

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 507714

(P2003 - 507714A)

(43)公表日 平成15年2月25日 (2003.2.25)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 2 G 0 4 5 D 4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 (全137数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 517177(P2001 - 517177)

(86) (22)出願日 平成12年7月28日 (2000.7.28)

(85) 翻訳文提出日 平成14年2月13日 (2002.2.13)

(86) 国際出願番号 PCT/US00/20847

(87) 国際公開番号 W001/013126

(87) 国際公開日 平成13年2月22日 (2001.2.22)

(31) 優先権主張番号 09/374,338

(32) 優先日 平成11年8月13日 (1999.8.13)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 ナノゲン・インコーポレイテッド
NANOGEN, INC.
アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サン
ディエゴ、パシフィック・センター・コー
ト10398番

(72)発明者 マイケル・ジェイ・ヘラー
アメリカ合衆国92024カリフォルニア州エン
シニタス、ホーク・ビュー・ドライブ1614
番

(72)発明者 ノルベルト・ヴィントハーブ
ドイツ連邦共和国デー - 65795ハッターシャ
イム、アカツィーヴシュトラーセ28番

(74)代理人 弁理士 青山 稔 (外 2 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分子間リガンド結合構造のコンビナトリアル選択および薬物スクリーニングのためのマイクロ
エレクトロニック分子ディスクリプターアレイのデバイス、方法、操作およびフォーマット

(57) 【要約】

本発明は、分子間リガンド結合構造のコンビナトリアル選択のための、および薬物スクリーニングのための、マイクロエレクトロニック分子ディスクリプターアレイデバイス、方法、操作およびフォーマットに関する。さらに詳しくは、それらのデバイスおよび方法は、独自のストリンジェンシーパラメータの適用によってコンビナトリアル的に生成した分子間リガンド結合成分、超分子構造および超分子複合体のより高次の選択性を迅速に遂行する。望ましくは、本発明は、超分子の構造または複合体の形成および検出に影響するエレクトロニックストリンジェンシーの影響を通じた、サブライブラリーの集合による指数関数的ライブラリーの形成を含む。さらに、本発明は分子認識プロセス、新薬発見、新しい親和性試薬の創成、合成抗体の創成のための、ならびにイムノアッセイのための、マイクロエレクトロニックアレイデバイス、操作、方法およびフォーマットに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 エレクトロニックマイクロロケーションのアレイ、

マイクロロケーションに連結した捕捉分子間リガンド結合成分、該分子間リガンド結合成分は捕捉プログラム可能对合成分およびリガンド結合成分を含み、該捕捉プログラム可能对合成分は、種々のマイクロロケーションで同一であり、該リガンド結合成分は、種々のマイクロロケーションで異なり、および

少なくともあるマイクロロケーションで形成された超分子複合体、該超分子複合体は、前記捕捉分子間リガンド結合成分、リガンド結合成分を含めた、補足プログラム可能对合成分の、少なくとも、一部に相補的な第1のプログラム可能对合成分、および該捕捉プログラム可能对合成分に相補的な、かつリガンド結合成分および特異的リガンド分子または構造を有する第2のプログラム可能对合成分を含み、それにより該特異的リガンド分子または構造の結合に際して、該特異的の第1のプログラム可能对合成分、該第2のプログラム可能对合成分および該捕捉プログラム可能对合成分の対合を介して特異的超分子複合体が形成される；を含むことを特徴とする特異的リガンド分子または構造と相互作用するためのアレイベースの分子ディスクリプターデバイス。

【請求項2】 該プログラム可能对合成分がp-RNAを含む、請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項3】 該プログラム可能对合成分が複数CNAを含む、請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項4】 該プログラム可能对合成分が複合システムを含む、請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項5】 該複合システムがp-RNAおよびDNAを共に含む、請求項4記載のアレイベースのデバイス。

【請求項6】 該プログラム可能对合成分が核酸を含む、請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項7】 該核酸がDNAである、請求項6記載のアレイベースのデバイス。

【請求項8】 該核酸がRNAである、請求項6記載のアレイベースのデバ

イス。

【請求項9】 該エレクトロニックマイクロアレイが独立して制御可能なエレクトロニックマイクロロケーションを有する、請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項10】 該リガンド結合成分がペプチドを含む、請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項11】 該リガンド結合成分がペプチド配列を含む、請求項10記載のアレイベースのデバイス。

【請求項12】 該ペプチド配列が六量体ペプチド配列である、請求項11記載のアレイベースのデバイス。

【請求項13】 該リガンド結合成分がアミノ酸を含む、請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項14】 該リガンド結合成分が抗体を含む、請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項15】 該リガンド結合成分がタンパク質を含む、請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項16】 該リガンド結合成分が酵素を含む、請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項17】 該リガンド結合成分が金属キレーターを含む、請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項18】 該リガンド結合成分がコンビナトリアルライブラリーから選択される、請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項19】 該リガンド結合成分が種々のリガンド結合成分の組合せを含む、請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項20】 1つのリガンド結合成分がペプチドリガンド結合成分を含み、もう1つのリガンド結合成分が金属キレーターを含む、請求項19記載のアレイベースのデバイス。

【請求項21】 特異的リガンド分子が小分子を含む、請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項22】 該小分子が薬物を含む、請求項21記載のレイベースのデバイス。

【請求項23】 該小分子が代謝産物を含む、請求項21記載のレイベースのデバイス。

【請求項24】 該小分子が金属イオンを含む、請求項21記載のレイベースのデバイス。

【請求項25】 該小分子がペプチドを含む、請求項21記載のレイベースのデバイス。

【請求項26】 特異的分子が大きい分子を含む、請求項1記載のレイベースのデバイス。

【請求項27】 該大きい分子がタンパク質を含む、請求項26記載のレイベースのデバイス。

【請求項28】 該大きい分子が酵素を含む、請求項26記載のレイベースのデバイス。

【請求項29】 該大きい分子が抗体を含む、請求項26記載のレイベースのデバイス。

【請求項30】 特異的構造がオルガネラを含む、請求項26記載のレイベースのデバイス。

【請求項31】 特異的構造が細胞を含む、請求項26記載のレイベースのデバイス。

【請求項32】 さらにエレクトロニックストリンジェンシーシステムを含む、請求項1記載のレイベースのデバイス。

【請求項33】 該エレクトロニックストリンジェンシーシステムが乱れシステムを含む、請求項32記載のレイベースのデバイス。

【請求項34】 さらに光源を含む、請求項1記載のレイベースのデバイス。

【請求項35】 さらに検出器を含む、請求項34記載のレイベースのデバイス。

【請求項36】 さらに解析システムを含む、請求項1記載のレイベース

のデバイス。

【請求項37】 さらにディスプレイを含む請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項38】 さらにエレクトロニック制御システムを含む、請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項39】 さらにデータ処理システムを含む、請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項40】 エレクトロニックマイクロロケーションのアレイ、

該マイクロロケーションと結合した分子間リガンド結合成分、該分子間リガンド成分は、p-RNA捕捉プログラム可能对合成分およびリガンド結合成分を含み、該捕捉p-RNAプログラム可能成分は種々のマイクロロケーションで同一であり、そして該ペプチドリガンド結合成分は種々のマイクロロケーションで異なり、および

少なくともあるマイクロロケーションで形成された超分子複合体、該超分子複合体は前記捕捉分子間リガンド結合構造、ペプチドリガンド結合成分を含めた、捕捉プログラム可能对合成分の少なくとも一部に相補的な第1のp-RNAプログラム可能成分、および、該捕捉プログラム可能对合成分に相補的で、ペプチドリガンド結合成分および特異的リガンド分子または構造を有する第2のp-RNAプログラム可能对合成分を含み、それにより、特異的リガンド分子または構造体の存在下で、特異的の第1のプログラム可能对合成分、第2のプログラム可能对合成分、および捕捉プログラム可能成分による選択的結合を介して、特異的超分子構造が形成される；

を含むことを特徴とする特異的リガンド分子または構造と相互作用するためのアレイベースの分子ディスクリプターデバイス。

【請求項41】 アレイ上の複数の部位に捕捉分子間リガンド結合構造を供し、各捕捉分子間リガンド結合構造は共通の捕捉プログラム可能对合成分および異なるリガンド結合成分を有し、

該捕捉プログラム可能对合成分に相補的であって、リガンド結合成分および特異的リガンド分子または構造を含むプログラム可能对合成分を有する、当該デバ

イスに相補的分子間リガンド結合構造を供し、

該デバイス上にストリンジェンシー条件を設定して超分子複合体形成を行ない、ならびに

超分子複合体が形成された、マイクロロケーションを検出する；
工程を含むことを特徴とするエレクトロニックアレイベースのデバイス上の超分子複合体のコンビナトリアル選択方法。

【請求項42】 該ストリンジェンシー条件がエレクトロニックストリンジェンシーを含む、請求項41記載の方法。

【請求項43】 該エレクトロニックストリンジェンシー条件がエレクトロニック乱れを含む、請求項42記載の方法。

【請求項44】 該ストリンジェンシー条件が慣用的ストリンジェンシー条件を含む、請求項41記載の方法。

【請求項45】 該ストリンジェンシー条件が温度を含む、請求項44記載の方法。

【請求項46】 該ストリンジェンシー条件がpHを含む、請求項44記載の方法

【請求項47】 該ストリンジェンシー条件がイオン強度を含む、請求項44記載の方法。

【請求項48】 該ストリンジェンシー条件が化学試剤を含む、請求項44記載の方法。

【請求項49】 さらに、与えられた超分子複合体に關与するリガンド結合成分を測定する工程を含む、請求項44記載の方法。

【請求項50】 リガンド結合成分の同一性が第2アレイのためのリガンド結合成分の選択に用いられる、請求項44記載の方法。

【請求項51】 該リガンド結合成分の同一性が合成抗体を形成するために利用される、請求項44記載の方法。

【請求項52】 該リガンド結合成分の同一性が新しい親和性試薬を形成するために利用される、請求項44記載の方法。

【請求項53】 該リガンド結合成分の同一性が合成触媒/酵素を形成する

ために利用される、請求項44記載の方法。

【請求項54】 該リガンド結合成分の同一性が新しい金属キレート構造を形成するために利用される、請求項44記載の方法。

【請求項55】 その上で超分子複合体が規定可能な位置で形成し得る分子ディスクリプターアレイを供し、

少なくとも1つの既知の基質を適用し、分子ディスクリプターアレイ上の既知の基質の応答をモニターし、次いで、そこからの応答プロフィールを発生させ、

テスト基質(分子)を分子ディスクリプターアレイに適用し、次いでそれへの応答をモニターし、次いで、

テスト物質の予期される生物学的応答を測定するために、該分子ディスクリプターアレイの上でテスト基質(分子)の応答を既知の基質から応答との関連において分析する；

工程を含むことを特徴とするテスト基質(分子)の予期される生物学的応答を測定する方法。

【請求項56】 複数の規定可能なロケーションを有する分子ディスクリプターアレイを供し、

該分子ディスクリプターアレイへ薬物を供し、次いで薬物に対する分子ディスクリプターアレイの応答をモニターし、それにより薬物に対する応答プロフィールを発生させ、

それに続いて、順次、関連化合物を分子ディスクリプターアレイに供給し、該関連化合物に対する分子ディスクリプターアレイの応答をモニターし、それにより該関連化合物に対するさらなる応答プロフィールを発生させ、次いで

該分子ディスクリプターアレイにテスト化合物を供し、該テスト化合物に対する分子ディスクリプターアレイの応答をモニターし、次いで、テスト化合物の期待された応答を予見するために、薬物と関連化合物に対する応答プロフィールに対して、テスト化合物の応答を分析する；

工程を含むことを特徴とする薬物発見のための方法。

【請求項57】 関連化合物がアゴニストである、請求項56記載の方法。

【請求項58】 関連化合物が拮抗剤である、請求項56記載の方法。

【請求項59】 関連化合物がインヒビターである、請求項56記載の方法

。

【請求項60】 関連化合物がトキシンである、請求項56記載の方法。

【請求項61】 第1の分子ディスクリプターアレイを供し、

該第1の分子ディスクリプターアレイに特異的リガンド分子または構造を適用し、該特異的リガンド分子または構造に対する応答を該分子ディスクリプターアレイの上でモニターし、次いで、超分子構造およびそれらの特異的リガンド結合成分を同定し、次いで、

リガンド結合成分の第2ライブラリーを供し、該ライブラリーの該成分は、少なくとも一部は、第1の分子ディスクリプターアレイ相互作用から同定したリガンド結合成分に基づいて選択され、次いで、第2のコンビナトリアルライブラリーを利用する、第2の分子ディスクリプターアレイを供する；
工程を含むことを特徴とする改善された分子ディスクリプターアレイを発生させるための方法。

【請求項62】 該ライブラリーがペプチド配列を含む、請求項61記載の方法。

【請求項63】 該第2のライブラリーが、第1のライブラリーにおけるペプチド配列より長いペプチド配列を含む、請求項61記載の方法。

【請求項64】 該第2のライブラリーが第1のライブラリーに含まれていない他のアミノ酸を含む、請求項61記載の方法。

【請求項65】 該第2のライブラリーが第1のライブラリーのサブセットを含む、請求項61記載の方法。

【請求項66】 マイクロロケーションのアレイを供し、

該マイクロロケーションに捕捉分子間リガンド結合構造を供し、該捕捉分子間結合構造体は、種々のマイクロロケーションに共通である捕捉プログラム可能対合成分およびマイクロロケーション間で変化するリガンド結合成分を有し、

分子間結合構造 a および b のプログラム可能対合成分が捕捉分子間リガンド結合構造の対合成分と動的平衡にある条件下で、該アレイを、分子間リガンド結合成分 a および分子間リガンド結合成分 b を含む溶液と接触させ、

特異的リガンド分子または構造を導入し、次いで、あるマイクロレーションで超分子複合体を形成させる；

工程を含むことを特徴とする、アレイ上での超分子複合体を形成させるための方法。

【請求項67】 動的平衡条件が、捕捉分子間リガンド結合構造ならびに分子間リガンド結合構造体 a および b からなる超分子複合体の融解温度に、またはその近くに存在する、請求項66記載の方法。

【請求項68】 該動的平衡条件が5 に、または融点より低い温度におけるものである、請求項66記載の方法。

【請求項69】 該アレイが能動マイクロエレクトロニックアレイである、請求項66記載の方法。

【請求項70】 該動的平衡条件がエレクトロニックストリンジェンシー条件を含む、請求項66記載の方法。

【請求項71】 該エレクトロニックストリンジェンシー条件がエレクトロニック乱れを含む、請求項66記載の方法。

【請求項72】 特異的リガンド分子または構造、分子間リガンド結合構造 a および分子間リガンド結合構造 b のダイマー複合体を形成する条件下で、溶液相に、特異的リガンド分子または構造、および分子間リガンド結合構造 a および分子間リガンド結合構造 b を供し、次いで、

ダイマー複合体および捕捉分子間リガンド結合成分よりなる超分子構造体を形成させるための条件下で、ダイマー複合体を捕捉分子間リガンド結合成分と接触させ、各捕捉分子間リガンド結合成分は、共通の捕捉プログラム可能对合成分および異なるリガンド結合成分を有する；

工程を含むことを特徴とする超分子複合体を形成させる方法。

【請求項73】 該ダイマー複合体の形成をアレイから分離して行う、請求項72記載の方法。

【請求項74】 該ダイマー複合体を、溶液中、アレイの上で生成させる、請求項72記載の方法。

【請求項75】 該アレイがエレクトロニックアレイである、請求項72記

載の方法。

【請求項76】 該エレクトロニックアレイを、ダイマー複合体の生成の間、該成分に対して反発的条件の中に置く、請求項72記載の方法。

【請求項77】 マイクロロケーションのアレイを供し、各マイクロロケーションは捕捉分子間リガンド構造を含み、該分子間リガンド結合構造は共通のプログラム可能対合成分および変化するリガンド結合成分を有し、

捕捉プログラム可能対合成分との対合に適しているプログラム可能対合成分およびリガンド結合成分を有する、分子間リガンド結合構造 a および分子間結合構造 b と該アレイとを接触させ、

特異的リガンド分子または構造を導入し、

ストリンジェンシー条件を変化させてアレイの上の特異的超分子複合体ロケーションを決定する；

工程を含むことを特徴とするエレクトロニックマイクロアレイ上で超分子構造を形成させる方法。

【請求項78】 該ストリンジェンシー条件がエレクトロニックストリンジェンシー条件を含む、請求項77記載の方法。

【請求項79】 該エレクトロニックストリンジェンシー条件がエレクトロニック乱れを含む、請求項77記載の方法。

【請求項80】 複数のマイクロエレクトロニックの部位を供し、各部位は、それに対するプログラム可能対合成分カップルを有し、該プログラム可能対合成分は部位間で異なり、

複数の異なるタイプの抗体を供し、抗体の各タイプは、異なるプログラム可能対合成分で標識されており、該プログラム可能対合成分は、マイクロエレクトロニック部位に結合したプログラム可能対合成分に相補的であり、

抗原を供し、

マイクロエレクトロニック部位において、抗原および複数の、標識した、異なるタイプの抗体を、プログラム可能対合成分と反応させ、

該プログラム可能対合成分と該相補的プログラム可能対合成分とを相互作用させる、次いで、

相補的プログラム可能对合成分に結合した抗原に結合した抗体が存在する部位を決定する；

工程を含むことを特徴とする、マイクロエレクトロニックアレイデバイス上で複数免疫反応を実行する方法。

【請求項81】 該抗原および複数の、標識した、異なるタイプの抗体を均一フォーマットにて一緒に供する、請求項80記載の方法。

【請求項82】 該プログラム可能对合成分および該プログラム可能对合成分に対する相補体がp-RNAである、請求項80記載の方法。

【請求項83】 付着表面、該付着表面は可変エレクトロニック環境に位置し、

少なくとも第1および第2の分子認識成分を含む分子認識システム、少なくとも該第1の成分は該表面に付着しており、

分子認識システムに結合した別々の分子種、および該別々の分子種とでの超分子複合体の形成のための第3の構造、を含む分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項84】 該分子認識システムが対合システムを含む、請求項83記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項85】 該対合システムが相補的対合システムである、請求項84記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項86】 該対合システムが相補的で、コード化した対合システムである、請求項85記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項87】 該相補的対合システムがp-RNA対合システムである、請求項86記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項88】 別々の分子種がペプチドを含む、請求項83記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項89】 該別々の分子種がペプチド配列を含む、請求項88記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項90】 該別々の分子種が抗体を含む、請求項88記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項91】 該別々の分子種が抗体フラグメントを含む、請求項88記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項92】 該別々の分子種が特異的結合蛋白を含む、請求項88記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項93】 該別々の分子種が特異的生物学結合部位を含む、請求項88記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項94】 該生理学的結合部位が単離された生物結合部位である、請求項93記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項95】 該生理学的結合部位がクローン化された生物学結合部位である、請求項93記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項96】 該生理学的結合部位が模倣生物学結合部位である、請求項93記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項97】 該生理学的結合部位が融合した生物学結合部位である、請求項93記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項98】 該別々の分子種がコンビナトリアルライブラリー由来である、請求項83記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項99】 該ライブラリーが2種を含む、請求項98記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項100】 該ライブラリーが少なくとも10種を含む、請求項98記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項101】 該ライブラリーが少なくとも100種を含む、請求項98記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項102】 該ライブラリーが少なくとも1000種を含む、請求項98記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項103】 該ライブラリーが少なくとも10,000種を含む、請求項98記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項104】 該ライブラリーがより高次のライブラリーを形成するために集合したサブライブラリーである、請求項98記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項105】 単一の別々の分子種が該分子認識システムに結合した、請求項83記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項106】 分子種の協力型アンサンブルが分子認識システムに結合している、請求項105記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項107】 2つの分子種（ジアド）が存在する、請求項106記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項108】 3つの分子種（トリアド）が存在する、請求項106記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項109】 該ライブラリーの成分が特異的分子性質を確認する、請求項98記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項110】 該ライブラリーの成分が特異的化学的性質を確認する、請求項98記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項111】 該性質が結合である、請求項109記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項112】 該性質が分子認識である、請求項109記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項113】 該性質が化学的なものである、請求項109記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項114】 該性質が物理的活性である、請求項109記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項115】 別々の分子種が共有結合的に該分子認識システムに結合している、請求項83記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項116】 別々の分子種が超分子的に該分子認識システムに結合している、請求項83記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項117】 該超分子結合がストレプトアビジン/ビオチン相互作用を含む、請求項116記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項118】 別々の分子種が第1および第2の分子認識成分の両方に結合した、請求項83記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項119】 該超分子複合体が共有結合を含む、請求項83記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項120】 該超分子複合体が超分子結合を含む、請求項83記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項121】 n 種のタイプが存在し、変異の数は b^n である、請求項98記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項122】 さらに検出器を含む、請求項83記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項123】 該検出器が超分子複合体の存在を検出する、請求項122記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項124】 該検出器が超分子複合体の集合に関する性質を検出する、請求項122記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項125】 該検出器が超分子複合体の解離に関する性質を検出する、請求項122記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項126】 該検出器が、オフレート(off-rate)を含む、超分子複合体の解離に関する性質を検出する、請求項125記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項127】 該検出が競合的結合フォーマットを含む、請求項122記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項128】 該検出がサンドイッチフォーマットを含む、請求項122記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項129】 複数の物理的に異なった部位(各々は付着表面からなる)が様々なエレクトロニック環境に置かれている、請求項83記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項130】 各部位が共通の第1の分子認識成分を有する、請求項129記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項131】 各部位が異なった成分を有する、請求項129記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項132】 分子認識成分、別々の分子種または超分子の複合体のう

