bound within the applied non-specific binding matrix 104. The methods, coatings, compositions, use and kits, according to preferred embodiments of the present invention, are described in more detail below.

Methods of the present invention are directed to the preparation of functional surfaces 100 capable of either or both specific binding and reduced non-specific binding to a target substrate 102. The coating method includes providing effective amounts of an active component 106, a cross-linking component 108, and a matrix-forming component 104. These three general components are incorporated onto the substrate, thereby creating and comprising the functional surface coating 100 and imparting the properties described by the invention.

The term "functional surface" 100 is used herein to describe a surface that employs specific chemical groups to selectively bind desired target molecules, particles, cells, and the like (collectively called target analytes), from external milieu, and/or to collectively reject undesired molecules, particles, cells, and the like (collectively called

WO 03/00433

PCT/US02/20408

non-target analytes), from the surface. By this definition, one class of functional surfaces 100 provides specific binding capabilities through the incorporation of specific functional groups 110 at the surface. An example is a biotinylated surface that exhibits high avidin binding activity (typically in the range of 300 to 500 ng/cm² of avidin) and low NSB of 5 other biologics, particulates, and solutes (typically in the range of 0.01 to 50 ng/cm²). The term "functional surface" is also used herein to describe chemical groups or surface compositions that exhibit inherently low protein or particulate binding or adsorption in the range specified (typically around 0.01 to 50 ng/cm²). Thus, the "function" in this class of surfaces is to be substantially inert to protein, cell, microbe and particulate 10 adsorption. An example of such inert functionality is a surface that presents methoxy-capped ethylene oxide oligomers or polymers. These inert surface groups 112 generally do not form covalent linkages, generally do not show affinity binding properties, and in general tend to resist adsorption of biomolecules, particulates, cells, microbes, and other soluble species (non-target analytes).

15 For the purposes of this application, "effective amount" is defined as an amount of a specified coating component that, when combined with the other coating components, yields a coating matrix that meets specified performance standards for the desired application (e.g., assay or implant coating). These performance standards are defined for both "low non-specific binding or adsorption" ("low-NSB") and "highly selective specific 20 binding," as described below.

For the purposes of this application, the terms "low non-specific binding," "low non-specific adsorption," and "low-NSB" are defined relative to the current method of bovine serum albumin (BSA) blocking, i.e., masking. BSA-blocking is a process in which the soluble serum protein, bovine serum albumin, is physically adsorbed from 25 solution to a substrate material prior to the use of that substrate in a biological fluid setting. This pre-adsorbed BSA layer serves to inhibit additional solute or particulate adsorption on the substrate. The BSA-blocking method represents a practical state-of-the-art process for the inhibition of non-specific binding or adsorption to a variety of substrates, particularly in the context of biochemical assays. Thus, for the purposes of the 30 present invention, a coating formulation that inhibits NSB in a manner similar to or superior to BSA-blocking, without the requirement of a BSA-preadsorption or any equivalent blocking step, is herein considered to be a low-NSB surface.

The "highly selective specific binding" performance standard is also defined in a comparative manner. For the purposes of this application, a surface is considered to be

WO 03/00433

PCT/US02/20408

highly selective when the specific binding group incorporated in the surface is able to selectively bind target (analyte) species from a complex milieu, when a similar surface lacking such specific binding groups shows little or no capacity to specifically bind target species (analytes). For example, a biotinylated surface is said to be highly selective
 5 relative to its non-biotinylated counterpart when significant, measurable quantities of avidin or streptavidin are bound to the former and not to the latter under the same binding conditions.

A final performance standard is the combination of "no selectivity" and low-NSB. In this case, no binding or adsorption is desired, either specific or non-specific. Again,
 10 performance is defined relative to a competing method such as BSA-blocking.

The incorporation or affixing step of the surface coat 100 onto a substrate 102 preferably comprises combining effective amounts of active component 106, a cross-linking component 108 and a matrix-forming component 104 into a coatable mixture. This coatable mixture is applied to the substrate and cured to yield the stable, robust
 15 surface. Coating mixtures may also include other non-covalently attached functional groups, for example streptavidin, which becomes entangled within the matrix.

The methods of the present invention preferably include combining the active component, matrix-forming component, and cross-linking component in a carrier solvent or solvent mixture. The range of component concentrations used depends on the
 20 particular coating method chosen. Selection of solvent also depends on component chemistry, the coating method and choice of substrate material, with factors such as solvent surface tension, solubility parameter, viscosity, and reactivity with the chosen substrate influencing solvent selection.

Active Component For Use With The Present Invention:

25 Typically, embodiments of the active component 106 of the present invention include a functional group 110, a spacer group 114 and a binding group 116 (see Fig. 1). Note that where no specific binding is required, an inert functional group 112 can be inserted in place of the functional group 110.

In more detail, the term "active component" is intended to signify a bifunctional
 30 reactive molecule that includes at least one reactive group (for example 116) at one end of the molecule and at least one functional group (for example 110 or 112) at either end of the molecule. The distance between the two groups can be varied by varying the length of the spacer group 114 to provide the desired attributes as defined by the final product required by a person skilled in the art. As previously described, the active component

WO 03/00433

PCT/US02/20408

106 preferably includes specific chemical parts representing the functional group, spacer, and binding group. Specific definitions of these terms are provided below. The active component 106 is preferably a combination of these groups; however, it is to be understood that the active component need not necessarily comprise three distinctly separate groups. It is possible that one group can act both as a functional group and a spacer group, for example. It is also possible, for example, that the functional group (for example 110 or 112) and the reactive group 116 have the same chemical structure (e.g., a homo bifunctional active component). The active component need only perform the function described with respect to each group of the active component as discussed below, with minimal parts needed to accomplish these objectives.

The term "functional group," 110 as used herein, is intended to include those groups that can generally interact with and form an association (both covalent and non-covalent) with target species external to the surface while generally not associating with non-target species. The term "functional group" may also refer to those groups that are essentially inert to binding and adsorption of any or all species in external milieu, referred to as an inert functional group 112.

For surfaces designed for specific binding applications, functional groups 110 include but are not limited to chemically active groups, receptor or ligand groups, and chelators capable of selectively binding desired target species. More specific examples of functional groups 110 include but are not limited to, for example, biotin, N-hydroxy succinimide esters, nitrophenyl esters, carboxylates, vinyls, vinylsulfone, metal chelates, glutathione, streptavidin, nitrenes, acrylate groups, phenylboronic acid, nitrotriacetic acid (NTA), imidodiacetate (IDA), salicylhydroxamic acid, hydroxyl groups (-OH), amine groups (-NH₂), imine groups (-NHR) carboxylic acids (-COOH), aldehydes (-CHO), ketones (C=O), esters (-COOR), ethers (-C-O-C), amide groups (-CONH₂), imides (-CONHR), cyanides (-CN), hydrazides (-NHNH₂), succinimides (-ONC₄O₂), maleimide, thiols (-SH), halides (-X), silyl (-SiH), azido groups (-N₃), phenyl groups, sulfonates (SO₃⁻), isothiocyanate, isocyanate, epoxides, nitrobenzyls, oxazoline, acid chloride, chloroformate, disulfide pyridyl, azlactone, cyanogen bromide, fluoroarenes, fluorocarbons, disulfides, isocyanides, sulfamido, sulfate, heparin, peptides, nucleotides, polynucleotides, organic silicon compounds and organic phosphate (phosphoramidite) compounds.

For surfaces on which little or no specific surface binding is desired, inert functional groups 112 include non-reactive chemical groups such as, ethylene glycol

WO 03/00433

PCT/US02/20408

oligomers, acrylamides, pyrrolidones, poly- and mono-saccharides and polar synthetic polymers.

Choice of the functional group is within the skill of the art, based on known binding parameters of and derivatives of the functional group(s) appropriate for each use.

- 5 Thus, the active component can be designed to specifically or non-specifically select and associate with chosen target analytes from external milieu.

The term "spacer," 114 as used herein, is intended to include those moieties that serve to separate the functional group 110 or inert functional group 112 from the binding group 116 of the active component 106. Typically, the length of the spacer group 114 is
10 sufficient when the functional group and binding group can perform their respective functions without physical or chemical interference from each other. The spacer links the functional group to the binding group and also preferably separates the functional group a distance away from the coated solid substrate 102. This spacer 114 increases the accessibility of the functional group 110 to target species and reduces the steric hindrance
15 from or binding interference with the solid substrate 102.

It is preferable that the spacer 114 is one consistent length that provides all functional groups with the same activity; however, this is not required. Example spacers include, but are not limited to, hetero-, bi-functional or multi-functional small molecules or polymers. These molecules can form covalent bonds or stable films upon solid
20 substrates and, at the same time, provide functional groups for specifically binding target species from external milieu. For example, bi-functional, linear, star-shape, and comb-like PEGs (oligomers or polymers), polyethylenimines, polystyrene, polysiloxanes, polyurethanes, proteins, poly(amino acids), polyphosphazenes, telechelic block copolymers (Pluronics[®]), polyacrylates, polyacrylamides, polymethacrylates,
25 polysaccharides, dendrimers, hyperbranched polymers, macromonomers, and cross-linking or heterobifunctional alkyl-linked coupling reagents are suitable spacers.

The term "binding group," 116 as used herein, is intended to include those moieties that can bind the active component 106 to the coating matrix 100 and/or to the underlying support 102. The binding group 116 is preferably selected to covalently bind
30 the active component to the coating matrix or to the substrate. The binding group can also react with itself in the form of cross-linking. Examples of the binding group for use in the present invention include, but are not limited to, silanes, methacrylates, disulfides, disilazanes, sulfhydryls, acrylates, carboxylates, activated esters, other active leaving groups, isonitriles, isocyanates, phosphoramidites, nitrenes, epoxides, hydrosilyl, esters,

WO 03/00433

PCT/US02/20408

arenes, azido, amine, nitrile, vinyl groups, alkylphosphonates, and known surface-coupling reactive species known to those skilled in the art of chemical coupling to surfaces.

- In a preferred embodiment, the active component **106** is produced by combining an amount of a reactive chemistry carrying the binding group portion, such as an amino-terminated alkyl silane, with a spacer bearing a terminal functional group, such as biotin-PEG-CO₂-N-hydroxysuccinimide (NHS-PEG-biotin). This combination results in an active component having a terminal silane available to act as the reactive or binding group, a PEG portion acting as a spacer group, and biotin serving as the functional group.
- The active component has the general molecular formula X-PEG-Y, where X is the functional group and Y is the binding group. Although a list of possible functional groups is provided above, example preferred functional groups include, but are not limited to biotin, N-hydroxysuccinimide, vinylsulfone, metal ion chelates (e.g., Ni²⁺-NTA), glutathione binding group, amino, aldehyde, epoxy, mercapto, maleimide, heparin, methoxy, and sulfonate. Example preferred binding groups include, but are not limited to silane, azide, acrylate, aldehyde, isocyanate, phosphonate, and epoxy.

- The methods of the present invention preferably include forming a 0.001 mol/liter to 0.1 mol/liter solution of active component **106** in a solvent, more preferably 0.005-0.02 mol/liter solution of active component in a solvent, and most preferably 0.01 mol/liter solution of active component in a solvent. As noted above, the active component **106** is preferably a molecule of the form X-PEG-silane, wherein: X is a functional group such as biotin, vinylsulfone, or an N-hydroxysuccinimide ester; PEG is a polyethyleneglycol polymer, preferably of molecular weight 2000 to 5000 atomic mass units; and silane is a hydrolyzable silane precursor group (e.g., trialkoxy or trichlorosilane).

- In a preferred embodiment, the active component **106** is a biotin-PEG-silane molecule formed by reacting biotin-PEG-CO₂-N-hydroxysuccinimide (biotin-PEG-NHS, molecular weight 3400, e.g., Shearwater Corp., OH2Z0F02) with an amino-terminated alkoxy silane ((3-trimethoxysilylpropyl)-diethylenetriamine, e.g., Gelest, SIT8398.0) at a 1:1 mole ratio in the chosen solvent. The reaction is preferably carried out at room temperature for two hours. The N-hydroxysuccinimide group on the biotin-PEG-NHS reacts reliably with the terminal amine on the aminosilane to yield the biotin-PEG-silane active component. An example solvent for the active component is *N,N*-dimethylacetamide (DMAC, Aldrich 27,055-5).

WO 03/00433

PCT/US02/20408

In another preferred embodiment, two active components 106: biotin-PEG-silane and methoxy-PEG-silane, are combined in the coating mixture. By diluting the biotin functional group in "inert" methoxy groups, increased biotin binding activity of bound streptavidin can be achieved. The first active component is the biotin-PEG-silane, molecular weight 3400 described in the previous paragraph. The second active component is a methoxy-PEG-silane, formed by reacting methoxy-PEG-OCH₂CH₂-CO₂-N-hydroxysuccinimide (methoxy-PEG-NHS), preferably of molecular weight less than 3400, most preferably molecular weight 2000 (e.g., Shearwater Corp., 2M4M0D01), with an amino-terminated alkoxy silane ((3-trimethoxysilylpropyl)-diethylenetriamine, e.g., Gelest, SIT8398.0) at a 1:1 mole ratio in the chosen solvent.

In another preferred embodiment, the active component is a methoxy-PEG-silane, preferably formed by reacting methoxy-PEG-OCH₂CH₂-CO₂-N-hydroxysuccinimide, molecular weight 5000 (e.g., Shearwater Corp., 2M4M0H01) with an amino-terminated alkoxy silane ((3-trimethoxysilylpropyl)-diethylenetriamine, e.g., Gelest, SIT8398.0) at a 1:1 mole ratio in the chosen solvent.

In another preferred embodiment, the active component 106 is a vinylsulfone-PEG-silane, preferably formed by reacting vinylsulfone-PEG-CO₂-N-hydroxysuccinimide, molecular weight 3400 (e.g., Shearwater Corp. 2Z5B0F02) with an amino-terminated alkoxy silane ((3-trimethoxysilylpropyl)-diethylenetriamine, e.g., Gelest, SIT8398.0) at a 1:1 mole ratio in the chosen solvent.

In another preferred embodiment 106, the active component is an NHS-PEG-silane, preferably formed by reacting a bis-functional N-hydroxysuccinimidyl ester of PEG (SPA-PEG-SPA, molecular weight 3400, e.g. Shearwater Corp., 4M4M0F02) with an amino-terminated alkoxy silane ((3-trimethoxysilylpropyl)-diethylenetriamine, e.g., Gelest, SIT8398.0) at a 2:1 mole ratio in the chosen solvent. In another preferred embodiment, the active component 106 is a COOH-PEG-silane, preferably formed by reacting COOH-PEG-N-hydroxysuccinimide, molecular weight 3400 (e.g., Shearwater Corp., 0Z2Z0F12) with an amino-terminated alkoxy silane ((3-trimethoxysilylpropyl)-diethylenetriamine, e.g., Gelest, SIT8398.0) at a 1:1 mole ratio in the chosen solvent.

Cross-Linking Component and Matrix Forming Component For Use With The Present Invention:

The "cross-linking component" 108 of the present invention is defined herein as a reactive molecule with multiple reactive moieties that when activated by appropriate

WO 03/00433

PCT/US02/20408

stimulus, provides cross-linked stabilization within the film **100** as well as covalent or adsorptive film attachment to or upon various solid substrates **102**.