ちの少なくとも1種が標識されている、請求項83記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項133】 標識が蛍光標識を含む、請求項132記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項134】 診断デバイスを含む請求項83記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項135】 診断デバイスが、血液、組織、大便、細胞、細胞コンパートメントおよび細胞画分からなる群からの試料を試験する、請求項134記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項136】 サブライブラリー（ELIAS）の集合によって指数関数的ライブラリー中に超分子構造を形成する方法において、超分子複合体の形成のための成分の少なくともあるものをエレクトロニックストリンジェンシーに付すことを特徴とする改良。

【請求項137】 エレクトロニックストリンジェンシー条件がエレクトロニック乱れを含む、請求項136記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明の分野は、顕微鏡的フォーマットにおいて多工程的かつ多重的亲和性結合反応を遂行するための装置および方法に関する。特に、それらの装置および方法は、独自のストリンジェンシーパラメータの適用によって、コンビナトリアル的に生成した分子間リガンド結合成分、超分子構造および超分子複合体のより高次の選択を速やかに遂行する。さらに、本発明は、分子認識プロセス、新薬発見、新しい親和性試薬の創成、合成抗体の創成およびイムノアッセイのためのマイクロエレクトロニックアレイの装置、手順、方法およびフォーマットに関する。

【0002】

本出願は、「分子生物学的な解析および診断法のための方法および手順」と題する、出願シリアル番号第08/968065号(1997年12月5日出願)、「生物物質の電子摂動解析の方法」と題する、出願シリアル番号第08/855058号(1997年5月14日出願)、「活力あるプログラム可能な行列装置のための機器および方法」と題する米国特許第5,849,486号(1995年9月27日出願)、「電極を含む分子生物学的な診断システム」と題する米国特許第5,632,957号(1994年9月9日出願)、「分子的生物学的な解析および診断のための電子的厳格制御のための方法」と題する、出願シリアル番号第08/271882号(1994年7月7日出願)、および「分子生物学的な解析および診断のための活力あるプログラム可能な電子装置」と題する、米国特許第5,665,662号(1993年11月1日出願)に関連する。本出願はまた、「分子生物学的な解析および診断のための進歩した有用な装置および方法」と題する出願PCT/US99/03080号(1999年2月11日出願)に関連する。本出願はまた、「新しい物質ライブラリーおよびそれをもって生産された超分子複合体」と題するWO第97/43232号(1997年11月20日公開)、「ペントピラノシルヌクレオシド、ならびにその生産および使用」と題するWO第99/15539号(1997年9月22日出願)、「電子成分を生産するためのペントピラノシルヌクレオシドおよび前記ペントピラ

ノシルヌクレオシドの共役化合物」と題するWO第99/15541号(1997年9月22日出願)、「シクロヘキシルおよびヘテロシクリルヌクレオシド誘導体ならびにこれらの誘導体を生産する方法、ならびに組合せおよび/または試験システムにおける該誘導体およびそのオリゴマーまたは共役体の使用」と題するWO第99/15509号(1997年9月22日出願)、「リンカーヌクレオシド、ならびにその生産および使用」と題するWO第99/15542号(1997年9月22日出願)、「アドレス指定可能なモジュラー認識系、生産形式および使用」と題する、WO第99/15893号(1997年9月22日出願)、「非らせんの超分子ナノシステム」と題するWO第98/25943号(1996年12月11日出願)に関連する。以上の明細書は、これによって、本明細書に完全に記載されているかのごとく、参照によって取り入れる。

【0003】

【従来の技術】

自動化されたコンビナトリアル合成プロセスを用いて、ペプチド、オリゴヌクレオチドおよび有機または無機の部分の他の興味深い組合せの大ライブラリーを創ることは現在可能である。ペプチドライブラリーの場合、これらは、次にリガンド結合成分構造を形成する独自の組合わせシステムと結合することができる。これらのリガンド結合成分構造は、それらがより大きな構造、「超分子構造」に集合することができるようにデザインされ、それは、分子認識性状ならびに重要な生物学的に活性分子および構造と選択的かつ安定な複合体を形成するポテンシャルを有する。多数のこれらのリガンド結合構造のコンビナトリアル選択を速く遂行する方法は、特に既知の医薬品および生物学的に活性な化合物に対する、リガンド結合プロセスの性質に関してのかなりの情報に導くことができる。非常に多数のこれらの複合体を既知の化合物で迅速に評価することができるならば、新薬および他の重要な化合物をスクリーニングし、評価するプロセスが進展する可能性がある(European Biopharmaceutical Review、1998年6月、52~57頁におけるミクルカ、C.、ホッピー、H. U.およびウインダブ、Nを参照)。

【0004】

超分子の結合構造は、本分野における多くの研究者によって記載されてきた。反復単位をもつ超分子ポリマーのクラスは、レーン、J. M.によってJ. Chem. Soc. Chem. Commun. 479頁、1990年に記載された。環状ペプチドから形成された、ポリマーの管形タイプ超分子の構造は、ガディリ、M. R.らによってNature 366巻、324~327頁、1993年に記載された。J. Am. Chem. Soc. 116巻、1661~1669頁、1994年において、チャン、Y.およびにおけるシーメン、N. C.によって、2次元および3次元のDNA構造がデザインされ、酵素反的に合成された。核酸およびペプチド成分から成る個別タイプの超分子複合体は、ヴァータネン、J.およびヴァータネン、S.によってPCT出願WO第96/13522(1996年5月9日)において記載された。核酸ペプチド構造の合成方法は提案されているが、特に成分および構造の大きいコンビナトリアルライブラリーから、どのように複合体が選択されるかについての言及はない。他のグループは、モデルコンビナトリアルシステムの自己集合版すなわち「仮想的コンビナトリアルライブラリー」に興味をもっていた(Proc. Nat. Acad. Sci. USA、94巻、2106~2110頁、1997年におけるI. ハクおよびJ. M. レーンならびにJ. Chem. Soc., Perkin Trans. 1巻、3237~3253頁、1997年におけるA. プレーディーおよびJ. K. M. サンダース参照)。

【0005】

複雑な超分子構造および他の三次元構造を調製するための多くの合成的技術が存在するが、一方で多くの意図された適用のために最適の構造を実際に決定する素早く選択的なプロセスが必要とされている。マイクロアレイ技術は、リガンド結合成分の大ライブラリーの素早い評価およびスクリーニング、ならびに、超分子構造および超分子複合体の選択にとって、価値があるであろう。DNAアレイ技術は、超分子の構造、特に成分構造のハイブリダイゼーションを通しての2次自己集合を含む構造の選択にとっては潜在的に役に立つであろう。多くのDNAアレイ技術が利用可能であり、この種のコンビナトリアル選択プロセスに適用することができるが、一方それらの限定されたストリンジェンシーパラメータは

、高度の選択作用を得ることに関して問題を提出するかもしれない(A.マーシャルおよびJ.ホジソン、Nature Biotechnology、第16巻、2731頁、1998年およびG.ラムゼー、Nature Biotechnology、第16巻、40~41頁、1998年参照)。

【0006】

多くのハイブリダイゼーション技術は、しばしば複雑で時間がかかる多数の操作の遂行を含む。多くのハイブリダイゼーション技術は、また、感度、特異性または再現性の欠如によって限定される。たとえば、感度および特異性に関する問題は、これまでのところ核酸ハイブリダイゼーションの適用を限定してきた。核酸ハイブリダイゼーションの解析には、通常、たくさんの非標的の核酸の中にあるプローブによる、ごく少量の特異的標的核酸(DNAまたはRNA)の検出が含まれる。高い特異性を保つために、ハイブリダイゼーションは通常、温度、塩、デタージェント、溶媒、カオトロピック剤および変性剤の組合せを通して成し遂げられる最もストリンジェントな条件で遂行される。多重試料の核酸ハイブリダイゼーション解析は、種々のフィルターおよび固体担体フォーマットの上で行われてきた(Methods in Enzymology、第100巻、パートB(R. U.、L. モルデイブ編、アカデミックプレス、ニューヨーク)第19章、266~308頁、1985年におけるG. A. ベルツを参照)。1つのフォーマット、いわゆる「ドットプロット」ハイブリダイゼーションには、フィルターへの標的DNAの付着が含まれ、それは、続いて標識したプローブ(1個または複数個)とハイブリダイズされる。「ドットプロット」ハイブリダイゼーションは広範囲の使用を獲得し、多くのバージョンが開発された(「核酸ハイブリダイゼーション - 実用的アプローチ」(B. D. ヘイムズおよびS. J. ヒギンス編、IRLプレス、ワシントンDC)第4章、73~111頁、1985年)におけるM. L. M. アンダーソンおよびB. D. ヤング参照)。「ドットプロット」ハイブリダイゼーションは、ゲノム突然変異の多重解析のために(欧州特許出願第0228075号(1987年7月8日)におけるダッタグプタ ナニブハシャンおよびD. ラビン参照)ならびに重複クローンの確認およびゲノムマップの構築のために開発された(米国特許第5, 2

19,726号(1993年6月15日)におけるG. A. エヴァンズ参照)

。

【0007】

もう一つのフォーマット、いわゆる「サンドイッチ」ハイブリダイゼーションには、固体担体にオリゴヌクレオチドプローブに共有結合的に付着すること、そして、多重核酸標的を捕らえ、検出するためにそれらを使用することが含まれる。(M. ランキら、Gene、21巻77~85頁、1983年、英国特許出願第2156074A号(1985年10月2日)におけるA. M. パルヴァ、T. M. ランキおよびH. E. ソーダーランド、米国特許第4,563,419号(1986年1月7日)におけるT. M. ランキおよびH. E. ソーダーランド、PCT出願のWO第86/03782号(1986年7月3日)におけるA. D. B. マルコムおよびJ. A. ラングデール、米国特許第4,751,177号(1988年1月14日)におけるY. スタビンスキー、PCT出願のWO第90/01564号(1990年2月22日)におけるT. H. アダムズら、R. B. ウォレスら、6 Nucleic Acid Res. 11巻、3543頁、1979年、およびB. J. コナーら、80 Proc. Natl. Acad. Sci. USA、278~282頁、1983年)。

【0008】

現在の核酸ハイブリダイゼーションフォーマットおよびストリンジェンシー制御方法を使用して、最も感度のよいレポーター基(酵素、蛍光団、ラジオアイソトープなど)および関連する検出システム(蛍光光度計、照度計、光子計数管、シンチレーションカウンターなど)を用いても低コピー数(すなわち、1~100,000)の核酸標的を見つけることは、困難なままである。この困難は、直接的プローブハイブリダイゼーションと関連するいくつかの基本的な問題によって引き起こされる。1つの問題は、ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシー制御に関する。ハイブリダイゼーション反応は、通常、ハイブリダイゼーション特異性を達成するためにストリンジェントな条件で遂行される。ストリンジェンシー制御の方法には、第一に、ハイブリダイゼーションおよび以後の洗浄

手順における温度、イオン強度および変性剤の最適化が含まれる。残念なことに、これらのストリンジェンシー条件の適用は、検出用のハイブリッド化したプローブ/標的複合体の数の顕著な減少を引き起こす。

【0009】

もう一つの問題は、大抵の試料、特にヒトゲノムDNA試料におけるDNAの高い複雑度に関する。試料が、特定の標的配列と密接に関連がある莫大な数の配列からなっていると、最も独自のプローブ配列でさえ、非標的配列をもつ多数の部分的なハイブリダイゼーションを有する。第3の問題は、プローブおよびその特定の標的間の好ましくないハイブリダイゼーション動力学に関連する。最高条件においても、ほとんどのハイブリダイゼーション反応は、プローブおよび標的分子の比較的低い濃度で行われる。さらに、プローブは、しばしば、現実の標的配列を求めて相補的(標的)鎖と競合しなければならない。ほとんどの現在のハイブリダイゼーションフォーマットにとっての第4の問題は、高レベルの非特異的バックグラウンドシグナルである。これは、ほとんどすべての材料に対するDNAプローブの親和性によって引き起こされる。これらの問題が、個々にまたは組み合わさって、記載されたフォーマットにおける核酸ハイブリダイゼーションに対する感度および/または特異性の減失に導く。

【0010】

マイクロフォーマット化された多重またはマトリックス装置(たとえば、DNAチップおよびDNAアレイ)上で、多重核酸ハイブリダイゼーション解析を遂行する新しい技術が開発されつつある(M. バリナガ、Science、253巻、1489頁、1991年、W. バインズ、Bio/Technology、10巻、757~758頁、1992年参照)。これらの方法は、通常、特異的DNAの塩基配列を、DNAチップのマイクロウエルのような固体担体の非常に小さい特定の領域に付着させる。これらのハイブリダイゼーションフォーマットは、従来の「ドットプロット」および「サンドイッチ」ハイブリダイゼーションシステムのマイクロスケールバージョンである。

【0011】

あるマイクロフォーマット化されたハイブリダイゼーションは、「ハイブリダイ

ゼーションによる配列決定」(SBH)を遂行するのに用いることができる(M. バリナガ、Science、253巻、1489頁、1991年、W. バインズ、Bio/Technology、10巻、757~758頁、1992年)。SBHは、未知のDNA試料におけるn量体を確認するために全ての可能なn-ヌクレオチドオリゴマー(n量体)を利用し、それは、後にアルゴリズム解析によってDNAの塩基配列を生じるように整列される(R. ドルマナクおよびR. クルクヴェンヤコブ、ユーゴスラビア特許出願第570/87号、1987年、R. ドルマナクら、Genomics、4巻、114頁、1989年、ストレゾスから、Proceedings Natl. Acad. Sci. USA、88巻、10089頁、1991年、ならびに、R. ドルマクおよびR. B. クルクヴェンヤコブ、米国特許第5,202,231号(1993年4月13日)参照)。SBHを遂行するための2つのフォーマットがある。1つのフォーマットは、支持体の上で全ての可能なn量体のアレイを創ることを含み、それは、その後標的配列でハイブリダイズされる。これは、「逆ドットプロット」と呼ばれている、もう1つのフォーマットは標的配列を支持体に付着することを含み、それは全ての可能なn量体で順番に検査される。両方のフォーマットは直接的プローブハイブリダイゼーションの基本的問題および多重ハイブリダイゼーションに関連する付加的な困難さを持っている。サザーン、英国特許出願第8810400号(1988年)、E. M. サザーンら、Genomics、13巻、1008頁、1992年は、「逆ドットプロット」フォーマットを用いて、DNAを分析するまたは配列決定をすることを提案した。サザーンは、PCR増幅ゲノムDNAを使用して既知の単一点突然変異を確認した。サザーンは、また、SBHのために固体担体の上でオリゴヌクレオチドのアレイを合成する方法を記載した。しかし、サザーンは、アレイ上の各オリゴヌクレオチドのための最適ストリンジェンシー条件を達成する方法について言及しなかった。たとえば、1988年5月3日優先権主張の「ポリヌクレオチド配列を分析すること」と題したPCT出願WO第89/10977号参照。逆ドットプロットマイクロアレイフォーマットを使用している他の研究者は、最小の単一塩基ミスマッチ認識を達成するために、非常に長いハイブリダイゼーションおよびストリンジェ

ントな洗浄時間を必要とした (Z. グオら、Nucleic Acids Res. 第22巻、No. 24、5456~5465頁、1994年)。

【0012】

フォドアら (Science、251巻、767~773頁、1991年) は、ガラスマトリックス上でオリゴヌクレオチドを合成するために写真平板技術を使用した。パールングらは、米国特許第5,143,854 (1992年9月1日) において、ケイ素基質上のアレイ風の大規模なポリペプチドの写真技術的固相合成を教示している。フォドアら (Nature、364巻、555~556頁、1993年) は、DNAの配列決定のために、固体担体の上で1,024個の8量体オリゴヌクレオチドのアレイを使用した。この場合、標的DNAは、ヌクレオチドAおよびCだけを含む、蛍光標識した一本鎖12量体オリゴヌクレオチドであった。12量体標的配列の1 pmol ($\sim 6 \times 10^{11}$ 分子) が、アレイ上での8量体オリゴマーとのハイブリダイゼーションのために必要であった。結果は、多くのミスマッチを示した。サザーンと同じように、フォドアらは、多重ハイブリダイゼーションに対するストリンジェンシー制御のような、直接的プローブハイブリダイゼーションの根本的な問題について言及しなかった。標的DNAの塩基配列のために最適のストリンジェンシーおよび選択性を達成するために、多数の固定された捕獲プローブ (通常、単一塩基ミスマッチを測定するために20以上、M. J. コーザルら、Nature Medicine、第2巻、No. 7、753~759頁、1996年参照) をアレイに組み込まれなければならなかった。たとえば、「基質に付着した材料のアレイ」と題した米国特許第5,744,305号 (フォドアら) 参照。

【0013】

ドラマナクラ (Science、260巻、1649~1652頁、1993年) は、いくつかの短い (116 bp) DNAの塩基配列を決定するために、上に述べた第二のフォーマットを使用した。標的DNAは、膜支持体 (「ドットプロット」フォーマット) に付着された。各フィルターは、順番に272個の標識した10量体および11量体オリゴヌクレオチドでハイブリダイズされた。広範囲のストリンジェンシー条件が、各々のn量体プローブのために特定のハイブリ

ダイゼーションを達成するのに用いられた、洗浄時間は5分から1夜、温度は0から16の範囲にわたった。ほとんどのプローブは、16で3時間の洗浄を必要とした。濾過器は、ハイブリダイゼーションシグナルを見つけるために2時間ないし18時間曝露しなければならなかった。全体での間違っただ陽性ハイブリダイゼーション割合は、単純な標的配列、数を少なくしたオリゴマープローブセットおよび利用できる最もストリンジェントな条件にもかかわらず、5%であった。たとえば、「オリゴヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションによる配列決定法」と題された米国特許第5,695,940号(ドラマナクラ)を参照。

【0014】

マトリックスハイブリダイゼーションのもう1つのアプローチにおいて、1992年サンディエゴ会議「遺伝子認識」(1992年11月)においてビーティらは、ガラス基質の上で個々のマイクロに製作された試料ウエルに特異的DNA塩基配列を含むマイクロ液滴を落とすためにマイクロロボットシステムを使用した。各々の試料ウエルにおけるハイブリダイゼーションは、ミニチュア電極試験取付具(これは、個々のマイクロウエル各々を交流(AC)電場で囲むようにしている)を調べることによって確認した。たとえば、「分子検出のための光学および電気的方法および装置」と題した米国特許第5,653,939号(ホリスら)を参照。

【0015】

このフォーマットにもかかわらず、現在のマイクロスケールDNAハイブリダイゼーションシステムおよび受動的DNAチップ/アレイアプローチは、核酸ハイブリダイゼーション反応と関連する基本的な問題のいくつかを克服していない。それらは、非常に高いレベルの比較的短い一本鎖の標的配列またはPCR増幅DNAを必要とし、しかも、最もストリンジェントな条件のもとでさえ高いレベルの間違った陽性ハイブリダイゼーションシグナルを出す可能性がある。短いオリゴヌクレオチド配列の受動的アレイを用いる多重フォーマットの場合、各々の個別の配列に対する全体ストリンジェンシー条件をなんらかの従来のアプローチで最適化することは不可能である。なぜなら、これらのフォーマットのために使用

されるアレイまたはデバイスは、他の場所と相対的な個々の試験位置または場所で、温度、イオン強度または変性剤を変えたり、または調整したりすることができないからである。こうして、普通のストリンジェンシー条件が、デバイス上で全ての配列のために使用されなければならない。これは、多数の非特異的かつ部分的ハイブリダイゼーションを結果し、受動的ハイブリダイゼーションアレイおよびデバイスの適用を限定する。問題は、アレイ上での異なる標的配列の複雑さおよび数値が増すにつれてさらに複雑になる。