In one embodiment, the cross-linking component **108** includes the alkylsilane and sulfonylazide reactive end groups, which when combined create dual reactive functionalities that upon curing proceed to form spontaneous cross-links both within the coating and to various substrates **102**. Exemplary crosslinking groups include molecules that combine groups from the list including: methacrylates, acrylates, epoxides, silanes, perfluorophenyl azides, aryl azides, bis-nitrenes, acyl azides, azidoformates, sulfonyl azides, phosphoryl azides, diazoalkanes, diazoketones, diazoacetates, beta-keto-alpha-diazoacetates, aliphatic azo, diazirines, ketenes, photoactivated ketones, dialkyl peroxidases, diacyl peroxidases, or quinones. As an example, 6-azidosulfonylhexyltriethoxysilane is provided, which includes silane groups able to form covalent bonds with reactive hydroxyl groups present on surfaces of substrates such as a oxidized polymers, metal oxides, silicon wafers, silicates, titanates, aluminates, or glasses. The silane groups can also cross-linked with each other or with other silane groups, forming a three-dimensional cross-linked matrix. The azidosulfonyl group can form covalent bonds with aliphatic and aromatic compounds both on the substrate **102** and/or within the costable multicomponent matrix **104**.

The term "matrix-forming component," **104** as used herein, is intended to include those molecules known in the art to have physical characteristics of providing low non-specific binding properties towards biological (e.g. proteins, polysaccharides, cells, and bacteria) and non-biological (e.g. particulate, colloidal, ionic, siliceous, and carbonaceous) compounds. Ostuni, E.; Chapman, R. G.; Holmlin, R. E.; Takayama, S.; Whitesides, G. M. *Langmuir*, 17: 5605-5620 (2001). Such matrix-forming molecules typically include one or more of the following characteristics: such molecules can be polar, hydrophilic, and electrically neutral, are hydrogen bond acceptors, and typically exhibit conformational flexibility.

Examples of the matrix-forming component **104** include, but are not limited to, polyoxyethylene-based surface-active substances, including polyoxyethylene sorbitan tetraoleate (PST), polyoxyethylene sorbitol hexaoleate (PSH), polyoxyethylene 6 tridecyl ether, polyoxyethylene 12 tridecyl ether, polyoxyethylene 18 tridecyl ether, Tween[®] surfactants, Triton[®] surfactants, and the polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymers such as the Pluronic[®] and Poloxamer[®] product series (from BASF). Other matrix-forming components include dextrans, linear PEG molecules (MW 500 to 5,000,000),

WO 03/00433

PCT/US02/20408

star-shaped PEG molecules, comb-shaped and dendrimeric, hyperbranched PEG molecules, as well as the analogous linear, star, and dendrimer polyamine polymers, and various carbonated, perfluorinated (e.g., DuPont Zonyl[®] fluorosurfactants) and siliconated (e.g. dimethylsiloxane-ethylene oxide block copolymers) surfactants. Matrix-forming components 104 of biological origin include casein, serum dilutions, bovine serum albumin, glycolipids and lipids, heparin and related glycosaminoglycans, casein and polysaccharides (dextran, hyaluron, sepharose, cellulose, agarose, chondroitins, chitosans).

A solution of cross-linking component 108 and matrix-forming component 104 is also formed in a carrier solvent. As noted above, the matrix-forming component 104 is preferably a linear or branched polyoxyethylene-containing surfactant. Most preferably, the matrix-forming component 104 is polyoxyethylene sorbitan tetracetate (PST, e.g., Aldrich 46,639-5). The matrix-forming component is preferably dissolved to provide a 0.01 to 5 % (vol/vol) solution in the final coating mixture. More preferably, the matrix-forming component has a concentration of 0.5 to 2% in the final coating mixture. Most preferably, the matrix-forming component 104 concentration is 1% (vol/vol) in the final coating mixture.

As noted above, the cross-linking component 108 is preferably a bi-functional chemically reactive compound, and more preferably a hetero bi-functional molecule with azido functionality on one end of the molecule and alkyl silane functionality on the other end. Most preferably, the cross-linking component 108 is an azidosilane (6-azidosulfonylhexyl-triethoxysilane, 95%; Gelest, e.g., SLA0780.0). The cross-linking component is preferably dissolved to give a 0.001 to 0.5 mol/liter solution, and more preferably, 0.005 to 0.1 mol/liter solution in solvent. Most preferably, the cross-linking component 108 is dissolved to provide a 0.02 mol/liter solution. The preferred solvent for the cross-linking component/matrix-forming component mixture is dimethylsulfoxide (DMSO, e.g., Aldrich 47,230-1), although other solvents are envisioned.

Coating Solutions For Use In The Present Invention:

In use, the coating solutions 100 of the present invention are prepared by combining an active component solution of the present invention with the cross-linking component 108/matrix-forming component 104 mixture of the present invention at a variety of different volume ratios. The most preferred ratio is approximately 1:4 volume ratio of active component solution to cross-linking/matrix-forming component solution. The most preferred final component concentrations in the coating solution are: 0.002

WO 03/00433

PCT/US02/20408

mol/liter active component (e.g., biotin-PEG-silane), 0.009 mol/liter matrix forming component (polyoxyethylene sorbitan tetroate) and 0.0183 reactive component (azidosilane).

Note that the most preferred final concentration depends in part on the coating method to be employed and the desired coating thickness. The most preferred concentrations described above are associated with a spin-coating fabrication operation. However, other active component to cross-linking/matrix-forming ratios and final concentrations are envisioned to be within the scope of the present invention as long as the combinations provide useful coating solutions that exhibit the desired specific/non-specific binding characteristics. Note also that other target proteins or analytes may be included in the combination of active component, cross-linking component, and matrix-forming component. For example, streptavidin may be mixed with biotinylated active components to form a streptavidin-biotin surface, thereby providing a surface coating having streptavidin immobilized within the coating matrix (termed a streptavidin-biotin surface, see Example VIII below).

Substrates For Use In The Present Invention:

The term "substrate," **102** as used herein, is art recognized and is intended to include any surface capable of being coated with the combination of components of the present invention. Suitable substrates **102** include refractive, transparent, adsorptive and opaque solid-phase materials. They include, but are not limited to metals, such as, gold, platinum, silver, copper, iron, aluminum; polymers: such as polystyrene, polysulfone, polyetherimide, polyethersulfone, polysiloxane, polyester, polycarbonate, polyether, polyacrylate, polymethacrylate, cellulose, nitrocellulose, perfluorinated polymers, polyurethane, polyethylene, polyamide, polyolefin, polypropylene, nylon, hydrogels, and related blends and copolymers; non-metals, such as silica, silicon dioxide, titanium oxides, aluminum oxides, iron oxides, carbon, silicon, various silicates and other glasses, for example soda-lime glass, ceramics and sol-gels. Advantageously, the surface chemistry of the present invention secures itself over all these classes of substrates **102** and their derivatives and modifications. Again, it is believed that the cross-linking and other reactions within the matrix-forming component, reactive component and active component facilitate the stability of the non-specific binding matrix upon and over the substrate **102** without unnecessary covalent attachment to the substrate.

Note that some substrates **102** for use in the present invention may require cleaning steps and drying steps, oxidation steps or other procedures known in the art to

WO 03/00433

PCT/US02/20408

facilitate the effective uniform coating interaction between the coating solution 100 and the target substrate 102. For example, glass slide substrates are typically "primed" by rinsing in high purity water, soaked in an alkaline glass cleaner, sonicated for a period of approximately 15 minutes in the cleaner, soaked in high purity water and finally blow dry under N₂ gas. Other substrate preparation procedures are discussed in the Examples or would be known to one of skill in the art.

Application of The Coating Solution to a Substrate:

The coating mixture, as described above, is applied to a target substrate 102. Preferably the application of the coating solution to the substrate 102 is accomplished by spin coating, dip coating, spray coating, or any other type of coating or application method known to those of ordinary skill in the art. More preferably, the coating mixture is spin coated onto the substrate. Most preferably, the coating mixture is spin coated onto the substrate by applying 0.5 ml of the coating mixture to a substrate in a spin coater (e.g., Laurel Model WS-200-4NPP/RPM/HSP-8K/VAC) and spinning at 3500 to 5000 rpm for 90 seconds. Note that in certain applications a second, and sometimes third, coat or application of the coating mixture to the substrate is performed. These additional coating applications allow the thickness of the coating mixture layer to vary. Coating thickness on a target substrate is typically from about 5 to 200 nm, and is preferably about 20 to 30 nm. However, coatings can be of other thickness, as long as the coating is sufficient for performing the functions of the herein described present invention.

Note that the combination of the above described components provide coatings 100 that exhibit performance superior to the same coatings comprising subsets of the components. As shown in Example XV below, embodiments of the present invention operate optimally when all the above-described components (active component 106, cross-linking agent 108, and matrix forming agent 104) are present in the coating surface 100. However, it is envisioned that embodiments of the present invention may exclude one of the above components and still maintain some level of function, albeit a function (specific and non-specific binding) at a potentially non-optimal manner.

Curing of Surface Coated Substrate Targets:

Once coated, curing, using known methods, stabilizes the coating onto the substrate. Preferably, the curing step is thermal activation in a vacuum oven. More preferably, the curing step includes a room temperature evacuation step in which the pressure within the vacuum oven is pumped down to a pressure of 150 mm Hg (absolute)

WO 03/00433

PCT/US02/20408

for a period of 30 minutes, after which the oven is heated to 40° to 140°C, most preferably to 70°C. The total thermal curing step takes approximately one hour in this method. The curing temperature and time depend in part on the physical properties of the substrate material. Hence, shorter or longer curing times may be required dependent on the temperature and physical properties of the substrate 102. The coated surfaces are then allowed to cool to room temperature. This multi-step curing process is beneficial because it provides solvent removal and sufficient reaction time and temperature to form a robust, adherent functional coating 100.

The curing step stabilizes the functional surface invention for use. Note that the curing step can be by thermal activation (discussed above), photo activation, chemical activation or any other type of curing that creates cross-linking within the functional surface as well as bonding to the substrate. Thermal activation includes, for example, heating in an oven, photo activation includes, for example, irradiation with ultraviolet light, and chemical activation includes, for example, submersion in water, chemically facilitating cross-linking. Chemical cross-linking may also proceed without external stimulus, for example through aging processes such as condensation. Any other form of chemical and physical transformation or curing can be used as known by those of ordinary skill in the art.

Example Binding Assays For Use With The Present Invention:

In one embodiment of the present invention, a functional surface 100 for performance of a biochemical or bioanalytical binding assay is provided. The functional surface comprises a general base composition tailorable to specific applications by changing appropriate functional group chemistries within the coating base formulation in a cassette-style format readily adaptable to several distinct classes of interfacial properties. The surface coating is engineered with the following components that permit facile, customized, tailoring of the platform chemistry across a number of applications: a non-specific binding matrix affixed upon and/or to the substrate; and an active component affixed to the non-specific binding matrix.

The active component 106 is preferably the same as is described above with respect to the method for producing a functional surface 100. The non-specific binding matrix facilitates adherence of the active component upon and/or to the substrate. Preferably, the non-specific binding matrix has a matrix-forming component and a cross-linking component. The matrix-forming component and the reactive component are

WO 03/00433

PCT/US02/20408

identical to those described above with respect to the method for forming a functional, selective-binding surface. Coating adhesion upon and/or to the underlying substrate is believed to be promoted by multiple non-covalent interactions (e.g., physical entanglement, non-covalent binding) between the insoluble cross-linked film matrix and substrate in addition to any covalent linkages directly to the substrate via chemical reaction.

The surface chemistries of the present invention can be utilized in numerous analytical systems, including immunodiagnosics, gene and protein microarrays and microfluidic "lab-on-a-chip" devices. Application of the surface chemistries to these analytical settings are accomplished using the compositions and methods of the present invention in ways known to one of skill in the art. Example analytic assays for use with the present invention include, but not limited to, TMB-microwell assay, which is described in the following Examples, the staphylococcal enterotoxin B sandwich assay, also described in the following Examples, oligonucleotide microarray assays, also described in the following Examples, as well as other like capture assays that quantify the presence of antigens, pathogens, particles, drugs, toxins, and metabolites.

Note that different embodiments of the surface coating 100 of the present invention may be packaged together with a number of surface coating compatible, useful, target assay ingredients to provide kits appropriate for performing analytical assays. For example, kits may include a solution of prepared surface coating, target substrate, for example primed or un-primed glass slides, assay ingredients, for example, labeled antibody, and other helpful tools (pipettes, filters, tubes, etc). Note also that kits may be packaged with the substrate pre-coated with the target surface coating for use in the particular assay of interest.

Further, the surface chemistries of the present invention can be utilized within the medical device implant field to limit or eliminate non-specific binding to the implanted device, examples include coatings to surfaces of existing devices such as catheters, shunts, pumps, filtration membranes, stents, valves, membranes and other devices. Such coatings are commonly used to reduce non-specific adsorption of biological components, cells and microbes.

In another potential embodiment, the surface chemistries of the present invention can be utilized within the medical device implant field to provide coatings that provide active functions. For example, the surface chemistries of the present invention can be used to entrap drugs for controlled release applications. In another example, the surface

WO 03/00433

PCT/US02/20408

chemistries of the present invention could be used to tether drugs, therapeutic proteins, antimicrobial compounds, etc. to the surface of a device.

Having generally described the invention, the same will be more readily understood by reference to the following examples, which are provided by way of illustration and are not intended as limiting.

EXAMPLE 1:

LOW NON-SPECIFIC BINDING (NSB) BIOTINYLATED SURFACE COATING CHEMISTRY ON A SiO_2/Si SUBSTRATE

The following example illustrates the utility of an embodiment of the present invention for limiting NSB of a protein to a treated SiO_2/Si substrate. A coating solution was prepared and used to form a low NSB, biotinylated, surface coating on a flat SiO_2/Si substrate. Experiments tested the level of non-specific binding to either an untreated SiO_2/Si substrate or to the low NSB, biotinylated, surface-coated SiO_2/Si substrate.

Coating Solution Preparation. An aminosilane solution in organic solvent was prepared in a polypropylene vial by adding 26.5 μl (3-trimethoxysilylpropyl)-diethylcucurbitamine (Galest) to 10 ml of solvent. Either dimethyl sulfoxide (DMSO) or n,n-dimethylacetamide (DMAC) can be used as the solvent (both from Aldrich). 1.0 ml of this solution was then added to a 40 mg aliquot of biotin-PEG- CO_2 -N-hydroxysuccinimidyl (Biotin-PEG-NHS, Shearwater Polymers, Inc.), where PEG is a 3400 molecular weight polyethylene glycol. The NHS group of the Biotin-PEG-NHS reacts with the terminal amine on the amino silane to form a biotin-PEG-silane molecule. The biotin-PEG-silane/DMAC solution will be referred to as solution A.

In a second vial, 70.6 μl of 6-azidosulfonylhexyl-triethoxysilane was added to 10 ml DMSO. 125 μl of matrix forming agent (polyoxyethylene sorbitan tetraoleate, PST, Aldrich) was then added to this solution yielding a solution B. Solutions A and B were combined in a 1:4 volume ratio (1 ml solution A added to 4 ml solution B) to give a final coating solution mixture used for spin coating onto target substrates.