【0016】

このように、リガンド結合成分の大きいコンビナトリアルライブラリーの現実的な評価およびスクリーニング、対合（ハイブリダイゼーション）および多重リガンド結合成分を含む超分子の構造および超分子の複合体の選択、既知の医薬品および関連化合物のセットの評価、および、薬物スクリーニングのための実際の分子ディスクリプターアレイの開発は、いくつかのタイプのマイクロアレイシステムを使用してもっともうまく遂行されうる。多くの受動的DNAアレイ技術が利用可能であり、それらは、ハイブリダイゼーション対合成分を含むリガンド結合成分を選択するために、潜在的に使用可能である。残念なことに、これらのDNA配列技術の受動的性質が問題を提供する。これらの受動的アレイは、単独で、膨大な数の可能性のある組合せから最も特異的なリガンド結合構造を選択するために必要とされるストリンジェンシー条件の無限の多様性を提供することができない。たとえば、リガンド結合成分の10,000個のライブラリーを使用することは、巨大な数の「潜在的」超分子構造の組合せ（ $> 10^{12}$ ）を生み出すことができる。リガンド結合成分の多様な性質および塩基の対合/ハイブリダイゼーション性状に対する要件の故に、限定された全体ストリンジェンシーパラメータ（温度、pH、イオン強度、など）をもつ受動的アレイ技術を使用することは、コンビナトリアル選択プロセスを遂行するために過度の時間を必要とする。第2に、多数の全体ストリンジェンシー条件が適用されるとき、各々の全体のストリンジェンシー変化がアレイ上での複合体の有効数を減らすことができる；こうして、限られた数のストリンジェンシーだけを適用することができる。要約すれば、受動的すなわち従来のDNAアレイフォーマットにとっては限界があり

、そこにおいては、それらが、リガンド結合成分の膨大なコンビナトリアルライブラリーおよびアレイの上で生成する多数の超分子の構造および複合体を評価し、スクリーニングするために必要な高速および高選択性を提供することができない。

【0017】

(発明の概要)

1つの態様において、本発明は、コンビナトリアルプロセス（ここに、成分構造は、改善された速度と高次の特異性をもって分子間または超分子リガンド結合構造およびひき続いての超分子複合体（または集合体）を形成する）を遂行するために活性なマイクロエレクトロニックアレイデバイスを使用するための機器および方法に関する。分子間または超分子のリガンド結合構造は、1つ以上のリガンド結合成分を含むプログラム可能な自己集合/対合成分から成る。適切なまたは選択的分子認識および結合性状をもつ超分子のリガンド結合構造が、薬剤分子または他の生物学的に活性な分子または構造を含む特異的なリガンド分子または構造と結合するかまたは集合するとき、超分子の複合体または集合体が形成される。

【0018】

一旦、既知の特異的なリガンド分子（薬物または他の生物学的に活性な化合物）に対しアレイ上の最適の超分子複合体パターン形成が決定されると、該アレイはその後「分子ディスクリプター」デバイスとして用いることができる。この「分子ディスクリプター」デバイスはいろいろな用途に使用することができ、そのいくつかには、新薬の発見およびスクリーニングプロセス、新しい親和性試薬の創成または高親和性/高特異性合成抗体の創成が含まれる。その上、これらのアレイの他のバージョンは、複合的なプロテオーム解析のために、および多重イムノアッセイ用途のために使用することができる。

【0019】

非アレイの、単一部位バージョンにおいては、本発明は、付着表面（該付着表面は、可変のエレクトロニック環境に位置し、分子認識システムは少なくとも第1および第2の分子認識成分を含み、少なくとも該第1の成分は表面に付着して

いる)、該分子認識システムに結合した別々の分子種、ならびに該別々の分子種での超分子集合体の生成のための第3構造、を含む超分子集合体の生成および検出のためのデバイスと考えることができる。望ましくは、分子認識システムは、対合システムから成る。最も望ましくは、該対合システムは、p-RNAのような相補的で、コードされた対合システムである。再び望ましくは、別々の分子種は、ペプチド配列から成る。

【0020】

本発明のコンビナトリアル選択プロセスにおいては、マイクロエレクトロニックアレイは、小分子(医薬品、代謝物、金属イオンなど)、大きい分子(タンパク質、酵素、抗体など)およびより大きい構造体(オルガネラ、細胞など)の、超分子リガンド結合構造に対する親和性結合を行うために用いられる。これらのプロセスは、薬物または他の生物学的に活性分子の存在下で最も選択的で、および/または安定な超分子複合体を形成する、これらの分子間リガンド結合構造の確認を可能にする。マイクロエレクトロニックアレイの使用は、近リアルタイムの進化的または学習的形式と考えられることにおいて遂行されるコンビナトリアル選択プロセスを可能にする。このプロセスは、より安定超分子の複合体を確認するだけでなく、構造の重要な分子認識性状についての情報も提供する。これらの分子認識性状には、ある種の超分子の構造およびそれらの成分分子間リガンド結合構造が、何故より適した結合特性を有するか、に関する化学的、物理的かつ力学的理由が含まれる。こうして、該アレイの分子認識性状は、結合した薬物または分子の構造/機能の関連性、リガンド結合成分およびプロセス、ならびにさらに実際の生物学的なレセプター部位についてのより有用な情報を提供することができる。超分子複合体形成の情報のフィードバックは、超分子リガンド結合構造の特定のクラスのより集中した選択または超分子のリガンド結合構造のより新しいクラスの非常に広いスクリーニングのための相互に関連のあるプロセスをデザインすることを可能にする。マイクロエレクトロニックアレイは、それらがアレイの上の各テスト部位での選択的電場ストリンジェンシー制御の付加的パラメータを提供する故に、この高次の特異性を達成することができる。こうして、温度、pH、イオン強度および化学試剤(溶剤、変性剤、カオトロピック剤

)を含む、従来のまたは古典的なストリンジェンシーパラメータに加えて、超分子複合体への電場のストリンジェンシーの適用は、改善されたおよび/またはさらに特異的な超分子のリガンド結合構造を選択する強力なパラメータを提供する。部位から独立した一般的なエレクトロニックストリンジェンシーを提供することに加えて、電場はまた、實際上、分子間超構造体自体に乱れを与えて、より低いエネルギー配置(これはよりよいリガンド結合環境および複合体の生成に導く)を生成するようにする。

【0021】

新薬発見およびスクリーニングの用途については、超分子複合体結合パターンは、まず、既知の医薬品、アゴニスト、拮抗剤、インヒビター、トキシンおよび目標とされた生物学的レセプター部位で相互に作用すると知られている他の生物学的な試剤に関して決定される。コンビナトリアルマイクロエレクトロニックアレイ上のこれらの既知医薬品または生物学的試剤の結合パターンは、良好なまたは望ましい特性(たとえば薬物有効性に関して)および悪いまたは望ましくない特性(たとえば毒性)と相関することがある。したがって、マイクロエレクトロニックアレイの分子認識性質は、それが、薬物/レセプター部位の構造/機能の関連性に対する有用な分子ディスクリプターになることを可能にする。新薬、治療薬または未知化合物のその後の試験および「分子ディスクリプター」アレイ上のそれらの特定超分子複合体形成パターンの決定は、新薬の、または、化合物の有効性、副作用および毒性に関する潜在的情報を提供することができる。

【0022】

本発明に関連する分子間リガンド結合構造の1つの重要な形態は、リガンド結合成分としてプログラム可能な自己集合性対合成分を、およびペプチドとしてピラノシル-RNAすなわちp-RNAを利用する。特に、プログラム可能な対合成分としてのp-RNAの使用は、自己集合分子間リガンド結合構造を生じることに関して顕著な利点を提供する。p-RNAは、糖基がペントピラノースである核酸様分子である(図1参照)。(ピッチュS.ら、*Helv. Chim. Acta*、76巻、2161~2183頁、1993年を参照)。通常のデオキシリボース(あるいはリボース)をペントピラノース糖に置換すると、ハイブリ

ダイズした2本鎖 p - RNA の平面形態になる (図 2 参照) 。 2本鎖 p - RNA 構造に関する平面形態は、薬物または他の分子が結合するとき、安定な分子間構造および超分子複合体を形成する独自の特質を有する。その上、p - RNA は DNA または RNA とハイブリダイズしないので、独自のプログラム可能な対合システムを提供する。p - RNA 分子は、また、それらの配列のほとんどの位置でもペプチド配列でもって誘導体化することができる。アミノ酸の種々のコンビナトリアル配置を含む、ペプチド配列は、実際のリガンド結合構造を形成する。自己集合性分子間リガンド結合超分子構造の他のクラスは、核酸 (DNA または RNA) およびペプチドを使用して生成させることができる。これらの超構造において、核酸部分はプログラム可能な自己集合性対合成分を提供し、ペプチド部分はリガンド結合成分を形成するのに役立つ。p - RNA および DNA (または RNA) をベースとしたクラスは、本発明に関連する、可能な分子間リガンド結合超構造のいくつかを表す。(本発明を記載する際に「超分子構造」と「超構造」は相互に交換可能として使用していることを指摘しなければならない)。

【 0 0 2 3 】

1つの特に有用な形の分子間リガンド結合成分は、「トリアド」タイプのリガンド結合立体配置を生じる超分子構造に導く。これらの「トリアド」結合構造は、2つの短い p - RNA 配列 (A) と (B) をデザインすることによって生成し、それらは、第3のより長い捕捉 p - RNA 配列 (C) と相補的である。2つの p - RNA 配列 (A) と (B) は、望ましくは、相補的捕捉 p - RNA (C) 配列 (図 3 参照) と対合 (ハイブリダイズ) するとき、近接するようにデザインする。「トリアド」-タイプリガンド結合超構造を利用するコンビナトリアル結合フォーマットおよびアッセイは、捕捉 p - RNA - ペプチド (C) リガンド結合成分構造が選択的にアドレスされ、アレイ上の特定のテスト位置またはマイクロローケーションに固定される、マイクロエレクトロニックアレイを生成することを含む。これらの固定された p - RNA - ペプチド (C) 構造において、p - RNA 成分は、2つの p - RNA (A) と p - RNA (B) の配列に対して相補的である1つの共通のまたは一般的な配列である。p - RNA 配列は、望ましくは、アレイの上の全ての固定された捕捉 p - RNA (C) に対するのと同じもの

であるが、アレイ上の各テスト位置（マイクロローケーション）は既知のコンビナトリアルペプチドライブラリーとは「異なるペプチド配列」を含む p - RNA - ペプチドのセットでアドレスされる。p - RNA の (A) および (B) 成分のペプチド配列は、望ましくは、アレイの上で固定された捕捉 p - RNA - ペプチドと同様に、既知ペプチド配列の同一セットを含む。したがって、p - RNA - ペプチド (A)、(B) および (C) はペプチドサブライブラリーを形成する。

【0024】

p - RNA - ペプチド (A)、(B) および (C) 成分が適切な対合（ハイブリダイゼーション）条件で結合するとき、多数の分子間リガンド結合超構造が形成される（ライブラリー中のペプチドの数の3乗）。このプロセスは、「サブライブラリーの集合による指数関数的ライブラリー」またはエリアス（ELIAS）の生成と呼ばれる（図4参照）。（一般的には下記を参照：「新しい物質ライブラリーおよびそれで作成された超分子複合体」と題した、WO第97/43232号（1997年11月20日公開）、「非らせん状超分子ナノシステム」と題する、WO第98/25943号（1996年12月11日出願）、および「アドレス指定可能なモジュラーの認識系、生産形式および使用」と題する、WO第99/15893号（1997年9月22日出願）。これらは、本明細書に完全に記載されているかのように、こうして参照によって取り入れる。）pRNA - ペプチド (A) および (B) 成分の2つの相補配列が、捕捉 p - RNA - ペプチド (C) 配列の相補配列にハイブリダイズするとき、それらは、三つのペプチド鎖がトリアド結合構造またはポケットを形成する分子間リガンド結合超構造を生じる。このトリアド結合構造またはポケットは、特定の薬物または他の生物学的に活性な分子または構造に対する親和性結合部位となるポテンシャルを有する（図5参照）。本発明に関連する、1つの基本的なELIASコンビナトリアル選択プロセスは、捕捉 p - RNA - ペプチド (C) リガンド結合成分（ついで、薬物分子および p - RNA - ペプチド (A) および (B) のリガンド結合成分を含む溶液と接触させる）でもって選択的にアドレス指定したマイクロエレクトロニックアレイを使用することを含む。コンビナトリアル選択プロセスは、超

分子リガンド結合構造および超分子複合体を形成するために、適当な従来のおよび/またはエレクトロニックストリンジェンシー条件で遂行される。アレイ上の超分子複合体パターンを確認し、特定のリガンド結合成分(ペプチド)はその後に同定する。このプロセスは、「チップ上のELIAS」またはELOCプロセスと呼ばれる(図6参照)。

【0025】

このコンビナトリアル選択またはELOCプロセスは、受動的または能動的マイクロエレクトロニックアレイを使用して遂行することができる。ELOCプロセスのために能動的マイクロエレクトロニックアレイを使用することは、ある種の状況において顕著な利点を有する。DNAの塩基配列で選択的にアレイを指定し、迅速な複合的ハイブリダイゼーションを遂行し、そしてDNAハイブリダイゼーション選択作用を改善するためにエレクトロニックストリンジェンシーを提供する、能力を提供する能動的マイクロエレクトロニックチップ/アレイ技術は例示されてきた。これらの同一の基本的マイクロエレクトロニックアレイは、本発明の対象であるコンビナトリアル選択プロセスのために使用することができる。マイクロエレクトロニックDNAチップおよびアレイ、特に高密度デバイス(10,000の活性部位)を作るための基本的なデザインおよび手順は、本発明のコンビナトリアルおよびELOCのプロセスに適用可能である。該アレイのエレクトロニックアドレス指定、能動エレクトロニックハイブリダイゼーションおよびエレクトロニックストリンジェンシーを遂行するための種々のエレクトロニクスの方法、手順、そしてフォーマットはすべて、本発明のコンビナトリアルおよびELOCのプロセスを開発することのための基礎として役立つ。

【0026】

本発明の1つの重要な態様は、コンビナトリアル選択プロセスを遂行するための速度およびより高次の選択性を提供するマイクロエレクトロニックアレイベースのELOCフォーマットを含む。本発明に関連するいくつかのELOCフォーマットの1つは、一過性動的平衡プロセス(フォーマット1)を含む。このフォーマットにおいて、マイクロエレクトロニックアレイの一般的ストリンジェンシー条件は、2つのp-RNA(A)および(B)配列の相補的捕捉p-RNA

(C)配列とのハイブリダイゼーションに対する T_m (熱融解温度の中央値)で、またはその近い点で設定される。このELOCフォーマットにおいて、アレイ上の「トリアド」の生成は、動的平衡状態にあり、特定の薬物または標的分子のp-RNA-ペプチド(A)、(B)および(C)セットからのペプチド配列のどれかの組合せとの最初の結合は、その特別の「トリアド」超分子複合体を安定化するであろう。リガンド結合事象は、アレイ上で選択された捕捉p-RNA-ペプチド(C)部位にハイブリダイズされたp-RNA-ペプチド(A)および/または(B)成分の熱融解温度(T_m)を上昇させる。こうして、ペプチド(C)とのある程度の安定性をもつこれらの薬物/p-RNA-ペプチド(A)および/または(B)複合体だけは、アレイ上での捕捉p-RNA-ペプチド(C)部位にハイブリダイズすることができる。他のELOCフォーマットは、溶液相において特定の薬物分子が最初に特異的p-RNA-ペプチド(A)および(B)構造と複合し、ついでアレイ(ELOCフォーマット2)に結合することを可能にするようにデザインされる均一のコम्ビナトリアル選択工程を含み、そして、不均一のコम्ビナトリアル選択プロセスは、マイクロアレイ上に非常に大きい数のトリアドリガンド結合超構造を最初に形成するように設計され、ついで薬物分子を結合するようにデザインされる(ELOCフォーマット3)。

【0027】

エレクトロニックストリンジェンシーは、異なる形で、異なるレベルでより高次の選択性を達成するために使用することができる。最初のレベルは、非特異的にまたは部分的に結合された構造を除去するために低電場ストリンジェンシーを含むことができる。第二のレベルは、p-RNA-ペプチド(A)と(B)のセットを含むさらに特異的なおよび/または安定な超分子の複合体を選択するために、電場強度のより正確な中間的レベルの適用を含むことができる。エレクトロニックストリンジェンシーの第3のレベルは、p-RNA-ペプチドのセット(A)および(B)の両方および捕捉p-RNA-ペプチドセット(C)、すなわち真の「トリアド」薬物/ペプチド複合体を含む最も安定な超分子複合体を選択するために、電場強度の最も正確なそして最も高いレベルの適用を含むことができる。その上、電場は薬物(薬剤)または標的分子のより良い結合環境およびよ

り安定な超分子複合体に導くことができる、より低いエネルギー立体配置を作る分子間超構造を効果的に乱すために用いることができる。

【0028】

コンビナトリアル選択プロセスが遂行された後、テスト部位の位置（そこに超分子複合体が生成する）が、薬物結合事象を担う p - RNA - ペプチド構造の全ての基本的なセットを同定する。このエレクトロニック E L O C プロセスは、多数の分子間リガンド結合構造のためのコンビナトリアル選択が非常に速くなされるのを可能にする。例として、100個の異なるペプチド配列をもつ100個のテスト部位のアレイは、 10^6 個の可能なトリアドリガンド結合構造を通して最も独自の組合せを選択する。1000個の異なるペプチド配列をもつ1,000個のテスト部位のアレイは、 10^9 個の可能なトリアドリガンド結合構造を通して最も独自の組合せを選択する。10,000個の異なるペプチド配列をもつ10,000のテスト部位のアレイは、 10^{12} 個の可能なトリアドリガンド結合構造を通して独自の組合せを選択する。一旦、超分子リガンド結合複合体パターンが決定され、独自の p - RNA - ペプチド分子間リガンド結合構造が既知の医薬品または生物学的に活性な化合物に対して確認されると、マイクロエレクトロニックアレイは新薬または未知化合物をスクリーニングするための分子ディスプレイとして使用することができる。

【0029】

【発明の実施の形態】

1つの態様において、本発明は、アドレス可能な能動的マイクロエレクトロニックアレイデバイスのデザインおよび製作、ならびに、顕微鏡的フォーマットでの多工程および多重的親和性結合反応を遂行する、これらのデバイスのプロセス、手順、技術、フォーマット、方法および用途に関する。第1の態様においては、本発明は、多数の潜在的分子間結合成分および超分子の複合体を含むコンビナトリアル選択および分子認識プロセスを速く遂行するための、これらのマイクロエレクトロニックアレイデバイスの使用に関する。第2の態様においては、本発明は、分子間および超分子リガンド結合構造の高次の選択性および超分子複合体の生成を効果的にするために、マイクロエレクトロニックアレイおよびエレクトロニックアレイ

トロニックストリンジェンシーパラメータを使用することに関する。第3の態様において、本発明は、超分子構造を乱してその最も低いエネルギー立体配置に効果的にもたらし、超分子構造を力学的に曲げ、および選択的かつ安定なリガンド結合複合体の生成を一般的に高めるように、マイクロエレクトロニックアレイおよびエレクトロニックストリンジェンシーパラメータを使用することに関する。

【0030】

本発明のコンビナトリアルアレイデバイスはいろいろな用途のために使用することができる。そのいくつかは、下記のものを含む：

- (1) 新薬の発見およびスクリーニングプロセス、
- (2) 既知の薬物の有効性および毒性の構造との相関、
- (3) ホルモンに関する構造 / 機能関連性の解明、
- (4) 神経伝達物質に関する構造 / 機能関連性の解明、
- (5) ハプテン / 抗原・抗体・エピトープ結合部位特性の解明、
- (6) 細胞表面レセプターに結合するリガンド結合部分に関する構造 / 機能関連性の解明、
- (7) 酵素基質に対する構造 / 機能関連性の解明、
- (8) 高親和性 / 高特異性の合成抗体の創成、
- (9) 新しい親和性試薬の創成、
- (10) 新しい合成酵素および触媒の創成、
- (11) 新しいキレート試薬の創成、
- (12) それに続く、新しい合成抗体アレイの創成、
- (13) それに続く、新しい親和性試薬アレイの創成、
- (14) それに続く、新しい合成酵素および触媒アレイの創成、
- (15) それに続く、新しいキレートアレイの創成。

【0031】

本発明のデバイス、プロセス、手順、技術、フォーマットおよび方法は、いろいろな他の生物学的および合成的親和性およびリガンドレセプターを含む、コンビナトリアルプロセスおよび分子認識プロセスのために使用することができる。その上、これらのアレイの他のバージョンは、複合的プロテオミク解析およ

びイムノアッセイ用途に使用することができる。

【0032】

(特定のリガンド分子および構造)