Spin-Coating. 5-inch silicon wafers (p- or n-type, single-side polished, test grade wafers) were loaded in a spin coater (Laurell Technologies Corp.) and spun at 5000 rpm. The coating solution (0.5 ml) was dispensed onto the spinning wafer, and the wafer was allowed to spin for 90 seconds.

Coated silicon wafers were placed in a vacuum oven pumped down to a vacuum of 150 mm Hg (absolute) for 30 minutes. The oven was then turned on and allowed to

WO 03/00433

PCT/US02/20408

heat to approximately 140°C. The total thermal treatment (heating ramp and hold) was for two hours. The wafers were then allowed to cool to room temperature in ambient air.

Six-millimeter diameter sample spots were defined on the wafer by stamping a silicone adhesive border pattern onto the surface. The wafer was then diced into square pieces as is well known in the art and used in various assays.

Non-Specific Protein Binding (NSB) Assay. The following assay is illustrative of the non-specific binding levels of a model soluble globular serum protein on the coating solution treated wafer surface. An immunoglobulin G (IgG) antibody (160 kDa) was used as the model non-specific binding protein. Specifically, a horseradish peroxidase conjugate of rabbit anti-sheep IgG (KPL Laboratories) was dissolved in phosphate buffered saline (PBS) to provide a series of IgG concentrations, ranging from 0.1 to 10 µg/ml. The sample to be assayed ("test piece") was first triple-rinsed with high purity water and blown dry with a stream of N₂ gas. 20 µl of varying concentrations of the IgG-PBS solution were placed on test spots and incubated at 37°C in a 100% (nominal) humidity chamber for 30 minutes. Various IgG test concentrations were used as described below. After incubation, the test spots were again triple rinsed with high purity water and blown dry with N₂ gas. 20 µl droplets of a commercial tetramethylbenzidine (TMB) peroxidase substrate were then added to each test spot. Each test piece was incubated at 37°C in a 100% (nominal) humidity chamber for 30 minutes.

HRP catalyzes the formation of an insoluble, surface-deposited membrane in this assay, which can be detected colorimetrically or by ellipsometry. As such, the greater the level of NSB of horseradish peroxidase coupled IgG to the test piece, the greater the level of surface-deposited membrane.

Control Experiments: Bare Substrates and BSA Blocking. In addition to the coating solution treated substrates discussed above, two NSB control experiments were also run in parallel: (1) bare SiO₂/Si wafer substrates; and (2) SiO₂/Si wafers blocked with bovine serum albumin (BSA). BSA-blocking is currently the most widely used technique for inhibiting non-specific protein binding on bioassay surfaces. Briefly, an untreated piece of silicon wafer was triple-rinsed in high purity water and blown dry with N₂ gas. 40 µl droplets of a 1% BSA solution in PBS were then placed on each 6 mm test spot. The droplet covered the entire test spot, which was then incubated for 1 hour at 37°C and 100% (nominal) relative humidity. The BSA solution was then rinsed off with

WO 03/00433

PCT/US02/0408

high purity water and blown dry with N₂ gas, and the NSB assay described above was performed on the BSA-blocked SiO₂/Si substrate.

The data in Fig. 2 illustrates that coated or treated SiO₂/Si substrates of the present Example showed little or no detectable IgG non-specific binding at any of the tested concentrations (solid bars). In contrast, BSA-blocked wafers showed a much greater level of IgG NSB (open bars). Note the large error bars on the BSA-blocked surface data, indicating the IgG NSB variability commonly encountered with this blocking technique. NSB was very high on the bare SiO₂/Si wafers, and increased off-scale for the 1 and 10 µg/ml IgG protein loading (data not shown).

This data supports a conclusion that biotin functional surfaces of the present invention are effective at limiting or eliminating NSB of proteins to SiO₂/Si substrates. In contrast, bare SiO₂/Si, and to a lesser extent BSA-blocked SiO₂/Si substrates, showed a greater level of non-specific protein binding, illustrating again the effective utility of the present invention.

EXAMPLE II:

LOW NON-SPECIFIC BINDING (NSB) THIOL-REACTIVE SURFACE COATING CHEMISTRY ON SiO₂/Si SUBSTRATES

The following example illustrates the utility of another embodiment of the present invention for limiting NSB of a protein to a treated SiO₂/Si substrate. A coating solution was prepared and used to form a low NSB, thiol-reactive, surface coating on a SiO₂/Si substrate. Experiments were performed to test the level of non-specific binding to either an untreated SiO₂/Si substrate or to the low NSB, thiol-reactive, surface coated SiO₂/Si substrate.

Coating Solution Preparation. The coating solution was prepared as essentially described in Example I, with the exception that the Biotin-PEG-NHS was replaced with vinylsulfone-PEG-NHS (Shearwater). Spin coating was also performed as essentially described in Example I.

The spin coated wafers were placed in a vacuum oven pumped down to a vacuum of 150 mm Hg (absolute) for 30 minutes. The oven was then turned on and allowed to heat to approximately 70°C. The total thermal treatment (heating ramp and hold) was for four hours. The wafers were then allowed to cool to room temperature in ambient air.

WO 03/000433

PCT/US02/20408

Six-millimeter diameter sample spots were defined on the wafer by stamping a silicone adhesive border pattern onto the surface. The wafer was then diced and used in various binding assays.

Non-Specific Protein Binding (NSB) Assay. Non-specific protein binding was assessed using a soluble TMB-microwell assay. Briefly, as described in Example 1, each test piece was rinsed with high purity water, dried, and incubated with a solution of horseradish peroxidase conjugate of rabbit anti-sheep IgG. Note that the PBS solution in this Example included 0.1% Tween20 surfactant. After protein incubation and rinsing, 20 μ l droplets of a commercial, tetramethylbenzidine (TMB) soluble peroxidase substrate solution were added to each test spot. 20 μ l of stop solution was added to each TMB droplet after 30 minutes incubation at 37°C and 100% (nominal) relative humidity. The stop solution stops the enzymatic reaction and locks in the color change in the droplet. Droplets were combined using a micropipet and 80 μ l samples were transferred from the test piece to a microtiter plate. A plate reader monitoring optical density at 450 nm was used to quantify the extent of the peroxidase reaction, which is directly related to the quantity of non-specifically bound IgG-HRP to each test piece.

Control Experiments: Bare Substrates and BSA Blocking. In addition to the coating solution treated substrates discussed above, two NSB control experiments were also run in parallel: (1) bare SiO₂/Si wafer substrates; and (2) SiO₂/Si wafers blocked with bovine serum albumin (BSA). As discussed in Example 1, BSA-blocking is currently the most widely used technique for inhibiting non-specific protein binding on bioassay surfaces. The BSA-blocking protocol was essentially as described in Example 1. The test piece was triple-rinsed in high purity water and blown dry with N₂ gas. 40 μ l droplets of a 1% BSA solution in PBS were then placed on each 6 mm test spot. The droplet covered the entire test spot, which was then incubated for 1 hour at room temperature and 100% (nominal) relative humidity. The BSA solution was then rinsed off with high purity water and blown dry with N₂ gas.

NSB Results: The data in Fig. 3 illustrates that coated or treated SiO₂/Si substrates of the present Example showed little or no detectable IgG binding at any of the tested IgG concentrations (solid bars). In contrast, BSA-blocked wafers showed a much greater level of IgG NSB (cross-hatched bars). Note the large error bars on the BSA-blocked surface data, indicating the IgG NSB variability commonly encountered with this

WO 03/000433

PCT/US02/20408

blocking technique. NSB was very high on the bare SiO₂/Si wafers (open bars), and increased off-scale for the 1 and 10 µg/ml IgG protein loading (data not shown).

This data supports a conclusion that thiol-reactive functional surfaces of the present invention are effective at limiting or eliminating NSB of proteins to SiO₂/Si substrates. In contrast, bare SiO₂/Si, and to a lesser extent BSA-blocked SiO₂/Si substrates, showed a greater level of non-specific protein binding, illustrating again the effective utility of the present invention.

EXAMPLE III:

LOW NON-SPECIFIC BINDING (NSB) BIOTINYLATED SURFACE COATING CHEMISTRY ON PLASTIC (POLYMERIC) SUBSTRATES

The following example illustrates the utility of an embodiment of the present invention for limiting NSB of a protein to a plastic (polymeric) substrate. A coating solution was prepared and used to form a low NSB, biotinylated, surface coating on the plastic substrate, e.g., polystyrene, polysulfone, polyetherimide, and polyethersulfone. Experiments were performed to test the level of non-specific binding to either an untreated plastic substrate or to the low NSB, biotinylated, surface coated plastic substrate.

Polystyrene (PS). The polystyrene substrates consisted of 3-inch hydrophobic disks approximately 2 mm thick. The disks were cut from bacteriological grade polystyrene Petri dishes (VWR). The coating solution preparation was identical to that described in Example I. Prior to coating the polystyrene Petri dishes with the coating solution, an oxidation step was performed on the hydrophobic polystyrene surface. Oxidation of the surface was accomplished by submerging the disk in concentrated sulfuric acid (95% H₂SO₄, Mallinckrodt) for two minutes. The disks were then rinsed extensively with high purity water and blown dry with N₂ gas. The disk was mounted in the spin coater and spun at 5000 rpm. The coating solution (0.5 ml) was dispensed onto the spinning disk and was allowed to spin for 90 seconds. At that point another 0.5 ml of the coating solution was dispensed and spun for 90 seconds. The PS surface thus received two coats of coating solution during the spinning process.

The coated PS disk was then placed in a vacuum oven that was evacuated to 150 mm Hg (absolute) at room temperature for 30 minutes. After the 30-minute pump down, the oven was turned on and the samples were heated to 90°C under vacuum. The total time for thermal treatment (heat ramp and hold) was four hours. Each sample was then

WO 03/00433

PCT/US02/20408

allowed to cool to room temperature under ambient atmosphere. After cooling, 6 mm test spots were defined on the surface by stamping with a silicone adhesive border pattern.

Polysulfone (PSU), polyetherimide (PEI), and polyethersulfone (PES). These substrates consisted of 2-inch square coupons cut from 0.02-inch thick commercial film stock. The coupons were cleaned by sonicating for 15 minutes in a non-ionic detergent (Triton X-100) bath. After extensive high purity water rinsing, the coupons were sonicated for another 15 minutes in a 50:50 ethanol:water solution, followed by a water rinse and N₂ gas blow dry.

The coating solution preparation was essentially identical to that described in Example I. The coupons were mounted in the spin coater and spun at 5000 rpm. 0.3 ml of the coating solution was dispensed on the coupons and spun for 90 seconds. The coupons were then placed in a vacuum oven that was pumped down to a vacuum of 150 mm Hg (absolute) for 30 minutes. The oven was then turned on and allowed to heat to approximately 140°C. The total thermal treatment (heating ramp and hold) was for two hours. The coupons were then allowed to cool to room temperature in ambient air. Six-millimeter diameter sample spots were defined on the water by stamping a silicone glue on the surface.

Non-Specific Binding (NSB) Assay. Non-specific protein binding was assessed using a soluble TMB-microwell assay. First, coated PS, PSU, PEI or PES surfaces were rinsed and incubated with the horseradish peroxidase conjugate of rabbit anti-sheep IgG (described in Example I), with the exception that the phosphate buffered saline also contained 0.1% Tween20 surfactant. After protein incubation and rinsing, 20 µl droplets of a commercial, tetramethylbenzidine (TMB) soluble peroxidase substrate solution was added to each test spot. 20 µl of stop solution was added to each TMB droplet after 30 minutes incubation at 37°C and 100% (nominal) relative humidity. The stop solution stops the enzymatic reaction and locks in the color change in the droplet. Droplets were combined using a micropipet and 80 µl samples were transferred from the test piece to a microtiter plate. A plate reader monitoring optical density at 450 nm was used to quantify the extent of the peroxidase reaction, which is directly related to the quantity of non-specifically bound IgG-HRP to each surface.

NSB Results. Fig. 4 provides representative non-specific protein (IgG) binding results. The data presented compare the performance of our surface coating (solid bars) relative to traditional bovine serum albumin (BSA) blocking (open bars). The data

WO 03/00433

PCT/US02/20408

correspond to incubation in 10 µg/ml IgG for each of the plastic substrate (PS, PSU, PEL, PES), and show that our surface coating is more effective in inhibiting NSB than BSA-blocking on these widely used plastic substrates.

EXAMPLE IV:

5 **LOW NON-SPECIFIC BINDING (NSB) BIOTINYLATED SURFACE COATING CHEMISTRY ON METAL/METAL OXIDE SUBSTRATES**

The following example illustrates the utility of an embodiment of the present invention for limiting NSB of a protein to a metal/metal oxide substrate. A coating solution was prepared and used to form a low NSB, biotinylated, surface coating on the
10 metal/metal oxide substrate. Experiments were performed to test the level of non-specific binding to either a BSA blocked metal/metal oxide substrate or to the low NSB, biotinylated, surface coated metal/metal oxide substrate.

The metal substrate consisted of a 30 nm gold film vapor deposited onto a 5-inch silicon wafer. A ~5 nm chromium adhesion interlayer was used between the gold and silicon oxide. The coating solution preparation was identical to that described in Example I. The gold-coated wafer was mounted in the spin coater and spun at 5000 rpm. 0.5 ml of the coating solution was dispensed onto the wafer that was spun for 90 seconds. A second application of 0.5 ml coating solution was dispensed onto wafer and spun for another 90 seconds. As such, the metal/metal oxide substrate surface received two coats
20 of coating solution during the spinning process.

The coated wafer was then placed in a vacuum oven that was pumped down to a vacuum of 150 mm Hg (absolute) for 30 minutes. The oven was then turned on and allowed to heat to approximately 140°C. The total thermal treatment (heating ramp and hold) was for two hours. The wafers were then allowed to cool to room temperature in
25 ambient air. Six-millimeter diameter sample spots were defined on the wafer by stamping silicone adhesive border pattern on the surface. Non-specific binding of protein was assessed using the soluble colorimetric TMB method as described in Example II.

NSB Results: Fig. 5 provides representative non-specific protein (IgG) binding results. The data presented compare the performance of our surface coating relative to traditional bovine serum albumin (BSA) blocking. The data shows that the coated surface
30 (solid bars) is superior to the traditional BSA-blocking approach (open bars) at an IgG protein solution load of 10 µg/ml. At lower protein concentrations, both surfaces are effective at inhibiting NSB.

WO 03/00433

PCT/US02/20408

This data supports a conclusion that biotinylated reactive functional surfaces of the present invention are effective at limiting or eliminating NSB of proteins to metal/metal oxide substrates. In contrast, BSA-blocked metal/metal oxide substrates, at 10 µg/ml or higher concentration, showed a greater level of non-specific protein binding, illustrating again the effective utility of the present invention.

EXAMPLE V:**LOW NON-SPECIFIC BINDING (NSB) THIOL-REACTIVE SURFACE COATING CHEMISTRY ON GLASS MICROSCOPE SLIDES**

The following example illustrates the utility of an embodiment of the present invention for limiting NSB of a protein to a glass microscope slide. A coating solution was prepared and used to form a low NSB, thiol-reactive, surface coating on the glass slide substrate. Experiments were performed to test the level of non-specific binding to either a bare glass slide, a BSA blocked glass slide or to the low NSB, thiol-reactive, surface coated glass slide.