1つの態様において、本発明は、超分子複合体の選択のためのコンビナトリアルプロセスを、改善された速度およびより高次の特異性をもって遂行するために能動的マイクロエレクトロニックアレイデバイスを使用することに関する。超分子複合体は、種々の特異的リガンド分子および構造の、分子間/超分子のリガンド結合構造への親和性結合によって形成される。本発明の目的では、特異的リガンド分子または構造は、もう一つの分子、合成的リガンド結合構造または生物学的リセプターに対する特異的親和性を有する目標とされた分子または構造として定義される。通常、与えられた特異的リガンド分子または構造は、生物学的に活性な分子(薬物、代謝物、ホルモン、ペプチド)または構造(タンパク質、抗体)であり、特異的な形態を持ち、特異的な、生物学的または生理学的なリセプター分子、部位または構造にぴったり入る、そこでは、一つ以上の非共有結合相互作用が該複合体を安定させる。レセプター部位には、これらに限定されないが、下記のもが含まれる:キレート、ペプチド、タンパク質、抗体、酵素、核酸/タンパク質複合体、膜および細胞。与えられた特異的リガンド分子または構造の、その特異的なレセプター部位への特異的または選択的適合は、時々「ロックとキー」適合と称される。レセプター部位に特異的リガンド分子を結合する非共有結合相互作用は、下記を含むことができる:水素結合、疎水性結合、芳香環スタッキング、静電的相互作用、(金属イオンリガンドとの)キレート化およびファンデルワールス相互作用。リガンド結合を決定する物理的/化学的パラメータに加えて、リガンドおよびレセプター部位は、また、立体選択的性質を有することができる。キラリティーが一つの原子での光学的非対称に基づく鏡像異性体のリガンドまたは分子に関しては、非対称的なレセプター部位または結合表面がない場合、物理的/化学的性質には相違はない。しかし、複数の不斉中心によるジアステレオマーリガンドは、異なる物理的/化学的性質を有することができる。小分子の鏡像異性的リガンドは、レセプター部位との結合に大きい相違(数桁の大きさ)を有することがあるということはよく知られている。これらのリガンドタ

イブは、「立体選択的であるだけでなく立体特異的である」と考えるべきである。(W. B. プラットおよびP.テイラー編「薬物作用の原理 - 薬理学の基本」第三版(1990年、チャーチルリヴィングストン)1~74頁のP.テイラーおよびP. A. インセルを参照)。

【0033】

特異的標的レセプター部位をもつ薬物分子に加えて、若干の他の重要な古典的リガンド/レセプター相互作用は下記のものを含む：酵素をもつ基質、抗体をもつハプテン/抗原、生物学的レセプターをもつトキシンおよび発癌性物質、アビジンまたはストレプトアビジンをもつビオチン、それらのレセプター部位をもつホルモン、ならびに神経細胞レセプターをもつ神経伝達物質。場合によっては、同一の分子または構造が、リガンドおよび受容体の両方として働くことができる、たとえば、抗体分子は、特定のハプテン分子に対するレセプターとして、また、もう一つの抗体に対するリガンドとして働くことことができる。本発明に関連する特異的リガンドの標的分子および標的構造のいくつかには、これらに限定されないが、下記のものが含まれる：

(1) 小リガンド分子 - 医薬品、治療薬、アゴニスト、拮抗剤、インヒビター、代謝物、アミノ酸、ペプチド、ホルモン、ACTH、アンジオテンシン、ブラジキニン、サイトカイン、エンドモルフィン、エンドルフィン、エンケファリン、エクソルフィン、リンホカイン、神経伝達物質、ビタミン類、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、合成的アンセンスオリゴヌクレオチド剤、レクチン、ハプテン、蔗糖、脂質、脂肪酸、生物学的コファクター(NADPH、FAD、チアミンピロリン酸など)、金属イオン、金属キレート、色素、ポルフィリン、トキシン、発癌性物質、突然変異原、および生物学的活性または結合特性をもつ他の天然または合成の小分子。

(2) 大リガンド分子 - タンパク質、ホルモン、インターロイキン、腫瘍壊死因子、酵素、抗体、関連する抗体エピトープ部位、DNA、RNA、合成ポリヌクレオチド、合成ポリペチド、トキシン、天然および合成のポリサッカライド、アプタマー、ならびに、生物活性または結合性質を有する他の天然および合成の大分子。

(3) より大きいリガンド/レセプター構造 - 細胞、バクテリア、ウイルス、細胞表面の膜、細胞表面タンパク質、細胞表面のレセプターおよびエフェクター部位、オルガネラ、ミトコンドリア、リボソーム、合成ミセルならびに生物活性または結合性質を有する他の天然および合成の表面。

【0034】

ある程度まで要点を繰り返すと、本発明のコンビナトリアル選択プロセスは、特定のリガンド標的分子の、1つ以上の「分子間リガンド結合構造」への結合によって形成される超分子複合体の選択を遂行するために、マイクロエレクトロニックアレイを使用することを含む。本発明の目的では、分子間リガンド結合構造は、プログラム可能な対合性質をもつ一成分およびリガンド結合性質をもつ第2の成分を有する分子構造として定義される。これらの構造は、それらがそのプログラム可能な対合特性を介して、適当な条件で自己集合してより大きい分子間構造「超分子構造」になることができるように設計される。さらに、該構造は、適切な特定のリガンド標的分子または構造の存在下で、2つ以上のリガンド結合成分によるリガンド分子の結合がより大きい超分子構造の形成および安定化にも導くように、設計される。リガンド結合成分による特定のリガンド分子の結合は、対合成分を通して自己集合した超分子の構造の分子間安定化を効果的に引き起こす。完全な特異的リガンド分子/分子間リガンドを結合する構造の生成は、「超分子複合体」と呼ばれる。

【0035】

(プログラム可能な対合構造)

本発明にとって特に重要な、プログラム可能な対合構造または成分のタイプ(自己集合性分子間リガンドを結合する構造を形成するのに使用することができる)は、ピラノシル-RNAまたはp-RNAである。p-RNAは、糖基がペントピラノースである核酸様分子である。図1は、基本的なp-RNA構造を示す。DNAに類似しているp-RNAの重要な特性のいくつかには、下記のものが含まれる: 古典的なワトソン-クリックタイプの塩基の対合、鏡像体選択的塩基の対合および2本鎖構造に対する反平行のストランドの向き。

【0036】

DNAとは異なる、いくつかの重要なp-RNA特性には下記のものが含まれる：DNAまたはRNAより高いデュプレックス安定性および選択性、p-RNAはDNAまたはRNAと塩基対を作らない、そして、p-RNAデュプレックスは、準ラダー構造を形成するが、古典的なラセンを形成しない。

【0037】

p-RNAはDNA/RNAに類似の若干の特性を有するが、それがDNAにハイブリダイズしないという事実は、それが他の核酸変異株または誘導体とはユニークに異なること、すなわちp-RNAは独自の対合システムを表すことを意味する。その上、通常のアデオキシリボース(あるいはリボース)をペントピラノース糖で置換すると、ハイブリダイズされた2本鎖のp-RNA構造の、平面の、またはラダー様の形態が生成する。2本鎖のp-RNA構造体の平面形態は、リガンド分子が結合されると、安定な自己集合性分子間構造、超構造および超分子の複合体を生成する独自の属性を提供する。p-RNAの合成および精製に対する基本的な手順は、実施例において提示される(例1参照)。また、「ペントピラノシルヌクレオシド、および同一物の生産および使用」と題するWO第99/15539号(1997年9月22日出願)、「ペントピラノシルヌクレオシドを生産する方法」と題するWO第99/15540号(1997年9月22日出願)、「電子部品を生産するためのペントピラノシルヌクレオシド、および前記ペントピラノシルヌクレオシドの接合体」と題するWO第99/15541号(1997年9月22日出願)を参照して欲しい。これらは、本明細書に完全に記載されているかのように、参照によってここに取り入れる。p-RNA分子は、DNAおよびRNAの修飾のために開発されたのと同じ成分の多くをもって、および、同じ手順の多くによって、誘導体化することができる。こうして、p-RNAは、ビオチン部分、芳香族および脂肪族アミン基、芳香族および脂肪族チオール基、芳香族および脂肪族アルデヒド基で誘導体化する(機能化する、または改質する)ことができる。p-RNAは、また、末端の位置で、あるいは、配列内でどこにでも、トリプタミンリボピラノシル(Tr)ホスホルアミダイトの取込みによって機能化することができる。たとえば、「リンカーヌクレオシド、および同一物の生産と使用」と題するWO第99/15542号(1997年9

月22日出願)を参照。これは、本明細書に完全に記載されているかのように、参照によってここに取り入れる。p-RNAへのトリプタミンリボピラノシル(I)ホスホルアミダイトの取込みの手順は、実施例において提示する(例1参照)。続いて、機能化されたp-RNAは、さらに、蛍光団(例2参照)、発色団、ビオチン、キレート、アミノ酸およびペプチド、タンパク質、ストレプトアビジン、核酸(DNA/RNA)、ナノ粒子ならびに種々の他の分子および構造で、誘導体化されるかまたは、それらと結合することができる。アミン、チオール、アルデヒドおよび/またはトリプタミン(I)ヌクレオシド(例3参照)で機能化されたp-RNAは、また、その後固体担体および表面に付着することができる。これらには、限定されないが、下記のものが含まれる:ガラス、シリコン、プラスチック、ナイロン、ニトロセルロース、セラミック、金属、金属酸化物、アガロース、ポリアクリルアミドおよび他の多糖。p-RNAは、その2'または4'末端の位置で、あるいは、配列内のどんな位置でも機能化することができる(例2参照)。p-RNAの誘導体化は、塩基部分、糖またはリン酸基の修飾を介して遂行することができる。

【0038】

p-RNAは好ましいプログラム可能な対合構造であるが、自己集合性分子間リガンド結合構造をつくるのに用いることができる他の潜在的に有用なプログラム可能な対合成分には、6員環を含むモノマーをもつホモログが含まれ、それは、シクロヘキシル核酸またはCNAと呼ばれる(CNA-ペプチド対合システムは、「シクロヘキシルおよびヘテロシクリルヌクレオシド誘導体、これらの誘導体を生産する方法、ならびにその誘導体およびそれらのオリゴマーまたはコンジュゲートの、対合および/または試験システムにおける使用」と題するWO第99/15509号(1997年9月22日出願)に開示されている)。CNAは、荷電していない骨格構造を有し、そのことは、それらが低いイオン強度条件で対合構造をつくるために利点を有することを意味する。

【0039】

しかし、自己集合性分子間リガンド結合構造をつくるのに用いることができるプログラム可能な対合成分には、これらに限定されないが、下記のものが含まれ

る：デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、合成ポリヌクレオチド、合成オリゴヌクレオチド、メチルホスホネート核酸アナログ、ホスホロチオネート核酸アナログ、ホスホロジチオネート核酸アナログ、ペプチド核酸（PNA）および他の修飾された核酸。これらの構造において、核酸部分は、古典的なハイブリダイゼーションを介して分子間対合システムを形成するのに働く。（p-RNAに対する対合システムがDNA/RNAおよび他の全ての核酸誘導体とは異なることを再度指摘することは重要である）。

【0040】

最後に、他の分子間対合システムは、ペプチド、タンパク質、改質多糖、レクチン、静電的（陽イオン/陰イオン）タイプポリマーおよび金属/キレート系、ならびにプログラム可能な自己集合性対合性質でデザインすることができる種々の合成構造。上記はすべて、これによって本発明に組み込まれる。

【0041】

（リガンド結合構造）

分子間リガンド結合構造の第二の重要な成分は、実際のリガンド結合構造それ自身である。本発明のリガンド結合構造は、適当な特定のリガンド標的分子または構造の存在下で、以下のうちの1つ以上を提供することができる構造と定義される。

- （1）特異的リガンド分子を収容するおよび/または適切に合致することができる二次元の配位構造または三次元構造（ポケット）、
- （2）適切な立体選択的および/または立体特異的適合性をもつリガンド分子を提供する、
- （3）1個以上の水素結合をもつリガンド分子を提供する、
- （4）1個以上の静電的相互作用をもつリガンド分子を提供する、
- （5）1個以上のキレート化相互作用をもつリガンド分子（金属）あるいは配位部位を提供する、
- （6）1個以上の疎水的相互作用をもつリガンド分子を提供する、
- （7）1個以上の塩基スタッキング相互作用をもつリガンド分子を提供する、および/または

(8) 1個以上のファンデルワールス相互作用をもつリガンド分子を提供する。

【0042】

本発明のリガンド結合構造の第一クラスには、これらに限定はされないが、下記のもが含まれる：アミノ酸、ペプチド、環状ペプチド、抗体、タンパク質、アビジン、ストレプトアビジン、レクチン、含水炭素、多糖、キレート、金属キレート、メンブレン、ミセル、蛍光団、発色団、クラウンエーテル、シクロデキストリン、細胞および上記のどれかの2個以上の複合体。

【0043】

構造の第二クラスにおいては、p-RNAおよび/または核酸成分が、対合およびリガンド結合の両方のために使用される。リガンド結合構造は、グループ1とグループ2の両方からの成分から成ることができる。

【0044】

プログラム可能な対合成分およびリガンド結合成分は、ほとんど無制限の数の立体配置で結合することができる。通常、プログラム可能な対合成分およびリガンド結合成分は、共有結合的に結合する。たとえば、ペプチドリガンド結合成分は、p-RNA対合成分に共有結合的に結合して、分子間リガンド結合構造を形成することができる。

【0045】

本発明の分子間リガンド結合構造は、これらに限定されないが、以下を含む：

(1) p-RNAをベースとした分子間結合構造

(p-RNA分子誘導体/構造/組成物)

p-RNA分子誘導体、構造および/または組成物の例は下記を含む：

- ・ p-RNAアミノ酸、L、D、自然型、非自然型、
- ・ p-RNA - ペプチド、
- ・ p-RNA - DNA - ペプチド (リガンド結合をもつ二重の認識/対合)、
- ・ p-RNA - 抗体 (タンパク質、酵素)、
- ・ p-RNA - ハプテン誘導体、
- ・ p-RNA - 薬物誘導体、
- ・ p-RNA - 神経伝達物質誘導体、

- ・ p-RNA - ホルモン誘導体、
- ・ p-RNA - トキシン誘導体、
- ・ p-RNA - 放射性物質誘導体、
- ・ p-RNA - レクチン（炭水化物、二糖、多糖類誘導体）、
- ・ p-RNA - DNA（RNA、PNA、メチルホスホン酸エステル）、
- ・ p-RNA-DNA（RNA、PNA、メチルホスホン酸エステル）- ペプチド、
- ・ p-RNA - 蛍光団、
- ・ p-RNA - ドナー/アクセプター蛍光団（光子によるエネルギー転移のための配置）、
- ・ p-RNA-蛍光団ペプチド、
- ・ p-RNA - 発色団、
- ・ p-RNA-発色団ペプチド、
- ・ p-RNA - 発色団/蛍光団（光子によるエネルギー転移のための配置）、
- ・ p-RNA - 電子供与体/受容体部分、
- ・ p-RNA - 金属キレーター、
- ・ p-RNA - 金属キレーター - ペプチド、
- ・ p-RNA - 複数の金属キレーター配置、および
- ・ p-RNA-金属キレーター - 発色団/蛍光団（光子ないし電子の伝達系のための配置）。

【0046】

（p-RNAナノスケール、メソスケールおよび固体担体構造）

p-RNAナノスケール、メソスケールおよび/または固体担体構造の例に含まれるもの：

- ・ p-RNAナノ粒子/ナノ構造体/ナノデバイス（金属ナノ粒子、金ナノ粒子、金属酸化物ナノ粒子、量子ドット、炭素ナノチューブ、多糖類ナノビーズ、そして、有機ポリマーナノビーズ）、
- ・ p-RNA - メソスケール構造/デバイス（金属粒子/構造/デバイス、金属酸化物粒子/構造/デバイス、ケイ素粒子/構造/デバイス、半導体粒子/構造/デバイス、ヒ化ガリウム粒子/構造/デバイス、リフトオフ（lift-off

f) マイクロエレクトロニックデバイス、リフトオフ光子デバイス、リフトオフ機械的デバイス、およびマイクロセンサーデバイス)、

・ p-RNA 巨視的表面 / 支持体材料 (ガラス、石英、雲母、金属、金属酸化物、ケイ素、二酸化ケイ素、GaAs、プラスチック、有機ポリマー、天然高分子、細胞表面、アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル、ヒドロゲル、シリカゲル、ナイロン、ニトロセルロースおよびセラミック)、

【0047】

(p-RNA - ペプチドナノスケール、メソスケールおよび固体担体構造)

p-RNA およびペプチドナノスケール、メソスケールおよび固体担体構造の例に含まれるもの :

・ p-RNA-ペプチドナノ粒子 / ナノ構造体 / ナノデバイス (金属ナノ粒子、金ナノ粒子、金属酸化物ナノ粒子、量子ドット、炭素ナノチューブ、多糖類ナノビーズおよび有機ポリマーナノビーズ)、

・ p-RNA-ペプチド - メソスケール構造 / デバイス (金属粒子 / 構造 / デバイス (金属酸化物粒子 / 構造 / デバイス ; ケイ素粒子 / 構造 / デバイス) 半導体粒子 / 構造 / デバイス、ヒ化ガリウム粒子 / 構造 / デバイス、リフトオフマイクロエレクトロニックデバイス、リフトオフ光子デバイス、リフトオフ機械的デバイス、およびマイクロセンサーデバイス)、および

・ p-RNA - ペプチド - 蛍光団 - 巨視的表面 / 支持体材料 (ガラス、石英、雲母、金属、金属酸化物、ケイ素、二酸化ケイ素、GaAs、プラスチック、有機ポリマー、天然高分子、細胞表面、アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル、ヒドロゲル、シリカゲル、ナイロン、ニトロセルロースおよびセラミック)。

【0048】

(p-RNA - ペプチド - 蛍光団 - ナノスケール、メソスケールおよび固体担体構造)

p-RNA およびペプチド-蛍光団ナノスケール、メソスケールおよび固体担体構造の例には :

・ p-RNA ペプチド-蛍光団ナノ粒子 / ナノ構造体 / ナノデバイス (金属ナノ粒子、金ナノ粒子、金属酸化物ナノ粒子、素量点、炭素ナノチューブ、多糖類ナノ

ビーズおよび有機ポリマーナノビーズ)、

・ p-RNAペプチド-蛍光団 - メソスケール構造 / デバイス (金属粒子 / 構造 / デバイス (金属酸化物粒子 / 構造 / デバイス ; ケイ素粒子 / 構造 / デバイス、半導体粒子 / 構造 / デバイス、ヒ化ガリウム粒子 / 構造 / デバイス、リフトオフマイクロエレクトロニックデバイス、リフトオフ光子デバイス、リフトオフ機械的デバイス、およびマイクロセンサーデバイス) ならびに

・ p-RNA - ペプチド - 蛍光団 - 巨視的表面 / 保持体 (ガラス、石英、雲母、金属、金属酸化物、ケイ素、二酸化ケイ素、GaAs、プラスチック、有機ポリマー、天然高分子、細胞表面、アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル、ヒドロゲル、シリカゲル、ナイロン、ニトロセルロース、およびセラミック)、
が含まれる。

【0049】

(2) CNAをベースとした分子間リガンド結合構造

CNAをベースとした分子間リガンド結合構造の例に含まれるもの :

- ・ CNA - アミノ酸、
- ・ CNA - ペプチド、
- ・ CNA - DNA (RNA、PNA、メチルホスホン酸エステル)、
- ・ CNA - DNA - ペプチド (リガンド結合による二重認識 / 対合)、
- ・ CNA - 蛍光団、
- ・ CNA - 蛍光団 - ペプチド、CNA - 抗体 (タンパク質、酵素)、
- ・ CNA - レクチン (炭水化物、二糖類、多糖類)、
- ・ CNA - 発色団、金属リガンド、ナノ粒子、ナノビーズ、およびメソスケール誘導体、
- ・ CNA - 巨視的表面 (ガラス、ケイ素、二酸化ケイ素、GaAs、プラスチック、セラミック、金属) ならびに
- ・ CNAを含有する、しかしこれらに限定されない、p-RNAに関して上に挙げた全ての誘導体。