Substrates (glass slides) used in this particular example were polished 25 x 75 mm microscope slides obtained from a commercial vendor (TeleChem SuperCleanTM) and used as received. Note, however, that several glass microscope slide substrates have been successfully used, including plain soda-lime glass slides.

Prior to coating, the slides were cleaned by the following protocol. First the slides were rinsed with high purity (18 MΩ-cm) water. Slides were then loaded in a glass staining rack, submerged in a 60°C, 1% Alconox solution (alkaline glass cleaner) and sonicated for 15 minutes. The slides were then rinsed with copious amounts of high purity water and sonicated in high purity water for another 15 minutes. Slides were then allowed to soak in fresh ultrapure water. Finally they were blown dry with N₂ gas. The slides were coated within two hours of cleaning.

Pre-primed glass slides have also been successfully coated. Primer coats include vapor deposited SiO₂ layers and spin-on glass formulations such as SeranicTM (Cielect).

The coating solution was prepared as described in Example II. Spin coating was performed as follows: a glass slide was mounted on the vacuum chuck of the spin coater. 0.5 ml of coating solution was dispensed on the stationary slide. The spinner was then turned on and accelerated to 3500 rpm, where it spun for 90 seconds.

The vacuum and thermal cure processes were identical to those described in Example II. The NSB assay and control experiments were performed as described in

WO 03/00433

PCT/US02/20408

Example IV, with the following changes. After the 5 minutes TMB peroxidase substrate incubation, 20 µl of TMB-Stop solution was added to the test spots to stop the colorimetric reaction. Optical density was then read directly with the glass slide mounted on a 96-well plate holder (there was no fluid transfer to a microtitre plate).

5 *Binding Results:* Results are presented in Fig. 6. These results show that the coated glass surface (solid bars) shows significantly lower non-specific protein binding than BSA-blocked (cross-hatched bars) and bare glass substrates (open bars).

10 This data supports a conclusion that thiol-reactive functional surfaces of the present invention are effective at limiting or eliminating NSB of proteins to a glass slide substrate. In contrast, bare glass slides and BSA-blocked glass slides showed a greater level of non-specific protein binding, illustrating again the effective utility of the present invention.

EXAMPLE VI:

LOW NON-SPECIFIC BINDING (NSB) OF FIBRINOGEN TO COATED SURFACE

15 The following example illustrates the utility of an embodiment of the present invention for limiting NSB of fibrinogen to coated surfaces of the present invention. A coating solution was prepared and used to form a low NSB, thiol-reactive, surface coating on a SiO₂/Si substrate. Experiments were performed to test the level of non-specific binding of fibrinogen to either a bare substrate, a BSA blocked substrate or to the low
20 NSB, thiol-reactive, surface coated substrate.

Coated surfaces were prepared as described in Example II.

Fibrinogen Non-Specific Protein Binding Assay. Non-specific fibrinogen binding was assessed using a soluble TMB-microwell assay as follows: test pieces were rinsed and test wells were incubated for 30 minutes with serial dilutions of human fibrinogen (Sigma) in phosphate buffered saline (PBS). After protein incubation, the substrates were
25 rinsed three times with PBST (PBS with 0.01% Tween20) and one time with clean water and then blown dry. Each test well was then incubated for 30 minutes with a 20 µl droplet of a 1:8000 dilution of peroxidase labeled anti-human fibrinogen (Abeam) in PBST. The slides were rinsed as above and then 20 µl droplets of a commercial,
30 tetramethylbenzidine (TMB) soluble peroxidase substrate solution. The TMB assay and optical density measurements were performed as described in Example IV.

WO 03/00433

PCT/US02/20408

Control Experiments: Bare Substrates and BSA Blocking. In addition to the coated substrates, two NSB control experiments were run in parallel, as essentially described in Example II.

5 *NSB Results:* Non-specific binding results are presented in Fig. 7. The coated surfaces (solid bars) show very low non-specific fibrinogen binding relative to the bare (open bars) and BSA-blocked (cross-hatched bars) surfaces.

10 This data supports a conclusion that thiol-reactive functional surfaces of the present invention are effective at limiting or eliminating NSB of fibrinogen to a target substrate. In contrast, non-treated substrate and BSA-blocked substrate showed a greater level of non-specific fibrinogen binding, illustrating again the effective utility of the present invention, especially in light of fibrinogens relative abundance as a serum protein.

EXAMPLE VII:

DEMONSTRATION OF SELECTIVE VERSUS NON-SPECIFIC PROTEIN BINDING ON COATED SURFACES

15 The following example illustrates the utility of an embodiment of the present invention for demonstrating selective protein (streptavidin) binding versus non-specific protein binding on biotinylated coatings. The test pieces in this study were film-coated silicon wafers, wherein the biotinylated coating was prepared as described in Example I. Control test pieces were also prepared as previously described except that control surfaces
20 were prepared with non-reactive methoxy-capped PEG molecules instead of biotin. Specifically, these coatings were formed by replacing the biotin-PEG-NHS molecule in Example I with a methoxy-PEG-succinimidyl propionate (mPEG-SPA, MW 5000). Otherwise, all processing steps were identical to those in Example I.

25 Streptavidin binding to these surfaces was assessed using horseradish peroxidase conjugated streptavidin (SA-HRP, Pierce) and the soluble TMB-Microwell assay described in Example II. Various concentrations of SA-HRP were prepared in phosphate buffered saline with 0.01% Tween20 surfactant. 20 μ l drops of SA-HRP solution were incubated on test spots for 30 minutes at 37°C and 100% (nominal) relative humidity. The test spots were then rinsed with high purity water. The soluble TMB-microwell
30 assay described in Example II was used to assess binding.

Binding Results: Fig. 8 shows representative results. These results show that the biotinylated functional surface (open bars) binds significantly more streptavidin than the methoxy-PEG control surface ("inert" surface) (solid bars). Given the previous non-

WO 03/00433

PCT/US02/20408

specific protein binding assay results (see Example I), we conclude that the SA is specifically bound to the biotinylated coating. The small signal observed on the methoxy-capped PEG sample for a SA load of 10 ug/ml is likely the result of a small amount of non-specific streptavidin binding.

- 5 This data supports a conclusion that functional surfaces of the present invention are effective at providing selective binding sites on a coated substrate, while inert functional surfaces of the present invention are effective at limiting non-specific binding on a coated surface.

EXAMPLE VIII:

10 Demonstration of Biotinylated Molecule Binding to Streptavidin-Biotin Coated Surfaces

The following example illustrates the utility of an embodiment of the present invention for demonstrating the fabrication of a streptavidin-biotin surface and the subsequent selective binding of a biotinylated molecules to this surface.

- 15 *Coating Solution Preparation.* A first aminosilane solution was prepared in a polypropylene vial by adding 26.5 μ l (3-trimethoxysilylpropyl)-diethylenetriamine (Gelest) to 10 ml of N,N-dimethylacetamide (DMAC). 1.0 ml of this solution was then added to a 40 mg aliquot of biotin-PEG-CO₂-N-hydroxysuccinimidyl ester (Biotin-PEG-NHS, Shearwater Corp.), where PEG is a 3400 molecular weight polyethylene glycol.
- 20 The NHS group reacts with the terminal amine on the amino silane to form a biotin-PEG-silane molecule. The biotin-PEG-silane/DMAC solution is called solution A. In a second vial, 70.6 μ l of 6-azidosulfonylhexyl-trimethoxysilane was added to 10 ml DMSO. 125 μ l of matrix forming agent (polyoxyethylene sorbitan tetracetate, PST, Aldrich) was then added to this solution, which is called solution B. Solution A and B were then combined
- 25 in a 1:4 volume ratio (1 ml solution A added to 4 ml solution B) to give a final mixture called the biotin-PEG solution.

- A second aminosilane solution was prepared in a polypropylene vial by adding 48.4 μ l (5-trimethoxysilylpropyl)-diethylenetriamine (Gelest) to 10 ml of N,N-dimethylacetamide (DMAC). 1.0 ml of this solution was then added to a 40 mg aliquot of
- 30 methoxy-PEG-succinimidyl propionate (mPEG-SPA, Shearwater Corp.), where PEG is a 2000 molecular weight polyethylene glycol. The NHS group reacts with the terminal amine on the amino silane to form a methoxy-PEG-silane molecule. The methoxy-PEG-silane/DMAC solution is called solution C. Solution C and B (described above) were

WO 03/00433

PCT/US02/20408

then combined in a 1:4 volume ratio (1 ml solution A added to 4 ml solution B) to give a final mixture called the methoxy-PEG solution.

The biotin-PEG solution was then combined with the methoxy-PEG solution in a 1:4 volume ratio. This final mixture is used to coat a silicon substrate.

- 5 *Spin-Coating.* Spin-coating and the thermal cure were performed as described in Example 1. Six-millimeter diameter sample spots were defined on the wafer by stamping a silicone adhesive border pattern onto the surface. The wafer was then diced and used in various assays.

- 10 *Formation of the Streptavidin Layer.* Streptavidin (Pruzyme, Inc.) was diluted to 100 µg/ml in phosphate buffered saline (PBS). 40 µl droplets were then incubated in sample spots for one hour at room temperature. Several spots on the wafer were incubated with PBS only. These are the "no streptavidin" control spots. After incubation, the wafers were rinse three times with PBS-Tween20 (PBST) and one time with ultrapure water and were then blown dry. This process results in a streptavidin immobilized within
15 the coating matrix.

- 20 *Specific and Non-Specific Binding Assays.* Biotinylated horseradish peroxidase (biotin-HRP, Pierce) was diluted to 10 µg/ml in PBST. 20 µl droplets were then incubated on test spots for 30 minutes at room temperature. Peroxidase labeled rabbit anti-sheep IgG (IgG-HRP) was used as a non-biotinylated control molecule. The IgG-HRP was diluted to 10 µg/ml in PBS (no Tween20), and 20 µl droplets were incubated on test spots for 30 minutes at room temperature.

- 25 Results are presented in Fig. 9. The streptavidin-biotin surface shows significantly higher signal for biotin-HRP (solid bars) than for the non-biotinylated IgG-HRP (open bars). Relative to the streptavidin surface, neither biotin-HRP nor IgG-HRP show significant binding to the no-streptavidin control. The slightly higher signal for the IgG-HRP on the no-streptavidin surface can be attributed to the different incubation buffers. In the absence of Tween20 in the buffer, the IgG-HRP shows slightly higher non-specific binding.

- 30 This data supports a conclusion that biotinylated molecules specifically bind to streptavidin-biotin surfaces of the present invention, and conversely, that non-specific binding proteins show limited binding to these same coated surfaces. This Example again highlights the utility of the present invention.

WO 03/00433

PCT/US02/20408

EXAMPLE IX:

DEMONSTRATION OF THIOLATED PROTEIN ATTACHMENT TO THIOL-REACTIVE
COATINGS ON POLYMER SUBSTRATES

The following example illustrates the utility of an embodiment of the present invention for selectively attaching a thiolated protein on a thiol-reactive coating chemistry on a plastic substrate. Results are compared to binding of the thiolated protein to an inert control surface chemistry on a plastic substrate.

Coating Preparation. The coating solution was prepared as described in Example I, with the exception that the Biotin-PEG-NHS was replaced with vinylsulfone-PEG-NHS (Shearwater). Spin coating on tissue culture polystyrene (TCPS) was performed as described in Example III.

The coated wafer was then placed in a vacuum oven and was subsequently pumped down to a vacuum of 150 mm Hg (absolute) for 30 minutes. The oven was then turned on and allowed to heat to approximately 70°C. The total thermal treatment (heating ramp and hold) was four hours. The substrates were then allowed to cool to room temperature in ambient air. Six-millimeter diameter sample spots were defined on the surfaces by stamping a silicone adhesive border pattern onto the surface.

Inert Coating Preparation. The inert control surfaces were prepared exactly as described in Example VII.

The specific binding assays were performed at room temperature as follows: surfaces were first triple-rinsed with ultrapure (18 MΩ-cm) H₂O and then blown dry with N₂ gas. Each test spot was then incubated with a 20 μl droplet of thiolated streptavidin in borate buffer (50 mM borate, 1 mM EDTA, pH 9.0, 0.01% Tween20). Incubation was at room temperature for 30 minutes. Note that no blocking step was used. After incubation, surfaces were triple-rinsed with PBST (0.1 M sodium phosphate, 0.15 M sodium chloride, pH 7.2, 0.01% Tween20) and blown dry. Test spots were incubated with a 1:100 dilution of biotin horseradish peroxidase (Pierce) for 30 minutes, rinsed with PBST, and then blown dry. Test spots were then incubated with a 20 μl droplet of TMB substrate. The enzyme catalyzed colorimetric TMB reaction was allowed to proceed for 5 minutes at which point it was stopped by applying a 20 μl droplet of stop solution. Optical density at 450 nm was read using a standard plate reader.

Binding Results: Specific binding results for the coated tissue culture polystyrene substrate are presented in Fig. 10 (note that each concentration was run in triplicate and

WO 03/00433

PCT/US02/20408

- error bars represent one standard deviation in the set). Binding of thiolated streptavidin to thiol-reactive coatings has been demonstrated (open bars). The dose response on the thiol-reactive coatings scales with concentration of thiolated streptavidin. Peroxidase activity on the inert surface is minimal (solid bars). The lack of non-specific binding on the inert surfaces provides solid evidence of covalent attachment of streptavidin to the thiol-reactive coatings.

EXAMPLE X:**DEMONSTRATION OF PROTEIN ATTACHMENT TO AMINE-REACTIVE COATINGS ON GLASS MICROSCOPE SLIDES**

- The following example illustrates the utility of an embodiment of the present invention for selectively attaching an amine-containing protein to the amine-reactive coating chemistry, compared to a deactivated control surface, on glass microscope slides.

- Coating Preparation.* The coating solution was prepared as described in Example I, with the exception that the Biotin-PEG-NHS was replaced with a 80 mg aliquot of SPA-PEG-SPA (Shearwater) where SPA is a succinimidyl derivative of propionic acid that exhibits reactivity towards amine groups. Glass substrates in a 25 x 75 mm microscope slide format were primed with an approximate 400 angstrom RF sputtered silicon oxide layer and then cleaned by the following protocol. The slides were first rinsed with high purity (18 MW-cm) water to remove gross impurities. They were then loaded in a glass staining rack, submerged in an outgassed solution of 1% Alconox solution heated to 60°C (alkaline glass cleaner) and sonicated for 15 minutes. The slides were then rinsed with copious amounts of high purity water and then sonicated in high purity water heated to 60°C for another 15 minutes. The slides were then rinsed with copious amounts of high purity water and then placed in fresh high purity water until the drying step. Slides were exhaustively blown dry with compressed N₂ gas and were stored dry until use. The cleaned and primed slides were mounted in the spin coater and spun at 3500 rpm. 0.5 ml of the coating solution was dispensed onto the primed glass slide and spun for 90 seconds.