【0050】

(p-RNA - ペプチド分子間リガンド結合構造)

p - RNA - ペプチド構造は、本発明にとって大きな重要性をもつ分子間リガンド結合構造のクラスを表す。これらの構造においては、p - RNA 部分は、プログラム可能な自己集合性分子間対合システム（塩基配列およびハイブリダイゼーションを介して）を提供し、ペプチド部分は実際のリガンド結合構造を形成するのに役立つ。p - RNA を使用することの特別の長所は、対合（ハイブリダイゼーション）で、2本鎖 p - RNA が平らなまたはラダー様の構造になることである。この構造は、通常の前脱キシリボース（またはリボース）をペントピラノース糖部分で置換した結果である。図2は、基本的な2本鎖 p - RNA の平坦/ラダー構造。対合した2本鎖の p - RNA の平坦な型またはラダー型は、より予測可能な超分子のリガンド結合構造および複合体を提供する。p - RNA は、さらに、DNA または RNA よりも安定で選択的な二重構造を提供するという長所を有する。p - RNA は DNA よりはるかに安定であるという事実は、顕著に短くなった配列を、2本鎖の平坦構造を形成するのに使用することができることを意味する。p - RNA は、また、DNA と対合またはハイブリッドしない。このことは、試料中の外来性 DNA が p - RNA の対合/ハイブリダイゼーションを妨害しないことを意味する。

【0051】

もう一つの利点は、2つのプログラム可能な対合成分（たとえば p - RNA - DNA または p - RNA - RNA ）をもつ別々の対合システムまたは複合体システムを作成するために DNA を用いることができるということである。こうして、ほとんど他の核酸アナログ（PNA、メチルホスホン酸エステル）とは異なり、p - RNA は、DNA または RNA と同じ塩基性のプリンおよびピリミジン塩基の対合（チミジンとアデニン、およびシトシンとグアニン）を含むが、DNA または RNA に対する親和性をもたない、独自のプログラム可能な対合システムを表す。

【0052】

p - RNA 構造は、同様のやり方で、そして DNA または RNA に対して使用されるのと同じ手順の大部分によって、誘導体化し、機能化することができる。p - RNA 分子は、基本的に配列中のどの位置でもペプチド配列で誘導体化す

ることができる。ペプチド配列は、アミノ酸のどんな配置をも含むことができ、潜在的リガンド結合構造の大きなコンビナトリアルグループを形成する。特に有用な一形態の p - RNA - ペプチドなる分子間リガンド結合構造は、自己集合して「トリアド」タイプリガンド結合超構造になることができる。第3のより長い p - RNA 配列 (p - RNA 配列 (C)) にとって相補的である2個の短い p - RNA 配列 (p - RNA 配列 (A) と p - RNA 配列 (B)) を設計することが、これらのトリアドリガンド結合超構造を生み出す。より長い p - RNA 配列 (C) は、2個のより短い配列 (A と B) を配置するための鋳型として機能する。2個のより短い p - RNA 配列 (A および B) は、相補的「鋳型」 p - RNA 配列 (C) にハイブリダイズするとき、隣接するか、ほとんど隣接するように設計する。図3は、3個の相補的 p - RNA 配列 (A、B および C) ならびに対合するかまたはハイブリダイズした二重鎖の平坦/ラダー構造、に対する一般的なデザインを示す。第3の「鋳型」 p - RNA 配列 (C) はさらに機能化することができ、それは、ビーズ、粒子または保持体 (ガラス、ケイ素、二酸化ケイ素、窒化ケイ素、金属、金属酸化物、可塑物、ナイロン、アガロース、ポリアクリルアミド、ヒドロゲル、シリカゲル、ゾル - ゲルなど) の上で固定することができる。

【 0 0 5 3 】

本発明のコンビナトリアル選択プロセスに関しては、適切な機能付与によって、鋳型 p - RNA 配列 (C) が共有結合的か非共有結合的にマイクロエレクトロニックアレイ上の特定のテスト部位に付着することが可能になる。例として、該 p - RNA は、ビオチン部分で機能化することができ、それにより、テスト部位の浸透層に取り入れられたストレプトアビジンを介してマイクロエレクトロニックアレイテスト部位に付着させることが可能になる。また、アミン、チオール、アルデヒド、カルボキシル基、ヒドラジン、アジド基でもって、およびフェニルホウ酸で機能化された p - RNA 配列を共有結合的に付着するかまたは固定することが可能である。通常、鋳型の p - RNA 配列 (C) は、固体担体への付着が目的であるときは、その 4 ' または 2 ' の末端位置のいずれかに機能化される。しかし、配列内のどの位置でも p - RNA を機能化することができ、それを

固体担体への付着のために使用することができる。

【0054】

分子間リガンド結合構造のリガンド結合成分を形成するペプチド配列は、通常 p - RNA 配列に共有結合的に結合する。しかし、非共有結合的付着は可能であり（ビオチン / アビジンなど）、時々応用可能性を有する。ペプチドの共有結合的結合は、ペプチド自体におけるアミノ酸のうち1個以上によって提供される機能的「R」基を使用すること、あるいは、ペプチド配列に更なる機能付与を組み込むこと、によって達成することができる。

【0055】

ペプチド配列自体の中のアミノ酸の1個以上が提供することができる官能基には、以下の基が含まれる：

【0056】

結合のためのアミノ酸の機能的「R」基に含まれるもの：

- ・システイン（チオール）、
- ・リジン（アミノ）、
- ・セリン（ヒドロキシル）、
- ・チロシン（ヒドロキシル）、
- ・グルタメート（カルボキシル）、
- ・アスパルテート（カルボキシル）、
- ・あらゆるN末端（アミノ）、
- ・あらゆるC末端（カルボキシル）。

【0057】

通常、p - RNA への結合に対するアミノ酸の機能的（R）基の使用は、結合のために使用されるアミノ酸由来の「R」基が実際のリガンド結合プロセスにおいては、小さい役割を演ずることを意味する。また、リガンド結合およびコンビナトリアル選択のために利用できる期待されるアミノ酸「R」基が p - RNA への結合の後も活性をもったままであるように、ペプチド合成、デブロッキング手順および最終の p - RNA / ペプチド結合手順を含む全合成的経路に対して考慮を与えなければならない。

【0058】

p - RNA分子へのペプチド配列の結合は、通常、p - RNA配列またはペプチド配列のいずれかの中のどんな位置でも遂行することができる。これに含まれるもの：

【0059】

(p - RNAおよびペプチド結合位置)

- ・ p - RNA上の、機能化された3'または5'末端の位置、
- ・機能化された、内部のp - RNA配列位置(塩基、糖、リン酸エステル)、
- ・機能化された介在するヌクレオチド(トリプタミン、DNA、RNAなど)、
- ・機能化されたスペーサー部分(ホスホルアミドヌクレオシドスペーサー)、
- ・ペプチドのN末端(アミン)、
- ・ペプチドのC末端(カルボキシル)、
- ・ペプチドのR基末端、
- ・ペプチドの内部R基、および、
- ・ペプチドに付加されたスペーサー/官能基。

【0060】

p - RNAに組み込むことができる結合反応のための官能基に含まれるもの：トリプタミンヌクレオチド、アミン、チオール、アルデヒド、ヒドロキシル(リボース)、カルボキシル、ホスフェート、マレイミドおよび多くの他のもの。システインチオール基を介してペプチドを結合するためスペーサーに関連する特別の方法は、末端の位置にシステインをもつペプチド配列を使用することを含み、それは、p - RNA配列内の1個以上のトリプタミンヌクレオチドと反応する。p - RNA配列を含むトリプタミン(I)にシステインペプチドを結合する手順は、実施例において示される(例3参照)。その上、場合によっては、基本的なコンビナトリアルペプチド構造がp - RNA構造から更なる距離まで伸びているようなペプチドを有することが望ましいかもしれない。より大きいリガンド分子および構造(抗体、細胞表面など)を結合するために超分子トリアド構造をつくる必要があるときに、これは重要である。こうして、いわゆるスペーサー基の使用も本発明に組み込まれる。これらのスペーサー基の例には、これらに限定

されないが、以下のものが含まれる：短い連鎖のアミノ酸（-gly-gly-gly-）、脂肪族鎖（-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂）、ポリグリコー
ルおよび多糖類構造。スペーサー基は、p-RNAおよびペプチドの間に尾根、
すなわち可撓性のある介入する構造を与えるように設計することができる。

【0061】

本発明に関連する分子間リガンド結合構造の他の一般的なクラスは、対合システム成分として核酸を、そしてリガンド結合成分としてペプチドを利用することができる。これらの構造は、Dスペーサーペプチド、RNAペプチドまたは、ペプチドを付けた種々の核酸アナログを含むことができる。対合システムを作るのにDNAを用いるとき、形成される2本鎖構造はらせん状である。ペプチド成分が対合DNA鎖の1個以上の構成メンバーの上にあるとき、DNAのらせんの性質が比較的複雑な構造体を生み出す。このことが、ペプチドリガンド結合構造のために最良の位置を決定することをややより困難にする。

【0062】

（ペプチドライブラリー、ELIAS、ELOCおよびトリプレックス超構造）

ペプチドライブラリー

本発明に関連する、種々のコンビナトリアル結合のアッセイ、フォーマットおよび手順は、最初に、捕捉p-RNA-ペプチド分子間リガンド結合構造の第一グループ（各々、異なるペプチド配列をもつ）が選択的にアドレス指定され、アレイ上の特定のテスト部位に固定されるマイクロエレクトロニックアレイを作成することを含む。マイクロエレクトロニックアレイにp-RNA-ペプチドをアドレス指定することは、電子的にアドレス指定すること（本発明の実施例において記載されているように）によって、または、他の機械的沈積（インクジェット、微量滴下、マイクロキャピラリー使用など）によって遂行することができる。p-RNA-ペプチド構造のアドレス指定を行ったグループにおいて、捕捉p-RNA（C）成分は、他の2個のp-RNA配列（AとB）に対して相補的である普通のまたは一般的な配列を有する。p-RNA配列AおよびBは互いに相補的ではないが、捕捉p-RNA（C）配列のそれら自体の相補的部分とだけ対合／

ハイブリダイズする。捕捉 p - RNA (C) 配列は全てのテスト部位に対して同一であるが、アレイ上の各テスト部位は既知のペプチドライブラリーとは異なるペプチド配列を含む。用語「各」の使用は、反復的または冗長なテスト部位がアレイの中に含まれている状況を除外することを意図してはいない。

【0063】

ペプチドライブラリーは、配列の範囲内のあらゆる数のアミノ酸の置換を含むペプチドのどんな与えられた数でも創ることができる。本発明のコンビナトリアル態様に関連する、1つの特に有用なペプチドライブラリーは、10,000個の六量体ペプチド(6個のアミノ酸を含む)の一群を含む。この六量体ペプチドのグループにおいて、C末端アミノ酸は通常グリシンであり、これは、通常、合成法における出発アミノ酸樹脂として使用され、そして、N末端アミノ酸は通常システインであって、これはp-RNA分子内のトリプタミンにカップリングするために使用されるチオール基を提供する。

【0064】

他のアミノ酸を含むことができるが、六量体ペプチドの4個の内部アミノ酸は、望ましくは、下記の10個のアミノ酸の群から選択される：

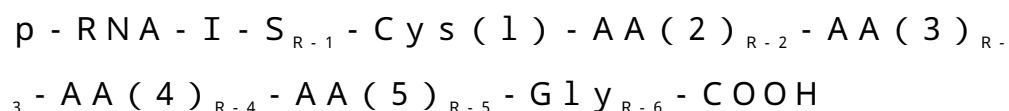
【0065】

(ペプチドライブラリー中のアミノ酸)

- ・アルギニン(グアニジニウムR基：正電荷、静電的相互作用)
- ・N(アミドR基：親水性および水素結合形成相互作用)
- ・グルタミン酸(脂肪族カルボキシルR基：陰電荷静電的相互作用)
- ・ヒスチジン(イミダゾールR基：pHに敏感な正電荷および金属配位)
- ・ロイシン(脂肪族鎖R基：疎水的相互作用)
- ・フェニルアラニン(芳香環R基：疎水性環スタッキング相互作用)
- ・プロリン(閉環アミノ酸：立体化学、ペプチド鎖においてバンドを生じる)
- ・セリン(脂肪族ヒドロキシルR基：親水性および水素結合形成)
- ・トリプトファン(芳香環R基：疎水性および環スタッキング相互作用)
- ・チロシン(フェノール環R基：疎水性環スタッキングおよび水素結合)

【0066】

10,000個のペプチド六量体ライブラリーは、上でリストされる10個のアミノ酸の全ての可能な置換を含む。10個の選ばれたアミノ酸は、リガンド結合構造を形成するために利用できるし、水素結合、疎水的相互作用、環スタッキング相互作用、静電的相互作用およびファンデルワールス相互作用によってリガンド複合体を安定させる重要な「R」グループの良好な表現を提供する。六量体ペプチドの一般的な構造を下の概略図に示す：



【0067】

六量体ペプチドライブラリーまたは他のペプチドライブラリーは、ペプチド合成の技術を行う人々によく知られている試薬および自動化した固相ペプチド合成手順を使用して創ることができる。

【0068】

上に記載した特定の10,000個のペプチド六量体ライブラリーは、コンビナトリアル選択プロセスおよび他の用途のために使用することができる多数のライブラリーの1つを表す。本発明によって予期される他のペプチドライブラリーには、これらに限定されないが、以下のものが含まれる：

- (1) より長いペプチド(たとえば7量体、8量体、9量体および100量体、ならびに種々のサブライブラリーの組合せ)によるライブラリー、
- (2) より短いペプチド(5量体、4量体、3量体、2量体および単一のアミノ酸、ならびに種々のサブライブラリーの組合せ)によるライブラリー、
- (3) アミノ酸の他の群によるライブラリーおよび組合せのサブライブラリーの組合わせ、ならびに
- (4) 21種のアミノ酸全部を含むライブラリー。

【0069】

また、他の部分によるペプチドの組合せならびに非ペプチドリガンド結合部分の組合せによるライブラリーが本発明によって構想される、その例には、これらに限定されないが、以下のものが含まれる：

- (1) ペプチドおよび金属キレート、

- (2) 選択的金属キレート、
- (3) ペプチドと蛍光団および/または発色団、
- (4) 蛍光団と発色団、
- (5) 発色団と電子供与体/受容体部分、
- (6) ペプチドと酵素、
- (7) ペプチドとコエンザイム、
- (8) ペプチドと抗体、
- (9) ペプチドとホルモン、
- (10) ペプチドと神経伝達物質、
- (11) ペプチドと医薬品、
- (12) ペプチドとレクチン、
- (13) ペプチドと多糖、
- (14) ペプチドと脂質、
- (15) ペプチドとDNA/RNA/オリゴヌクレオチド、その他、
- (16) ペプチドおよびp-RNA/CNA(ここにおいて、これらの部分はリガンド結合のために利用できる)。

【0070】

(ELIASおよびELOCの概念およびプロセス)

完成した、アドレス指定されたマイクロエレクトロニックアレイには、該アレイ上の既知のテスト部位のペプチドライブラリーからの既知のペプチド配列が存在する。各部位のペプチド配列は異なるが、捕捉p-RNA(C)配列は一般的であるか、または共通であり、p-RNA配列(AおよびB)両者に対し相補的である。通常、p-RNA配列AおよびBを、固定された捕捉p-RNA-ペプチドと同様に、(既知のペプチドライブラリーからの)ペプチド配列の同一セットとカップルさせていた。グループA、BおよびCのp-RNAペプチドは、いまや、元のペプチドライブラリーのサブライブラリーを表示する。p-RNA-ペプチドの3グループをハイブリダイゼーション条件で一緒に混合するとき、多数の分子間リガンド結合超構造が形成される(ライブラリー中すなわちアレイ上の数の3乗)。

【0071】

このプロセスは、「サブライブラリーの集合による指数関数的ライブラリー」の生成を表し、「ELIAS」と呼ばれる。基本的なELIASの概念を図4に示す。p-RNA-ペプチド(A)および(B)成分の2種の相補配列が捕捉p-RNA-ペプチド(C)配列の相補配列にハイブリダイズするとき、それらは、ペプチド鎖が「トリアド」結合構造またはポケットを形成する分子間リガンド結合構造を生成する。この「トリアド」結合構造またはポケットは、特定のリガンド分子または構造に対し潜在的親和性を有する(図5参照)。

【0072】

例として、p-RNA-ペプチド(C)の100個の異なるセットでアドレス指定され、ハイブリダイゼーション条件下でp-RNA-ペプチド(A)の100個の異なるセットおよびp-RNA-ペプチド(B)の100個の異なるセットと接触させた、100個のテスト部位アレイは、 10^6 個の可能な超分子またはトリアドリガンド結合構造を通して、独自の組合せを選択する。

【0073】

ハイブリダイゼーション条件下でp-RNA-ペプチド(A)の1000個の異なるセットおよびp-RNA-ペプチド(B)の1000個の異なるセットと接触させた、p-RNA-ペプチド(C)の1000個の異なるセットをもつ1000個のテスト部位アレイは、 10^9 個の可能な超分子またはトリアドリガンド結合構造を通して、独自の組合せを選択する。ハイブリダイゼーション条件下でp-RNA-ペプチド(A)の10,000個の異なるセットおよびp-RNA-ペプチド(B)の10,000個の異なるセットと接触させた、p-RNA-ペプチド(C)の10,000個の異なるセットをもつ10,000個のテスト部位アレイは、 10^{12} 個の可能な超分子またはトリアドリガンド結合構造を通して、独自の組合せを選択する。

【0074】

マイクロエレクトロニックアレイまたは他のアレイプラットフォームが「ELIAS」を遂行するのに用いられるとき、該プロセスは「チップ上のELIAS」または「ELOC」と呼ばれる。基本的なELOC概念を図6に示す。マイク

ロエレクトロニックアレイをベースとしたELOCプロセスおよび種々のエレクトロニックフォーマットは、ある種の具体例における本発明の重要な態様を表わす。

【0075】

特定のコンビナトリアルアッセイの目的および特異的標的分子または構造の性質に依存して、異なるフォーマットがリガンドおよび結合部位の間の構造 - 機能相関についての情報を提供することにおいて、より効果的であることができ、より有用な「分子ディスクリプター」デバイスに導く。基本的なELOCコンビナトリアル選択プロセスは、p-RNA対合/ハイブリダイゼーションプロセスに影響を及ぼし、ペプチドトリアド構造およびリガンド結合プロセスに、影響するおよび/または乱れを与える、異なる通常のパラメータおよびエレクトロニックストリンジェンシーパラメータの使用を含む、多数の異なるフォーマットにおいて遂行することができる。さらに、該フォーマットは、リガンドおよびp-RNA - ペプチド成分AおよびBがそのシステムに添加される時と方法に関して異なる状態を含むことができる。ELOCのプロセスとフォーマット、およびp-RNA - ペプチド構造それ自体は、下記のことを遂行するようにデザインされる：

- (1) 特定の分子および構造を受け入れ、選択的に結合するために最適のペプチド配置「トリアド」をもつ超分子構造を生成する。
- (2) 非特異的結合相互作用および/またはより少ない特異的ペプチド/リガンド超複合体がより特異的なおよび/またはより強い結合の超分子のペプチド/リガンド超分子複合体と認識するのを可能にする最適のストリンジェンシー条件を生成する。
- (3) 「超分子複合体」生成を速く見つけることおよび最適の分子間リガンド結合構造(p-RNA - ペプチド)を確認すること。
- (4) 新薬のスクリーニングと選択のために有用な「分子ディスクリプター」アレイを生成すること。

【0076】

(トリアド超構造)

本発明に関連する p - RNA ペプチド分子間構造の特別のグループは、 p - RNA 対合 / ハイブリダイゼーションを通して、「トリアド」ペプチドリガンド結合構造を生じる配置へ自己集合することができる構造である。「トリアド」ペプチドリガンド結合構造を形成する能力は、 p - RNA - ペプチド構造の適切なデザインによって達成される。1つの方法では、捕捉 p - RNA (C) 配列は、テスト部位のアガロース浸透層中のストレプトアビジンを介してマイクロエレクトロニックアレイテスト部位へのその後の固定化のために、4' - 末端の位置でビオチン部分により機能化される。こうして、固定された捕捉 p - RNA は「テスト部位表面 - ビオチン - 4' - p - RNA - 2' 末端」配向を有する。捕捉 p - RNA (C) 配列に対する長さは、最も広い範囲では、約 6 個のヌクレオチド (塩基) から 100 個以上のヌクレオチド (塩基) にまでわたることができる ; より理想的な長さは、約 7 個のヌクレオチドから 60 個のヌクレオチドまでである ; そして、最も理想的な長さは、約 8 個のヌクレオチドから 40 個のヌクレオチドまでである。通常、捕捉 p - RNA (C) 配列に対するペプチド配列は、 p - RNA (C) 配列の中央でまたはその近くで (3 個の塩基内で) カップリングされる。ほとんどの場合、該ペプチドは、 p - RNA 配列の範囲内の修飾されたトリプタミンヌクレオシド (I) を通して、カップリングされる (例 3 参照)。 p - RNA - ペプチド配列 (A) は、捕捉 p - RNA (C) 配列の 2' 末端でハイブリッドするように設計される。 p - RNA (A) 配列に対する長さは、最も長い場合は、約 3 個のヌクレオチド (塩基) から 100 個以上のヌクレオチド (塩基) までの範囲であることができる ; より理想的な長さは、約 4 個のヌクレオチドから 30 個のヌクレオチドまでである ; そして、最も理想的な長さは、約 5 個のヌクレオチドから 20 個のヌクレオチドまでである。通常、 p - RNA (A) 配列に対するペプチド配列は、 p - RNA (A) の 2' - 末端で、またはその近くで (3 個の塩基の中で) カップリングされる。ペプチドの p - RNA (A) とのカップリングは、 p - RNA (C) に関して上に記載した手順を使用して、 p - RNA (A) の 2' 末端でまたはその近くで、システインチオール (ペプチド) を介して改質トリプタミンヌクレオシド (I) とである。 p - RNA 配列 (B) は、固定された捕捉 p - RNA (C) 配列の 4' 末端とハイブリダイズするよ

うに設計される。p - RNA (B) に対する長さは、最も長い場合には、約 3 個のヌクレオチド (塩基) から 1 0 0 個以上のヌクレオチド (塩基) までの範囲にわたることができる ; より理想的な長さは、約 4 個のヌクレオチドから 3 0 個のヌクレオチドまでである ; そして、最も理想的な長さは、約 5 個のヌクレオチドから 2 0 個のヌクレオチドまでである。通常、p - RNA (B) 配列に対するペプチド配列は p - RNA (B) の 4 ' - 末端で、またはその近くで (3 個の塩基の範囲内で) カップリングされる。p - RNA (B) 配列へのペプチドのカップリングは、p - RNA (C) に関して上に記載した手順を使用して、p - RNA (B) の 4 ' 末端でまたはその近くでシステインチオール (ペプチド) を通して、修飾されたトリプタミン (I) とである。

【 0 0 7 7 】

アレイ表面の特異的テスト部位に形成された超分子の構造または超分子の複合体の生成を見つけ、確認するために、(A) または (B) p - RNA いずれか (または A および B 両方) の配列は、レポーター基で誘導体化される。使用される普通のリポーター基は、蛍光団である ; しかし、本発明には、発色団、ビオチン / アビジン検出システム、化学ルミネッセンス剤、金属キレート、ラジオアイソトープ、タンパク質、酵素検出システム、抗体およびナノ粒子も含まれる。例として、p - RNA - ペプチド (A) はシアニン - 3 蛍光団 (Ex 530 nm、Em 570 nm) で標識し、p - RNA - ペプチド (B) はテキサスレッド蛍光団 (Ex 590 nm、Em 620 nm) で標識することができた。例 2 を参照。この場合、アレイ表面上の分子間リガンド結合複合体の生成を検出する 2 色蛍光性解析を用いることができる。様々な蛍光標識 (フルオレセイン、ローダミン、ボジピテキサスレッド、ボジピファーレッド、シアニン - 5 など) を使用することができるので、蛍光解析はこれらの 2 種の蛍光団に限定されない。当業者に良く知られている、DNA ハイブリダイゼーションおよび免疫診断的解析のために使用されるフォーマットおよびシステムもまた、多くのコンビナトリアル用途のために使用することができる。これらの一般的な検出方法は、これによって本発明に組み入れる。

【 0 0 7 8 】

有用な十分に修飾された7量体p-RNA(A)配列、7量体p-RNA(B)配列および相補的14-量体p-RNAC)配列の1例を下に示す:

p-RNA(A) 4'-(蛍光団)-C-G-G-G-G-G-I-(ペプチド)-2'

p-RNA(B) 4'-(ペプチド)-I-G-A-A-G-G-G-X-2',

p-RNA(C) 4'-(ビオチン)-C-C-C-T-T-C-I-(ペプチド)-T-C-C-C-C-C-G-2'

【0079】

十分に修飾されたp-RNA-ペプチド(A)(B)および(C)配列の対合されるかまたはハイブリダイズされた形を図7に示す。

【0080】

3個のp-RNA配列すべてがハイブリダイズされる時、p-RNA(A)(B)および(C)配列の中に位置するペプチドの組合せ、および平坦/ラダー様構造を形成する内因的p-RNA性質が、中でペプチド鎖がリガンド結合構造のようなポケットを形成している「トリアド」分子間超構造を生成する。このポケットのような構造は、リガンド分子または構造を受け入れ、結合するための理想的な一般的立体配置を有している。基本的なペプチドトリアド構造は、一般的に3次元の小分子リガンド結合レセプターを表す。3個の六量体ペプチド鎖がp-RNA構造との結合の中心点から60°反れているペプチドトリアド構造については、各鎖はその中心点から約2.0ナノメートル(nm)の距離だけ伸びている(図8参照)。上に述べた六量体ペプチドライブラリーに関しては、第一のアミノ酸(システイン)およびそのチオールR-1基(-SH)は、p-RNAへの共有結合的付着に包含される。R-2基をもつ第二アミノ酸は、潜在的にリガンド交互作用のために利用でき、付着中心点からおよそ0.6ナノメートル(nm)にある。R-3基をもつ第3アミノ酸は、中心点からおよそ0.95nmにある。R-4基をもつ第4アミノ酸は、中心点からよそ1.3nmにある。R-5基をもつ第5アミノ酸は、中心点からおよそ1.7nmにある。第6のかつ最後のアミノ酸は、中心点からおよそ2.0nmにある。C末端の位置にグリシ

ンを使用している六量体ペプチドライブラリーの場合、R - 6基は、リガンド分子と顕著な相互作用をもつとは思われない水素原子である。しかし、グリシンの遊離C末端のカルボキシル(-COO⁻)は、潜在的にリガンド結合相互作用に包含されうる。例として、図9は、ビオチンリガンド分子を結合している全p-RNA - ペプチドトリアド超構造の分子模型を示す。ビオチン部分は、CPK空間充填モデル系を利用して作成した。

【0081】

(トリアドモデルを結合しているアセチルコリンリガンド)

アセチルコリン分子および関連した基質、アゴニスト、拮抗剤、インヒビター、および薬物の、アセチルコリンエステラーゼおよびニコチン性コリン受容体のアニオン性結合部位およびムスカリン様コリン受容体(M1、M2、M3)との結合は、ペプチドリガンド結合システムを開発するための良好なモデルを提供する。アセチルコリンは、コリン(2-ヒドロキシN、N、N-トリエチルエタナミニウム)のアセチルエステルである、比較的小さい分子(分子量146)である。アセチルコリン分子は、酵素活性部位において、およびレセプター部位において分子を結合し、配向させることにおいて役割を果たす、正の形式電荷を持っている(図10a参照)。したがって、アセチルコリン分子に対しかなりの親和性を有したペプチド「トリアド」構造の最初のグループが、プラスに荷電したコリングループとの静電的相互作用に対する陰イオン結合部位、およびアセチル基を収容することのできるわずかに疎水結合性ポケットを有することは予想外ではない。直観的な例として、潜在的に好ましいリガンド結合「トリアド」構造は、下記の六量体ペプチド(A、BおよびC)配列から成るであろう：

【0082】

(可能性のある、好ましいアセチルコリン結合「トリアド」ペプチド)

p-RNA - (A) - C y s - L e u - S e r - L e u - G l u - G l y

p-RNA - (B) - y s - S e r - L e u - G l u - S e r - G l y

p-RNA - (C) - C y s - L e u - L e u - S e r - G l u - G l y

【0083】

上記のトリアドペプチド構造へのアセチルコリンの潜在的に好ましい結合を図

10bに示す。また、陽イオンアミノ酸（アルギニン、ヒスチジン）を含むペプチドによるトリアドがアセチルコリン分子に対する好ましくない結合部位であると予想することは合理的である。直観的な例として、潜在的に好ましくないリガンド結合「トリアド」構造は、下記の六量体ペプチド（A、BおよびC）配列からなるであろう：

【0084】

（潜在的に好ましくないアセチルコリン結合「トリアド」ペプチド）

p-RNA - (A) - Cys - Ser - Arg - Ser - Arg - Gly

p-RNA - (B) - Cys - Ser - Arg - His - Arg - Gly

p-RNA - (C) - Cys - His - Arg - Tyr - Arg - Gly

上記のトリアドペプチド構造へのアセチルコリンの潜在的に好ましくない結合を図10cに示す。

【0085】

アセチルコリンアゴニスト（ニコチンムスカリン、フェニルメチルアンモニウムなど）および拮抗剤（d-ツボクラリン、トリメタファン、ヘキサメトミウム、デカメトニウム、アトロピンなど）の多数が第一のペプチドトリアド構造によって好ましく、そして、第二のペプチドトリアド構造によっては好ましくなく結合されると期待することも合理的であろう。何がある種のリガンドにとって一般的に好ましいまたは好ましくない結合リガンド構造であるかをある程度予測することはできるが、どちらが分子ディスクリプターデバイスのための基礎を提供する「最適の」構造であるかを経験的に決定することは非常に困難である。リガンド分子および可能である「非常に大きい」数の超分子トリアド構造に関する立体選択性および立体特異性のパラメータが含まれるとき、これは特に真実である。これは、もちろん、高次の選択作用をもつ速いコンビナトリアル選択プロセスが必要とされる主要な理由である。

【0086】

（他の超分子の配置）

また、他のタイプの超分子の配置の生成に導く分子間リガンド結合構造の組合せも本発明に含まれる。これらに限定されないが、いくつかは下記のものを含む

:

(1) ダイマーの超分子リガンド結合構造を形成する、2個のp-RNA-ペプチド成分構造(その一つは固定されうる)をもつ構造(図11a参照)。これらの構造はややより簡単な立体配置を表すが、比較的安定な複合体;

特に、しばしばより平坦なまたは二次元の構造を有することができる特定の金属配位およびキレート構造、を形成することができる。

(2) 四重の超分子のリガンド結合構造を形成する4個のp-RNA-ペプチド構造(その一つは固定化されうる)(図11b参照)。これらの構造は、4本のペプチド鎖を含む「結合ポケット」を形成するのに用いることができる。そのような構造は、さらに保護されたりリガンド結合「ポケット」を創るのに用いることができ、立体選択性および結合相互作用を提供することにおいてより多くのアミノ酸R基を包含することができる。四重のp-RNA-ペプチド構造の合成に対する手順は、実施例に示す(例3を見る)。

(3) 長さ方向に沿って、1個以上のトリアド超分子の複数の結合構造を形成することができる固定されたp-RNA-ペプチド成分による構造(図11参照)。これらの、複数のトリアドリガンド結合成分による独自の超分子の構造は、同一塩基構造に複数のリガンドを結合するために使用することができる。より重要なことに、そのような構造は、異なるトリアドリガンド結合成分でもってデザインすることができ、多重結合部位を有するより大きいおよび/またはポリマーのリガンドを結合するのに用いることができる。

【0087】

(マイクロエレクトロニックアレイのコンビナトリアルフォーマットおよびプロセス)

本発明の重要な態様は、マイクロエレクトロニックアレイを用いて、種々の超分子の構造に小分子(医薬品、作動薬、拮抗剤、基質、代謝物、金属イオンなど)、大きい分子(タンパク質、酵素、抗体など)およびより大きい構造(オルガネラ、細胞、その他)を結合させる親和性に影響を及ぼすようにする、電子コンビナトリアル選択プロセスおよびフォーマットを含む。本発明にとって重要である超分子の構造の1例は、p-RNA-ペプチド分子間トリアドリガンド結合

構造である。マイクロエレクトロニックアレイの使用は、近リアルタイムの進展的形式または学習形式と考えられるものにおいてコンビナトリアル選択プロセスを遂行することを可能にする。したがって、ペプチド（たとえば、10,000個）の非常に大きいコンビナトリアルライブラリーを、天文学的数字に近い潜在的超分子のリガンド結合構造（ 10^{12} 個）を通して選択するフォーマットで試験することができる。これらのエレクトロニクスをベースとしたコンビナトリアルプロセスは、より安定超分子の複合体の急速選択を可能にし、一方で、ある種の分子間リガンド結合構造が多かれ少なかれ適合した特性を有する形態学的、化学的および力学的理由に関する情報をも提供する。すなわち、該アレイは結合プロセスに関する構造/機能の相関性を提供する。超分子複合体生成の情報のフィードバックは、分子間リガンド結合構造の特定のクラスのより集中した選択のための反復プロセス、または分子間リガンド結合構造のより新しいクラスのための非常に広いスクリーニングをデザインすることを可能にする。薬物発見の応用に関連して、医薬品（作動薬、拮抗剤、インヒビター、トキシンなど）の既知のクラスを迅速に分析することができ、それらの結合プロセスの構造/機能関連性を決定することができる。これらの既知の医薬品（アゴニスト、拮抗剤など）の相関および解析から、マイクロエレクトロニックアレイは、それらの有効性、副作用および毒性を決定する、新薬のスクリーニングのため分子ディスクリプターデバイスとして使用することができる。実施例の例9は、薬物/リガンド結合実験の後、ELOCコンビナトリアルアレイから出てくる大量のデータをデコンボリューションして分析するアルゴリズムのタイプの説明を与える。この種の解析は、ELOCアレイの分子ディスクリプター性質を決定するために重要である。図12は、マイクロエレクトロニック分子ディスクリプターアレイが、どのようにして超分子の複合体（これは薬物の有効性を示す）が生成したテスト部位のグループ分け、および薬物の毒性を示すテスト部位のもう一つのグループ分けを示すかを概念的に図示している。

【0088】

（コンビナトリアル複雑性およびストリンジェンシー）

大きいコンビナトリアルペプチドライブラリーおよび超分子の生成プロセス

の有用性は、顕著な数の高度に選択的なりガンド結合複合体を形成する可能性を提供する。残念なことに、非常に大きな数の混合ペプチド配列（異なる相互に作用するおよび結合するR基との）、p-RNA配列およびリガンド分子、の組み合わせも大量の非特異的に結合した材料を生み出す。この非特異的に結合した材料は、「真の」超分子複合体形成を検出することを非常に困難にする高いバックグラウンドシグナルの生成に導く。さらに、若干の非生産的または非特異的結合に関係している特定のp-RNAペプチド配列のいくつかは、真に選択的超分子の複合体を形成するためには利用できないであろう。例として、いくつかのアルギニン部分を含み、正味の正電荷を持つ、コンビナトリアルペプチドライブラリーからのペプチドは、p-RNA配列のマイナスに荷電した骨格、特にそれらの分子間連結p-RNA成分との顕著な相互作用を有すると期待される。そのような非特異的結合相互作用は、これらのペプチドの役に立たない集合およびこれらのp-RNA-ペプチド成分の減少を引き起こすことができる。図13aおよび13bは、どのようにしてエレクトロニック乱れおよびストリンジェンシーがそのような非生産的な構造を曲げるように使用することができ、それらが今や若干の潜在的にマイナスに荷電したリガンド分子に対する活性のトリアド結合構造を創ることを可能にするかを示す。したがって、活性で、検出可能な超分子のトリアド複合体を生産する能力をなお維持しながら、非特異的相互作用を減らすことを可能にする、適切なストリンジェンシープロセスの適用が、本発明の重要な目的の1つである。

【0089】

マイクロエレクトロニックアレイは、コンビナトリアル選択プロセスに対する高次の特異性を達成する可能性を有する。なぜならそれらがアレイ上の各結合（テスト）部位での、選択的電場ストリンジェンシー制御の付加されたパラメータを提供するからである。こうして、温度、pH、イオン強度および化学試剤（デタージェント、変性剤、カオトロピック剤）を含む古典的なストリンジェンシーパラメータに加えて、超分子複合体への電場ストリンジェンシーの適用が、改善され、さらに特異的な分子間リガンド結合構造体を選択する全く新しいかつ強力なパラメータを提供する。迅速な多重ハイブリダイゼーションおよびハイブリ

ッド選択性を改善するためのエレクトロニックストリンジェンシーを提供する、活性なマイクロエレクトロニックチップ/アレイ技術が示されてきた。この技術はまた、アレイデバイスにDNA配列、オリゴヌクレオチド、アンプリコンおよび他の部分を選択的にアドレス指定するための手順および方法を含む。マイクロエレクトロニックDNAチップおよびアレイデバイスを製作するための基本デザインおよび手順、ならびにエレクトロニックアドレス指定、能動エレクトロニックハイブリダイゼーションおよびストリンジェンシーを遂行する手順およびフォーマットは、下記の特許に見出される：米国特許第5,605,662号「分子生物学的解析および診断に対する能動プログラム可能電子デバイス」；米国特許第5,632,957号「電極を含む分子診断システム」；米国特許第5,849,486号「プログラム可能な能動行列デバイスに対する装置および方法」；米国特許第4,787,963号「加速された速度で核酸分子をアニールするための方法および装置」；SN08/271882「分子生物学的解析および診断に対するエレクトロニックストリンジェンシー制御に対する方法」(207/263))。

【0090】

特に、エレクトロニック乱れに関係するエレクトロニックストリンジェンシーパラメータ(DC、AC/DCおよびエレクトロニックパルシングプロトコール)は、いわゆる蛍光乱れの領域を扱う特許および出願明細書に記載されている。たとえば、「プログラム可能な能動行列デバイスに対する装置および方法」と題する米国特許番号第5,849,486号および「生物学的物質のエレクトロニック乱れ解析に対する方法」と題する出願明細書シリアル番号第08/855058号(1997年5月14日出願)参照。

【0091】

さらに、能動オンボードエレクトロニック制御を有する高密度マイクロエレクトロニックアレイ(たとえば400、1200、10,000およびさらに高い数のテスト部位)のためのデザインおよび製作手順は、下記の特許明細書に記載されている。たとえば、「分子生物学的解析および診断のための高性能能動デバイスおよび方法」と題するPCT/US99/03080(1999年2月11

日出願) 参照。

【0092】

上記の特許および出願明細書に記載されたデザイン、手順およびフォーマットは、アレイに p - RNA - ペプチドのアドレス指定を行うためのマイクロエレクトロニックディスクリプターアレイを開発する基本原理を提供する。この材料はまた、本発明において記載されるコンビナトリアル選択およびスクリーニングプロセスにおいて使用されるはずのエレクトロニックストリンジェンシーパラメータのための基礎を提供する。これによって上記の特許および特許明細書を本発明に組み入れる。エレクトロニックハイブリダイゼーションおよびストリンジェンシーの基本についての更なる情報は、次の参考資料 - ヘラー、M. J.、IEEE Engineering in Medicine and Biology、100~104頁、1996年3月/4月；ソウノウスキ、R.ら、Proc. Nat. Acad. Sci. 94巻、1119~1123頁、1997年；エドマン、C. F.ら、Nucleic Acid Research 25巻、4907~4914頁、1997年；チャン、J.ら、Nature/Biotechnology 16巻、541~546頁、1998年6月；およびジル、P. N.ら、Nature/Biotechnology 17巻、No. 4、365~370頁、1999年 - においても記載されている。p - RNA - ペプチド分子間構造のためにエレクトロニックストリンジェンシーを示す実験を実施例に示す(例4参照)。例5は、さらに、ニッケルイオンの存在下での超分子複合体生成およびヒスチジンリッチのペプチドの分子間複合物安定性の「顕著な」増加(エレクトロニックT_mを上げる)を例証する実験を示す。これは、ある種の分子間複合体が適当なリガンド分子結合でかなり安定化するという証拠を提供するので、特に重要な実験である。

【0093】

(p - RNA - ペプチドでのアレイのアドレス指定)

マイクロアレイは、エレクトロニックまたは機械的手段によって p - RNA ペプチドセットで選択的にアドレス指定を行うことができる。マイクロエレクトロニックアレイへの p - RNA - ペプチドのエレクトロニックアドレス指定は、ア

レイを特定の p - RNA ペプチド (C) の溶液にさらすことおよびアレイ上の選択的部位を一組のマイナス電荷にバイアスをかけた部位または対電極に対してプラスにバイアスをかけることを含む。一般的に、アドレス指定を行う溶液は、50 ~ 100 nM ヒスチジン (双性イオン) 溶液中にビオチンを結合した p - RNA - ペプチド (C) 配列の 1 ~ 100 nM を含む。エレクトロニックアドレス指定は、60 ~ 120 秒間 200 nA ~ 600 nA (プラス電荷にバイアスをかけた部位へ) の負荷によって遂行される。エレクトロニックアドレス指定は、通常連続的に遂行されるが、しかし平行的エレクトロニックアドレス指定デバイスおよび方法が上の部分にリストされた特許において記載されている。特許および出願明細書の上記のリストは、エレクトロニックアドレス指定方法の方法および手順に関する詳細な情報を提供しており、これによって本発明に組み入れられる。選択的にマイクロアレイをアドレス指定する機械的手段は、インクジェット、微量滴下、マイクロキャピラリ沈積および他の技術を含み、その多くは DNA または他のマイクロアレイ技術を行う人々に知られている)。例 6 (実施例) は、相補的および非相補的 p - RNA 捕捉配列での 10,000 個のテスト部位のマイクロエレクトロニックアレイ (30 ミクロンテスト部位) のアドレス指定を行うこと、およびその後の、相補的蛍光標識 p - RNA 標的配列とのハイブリダイゼーションを記載する。図 14 は、10,000 テスト部位マイクロエレクトロニックアレイ上でのアドレス指定およびハイブリダイゼーションの結果を示す。