- The coated 25 x 75 mm glass slide was then placed in a vacuum oven and was subsequently pumped down to a vacuum of 150 mm Hg (absolute) for 30 minutes. The oven was then turned on and allowed to heat to approximately 70°C. The total thermal treatment (heating ramp and hold) was 1 hour. The substrates were then allowed to cool

WO 03/00433

PCT/US02/20408

to room temperature in ambient air. Six-millimeter diameter sample spots were defined on the surfaces by stamping a silicone adhesive border pattern onto the surface.

Specific Binding Assay: The specific binding assays were performed at room temperature as follows. Surfaces were first triple-rinsed with ultrapure (18 M Ω -cm) H₂O and then blown dry with N₂ gas. An inert control surface was generated by chemically deactivating an amine-reactive coating using a 50 mM ethanolamine in a 50 mM borate buffer, pH 9.0 for 1 hour. Each test spot was then incubated with a 20 μ l droplet of streptavidin in 50 mM phosphate buffer at pH 7.0. Incubation was at room temperature for 60 minutes. No blocking step was used. After incubation, surfaces were triple-rinsed with PBST (0.1 M sodium phosphate, 0.15 M sodium chloride, pH 7.2, 0.01% Tween20) and blown dry. Test spots were incubated with a 1:100 dilution of biotin horseradish peroxidase (Pierce) for 30 minutes, rinsed with PBS (0.1 M sodium phosphate, 0.15 M sodium chloride, pH 7.2), and then blown dry. Test spots were then incubated with a 20 μ l droplet of TMB substrate. The enzyme catalyzed colorimetric TMB reaction was allowed to proceed for 5 minutes at which point it was stopped by applying a 20 μ l droplet of stop solution. Optical density at 450 nm was read using a standard plate reader.

Binding Results: Specific binding results for the amine-reactive coating are presented in Fig. 11. Streptavidin immobilization to the amine-reactive coatings has been demonstrated (open bars). The dose response on the amine-reactive coatings scales with concentration of streptavidin. Peroxidase activity on the deactivated surface is minimal (solid bars). The lack of non-specific binding on the deactivated coatings provides solid evidence for the covalent attachment of streptavidin to the amine-reactive coatings.

EXAMPLE XI:

DEMONSTRATION OF SELECTIVE BINDING OF BIOTINYLATED ANTIBODY TO STREPTAVIDIN COATED SURFACES

The following example illustrates the utility of an embodiment of the present invention for demonstrating the selective binding of a biotinylated antibody to a coated surface of the present invention.

Surface Fabrication. Glass microscope slides with amine reactive surface chemistries were prepared as described in Example X. Six-millimeter diameter sample spots were defined on the wafer by stamping a silicone adhesive border pattern onto the surface. Streptavidin was covalently attached through its surface amine using the following procedure. Streptavidin (Prozyme, Inc.) was diluted to 100 μ g/ml in phosphate

WO 03/00433

PCT/US02/20408

buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7.0). 40 μ l droplets of this solution were then incubated in sample spots for one hour at room temperature. The slides were then rinsed and the submerged in a deactivation solution consisting of 50 mM ethanolamine in 50 mM phosphate buffer, pH 7. The deactivation was allowed to proceed for 1 hour, at which point the slides were removed from the solution, rinsed with water and dried.

Assay: A biotinylated goat antibody (goat anti-mouse IgG, biotin-labeled, Pierce) was used as the positive sample. The control was a non-biotinylated goat antibody (goat anti-human myoglobin, ICN). Both antibodies were diluted to 100 μ g/ml in phosphate buffered saline containing 0.005% Tween20 (PBST). 20 μ l droplets of each antibody solution were incubated in sample spots for 30 minutes at room temperature. Several control spots were incubated with PBST only (no antibody). Slides were then rinse three times with PBST, one time with ultrapure water, and then dried. Goat antibody immobilized on the surface was assessed using immunochemistry. Specifically, 20 μ l droplets of a peroxidase labeled anti-goat antibody (rabbit anti-goat IgG-HRP, KPL Inc., 1:100 dilution in PBST) were incubated on all test spots for 30 minutes at room temperature. The slides were then rinsed as above and incubated with 20 μ l droplets of peroxidase substrate (TMB, KPL Inc.) for 5 minutes, at which point the colorimetric reaction was stopped with a TMB stop solution. Droplets were transferred to a 96-well microtitre plate and optical density at 450 nm was measured using a plate reader (Opsys MR, Thermo Labsystems).

Binding Results: Results are presented in Fig. 12. The data illustrates that in the absence of the first layer capture antibody (capture antibody concentration = 0), the non-specific binding of the detection antibody (anti-goat, HRP) is very low (open bars). On surfaces incubated with the goat antibodies, results show that only the biotinylated antibody gives significant signal (solid bars). These results demonstrate that the surface embodiments of the present invention are selective for biotinylated antibody.

EXAMPLE XII:

DEMONSTRATION OF IMPROVED IMMUNOASSAY PERFORMANCE ON COATED SURFACES

The following example illustrates the utility of an embodiment of the present invention by comparing the assay performance and detection limits of the coating chemistries of the present invention relative to a standard diagnostic assay. The comparison is based on sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for staphylococcal enterotoxin B (SEB).

WO 03/00433

PCT/US02/20408

SEB Sandwich Assay Protocol for Coated Substrates. The substrates for this assay consisted of SiO₂/Si wafers coated with biotinylated, low-NSB surface coating as described in Example I. Streptavidin was bound to the surface by incubating 25 mg/ml (streptavidin in PBST) droplets (20 µl) at each 6 mm test spot. Incubation was for 30 minutes at 37°C. Each test piece was then triple-rinsed with high purity (18 MΩ-cm) water and blown dry with N₂ gas. Capture antibody was bound to each test spot by incubating with 20 µl droplets of biotin anti-SEB (Toxin Technologies). Incubation was performed for 30 minutes at 37°C followed by a triple rinse in high purity water and the N₂ gas drying step. Test spots were then incubated with 20 µl droplets of the SEB antigen solution in concentrations ranging from 0.01 ng/ml to 1.0 ng/ml. Incubation was again performed for 30 minutes at 37°C. Test pieces were then triple rinsed with high purity water and blown dry. Detection antibody (anti SEB-HRP in PBST, 20 µl droplets, Toxin Technologies) was then incubated for 30 minutes at 37°C, followed by a triple rinsing with high purity water and blow dry. The final incubation was with a commercial, precipitate TMB assay. TMB-Membrane substrate (KPL, Inc.) was added in 20 µl droplets to each of the test spots and incubated for 30 minutes at 37°C. As described previously, HRP catalyzes the formation of an insoluble deposit on the surface. After blowing the test piece dry with N₂, the thickness of the deposited layer was quantified using a custom-built ellipsometer, providing an indirect, quantitative measurement of antigen at the surface.

SEB Sandwich ELISA Protocol. A standard ELISA format assay was performed for comparison to the SEB sandwich assay for coated surfaces discussed above. Briefly, 100 µl of capture antibody (biotin anti-SEB, Toxin Technology) in PBS-Tween (0.01%) was added to the wells of a 96-well microtiter plate (Dynex Technologies, Immulon 2HB) and was incubated for 120 minutes at 37°C. The wells were then triple rinsed with PBS solution, tapping fluid from the plate after each rinse. The wells were then blocked with bovine serum albumin (BSA) by adding 200 µl of 1% BSA in PBST and then incubating at 37°C for 1 hour. SEB antigen solutions (Toxin Technology, 100 µl volumes with concentrations ranging from 0.01 ng/ml to 1.0 ng/ml in PBST) were added to the microwells and incubated at 37°C for 60 minutes. The wells were then rinsed with PBST and fluid was tapped from the inverted plate. The detection antibody was a horseradish peroxidase conjugated anti-SEB (Toxin Technology). 100 µl volumes were incubated in each of the wells for 60 minutes at 37°C. Again, the wells were washed with PBST.

WO 03/00433

PCT/US02/20408

Color was developed in the well by adding a commercial TMB peroxidase substrate (TMB-Microwell, KPL, Inc.). 100 μ l volumes of the developer were added to the wells and were incubated for 60 minutes at 37°C. After 60 minutes, 100 μ l of the TMB stop solution was added to each well, and the optical density at 450 nm was read using a microplate reader.

Binding Results. Representative assay results are presented in Fig. 13A, results of the standard microtiter plate ELISA assay, and Fig. 13B, results for the ELISA assay performed on the functional coated surface of this invention. The important observation is that the coated surface, which presents specifically bound streptavidin for the sandwich assay, enables an order of magnitude improvement in assay sensitivity relative to a traditional sandwich ELISA. Specifically, the lower detection limit in the microtiter plate ELISA was approximately 1.0 ng/ml SEB. On the coated surface of the present invention, the lower detection limit was 0.1 ng/ml SEB.

EXAMPLE XIII:

15 SURFACE CHEMISTRY COMPARISON IN OLIGONUCLEOTIDE MICROARRAY FORMAT

The following example illustrates the utility of an embodiment of the present invention as coating chemistries for use in oligonucleotide microarray formats. The experiments described in this example evaluate one coating chemistry embodiment of the present invention in parallel with current "state-of-the-art" commercial polymer and silane chemistries. In particular, the signal, noise and signal-to-noise levels are compared for the chemistries in a microarray format using amine labeled oligonucleotides.

Coating Preparation. The coating chemistry was prepared exactly as described in Example X. The current state of the art commercial polymer chemistry is advertised as a three dimensional polymer coating on a glass slide substrate with a high loading capacity for amine labeled oligonucleotide. The commercial silane chemistry is advertised as a low background silane coating on a glass slide substrate. The commercial chemistries were processed according to the manufacturer suggested protocols, which are known and uniform for these types of substrates (two such manufacturers include:

Microarray Printing: 5' amine-linked and 3' biotin-labeled oligonucleotide (Operon) was suspended in 300mM sodium phosphate buffer, pH 8.5 at a concentration of 20 μ M. The coating chemistry was first triple-rinsed with ultrapure (18 M Ω -cm) H₂O and then blown dry with N₂ gas prior to arraying. Commercial chemistries were used out of the box. An array of spots was printed on the chemistries using a SpotBot

WO 03/00433

PCT/US02/20408

microarray (Telechem) fitted with SMP3B pins (Telechem). Commercial polymer and coating chemistries were incubated at 75% relative humidity for 5 hours. The polymer, silane and coating chemistries were stored desiccated at room temperature for 72 hours prior to use. The coating chemistry was deactivated with 50mM ethanolamine in phosphate buffer pH 7.0 for 1 hour.

Specific Binding Assay: The commercial polymer chemistry was deactivated with a 50mM ethanolamine in 0.1M Tris, pH 9.0, 1%SDS solution at 50°C for 20 minutes. The commercial silane chemistry was baked at 80°C for 2 hours then blocked with bovine serum albumin for 1 hour. The specific binding assays were performed at room temperature as follows: chemistries were incubated with 140 μ l of 10 μ g/ml of Cy5 labeled streptavidin (Amersham) in PBST (0.1 M sodium phosphate, 0.15 M sodium chloride, pH 7.2, 0.01% Tween20). 40 mm Lifter Slips (Erie) were utilized to spread liquid evenly over surface of slide chemistries. Chemistries were placed in hybridization chamber for 30 minutes. Lifter Slips were removed from slide chemistries and slides were triple-rinsed with PBST then ultrapure (18 M Ω -cm) H₂O and dried. Slide chemistries were placed in GenePix 4000B scanner (Axon) and settings were optimized for the commercial polymer slide chemistry. Final scanner settings were 100% laser power and 500 volt setting on the photo multiplier tube.

Binding Results: Specific binding results for the coating chemistry and commercial chemistries are presented in Fig. 14A. Signal intensities are reported in relative fluorescence units. Fig. 14A shows that the coating chemistry (open bar) has higher signal intensity than both the polymer (cross-hatched bar) and silane (solid bar) chemistries in this experiment.

The background was monitored in the Cy5 channel. Noise levels are reported in relative fluorescence units. Representative non-spotted areas of the scanned image were used to calculate global background values. The Cy5 channel signal provides a measurement of the non-specific binding contribution to background signal. Fig. 14B shows the coating chemistry (open bar) has significantly lower Cy5 background compared to polymer (cross-hatched bar) and silane (solid bar) chemistries. The coating chemistry has lower background signal due to low surface non-specific binding of the Cy5 streptavidin.

Resulting signal-to-noise ratios in the Cy5 channel were calculated for the slide chemistries and are shown in Fig. 14C. The coating chemistry (open bar) shows

WO 03/00433

PCT/US02/20408

approximately 3x higher signal-to-noise ratio than the commercial polymer chemistry (cross-hatched bar) and a 6x improvement in signal-to-noise over the commercial silane chemistry (solid bar).

EXAMPLE XIV:

5 DEMONSTRATION OF ANTIBODY-ANTIBODY INTERACTION IN A PROTEIN MICROARRAY

The following example illustrates the utility of an embodiment of the present invention for demonstrating the fabrication of an array of biotinylated antibodies on a coated surface of the present invention, and their subsequent detection using antibody-antibody recognition.

- 10 *Surface Fabrication.* Glass microscope slides with amine reactive surface chemistries were prepared as described in Example X. Streptavidin was covalently attached to the surface using the following procedure. First, an adhesive hybridization chamber (Schleicher and Schuell) was placed on the glass substrate. Streptavidin (Prozyme, Inc.) was diluted to 100 µg/ml in phosphate buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7.0), and approximately 700 µl was added to the hybridization chamber, where the reaction was allowed to proceed for 1 hour. The chamber was then removed, and slides were rinsed and then submerged in a deactivation solution consisting of 50 mM ethanolamine in 50 mM phosphate buffer, pH 7. The deactivation was allowed to proceed for 1 hour, at which point the slides were removed from the solution, rinsed with water and dried.

- 20 *Microarray Printing:* Lyophilized biotinylated goat antibody (goat anti-mouse IgG, biotin-labeled, Pierce) was reconstituted to 1 mg/ml in phosphate buffered saline with 15 mg/ml bovine serum albumin (reconstitution buffer as supplied by Pierce). This stock was then diluted to 100 µg/ml antibody in phosphate buffered saline with varying amounts of Tween20® surfactant. A 384-well source plate was prepared with 20 µl droplets of the antibody solution, with wells dedicated to 0, 0.0001, 0.0005, 0.001, and 0.005, 0.01, 0.05 vol% Tween20®. The coating chemistry was first triple-rinsed with ultrapure (18 MΩ-cm) H₂O and then blown dry with N₂ gas prior to arraying. An array of spots was printed on the chemistries using a SpotBot microarrayer (Telechem) fitted with SMP3B pins (Telechem). Spotted slides were incubated at 75% relative humidity for 1.5 hours.

Specific Binding Assay: The specific binding assays were performed at room temperature as follows: chemistries were incubated with 700 µl of 10 µg/ml of Cy3

WO 03/00433

PCT/US02/20408

labeled rabbit anti-goat IgG (Sigma) in PBS (0.1 M sodium phosphate, 0.15 M sodium chloride, pH 7.2), using an adhesive hybridization chamber (described above). Slides were incubated for 30 minutes. The hybridization chamber was then removed and slides were triple-rinsed with PBST (0.1 M sodium phosphate, 0.15 M sodium chloride, pH 7.2, 0.05% Tween20®) then ultrapure (18 MΩ-cm) H₂O and dried. Slide chemistries were placed in a GenePix 4000B scanner (Axon) and settings were optimized for the best signal to noise performance. Final scanner settings were 100% laser power and 460 volt setting on the photo multiplier tube.