【0094】

(エレクトロニック ELOC フォーマットの重要目的)

異なる (より小さいまたはより大きい) ライブラリー、異なるリガンドを含む、および / または速度、選択作用および感度のような異なるコンビナトリアル選択基準を必要とするコンビナトリアル選択プロセスを遂行するための利点を提供する 3 種の基本的なエレクトロニック ELOC フォーマットを記載する。該フォーマットは、p - RNA 配列の自己集合する性質 (p - RNA A および B の p - RNA C 配列へハイブリダイゼーション) およびリガンド結合で起こる分子間構造の総体的な安定化の両方を利用するようにデザインする。該フォーマットは、また、非特異的結合および非特異的バックグラウンド問題に導くコンビ

ナトーリアル複雑性問題を克服するために従来のストリンジェンシー（温度、pH、イオン強度など）、エレクトロニック援助ハイブリダイゼーション、エレクトロニックストリンジェンシーおよびエレクトロニック乱れを利用するようにデザインされる。非特異性の結合およびバックグラウンドの減少は、それが超分子の複合体を検出するための対応する感度に直接導くので、コンビナトリアルプロセスにとって基本的に重要である。一般的に、該フォーマットは、選択的で安定な超分子複合体の最大数を生成し、それらができるだけ速く検出されるようにデザインされる。

【0095】

（エレクトロニックELOCフォーマット1 - 動的平衡トリアド生成プロセス）

このフォーマットは、アレイ上に固定されたp-RNA-ペプチド(C)部位とのp-RNA-ペプチド(A)および(B)ハイブリッドを迅速に形成し、かつ切断することによって生成する一過的超分子の構造形成を利用するようにデザインされる。その上、フォーマットは、好ましいリガンド結合現象が一過的プロセスにおいて生じる特定のトリアド構造を安定させるときに起きる安定化効果を利用する。このエレクトロニックELOCフォーマットは、マイクロエレクトロニックアレイの一般的ストリンジェンシー条件が熱融解温度中央値(T_m)でまたはその近くで(プラス/マイナス5)、2個のp-RNA(A)および(B)配列の、固定された相補p-RNA(C)配列へのハイブリダイゼーションに対してである、第一工程を含む。p-RNA-ペプチド(A)および(B)サブライブラリーは、各サブライブラリーの約1nmから100 μ mまでの濃度で加えることができる。10,000個のコンビナトリアルペプチドライブラリーについては、これは各ペプチド配列に対して約100のfMから10nMまでの濃度である。これらのp-RNAペプチドライブラリーは、低いコンダクタンス溶液またはより高いコンダクタンス溶液のいずれかの中にあることができる。低いコンダクタンス条件(50mM~100mMヒスチジン)の下で、エレクトロニック援助ハイブリダイゼーションは、ハイブリッド生成のオン/オフ速度を加速するために用いることができる。より高いコンダクタンス溶液を使用するとき

、ハイブリダイゼーションはその通常ので進むことができ、エレクトロニックストリンジェンシーまたは乱れは、脱ハイブリダイゼーション速度を加速するのに用いることができる。より高いコンダクタンス溶液は、1 mM ~ 1 Mの、塩化ナトリウム/リン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、トリス、または、よく知られている技術である、通常のハイブリダイゼーションまたは親和性結合反応のために使用される普通の緩衝システム、からなることができる。これらの手順は、大部分の潜在的 p - RNA - ペプチド (A、B および C) に対する超分子のトリアド構造形成が一過的すなわち動的平衡の中に存在するような条件を達成するようにデザインされる。p - RNA ハイブリダイゼーションに対する T_m で、またはその近くで、超分子複合体は、アレイ上の全てのテスト部位で迅速に形成し、分解している。したがって、これらの条件下で、非常に大きな個数のコンビナトリアル超分子トリアド構造は、アレイ上の p - RNA - ペプチド (C) 部位の全てで試験されている。このプロセスは、主に p - RNA 配列のハイブリダイゼーションによって進められる。温度および/またはエレクトロニック援助ハイブリダイゼーションに加えて、アレイ上のストリンジェンシーは、pH、イオン強度、デタージェント、変性剤およびカオトロピック剤を含む他の因子によっても調整することができる。これらの一般的ストリンジェンシーパラメータ (温度を含む) のいくつかの、またはすべての組合せは、一過的すなわち動的平衡状態を達成するために使用することができる。

【 0 0 9 6 】

リガンド分子はこのプロセスの間のいつでも該システムに添加することができるが、しかしリガンドの性質に依存して、動的な平衡状態に到達した後の添加が時には好まれるかもしれない。リガンド分子濃度は、約 1 pM ~ 100 nM までの範囲にあることができる。これらの条件下で、リガンド分子のペプチド配列の好ましいトリアド組合せへの結合は、効果的にその特定の超分子構造 / 複合体形成を安定させる。これは、アレイ上での、これらの選択された p - RNA - ペプチド (A) および / または (B) 成分の選択された捕捉 p - RNA - ペプチド (C) 部位へのハイブリダイゼーションのために、効果的に熱融解温度 (T_m) を上げる、分子間に生じる安定化である。したがって、このより高い程度の安定性

を有するそれらのリガンド / p - RNA - ペプチド (A) および / または (B) 複合体だけは、アレイ上の捕捉 p - RNA - ペプチド (C) 部位にハイブリダイズされたままである。これらの動的平衡条件下で、この増大した安定性は、ほとんど全く、リガンド / ペプチド複合体生成プロセスによる。エレクトロニック援助ハイブリダイゼーション、ストリンジェンシーおよび乱れは、初期のプロセスの間および後の両方においていくつかの形式で使用することができる。該プロセスの間、分子間超構造を効果的に乱して、より良いリガンド結合環境に、そしてより安定な複合体に導くことができる、より低いエネルギー立体配置を生成するように、電場を使用することができる。連続的またはパルスの DC および / またはオフセット AC シナリオにおけるプラスとマイナス両方の電場のストリンジェンシーは、ペプチドトリアド構造およびリガンド / ペプチドトリアド複合体を乱すために用いることができる。潜在的に生じうるコンビナトリアルトリアド構造の多数は、プラスおよびマイナスに荷電したアミノ酸 R 基を含む多数のペプチド組合せを有する。これらの帯電したペプチド R 基は、電場の適用によって強く影響を受ける。特に、電場は、ペプチドトリアド構造を曲げて、それらがリガンド結合に最も適した非常に低いエネルギーコンフォメーションを達成するのを助けるために用いることができる。

さらに、電場は、リガンド / 超分子の複合体を乱して、それらがより安定した立体配置を見つけることを可能にするように用いることができる。帯電したリガンド分子はすべて、それ自体、プラスまたはマイナスの電場の適用によって影響され、乱される。図 13 a および 13 b は、帯電した p - RNA - ペプチド構造へのエレクトロニック乱れ効果の一例を示す。さらなる例として、プラスの形式電荷を有するアセチルコリンリガンド分子は、プラスにバイアスをかけたマイクロエレクトロニックアレイのテスト部位の方へ移動し、そこで濃縮され、マイナスにバイアスをかけたテスト部位から離れ去る。さらに、リガンド結合部位への正電子のストリンジェンシーの適用によってその部位からプラスに帯電したリガンド分子を除去することができる。マイナスの形式電荷を有するメトトレキセートリガンド分子については、マイナスのバイアスの適用は該分子をテスト部位から動かすが、一方プラスのバイアスの適用は該分子を動かし、そのテスト部位

でそれを濃縮する。さらに、マイナス電子のストリンジェンシーの適用によってマイナスに帯電したリガンド分子をそのリガンド結合部位から除去することができる。

【0097】

プロセスの動的平衡および複合体形成段階の後、電場ストリンジェンシーは、超分子複合体を検出する、より高い選択性および感度を達成するために3つの他のレベルで使用することができる。第1レベルは、非特異的または部分的に結合した構造を除去するために低い電場ストリンジェンシーを含む。第2レベルは、p-RNAペプチド(A)および(B)セットを含む最も選択的および/または安定な超分子の複合体だけを選択するために電場強度のより正確な中間レベルの適用を含む。エレクトロニックストリンジェンシーの第3レベルは、p-RNA-ペプチドセット(A)および(B)、ならびに捕捉p-RNAペプチド(C)、すなわち最適の「トリアド」ペプチド/リガンド複合体を含む最も安定な超分子複合体を選択するために、電場強度の最も正確で最も高いレベルの適用を含む。超分子複合体が生成するアレイ上の位置が、リガンド結合事象の原因となる分子間p-RNA-ペプチド構造の基本的なセット全部を認識する。このエレクトロニックELOCフォーマットは、非常に沢山の分子間リガンド結合構造に対するコンビナトリアル選択が非常に速くなされることを可能にする。図15aおよび15bは、ELOCフォーマット1すなわち一過的動的平衡トリアド生成プロセスを示す。

【0098】

例として、ニコチン受容体およびムスカリン様コリン受容体に影響を及ぼす新薬および治療法をスクリーニングするための、分子ディスクリプターアレイを生成するコンビナトリアル選択プロセスは、下記の方法で遂行されるであろう。10,000個のp-RNAペプチドライブラリーを含むコンビナトリアル選択プロセスは、コリン作動性基質(アセチルコリン)および関連薬物、アゴニストおよび拮抗剤(ニコチン、ムスカリン、フェニルメチルアンモニウム、d-ツボクラリン、ヘキサメソニウム、アトロピンなど)を含む一群のリガンドに対するエレクトロニックELOCフォーマット1で遂行される。10,000テスト

部位マイクロエレクトロニックアレイは、10,000個のp-RNA-ペプチド(C)配列全部で選択的にアドレス指定される。ELOCフォーマット1は、既知のコリン作動性リガンド(アセチルコリン、ニコチン、ムスカリン、など)の各々に対し、p-RNAペプチド(A)および(B)サブライブラリーで遂行される。マイクロエレクトロニックアレイの超分子複合体生成の位置は、既知のコリン作動性基質、アゴニストおよび拮抗剤のすべてに関して、検出され、相互に関連付けられる。マイクロエレクトロニックアレイは、今や、コリン受容体に影響を及ぼす新薬をスクリーニングするための有用な分子ディスクリプターである。

【0099】

(エレクトロニックELOCフォーマット2 - 均一なトリアド生成プロセス)
エレクトロニックアレイELOCフォーマット2は、溶液相において特定のリガンドが特定のp-RNA-ペプチド(A)および(B)構造と複合体を形成することを可能にするようにデザインされるコンビナトリアル選択プロセスである。1組の低いストリンジェンシー条件(p-RNAハイブリダイゼーションに対する T_m 以下)の下で、均一相がマイクロエレクトロニックアレイから分離して、遂行される。この場合、ストリンジェンシー条件は、リガンド/p-RNA-ペプチド(A)/p-RNAペプチド(B)複合体の生成のために最適化される。一旦、溶液相(均一)複合体形成が起こると、溶液はp-RNA-ペプチド(C)ライブラリーで選択的にアドレス指定を行われたマイクロエレクトロニックアレイの上に置くことができる。ついで、ダイマー複合体(p-RNA-ペプチドA/リガンド/p-RNAペプチドB)は、アレイの上特定の位置(p-RNA-ペプチドC)部位に結合することによって、トリアド超分子複合体を形成することが可能にする。ELOCフォーマット1のために記載された同一の基本的な一般的手順およびエレクトロニック手順は、現在、最適の超分子リガンド複合体のコンビナトリアル選択を遂行するために使用することができる。

【0100】

フォーマット2の第2バージョンは、マイクロエレクトロニックアレイの上でリガンド/p-RNA-ペプチド(A)/p-RNAペプチド(B)複合体の均

一相生成を遂行することを含む。この場合、最初の手順は、高いストリンジェンシーでまたは、 p -RNA-ペプチドハイブリダイゼーションに対する T_m より高い温度で、遂行しなければならない。第二相は、トリアド複合体形成はアレイに起こり始めるように、 p -RNAハイブリダイゼーションに対する T_m で、またはその近くで、全般的ストリンジェンシー条件を下げることを含む。エレクトロニック援助ハイブリダイゼーション、ストリンジェンシーおよび乱れは、第二相の間と後の両方において、いくつかの形式で使用することができる。プロセスの間、分子間超構造を乱して、より良いリガンド結合環境に、そしてより安定な複合体に導くことができる、より低いエネルギー立体配置を生成するように、電場を用いることができる。ペプチドトリアド構造およびリガンド/ペプチド三つ組複合体を乱すために、連続的またはパルス状DCおよび/またはオフセットACシナリオにおけるプラス、マイナス、両方の電場のストリンジェンシーを用いることができる。潜在的に生成することができるコンビナトリアルトリアド構造の多数は、プラスおよびマイナスに荷電したアミノ酸R基を含む多数のペプチド組合せを有する。これらの帯電したペプチドR基は、電場の適用によって強く影響を受ける。特に、ペプチドトリアド構造を曲げ、それがリガンド結合に最も適切である、非常に低いエネルギーコンフォメーションを遂行するのを助けるために、電場を用いることができる。さらに、リガンド/超分子の複合体を乱し、それらがより安定な立体は位置を見つけるために、電場を使用することができる。帯電したリガンド分子はすべて、それ自体、プラスおよび/またはマイナスの電場の適用によって影響され、乱される。プロセスの複合体形成段階の後、超分子複合体を検出するためのより高い選択性および感度を遂行するために、エレクトロニックストリンジェンシーを使用することができる。第一レベルは、非特異的または部分的に結合した構造を除去する低い電場ストリンジェンシーを含む。第二レベルは、 p -RNA-ペプチド(A)および(B)セットを含む、最も選択的なおよび/または安定な超分子複合体だけを選択するために、電場強度のより正確な中間レベルの適用を含む。エレクトロニックストリンジェンシーの第3レベルは p -RNAペプチドセット(A)および(B)の両方、ならびに捕捉 p -RNA-ペプチドセット(C)、すなわち最適のトリアドペプチド/リガ

ンド複合体を含む、最も安定な超分子複合体を選択するために、電場強度の最も正確で最も高いレベルの適用を含む。超分子複合体が生成するアレイ上の位置は、リガンド結合事象の原因である分子間 p - RNA ペプチド構造の全基本的セットを確認する。図 16 a、16 b および 16 c は、ELOC フォーマット 2 または均一なトリアド生成プロセスを示す。

【0101】

(エレクトロニック ELOC フォーマット 3 - 不均一のトリアド生成プロセス)

エレクトロニックアレイ ELOC フォーマット 3 は、初めに非常に大きい数のトリアドタイプリガンド結合超構造を形成するようにデザインされたコンビナトリアル選択プロセスである。このプロセスは、2 個の p - RNA ペプチド (A と B) 配列の完全なペプチドサブライブラリーセットの、アレイ上のテスト位置に固定した捕捉 p - RNA 配列 (C) への低いストリンジェンシーハイブリダイゼーションを遂行する第一ステップを含む。アレイ上のハイブリダイゼーションに対する低いストリンジェンシー条件は、5 または p - RNA ハイブリッドに対する T_m (熱融解温度中央値) より下の温度の相当条件である。この低いストリンジェンシー条件は、アレイの上で非常に大きい数の p - RNA ペプチドトリアド超構造が迅速に生成することを可能にする。次の工程において、リガンド分子 (薬物または生物学的に活性な化合物) は、この低いストリンジェンシー条件でシステムに添加される。エレクトロニックストリンジェンシーは、いくつかの形式において初期のプロセスの間と後、両方において使用することができる。該プロセスの間、分子間超構造体を効果的に乱して、より良いリガンド結合環境に、そしてより安定な複合体に導くことができる、より低いエネルギー立体配置を生成するように、電場を使用することができる。連続的またはパルス的 DC および / またはオフセット AC シナリオにおける正と負両方の電場ストリンジェンシーは、ペプチドトリアド構造およびリガンド / ペプチドトリアド複合体を乱すために用いることができる。潜在的に生成することができるコンビナトリアルトリアド構造の多数は、プラスおよびマイナスに荷電したアミノ酸 R 基を含む多数のペプチド組合せを有する。これらは、電場の適用によって強く影響を受ける。

特に、ペプチドトリアド構造を曲げ、それがリガンド結合に最も適切である非常に低いエネルギーコンフォメーションを遂行するのを助けるために、電場を用いることができる。さらに、リガンド/超分子の複合体を乱し、それらがより安定な立体は位置を見つけるために、電場を使用することができる。エレクトロニックストリンジェンシーは、さらに選択性の三レベルのために使用することができる。第一レベルは、非特異的または部分的に結合した構造を除去する低いエレクトロニックストリンジェンシーを含む。第二レベルは、p-RNA-ペプチド(A)および(B)セットを含む、最も選択的なおよび/または安定な超分子複合体だけを選択するために、電場強度のより正確な中間レベルの適用を含む。エレクトロニックストリンジェンシーの第3レベルはp-RNAペプチドセット(A)および(B)の両方、ならびに捕捉p-RNA-ペプチドセット(C)、すなわち最適のトリアドペプチド/リガンド複合体を含む、最も安定な超分子複合体を選択するために、電場強度の最も正確で最も高いレベルの適用を含む。超分子複合体が生成するアレイ上の位置は、リガンド結合事象の原因である分子間p-RNAペプチド構造の全基本的セットを確認する。このエレクトロニックELOCフォーマットは、体が非常に大きな数の分子間リガンド結合構造に対するコンビナトリアル選択が迅速になされることを可能にする。図17a、17bおよび17cは、ELOCフォーマット3または不均一のトリアド生成プロセスを示す。

【0102】

(コンビナトリアル選択プロセスから誘導される他の応用)

薬物スクリーニング用途のための分子ディスプレイアレイを生産するために本発明のコンビナトリアルプロセスを使用することに加えて、リガンド特異的超分子構造の確認は、数多くの他の領域へのそれらの直接的な使用および適用にも導くことができる。これら独自の超分子構造のいくつかには、これらに限定されないが、下記のものが含まれる：

- (1) 合成抗体、
- (2) 新しい親和性試薬、
- (3) 合成触媒/酵素
- (4) 新しい金属キレート構造体。

【0103】

(合成抗体)

一旦コンビナトリアルプロセスが特定のリガンドに対し高い選択性および結合を有する超分子の構造を確認するのに用いられると、それらの特定のトリアド構造は「合成抗体」の相当物を表す。あるハプテン/抗原への通常の哺乳類の応答は 10^6 個もの抗体を生じることができるが、本発明に記載したペプチドライブラリーおよびコンビナトリアルプロセスは 10^{12} 個の異なるトリアド結合構造を生成することができる。したがって、抗体様の結合性質を有する非常に独自の、そして選択的な超分子構造を生成する可能性は莫大である。与えられた超分子のトリアド構造全ての中の3個のペプチド配列すべてを確認することができるので(アレイ上の疑似3重対称のため)、「特定の」トリアド構造は今より大きな量を非常に簡単に生成させることができ、従来のポリクローナルまたはモノクローナル抗体を置換して、免疫診断試薬として使用することができる。これらの特定のp-RNA-ペプチド超分子の「合成抗体」構造は、いまや均一および不均一の(固定された)イムノアッセイフォーマットの種において使用することができる。これらのフォーマットは、多重リガンド(ハプテン/抗原)解析のための合成抗体アレイの創成を含む。コンビナトリアル選択プロセスに対して、または特定のp-RNAペプチド配列について記載したように、特定のペプチド配列をもつ特定のp-RNA超分子構造を、一般的なp-RNA配列について生成させることができる。一般的なp-RNA配列をもつ特定のp-RNAペプチド超分子のトリアドは、エレクトロニックコンビナトリアルプロセスに対して記載したのと同じエレクトロニック手順を使用して、アレイに選択的にアドレス指定を行うことができる。他のフォーマットは、特定のp-RNA配列A、BおよびCを使用することを含むことができ、それらは、全ての成分構造が単に一緒に混合されたとき、「特定の」p-RNA-ペプチドトリアド構造を生成する。さらに、他のフォーマットは、付加した特定のp-RNA延長(4~30塩基)をもつCタイプ構造を使用することを含み、これは全トリアド構造が、続いて、マイクロエレクトロニックアレイに固定された相補的特定p-RNA配列にハイブリッドされるのを可能にする(図18参照)。このフォーマットにおいて、特