Binding Results: A representative array image is presented in Fig. 15. All spots in the image are printed with the same antibody concentration, 100 µg/ml. Each row has a different Tween20® concentration in the buffer, with Tween20® concentration increasing from 0 in the top row to 0.05% in the bottom row. Five duplicate spots are printed in each row. The first observation is that the arrayed antibodies are recognized by the fluorescently labeled detection antibody, demonstrating the surface immobilization of the printed antibody. The addition of Tween20® to the print buffer increases both the size and intensity of the printed spots. Spots in the bottom row have specific binding signal of approximately 9000 relative fluorescence units (RFUs), while the local background is roughly 1000 RFUs.

EXAMPLE XV:

20 DEMONSTRATION OF SYNERGISTIC EFFECT OF COATING COMPONENTS FOR IMPROVING NON-SPECIFIC BINDING PROPERTIES OF COATED SUBSTRATES

The following example was designed to show that the combination of components embodied in the present invention provide performance superior to coatings comprised of subsets of these components.

25 The components in the "standard formula" coating solution can be abbreviated as follows:

Biotin-PEG	1-biotin-PEG-CO ₂ -N-hydroxysuccinimidyl ester (Shearwater Corp.)
Aminosilane	(3-trimethoxysilylpropyl)-diethylenetriamine (Gelest)
Azidosilane	6-azidosulfonylhexyl-triethoxysilane (Gelest)
30 PST	polyoxyethylene sorbitan tetraoleate (Aldrich)

For this experiment, coating solutions were prepared in the standard formula (as described in Example I), as well as in various subtractions and combinations of these

WO 03/00433

PCT/US02/20408

components. In all cases, the volume and ratio of carrier solvents (1:4 DMAc:DMSO) was held constant.

Glass microscope slides were coated as described in Example V.

5 The surfaces were then assayed for non-specific binding using the procedure described in Example II.

Binding Results: Results are presented in Fig. 16. Results show that the standard formulation provides the best NSB performance relative to all other component combinations, with the exception of the "no azidosilane" formulation, which shows equivalent NSB in this assay. Subsequent experiments have shown that the "no azidosilane" formulation has inferior shelf life relative to the standard formulation. Specifically, once the surface is exposed to water rinse, the low NSB properties of the "no azidosilane" degrade much more rapidly than the standard formulation (days versus weeks or months). This is consistent with the concept that the azidosilane provides some cross-linking/stabilizing role in the surface coating.

15 The data from this example shows that embodiments of the present invention operate at optimal performance when all the components of the surface coating are present.

EXAMPLE XVI:

20 DEMONSTRATION OF ADDITIONAL MATRIX FORMING COMPONENTS IN THE COATING FORMULATION

The following example illustrates the utility of an embodiment of the present invention utilizing alternative matrix-forming molecules, as compared to polyoxyethylene sorbitan tetraoleate (PST). The experiments described here demonstrate other embodiments of the invention, in which alternative matrix-forming molecules provide good non-specific binding and specific binding performance.

25 Coating solutions were prepared as described in Example II. In addition, coating solutions were also prepared in which the PST was replaced with commercial surfactants, namely Triton X-100 and Tween20. As a control, the matrix-forming component was replaced with glycerol in the formulation. Note that glycerol is not expected to show equivalent matrix-forming ability.

30 Coating solutions were cast on silicon wafers and cured as described in Example II. The non-specific binding assay was performed as described in Example II. The specific binding assay was performed as described in Example IX.

WO 03/00433

PCT/US02/20408

Binding Results: Results are presented in Fig. 17. Fig. 17A shows that all three matrix-forming components outperform BSA-blocking in the NSB experiment. Of the three tested, the PST gives the best performance, followed by Tween20 and Triton X-100. As expected, coatings made with the glycerol substitute had very high NSB.

- 5 Fig. 17B shows that specific binding performance is similar for all three matrix-forming components. Although the glycerol also gives high signal, this is most likely the result of non-specific, rather than specific binding, as suggested by the NSB experiment.

EXAMPLE XVII:

INHIBITION OF CELL PROLIFERATION ON COATED SURFACES

- 10 The following example illustrates the inhibition of mammalian cell proliferation from culture on one embodiment of the present invention. Coatings were prepared on tissue culture polystyrene substrates in the manner described in Example III.

- Cell Culture:* Routine cell culture methods using sterile technique and commercial cell culture media and cell lines were employed. Two cell lines were employed (L929
15 fibroblasts, ATCC, and human umbilical venous endothelial cells, HUVECs, BioWhittaker). Cell culture media for L929 culture, changed every three days, comprised commercial 10% fetal bovine serum in DMEM saline with antibiotic supplements. The control surface was a sterile uncoated tissue culture polystyrene petri dish (BD-Falcon) with cells subject to identical conditions. Cultured stock cells
20 trypsinized from commercial culture ware after reaching confluent phase were plated at a density of 10^5 per dish and incubated in a commercial cell incubator under 5% CO₂ at 37°C.

- Results:* Fig. 18 provides microscope images of the L929 fibroblast cell culture surfaces after three days of growth. The coated surface Fig. 18A shows few cells relative
25 to the TCPS control Fig. 18B, which shows adherent cell monolayer coverage typical of culture for these cells. The cells that are present on the coated surface appear rounded, in loosely bound clusters, clearly avoiding surface contact and unable to generate confluent cell monolayers or consistent cell attachment. Their rounded shape indicates a stressed condition for these attachment-dependent cells. The control surface shows spread,
30 adherent cells typically observed for these cultures of viable cells. It is believed that the inhibition of extracellular matrix protein adhesion to the coated surface inhibits fibroblast proliferation. Bacterial adhesion and proliferation was also investigated in preliminary experiments. *Pseudomonas aeruginosa* strain PA01 (ATCC, Manassas, VA) cultured in

WO 03/00433

PCT/US02/20408

tryptic soy broth (TSB) per routine microbiological methods to a culture density of $\sim 10^8$ CFU/ml and inoculated onto coated polystyrene petri dishes in various dilutions from this stock using TSB. Bacteriological grade polystyrene (BD) was used as a control surface.

After 24-hour incubation in a culture incubator (37°C) and rinsing with TSB, few

5 adherent microbes were observed on the coated surface using phase contrast microscopy (40x magnification). By contrast, the control surface was colonized with adherent viable organisms to high density, not removable by media rinsing (data not shown).

It will be clear that the invention is well adapted to attain the ends and advantages mentioned as well as those inherent therein. While a presently preferred embodiment has
10 been described for purposes of this disclosure, various changes and modifications may be made which are well within the scope of the invention. Numerous other changes may be made which will readily suggest themselves to those skilled in the art and which are encompassed in the spirit of the invention disclosed herein and as defined in the appended claims.

15 All publications cited herein are hereby incorporated by reference.

WO 03/000433

PCT/US02/20408

CLAIMS

What is claimed is:

1. A method of preparing a functional surface, said method comprising:
 providing a substrate;
 5 providing an effective amount of active component;
 providing an effective amount of cross-linking component;
 providing an effective amount of matrix-forming component;
 affixing said active component, said cross-linking component and said matrix
 forming component onto said substrate, thereby forming a functional surface.
- 10 2. The method of claim 1, wherein said affixing further comprises coating said
 active component, said cross-linking component and said matrix forming component onto
 said substrate creating a coated substrate and curing said coated substrate.
3. The method of claim 2, wherein said curing is selected from the group
 consisting of thermal activation, photo activation or chemical activation.
- 15 4. The method of claim 1, wherein said active component includes a functional
 group, a spacer group and a binding group.
5. The method of claim 4, wherein said functional group is selected from the
 group consisting of biotin, methoxy-polyethylene glycol, N-hydroxy succinimide esters,
 nitrophenyl esters, carboxylates, vinyls, nitrenes, aldehyde groups, phenylboronic acid,
 20 salicylhydroxamic acid, hydroxyl groups, amine groups, imine groups, carboxylic acids,
 aldehydes, ketones, esters, ethers, amide groups, imides, cyanides, hydrazides,
 succinimides, maleimide, thiols, halides, azido groups, phenyl groups, sulfonates,
 isothiocyanate, isocyanate, oxazolines, epoxides, nitrobenzyls, oxazoline, acid chloride,
 chloroformate, disulfide pyridyl, azlactone, cyanogens bromide, fluoroarenes,
 25 fluorocarbons, disulfides, isocyanides, sulfates, heparin, peptides, nucleotides,
 polynucleotides, organic silicon compounds and organic phosphate compounds, ethylene
 glycol oligomers, acrylamides, pyrrolidones, polysaccharides and polar synthetic
 polymers.
6. The method of claim 4, wherein said functional group is biotin, methoxy-
 30 polyethylene glycol, vinyl-sulfone, succinimidyl propionate, or streptavidin.
7. The method of claim 4, wherein said functional group is biotin.
8. The method of claim 4, wherein the functional group is a succinimidyl
 derivative.

WO 03/00433

PCT/US02/20408

9. The method of claim 4, wherein said spacer group is selected from the group consisting of bifunctional, linear, star-shape, and comb-like polyethylene glycols, polyethylenimines, polystyrene, polysiloxanes, polyurethanes, proteins, poly(amino acids), polyphosphazenes, telechelic block copolymers, polyacrylates, polyacrylamides, polymethacrylates, polysaccharides, dendrimers, hyperbranched polymers.
10. The method of claim 4, wherein said spacer group is a linear PEG molecule, a star-shape PEG molecule, or a comb-like PEG molecule.
11. The method of claim 4, wherein said spacer group is a linear PEG molecule.
12. The method of claim 4, wherein said binding group is selected from the group consisting of silanes, methacrylates, disulfides, disilazanes, sulfhydryls, acrylates, carboxylates, isonitriles, isocyanates, and phosphoramidites, nitrenes, epoxides, hydrosilyl, esters, arenes, azides, nitriles, quinones, and vinyl groups.
13. The method of claim 4, wherein said binding group is alkoxysilane or chlorosilane.
14. The method of claim 4, wherein said binding group is an alkoxysilane.
15. The method of claim 4, wherein said binding group is a succinimidyl derivative.
16. The method of claim 1, wherein said cross-linking component is a molecule comprising at least two reactive groups selected from the list consisting of methacrylates, acrylates, epoxides, silanes, perfluorophenyl azides, aryl azides, acyl azides, azidoformates, sulfonyl azides, phosphoryl azides, diazoalkanes, diazoketones, diazoacetates, beta-keto-alpha-diazoacetates, aliphatic azo, diazirines, ketenes, photoactivated ketones, dialkyl peroxidases, diacyl peroxidases, and quinones.
17. The method of claim 1, wherein said cross-linking component is azido silane.
18. The method of claim 1, wherein said matrix-forming component is comprised of one or more of the molecules selected from the group consisting of polyoxyethylene-based surface-active substances, including, polyoxyethylene sorbitan tetraoleate, polyoxyethylene sorbitol hexaoleate, polyoxyethylene 6 tridecyl ether, polyoxyethylene 12 tridecyl ether, polyoxyethylene 18 tridecyl ether, Tween[®] surfactants, Triton[®] surfactants, polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymers, linear PEG molecules, star-shaped PEG molecules, comb-shaped and dendrimeric, hyperbranched PEG molecules, carbonated, perfluorinated and siliconated surfactants, casein, serum dilutions, bovine serum albumin, glycolipids, lipids, heparin or other glycosaminoglycans, mucin, proteoglycans, and polysaccharides.

WO 03/00433

PCT/US02/0408

19. The method of claim 1, wherein said matrix-forming component is polyoxyethylene sorbitan tetracetate, TweenTM surfactant, or PluronicTM block copolymers, or synthetic copolymers of similar polar non-ionic chemistry composition.

20. The method of claim 1, wherein said matrix-forming component is
5 polyoxyethylene sorbitan tetracetate.

21. A functional surface having low non-specific binding characteristics for non-target analytes comprising

a substrate having an effective amount of active component;
an effective amount of cross-linking component;
10 and an effective amount of matrix-forming component;

whereby said active component, said cross-linking component and said matrix-forming component form an integrally emeshed matrix that provides a functionalized surface having low non-specific binding characteristics for non-target molecules in external milieu.

15 22. The functional surface of claim 21, wherein said active component includes a functional group, a spacer group and a binding group.

23. The functional surface of claim 22, wherein said functional group facilitates selective binding to target analytes and is selected from the group consisting of biotin, methoxy-polyethylene glycol, N-hydroxy succinimide esters, nitrophenyl esters,
20 carboxylates, vinyls, nitrenes, aldehyde groups, phenylboronic acid, salicylhydroxamic acid, hydroxyl groups, amine groups, imine groups, carboxylic acids, acid chlorides, haloaldehydes, ketones, esters, ethers, amide groups, imides, cyanides, hydrazides, succinimides, maleimide, thiols, halides, azido groups, phenyl groups, sulfonates, isothiocyanate, isocyanate, epoxides, nitrobenzyls, oxazoline, acid chloride,
25 chloroformate, disulfide pyridyl, azlactone, cyanogens bromide, fluoroarenes, fluorocarbons, disulfides, isocyanides, sulfates, heparin, peptides, nucleotides, polynucleotides, organic silicon compounds and organic phosphate compounds, ethylene glycol oligomers, acrylamides, pyrrolidones, proteo- and glycosamino-glycans, polysaccharides and polar synthetic polymers.

30 24. The functional surface of claim 22, wherein said functional group facilitates selective binding to target analytes and is biotin, methoxy-polyethylene glycol, succinimidyl propionate, streptavidin, or aldehyde.

25. The functional surface of claim 22, wherein said functional group facilitates selective binding to target analytes and is biotin.

WO 03/00433

PCT/US02/20408

26. The functional surface of claim 22, wherein said spacer group is selected from the group consisting of bifunctional, linear, star-shape, and comb-like polyethylene glycols, polyethylenimines, polystyrene, polysiloxanes, polyurethanes, proteins, poly(amino acids), polyphosphazenes, telechelic block copolymers, polyacrylates, polyacrylamides, polymethacrylates, polysaccharides, dendrimers, and hyperbranched polymers.
27. The functional surface of claim 22, wherein said spacer group is a linear polyethylene glycol, star-shape PEG molecule, or a comb-like PEG molecule.
28. The functional surface of claim 22, wherein said spacer group is a linear PEG molecule.
29. The functional surface of claim 22, wherein said binding group is selected from the group consisting of silanes, methacrylates, disulfides, disilazanes, sulfhydryls, acrylates, carboxylates, isonitriles, isocyanates, and phosphoramidites, nitrenes, epoxides, hydrosilyl, esters, arcacs, azides, nitriles, quinones, and vinyl groups.
30. The functional surface of claim 22, wherein said binding group is alkoxysilane or chlorosilane.
31. The functional surface of claim 22, wherein said binding group is an alkoxysilane.
32. The functional surface of claim 21, wherein said cross-linking component is a molecule comprised of at least two reactive groups selected from the list consisting of methacrylates, acrylates, epoxides, silanes, perfluorophenyl azides, aryl azides, acyl azides, azidoformates, sulfonyl azides, phosphoryl azides, diazoalkanes, diazoketones, diazoacetates, beta-keto-alpha-diazoacetates, aliphatic azo, diazirines, ketenes, photoactivated ketones, dialkyl peroxidases, diacyl peroxidases, and quinones.
33. The functional surface of claim 21, wherein said cross-linking component is azido silane.
34. The functional surface of claim 21, wherein said matrix-forming component is selected from the group consisting of polyoxyethylene-based surface-active substances, including, polyoxyethylene sorbitan tetraoleate, polyoxyethylene sorbitol hexaoleate, polyoxyethylene 6 tridecyl ether, polyoxyethylene 12 tridecyl ether, polyoxyethylene 18 tridecyl ether, Tween[®] surfactants, Triton[®] surfactants, polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymers, linear PEG molecules, star-shaped PEG molecules, comb-shaped and dendrimeric, hyperbranched PEG molecules, linear, star, and dendrimer polyamine polymers, carbonated, perfluorinated and siliconated surfactants, and casein, serum

WO 03/00433

PCT/US02/20408

dilutions, bovine serum albumin, glycolipids and lipids, heparin or other glycosaminoglycans, mucin and polysaccharides.

35. The functional surface of claim 21, wherein said matrix forming component is polyoxyethylene sorbitan tetraoleate, Tween[®] surfactant, or Pluronic[®] block co-
5 polymers, or synthetic non-ionic polar hydrophilic copolymers of similar chemical composition.

36. The functional surface of claim 21, wherein said matrix forming component is polyoxyethylene sorbitan tetraoleate.

37. The functional surface of claim 21, wherein said active component is biotin-
10 PEG-silane.

38. The functional surface of claim 37, wherein said substrate is composed of SiO₂/Si.

39. The functional surface of claim 37, wherein said substrate is composed of thermoplastic or thermoset polymers.

40. The functional surface of claim 37, wherein said substrate is composed of
15 metal/metal oxide.

41. The functional surface of claim 21, wherein said active component is methoxy-PEG-silane.

42. The functional surface of claim 21, wherein said active component is a
20 combination of methoxy-PEG-silane and biotin-PEG-silane.

43. The functional surface of claim 42 further comprising streptavidin immobilized within the emmeshed matrix.

44. The functional surface of claim 21, wherein said active component is vinylsulfone-PEG-silane.

45. The functional surface of claim 44, wherein said substrate is composed of
25 glass.

46. The functional surface of claim 21, wherein said active component is NHS-PEG-silane.

47. The functional surface of claim 21, wherein said active component is COOH-
30 PEG-silane.

48. The functional surface of claim 21, wherein said active component is SPA-PEG-SPA.

49. A functional surface for performance of a biochemical binding assay comprising:

WO 03/000433

PCT/US02/20408

- a substrate;
 a non-specific binding matrix affixed to said substrate; and
 an active component affixed to said non-specific binding matrix, thereby forming
 a functional surface for a biochemical binding assay.
- 5 50. The functional surface of claim 49, wherein said non-specific binding matrix
 further comprises a cross-linking component and a matrix-forming component providing
 cross-linked stabilization of said functional surface and bonding to said substrate.
51. The functional surface of claim 49, wherein active component further
 comprises a functional group, a spacer group and a binding group, said binding group
 10 being affixed to said non-specific binding matrix.
52. The functional surface of claim 51, wherein said functional group facilitates
 specific binding of a target protein to said active component.
53. The functional surface of claim 52, wherein said active component is biotin.
54. The functional surface of claim 52, wherein said active component is
 15 vinylsulfone.
55. The functional surface of claim 52, wherein said active component is NHS.
56. The functional surface of claim 52, wherein said active component is SPA.
57. The functional surface of claim 49 wherein said non-specific binding matrix is
 comprised of effective amounts of azido-silane and polyoxyethylene sorbitan tetraoleate.
- 20 58. The functional surface of claim 49, wherein said substrate is selected from the
 group consisting of: a silica-based substrate, a metal substrate, a metal oxide substrate, a
 hydrogel substrate, a glass substrate and a polymer substrate.
59. The functional surface of claim 49, wherein said cross-linking component is
 azido-silane.
- 25 60. The functional surface of claim 49, wherein said matrix-forming component
 is polyoxyethylene sorbitan tetraoleate.
61. A packaged formulation for preparing functionalized surfaces having low
 non-specific binding characteristics suitable for application to a substrate comprising an
 effective amount of active component, an effective amount of a cross-linking component
 30 and an effective amount of matrix forming component, whereby said active component,
 said cross-linking component and said matrix forming component form an integrally
 enmeshed matrix that provides a functionalized surface having low non-specific binding
 characteristics; and instructions to apply the components onto a substrate surface.

WO 03/00433

PCT/US02/20408

62. The packaged formulation of claim 61, wherein said active component includes a functional group, a spacer group and a binding group.

63. The packaged formulation of claim 62, wherein said functional group facilitates specific analyte binding and is selected from the group consisting of biotin,
 5 methoxy-polyethylene glycol, N-hydroxy succinimide esters, nitrophenyl esters, carboxylates, vinyls, nitrenes, aldehyde groups, phenylboronic acid, salicylhydroxamic acid, hydroxyl groups, amine groups, imine groups, carboxylic acids, aldehydes, ketones, esters, ethers, amide groups, imides, cyanides, hydrazides, succinimides, maleimide, thiols, halides, azido groups, phenyl groups, sulfonates, isothiocyanate, isocyanate,
 10 epoxides, nitrobenzyls, oxazoline, acid chloride, chloroformate, disulfide, pyridyl, azlactone, cyanogens bromide, fluoroarenes, fluorocarbons, disulfides, isocyanides, sulfates, heparin, peptides, nucleotides, polynucleotides, organic silicon compounds and organic phosphate compounds, ethylene glycol oligomers, acrylamides, pyrrolidones, polysaccharides, proteoglycans, glycosaminoglycans, and polar water-soluble synthetic
 15 polymers.

64. The packaged formulation of claim 62, wherein said functional group facilitates specific analyte binding and is biotin, methoxy-polyethylene glycol, succinimid, succinimidyl propionate, streptavidin, or aldehyde.

65. The packaged formulation of claim 62, wherein said functional group
 20 facilitates specific analyte binding and is biotin.

66. The packaged formulation of claim 62, wherein said spacer group is selected from the group consisting of bifunctional, linear, star-shape, and comb-like polyethylene glycols (PEG oligomers or polymers), polyethylenimines, polystyrene, polysiloxanes, polyurethanes, proteins, poly(amino acids), polypyrrolidones, polyphosphazenes,
 25 telechelic surface-active block copolymers (e.g., PluronicTM), polyacrylates, polyacrylamides, polymethacrylates, polysaccharides, saccharide monomers, proteoglycans, glycosaminoglycans, dendrimers, or hyperbranched polymers.

67. The packaged formulation of claim 62, wherein said spacer group is a linear polyethylene glycol (PEG oligomer or polymer), star-shape PEG molecule, or a comb-like PEG molecule,
 30

68. The packaged formulation of claim 62, wherein said spacer group is a linear PEG molecule.

69. The packaged formulation of claim 62, wherein said binding group is selected from the group consisting of silanes, methacrylates, SPA, disulfides, disilazanes,

WO 03/00433

PCT/US02/20408

sulphydryls, acrylates, carboxylates, isonitriles, isocyanates, and phosphoramidites, nitrenes, epoxides, hydrosilyl, esters, aranes, azidos, nitriles, quinones, and vinyl groups.

70. The packaged formulation of claim 62, wherein said binding group is alkoxyasilane or chlorosilane.

5 71. The packaged formulation of claim 62, wherein said binding group is an alkoxyasilane.

72. The packaged formulation of claim 62, wherein said binding group is SPA.

73. The packaged formulation of claim 62, wherein said cross-linking component is a molecule comprised of at least two reactive groups selected from the list consisting of
10 methacrylates, acrylates, epoxides, silanes, perfluorophenyl azides, aryl azides, acyl azides, azidoformates, sulfonyl azides, phosphoryl azides, diazoalkanes, diazo ketones, diazoacetates, beta-keto-alpha-diazoacetates, aliphatic azo, diazirines, ketenes, photoactivated ketones, dialkyl peroxidases, diacyl peroxidases, and quinones.

74. The packaged formulation of claim 62, wherein said cross-linking component
15 is azido silane.

75. The packaged formulation of claim 62, wherein said matrix-forming component is selected from the group consisting of polyoxyethylene-based surface-active substances, including, polyoxyethylene sorbitan tetraoleate, polyoxyethylene sorbitol hexaoleate, polyoxyethylene 6 tridecyl ether, polyoxyethylene 12 tridecyl ether,
20 polyoxyethylene 18 tridecyl ether, Tween[®] surfactants, Triton[®] surfactants, polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymers, linear PEG molecules, star-shaped PEG molecules, comb-shaped and dendrimeric, hyperbranched PEG molecules, linear, star, and dendrimer polyamine polymers, carbonated, perfluorinated and siliconated surfactants, and casein, serum dilutions, bovine serum albumin, glycolipids and lipids, heparin,
25 muscin and polysaccharides.

76. The packaged formulation of claim 62, wherein said matrix-forming component is polyoxyethylene sorbitan tetraoleate, Tween[®], surfactant, or Pluronic[®] block co-polymers.

77. The packaged formulation of claim 62, wherein said matrix-forming
30 component is polyoxyethylene sorbitan tetraoleate.

78. A functional surface for use in detecting a target analyte in a bio-analytical assay comprising:

a substrate for performing the bioanalytical assay;

WO 03/00433

PCT/US02/20408

a means coated over said substrate for limiting non-specific binding during the detection of said target analyte.

79. The functional surface of claim 78 wherein the bioanalytical assay is a microarray.

- 5 80. The functional surface of claim 79 wherein the microarray is a oligonucleotide microarray.

WO 03/060433

PCT/US02/20408

1/13

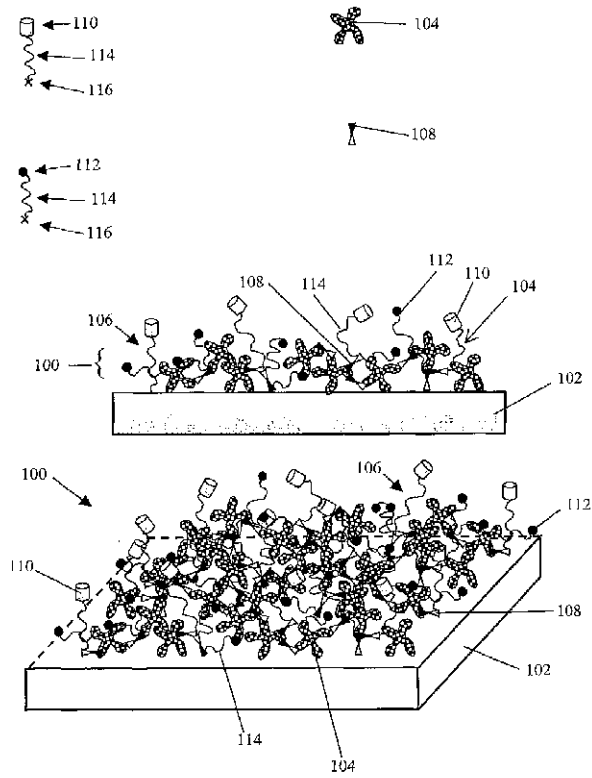


FIG. 1

1/13

WO 03/000433

PCT/US02/20408

2/13

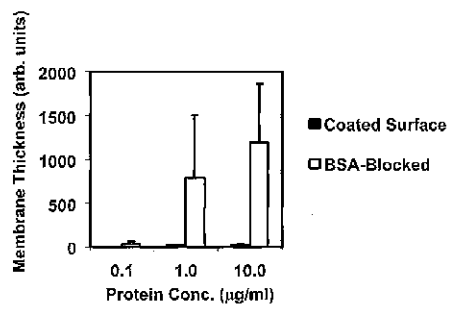


FIG. 2

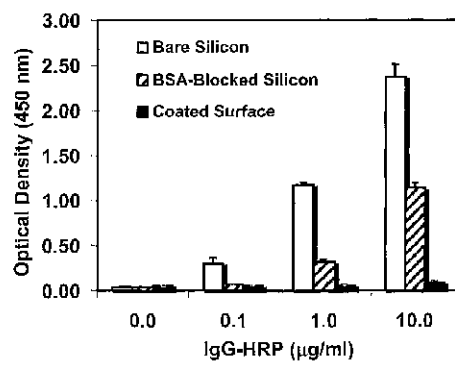


FIG. 3

2/13

3/13

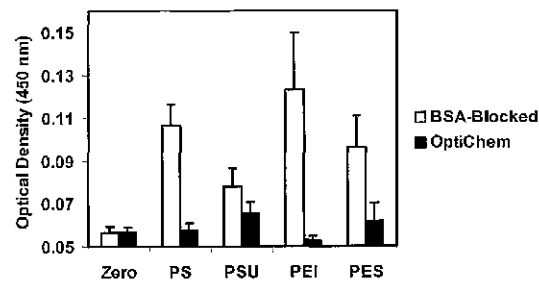


FIG. 4

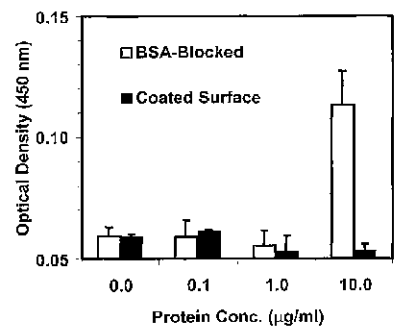


FIG. 5

WO 03/060433

PCT/US02/20408

4/13

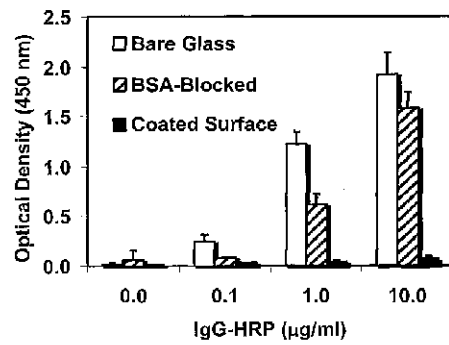


FIG. 6

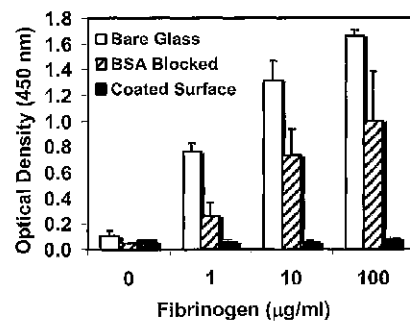


FIG. 7

4/13

WO 03/060433

PCT/US02/20408

5/13

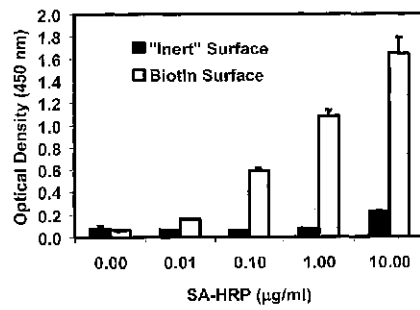


FIG. 8

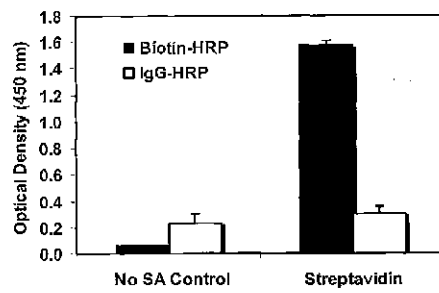


FIG. 9

5/13

WO 03/060433

PCT/US02/20408

6/13

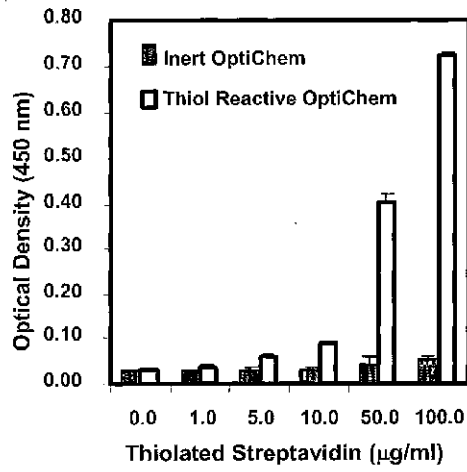


FIG. 10

6/13

WO 03/060433

PCT/US02/20408

7/13

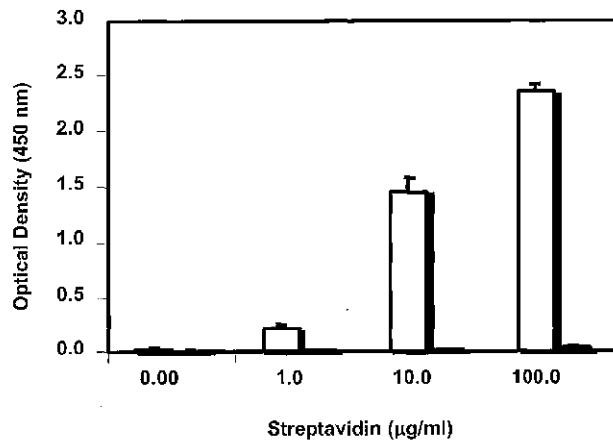


FIG. 11

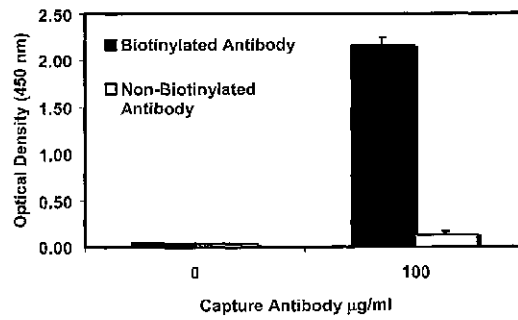


FIG. 12

7/13

WO 03/060433

PCT/US02/20408

8/13

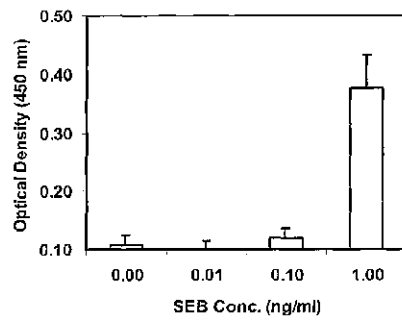


FIG. 13A

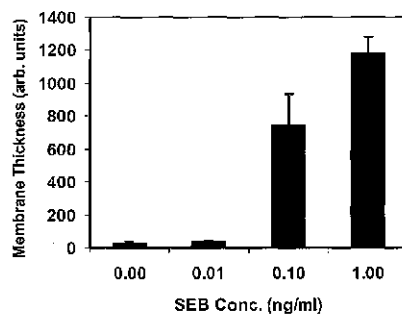


FIG. 13B

8/13

WO 03/060433

PCT/US02/20408

9/13

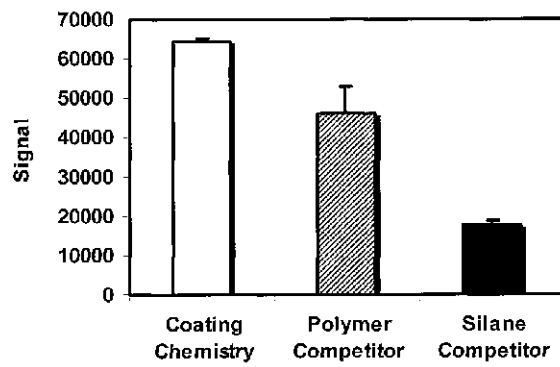


FIG. 14A

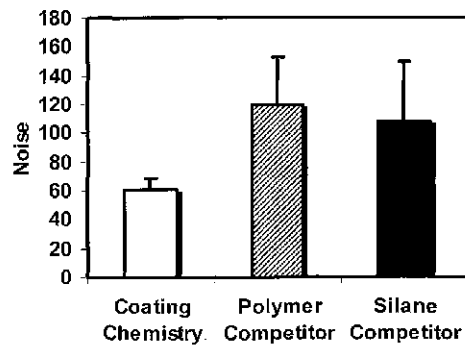


FIG. 14B

9/13

WO 03/060433

PCT/US02/20408

10/13

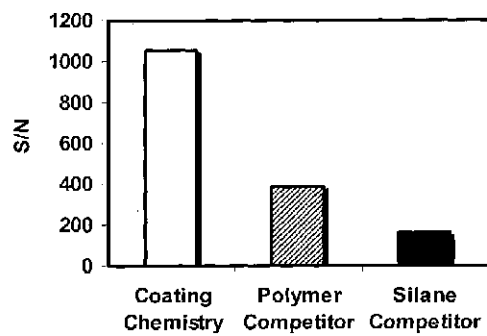


FIG. 14C

WO 03/060433

PCT/A S02/20408

11/13

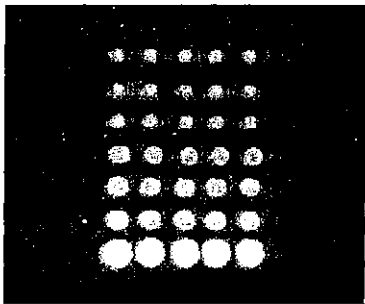


FIG. 15

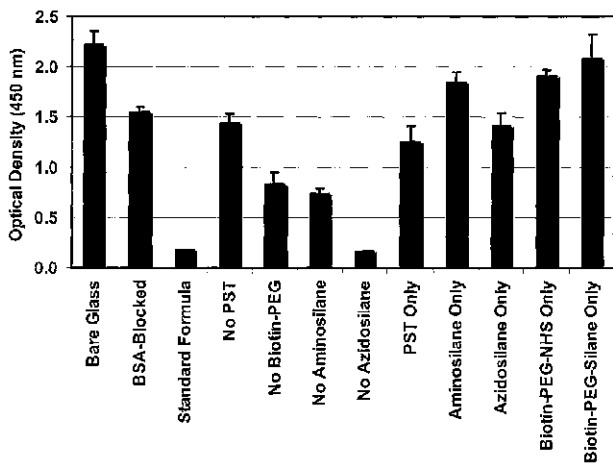


FIG. 16

11/13

WO 03/060433

PCT/US02/20408

12/13

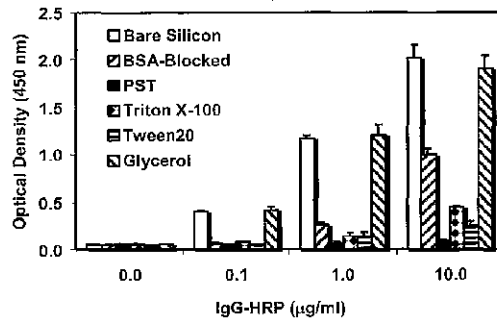


FIG. 17A

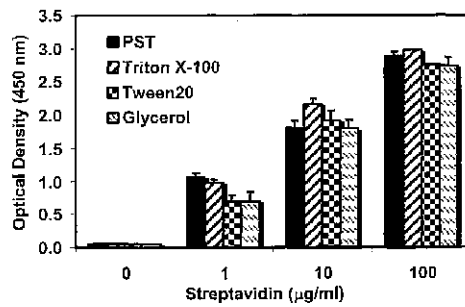


FIG. 17B

12/13

WO 03/060433

PCT/US02/20408

13/13

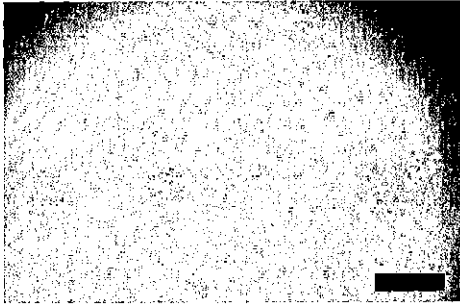


FIG. 18A

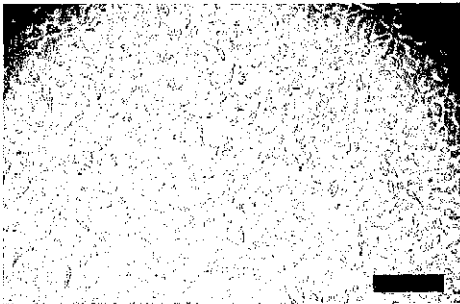


FIG. 18B

13/13

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/20408																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : B05D 5/00 US CL : 427/2.11, 2.13 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) U.S. : 427/2.11, 2.13 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 practicable, search terms used)																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US 5,075,400 A (ANDRADE et al) 24 December 1991, column 1, lines 57-68.</td> <td>1-80</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 6,093,599 A (BUCKHINDER et al) 25 July 2000, see Abstract</td> <td>1-80</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 6,235,340 B1 (JEH et al) 22 May 2001, column 2, lines 57-68</td> <td>1-80</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 96/22966 A1 (BIOGEN, INC.) 1 August 1996, page 1, lines 7-17</td> <td>1-80</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 98/40741 A1 (DDX INCORPORATED) 17 September 1998, see Abstract</td> <td>1-80</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	US 5,075,400 A (ANDRADE et al) 24 December 1991, column 1, lines 57-68.	1-80	Y	US 6,093,599 A (BUCKHINDER et al) 25 July 2000, see Abstract	1-80	Y	US 6,235,340 B1 (JEH et al) 22 May 2001, column 2, lines 57-68	1-80	A	WO 96/22966 A1 (BIOGEN, INC.) 1 August 1996, page 1, lines 7-17	1-80	A	WO 98/40741 A1 (DDX INCORPORATED) 17 September 1998, see Abstract	1-80
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
Y	US 5,075,400 A (ANDRADE et al) 24 December 1991, column 1, lines 57-68.	1-80																		
Y	US 6,093,599 A (BUCKHINDER et al) 25 July 2000, see Abstract	1-80																		
Y	US 6,235,340 B1 (JEH et al) 22 May 2001, column 2, lines 57-68	1-80																		
A	WO 96/22966 A1 (BIOGEN, INC.) 1 August 1996, page 1, lines 7-17	1-80																		
A	WO 98/40741 A1 (DDX INCORPORATED) 17 September 1998, see Abstract	1-80																		
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.																				
* Special categories of cited documents: "A" document defining the generic state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other prior documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family																				
Date of the actual completion of the international search 01 September 2002 (01.09.2002)		Date of mailing of the international search report 03 OCT 2002																		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer ERICA C. CAMERON Telephone No. 703-308-0661																		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

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 33/547

G 0 1 N 37/00 1 0 2

(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,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100080137

弁理士 千葉 昭男

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100077506

弁理士 戸水 辰男

(72)発明者 マオ, グオキアン

アメリカ合衆国ジョージア州 3 0 0 8 2 , スマーナ, ダーリー・ウォーク 4 9 5 1

(72)発明者 メッツガー, スティーブン・ダブリュー

アメリカ合衆国コロラド州 8 0 5 2 6 , フォート・コリンズ, コロニー・ドライブ 3 3 3 1

(72)発明者 ロックヘッド, マイケル・ジェイ

アメリカ合衆国コロラド州 8 0 3 0 4 , ボールダー, カルミア・アベニュー 2 3 9 9

F ターム(参考) 4D075 BB26Z BB42Z BB46Z BB64Z CA13 CA47 DA06 DB01 DB02 DB06

DB07 DB13 DB14 DB33 DB36 DB37 DB39 DB43 DB48 DB50

DB53 DB54 DB55 EA07 EB07 EB14 EB20 EB22 EB38 EB39

EB43 EB47 EC05 EC07 EC08 EC15 EC24 EC30 EC35

专利名称(译)	功能性表面涂层		
公开(公告)号	JP2004531390A	公开(公告)日	2004-10-14
申请号	JP2003506665	申请日	2002-06-26
[标]申请(专利权)人(译)	ACCEL R8 TECH		
申请(专利权)人(译)	阿克塞尔后期技术公司		
[标]发明人	マオグオキアン メッツガースティーブンダブリュー ロックヘッドマイケルジェイ		
发明人	マオ,グオキアン メッツガー,スティーブン・ダブリュー ロックヘッド,マイケル・ジェイ		
IPC分类号	B05D7/24 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/547 G01N35/00 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N33/5306 G01N2035/00158 Y10T428/31504 Y10T428/31612 Y10T428/31663 Y10T428/31678		
FI分类号	B05D7/24.302.Z G01N33/53.M G01N33/53.U G01N33/543.501.J G01N33/543.525.U G01N33/547 G01N37/00.102		
F-TERM分类号	4D075/BB26Z 4D075/BB42Z 4D075/BB46Z 4D075/BB64Z 4D075/CA13 4D075/CA47 4D075/DA06 4D075/DB01 4D075/DB02 4D075/DB06 4D075/DB07 4D075/DB13 4D075/DB14 4D075/DB33 4D075/DB36 4D075/DB37 4D075/DB39 4D075/DB43 4D075/DB48 4D075/DB50 4D075/DB53 4D075/DB54 4D075/DB55 4D075/EA07 4D075/EB07 4D075/EB14 4D075/EB20 4D075/EB22 4D075/EB38 4D075/EB39 4D075/EB43 4D075/EB47 4D075/EC05 4D075/EC07 4D075/EC08 4D075/EC15 4D075/EC24 4D075/EC30 4D075/EC35		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/301223 2001-06-26 US 10/180199 2002-06-25 US		
其他公开文献	JP2004531390A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了用于生产显示低非特异性结合的功能性薄膜或功能表面涂层 (100) 的组合物, 以及用于制造所述薄膜或表面涂层的方法。本发明的薄膜含有特定的官能团和拒绝非特异性结合的成分。本发明的薄膜与各种固体载体 (102) 共价结合或以未结合的状态吸附。特定官能团 (110) 对由薄膜变性的固体表面具有特殊效果, 并且非特异性结合排斥组分引起非特异性结合到由薄膜变性的固体表面大幅减少。非特异性结合排斥组分不影响特定官能团在薄膜中的作用。在这些方法中, 专门的官能团通过间隔物 (114) 连接到固体支持物上。还描述了结合非特异性蛋白质结合性质和官能团的表面涂层用于特异性识别靶蛋白但限制非特异性蛋白质结合的特异性结合作用获得这种表面涂层。