定の相補的 p - RNA 配列は、最初にアレイに予めアドレス指定される。特定の p - RNA - ペプチド超分子のトリアド「合成抗体」は、溶液中で（均一に）標的ハプテン / 抗原を含む試料と反応する。特定の p - RNA - ペプチドトリアドおよびハプテン / 抗原の間の複合体形成の後、複合体はアレイの上でハイブリダイゼーションによって相補的 p - RNA 配列に選択的に固定されうる。マイクロエレクトロニックアレイは、構造体の選択的アドレス指定のために、構造および複合体のエレクトロニック乱れのために、および、より良いアッセイ感度および選択性を達成するためにエレクトロニックストリンジェンシーを適用するために使用することができる。上記の説明は、本発明によって構想される多くの均一および不均一合成的抗体「イムノ」タイプアッセイフォーマットのいくつかを表すに過ぎない。本発明の更なる態様は、1つの特異的 p - RNA - ペプチドトリアド構造が、目標とされたハプテン / 抗原を結合し、固定するのに用いられ、そしてレポーター基で標識された第2の特定の p - RNA - ペプチドトリアドが複合体を検出するために用いられる、サンドイッチタイプの合成抗体関連アッセイの開発を含む。これらの p - RNA ペプチドトリアドを標識するのに使用することのできるレポーター基のいくつかは、これらに限定されないが、蛍光団、発色団、酵素、化学ルミネッセント部分、ビオチン / アビジン検出生成複合体、金粒子、ナノビーズ、マグネチックビーズおよびラジオアイソトープを含む。

【0104】

例として、本発明の合成抗体を利用する1つの重要な「イムノ」タイプアッセイは、サイトカニン（TNF、IL - 1、IL - 6、IL - 8など）および他の細胞用試剤（ブラジキニン、組織因子、接着分子など）（これらは細菌性 / エンドトキシン敗血症性感染、浸透移行性炎症性応答症候群（SIRS）、敗血症および切迫した敗血症性ショック、ならびに多重器官不全症候群（MODS）の初期の指示薬である）の濃度の検出し、定量するようにデザインされている。

【0105】

（免疫診断およびプロテオームへの応用）

本発明の対象である適用の他の広いクラスには、マイクロエレクトロニックアレイにアドレス指定することができ、その後の応用（たとえば、免疫学的診断、

タンパク質結合実験および酵素アッセイ)において使用することができる、p-RNA-抗体、p-RNA-タンパク質およびp-RNA-酵素誘導体の使用が含まれる。

【0106】

(免疫診断用p-RNA抗体アレイ) 多重またはモジュールタイプの免疫診断用アッセイは、マイクロエレクトロニクス、または他のアレイタイプデバイスまたは基質に選択的にアドレス指定される特定のp-RNA-抗体コンジュゲートを調製することによって開発することができる(図19参照)。そのようなフォーマットにおいて、特定の相補的p-RNA配列(捕捉配列)は、最初にアレイに予備アドレス指定される。次の工程において、特異的p-RNA-抗体複合体は、溶液中で標的ハプテンまたは抗原を含む試料と反応する。これらのp-RNA抗体複合体は、特異的抗体および特異的p-RNA配列の両方を有し、それは、アレイの上でその相補的p-RNAに(ハイブリダイゼーションを通して)捕捉されることを可能にする。ついで、p-RNA抗体/ハプテン/抗原複合体は、アレイの上でハイブリダイゼーションによって相補的p-RNA配列に選択的に固定される。抗体/ハプテン/抗原複合体を検出するのに、多くの方法を用いることができるが、その一つはいわゆるサンドイッチフォーマットである。サンドイッチアッセイフォーマットでは、最初の特異的p-RNA抗体複合体は、目標とされたハプテン/抗原を選択的に結合し、固定するのに用いられ、そして、レポーター基で標識した第二の特異的抗体は該複合体を検出するのに使用することができる。レポーター抗体を標識するために使用することができる若干のレポーター基のいくつかには、これらに限定されないが、蛍光団、発色団、酵素、化学ルミネッセント部分、ビオチン/アビジンリポーター複合体、金粒子、ナノビーズ、磁性ビーズおよびラジオアイソトープが含まれる。さらに、本発明の重要な態様は、下記の事項のためにマイクロエレクトロニックアレイの電子性質の使用することを含む:

- (1) 最初のp-RNA捕捉配列および/または特定のp-RNA-抗体コンジュゲートの選択的にアドレス指定。
- (2) p-RNA抗体および生成するハプテンまたは抗原複合体のエレクトロニ

ック乱れのために。

(3)より良いアッセイ感度および選択作用を達成するためにエレクトロニックストリンジェンシーをp-RNA-抗体/ハプテン/抗原複合体に適用するため。

【0107】

上記の説明は、本発明によって構想される、多くの均一および不均一の免疫診断的アッセイフォーマットのいくつかに過ぎない。

【0108】

抗体は、多くの共有結合的および非共有結合的方法によって、p-RNA分子に容易に付着させることができる。本発明の例7は、相補的p-RNA構成体がストレプトアビジンおよびヤギ抗ヒトF(ab')₂抗体からなるタンパク複合体の固定化の繋ぎ鎖として使用された方法を記載する。p-RNA No. 81のビオチンをマイクロエレクトロニックアレイ(APEXチップ)をカバーしている浸透層中に固定されたストレプトアビジンに結合させることによって、p-RNA No. 80に対する捕捉配列を提供するためにp-RNA No. 81が用いられた。ついで、化学的にヤギ抗ヒトF(ab')₂抗体に接合した可動性ストレプトアビジンに結合するためにp-RNA No. 80のビオチンが用いられた。ヒトIgG F(ab')₂抗体である、その特定の抗原標的を捕らえるためにヤギ抗ヒトF(ab')₂抗体が用いられた。これは、抗体が特定のp-RNA分子で修飾されることができ、マイクロエレクトロニックアレイデバイスまたは他のアレイデバイスにアドレス指定される多くの方法のうちの1つを表すに過ぎない。さらなる実験において、捕捉性p-RNA s # 54および# 79は、もう一つの固定化繋ぎ鎖またはp-RNA-抗体誘導体を形成するために用いた。この場合、浸透層中にある固定されたストレプトアビジンにその4'ビオチンを結合させることによって、マイクロエレクトロニックアレイを覆っている浸透層にp-RNA # 54を固定させた。p-RNA # 79はその相補的鎖# 54にハイブリダイズされ、# 79の4'ビオチンは、ストレプトアビジンとヤギアンチヒトF(ab')₂抗体との可溶化されたコンジュゲートのストレプトアビジン半分を固定するために用いられた。ついで、ヤギ抗ヒトF(ab')

)₂抗体は、ヒトIgG F(a b')₂抗体であるその標的抗原を捕らえる免疫吸着材として使用した。それぞれの捕捉p-RNA捕捉鎖(#81または#54)の選択性は、p-RNA(#80または#79、それぞれ)の相補鎖が溶液中でストレプトアビジン-ヤギアンチヒト抗体タンパク質複合体に結合し、ついで捕捉体を含むAPEXチップにハイブリッドされたとき、タンパク複合体に付着したp-RNAはそれらのそれぞれの相補的固定化捕捉鎖にだけ結合したことを立証した。これは、均一溶液中に同時に存在する免疫学的試薬の地理的ソーティングを可能にする基礎を示す。例8は、別々の検体検出と組み合わせさせた同時の多重均一アッセイを達成する新しい方法を示す。

【0109】

例3からのp-RNA配列の相補的ペア、例3からの免疫学的な試薬を使用し、そしてHCGのネズミのモノクローン抗-サブユニットに、化学的に結びつけられたストレプトアビジンからなる第二のタンパク複合体を含めて、2つの異なる抗原の同時免疫学的検出が成し遂げられた。p-RNA捕捉鎖は、2個の抗原標的が適当なp-RNA捕捉鎖によって区別して検出されるように、それらのそれぞれの相補鎖の間で成功裏に認識された。

【0110】

これは、多重同時免疫反応が、個々の免疫反応の各々の特定の抗原標的の個々の検出と結びついて、溶液中で実行される可能性を示す。抗原標的検出の分離は、それらのそれぞれの補体が選択的抗原標的検出を達成するp-RNA鎖の選択性を利用することによって達成される。

【0111】

それぞれの捕捉p-RNA捕捉鎖(#81または#54)の選択性は、p-RNA(それぞれ、#80または#79)の相補鎖が溶液中でストレプトアビジン-ヤギアンチヒト抗体タンパク質複合体に結合し、ついで捕捉体を含むAPEXチップにハイブリッドされたとき、タンパク複合体に付着したp-RNAはそれらのそれぞれの相補的固定化捕捉鎖にだけ結合したことを立証した。これは、多重同時免疫反応が、均一な溶液中に同時に存在する免疫学的試薬の地理的ソーティングを行うことができる基礎を示す。

【0112】

【実施例】

(実施例1 - p - RNAの合成および精製)

典型的な15 μ mスケールにおけるp - RNAオリゴヌクレオチドの自動合成は、ECOSYN™D 300⁺ - Eppendorf、BIOTRONIC DNA合成装置を使用して遂行した。2' - 位置がフリーの、DMT保護ピラノシル - ヌクレオシド(A、T、G、C)前駆体から誘導され、3' - 位置でベンゾイル化された固体担体誘導体をp - RNA合成のために使用した。CPG固形保持体もまた、標準のホスホルアミダイトDNA合成を遂行する際に、そして、トリプタミンリボピラノシル(I)ホスホルアミダイトモノマーを取り入れるために使用した。標準DNAホスホルアミダイト、DNAホスホルアミダイトピラノシルヌクレオチドモノマー、トリプタミンリボピラノシル(I)ホスホルアミダイトモノマー、ならびに市販のホスホルアミダイト染料(シアニン3、シアニン5など)、アミノリンカー部分およびビオチン部分のこれらの誘導体すべては、標準のコハク酸リンカーを介してCPG支持体に結合させることができる。使用したホスホルアミダイト合成方法は、ノヨリらによってDNAに関して記載されたアリル - オキシ - ホスホルアミダイトストラテジー(Y. ハヤカワ、S. ワカバヤシ、H. カト、R. ノヨリ、J. Am. Chem. 1990年、112巻、1691頁)に従った。

【0113】

合成プロトコールは、以下の工程を含んだ：(1)DMT脱ブロッキングは、ジクロロメタン(100ml)中の6%ジクロロ酢酸(v/v)を使用して行った；(2)ジクロロメタン(20ml)での洗浄、アセトニトリル(20ml)での洗浄およびアルゴンでのフラッシュ；(3)カップリング手順は、第一にアクティベーター(0.5Mピリジニウム塩酸塩のジクロロメタン(0.2ml)溶液)でCPG固体担体材料を洗うこと、ついで1/1 - アクティベーター(ホスホルアミダイト0.76ml(8eq；0.1Mをアセトニトリルに溶解した)での30分間の処理；(4)アセトニトリル(20ml)での洗浄(5)パーセプティブ(PerSeptive)から入手した50%CapA(10.5m

1) および50% Cap B (10.5 ml) 試薬での2分間処理を含んだキャッピング手順 (Cap A: THF、ルチジン、無水酢酸、Cap B: 1-メチルイミダゾール、THF、ピリジン); (6) アセトニトリル (20 ml) での洗浄; (7) 酸化操作は、酸化溶液 (2,4,6-コリジン 9.2 ml および水 46 ml を加えた、アセトニトリル 100 ml 中にヨウ素 400 mg を含む新に調整した溶液) 120 ml での1分間の処理を含んだ。

【0114】

固体担体からの切断の前に、ノヨリおよび共同研究者によって記載された条件下で、p-RNA-オリゴヌクレオチドを、まずリン酸トリエステルリンケージの位置および、グアニン塩基の位置のアリル基を外した。(Y.ハヤカワ、S.ワカバヤシ、H.カト、R.ノヨリ、J. Am. Chem. 1990年、112巻、1691頁)。これは、室温で、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 272 mg、 PPh_3 272 mg およびの $\text{Et}_2\text{NH}_2\text{HCO}_3$ 272 mg の混合液中の支持体をジクロロメタン 15 ml 中に懸濁することによって行った。懸濁液を4~5時間激しく振とうする。ついで、支持体をジクロロメタン (30 ml)、アセトン (30 ml) および水 (14 ml) で注意深く洗浄し、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムの0.1 M水溶液中に懸濁し、そして再び水 (15 ml)、アセトン (15 ml) およびジクロロメタン (15 ml) で洗浄する。固体担体からの切り離しおよび塩基と糖の脱アシル化は、4 で25~40時間以内でヒドラジン分解によって行った (水 6 ml 中の25%ヒドラジン水化物)。Sep-Pak-カートリッジ上での脱塩によって粗オリゴヌクレオチドからヒドラジンを除いた (アセトニトリル/炭酸水素トリエチルアンモニウム 0.1 M 溶液での溶出)。オリゴヌクレオチド含有フラクションを合して、蒸発乾涸した。オリゴヌクレオチドのHPLCによる最初の精製 (LiChrospher 100 RP-18 (10 μM) メルク; 緩衝液A: 0.1 M 酢酸トリエチルアンモニウム; 緩衝液B: 0.1 M 酢酸トリエチルアンモニウム/アセトニトリル 1/4) の後、室温でオリゴヌクレオチド (乾燥) を蟻酸/水 = 3/2 に溶かすことによって} 4' 末端のジメトキシトリチル基を切り離した。酸の蒸発後、完全に保護基を外したオリゴヌクレオチドを水に溶かし、調製用HPLC-カラム (RP

18) 上で精製した。一緒にした生成物フラクションを蒸発乾涸し、ついで0.1 M炭酸水素トリエチルアンモニウムに溶解し、Sep-Pak-C18 (ウオータース) カートリッジ上で脱塩した。溶出した生成物を真空中で蒸発させ、一旦水2 mlで溶解し、再度蒸発乾涸し、ついで光学濃度の測定のために水1 mlに溶かした。純度をチェックするために、オリゴヌクレオチドを分析用RP18カラム上に注入した。(> 95%)。生成物の特性を評価し、ESI-MSによって同定した。

【0115】

(実施例2-2'-末端のp-RNAの蛍光染料標識化のための操作)

以下は、蛍光染料をp-RNA配列の2'-末端の位置に組み入れるための基本的な操作を示す。これは、リポーター標識および他の部分のp-RNA配列への導入のための多くのオプションのうちの1つを提供するに過ぎない。

【0116】

3'-アミノ-変性剤C3-CPG約100 mg (グレンリサーチから購入) をDMF 2 mlに注ぎ、5分間穏やかに攪拌した。3'-アミノ部分のFmoc保護基をDMF/ピペリジン(6/4) 3.5 mlでの10分間処理によって除去した。操作は、二度繰り返した。ついで、保護基を外した3'-アミノC3-CPG保持体を、DMF 10 mlおよびアセトニトリル10 mlで洗浄した。ついで、3'-アミノ-C3-CPG保持体を、10分間高真空で乾燥した。ついで、保護基を外した3'-アミノ-C3-CPG保持体約71 mg (43 μmol / g ~ 3.06 μmol) を、NaHCO₃の飽和水溶液0.05 mlを含むDMF 0.4 ml中に入れた。テキサスレッド-Xスクシンイミジルエステル(モレキュラープローブズから購入) 約5 mg (3.06 μmol) を、DMF 0.1 mlに溶かし、ついで保護基を外した3'-アミノ-C3-CPG支持体に添加した。ついで、反応液を4時間室温で振とうした。ついで、テキサスレッド色素を反応させた3'-アミノ-C3-CPG保持体を、DMF/ピリジン10 mlで洗浄した。反応後の材料は、青色および赤い蛍光を有した。修飾したCPG上の残りの遊離アミノ基を、ピリジン2 ml中の無水酢酸0.4 ml (DMAPO 0.2 gを含む) で30分間キャップした。ついで、染料で修飾したCPG支持体

を、ピリジン、DMF、メタノールおよびメチル *t*-ブチルエーテルで洗浄し、その後高真空で乾燥した。ついで、テキサスレッドを標識した3'-アミノ-C₃CPG支持体は、DMT保護基を外した後、標準ホスホルアミド合成操作を用いて、p-RNAオリゴヌクレオチド配列の合成のために準備した。この2'-標識化操作は、残りのp-RNA合成操作を通して安定な蛍光染料に対して使用することができる。

【0117】

2'-末端の位置にテキサスレッド(4'-I-G-A-A-G-G-G-TR-2')、I=トリプタミンおよびTR=テキサスレッド)で標識した、合成した7量体p-RNAの構造を図20に示す。TR-90分子のマススペクトルも、図20に示す。相補的ビオチン化B-92配列(4'-ビオチン-C-C-C-T-T-C-T-I-C-C-C-C-C-G-2')でハイブリッドしたTR90配列(4'-I-G-A-A-G-G-G-TR-2')の構造を図21に示す。ハイブリッドされたペアの熱変性に対するUV淡色性曲線も図21に示す。このハイブリダイゼーションは、0.01Mトリス/HCl pH 7/0.15M NaCl₂中でp-RNA配列の各々の5 μm濃度を用いて、行った。そのUV淡色性データは、ハイブリッドしたペアのT_mが59であったことを示す。

相補的ビオチン化B-92配列(4'-ビオチン-C-C-C-T-T-C-T-I-C-C-C-C-C-G-2')でハイブリッドした、TR90配列(4'-I-G-A-A-G-G-G-TR-2')およびシアニン-3蛍光染料で標識した配列Cy3-91(4'-Cy3-C-G-G-G-G-I-2')の構造を図22に示す。このハイブリダイゼーションは、0.01 μMトリス/HCl pH 7/0.15M NaCl₂中でp-RNA配列の各々の5 μm濃度を用いて行った。その淡色性データは、ハイブリダイズした複合体のT_mが約61であったことを示す。

【0118】

(実施例3-トリプタミンリンカーによる、ペプチド部分のp-RNAへの付着のための操作)

以下の例は、トリプタミン基を含む p - RNA オリゴマーに、通常の塩基部分の代わりにペプチド部分を付けるために使用する手順である。まずこの手順には、p - RNA 配列へのトリプタミンヌクレオシドの取込みが含まれ、それが、ついで、p - RNA へのペプチドのカップリングのために脂肪族アミン基を提供する。

【0119】

N - (ヨードアセチルオキシ) - スクシンイミドによる p - RNA のヨウ素化アセチル化は、DMSO (10% = 500 nmol オリゴにつき 0.1 ml) 中の N - (ヨードアセチルオキシ) スクシンイミド (M = 283.018) の 70 当量の溶液と混合した重炭酸ナトリウムの 0.1 モル液 (pH 8.4 ; オリゴ 500 nmol につき 1 ml) 中で、トリプタミンアミノ - 結合 p - RNA - オリゴマーの 1 当量を用いて行った。管は、周囲温度 (25) で暗所に約 30 ~ 90 分間保存した。反応の完了は、HPLC によってモニターした。[緩衝液 A : 0.1 M トリエチルアンモニウムアセテート水溶液、緩衝液 B : 0.1 M トリエチルアンモニウムアセテートの水溶液 : CH₃CN = 1 : 4]。方法 1 : 10% の緩衝液 B から始める ; 40 分後、50% 緩衝液 B に進む ; 観測波長 260 nm。方法 2 : 10% 緩衝液 B から始める ; 100 分後 45% 緩衝液 B に進む ; 観測波長 260 nm、メルクの 10 μM LiChrosphere™ 100 RP - 18 カラム (250 × 4 mm) 上で。生成物は、ヨードアセチル化オリゴヌクレオチドの後 4 ~ 9 分のどこかで溶出した。生成物を脱塩し、Sep Pak™ カートリッジ上で標準作業手順によってさらに精製した。溶液を、Sep Pak™ カートリッジの上に注ぎ、0.1 M TEAB 緩衝液 20 ml で洗浄し、純アセトニトリルで溶出させた。生成物の収率は、260 nm の UV 吸収によって測定した、ついで、生成物を、真空遠心機を使用して、凍結乾燥した。

ヨードアセチル化 p - RNA を、ホウ酸塩 - HCl 緩衝液および Na₂EDTA を含む緩衝液系 (pH 7.6 ; オリゴ 10 nmol につき 100 μg) に溶解し、DMF 100 μl 中のペプチド 30 ~ 60 当量と混合した。(緩衝液システム : ホウ砂 / HCl 緩衝液 ; Riedel - de Haen、pH 8.0、Na

2 EDTAの10 mM水溶液の等量で混合した、pHをHClで7.6に調整し、得られた溶液は~5 mM Na₂EDTAを含んだ)。暗所、周囲温度(25)で約6~12時間、反応を行った。HPLCで反応の完了をモニターした。HPLC緩衝液系は、緩衝液A(0.1 Mトリエチルアンモニウムアセテートの水溶液)および緩衝液B(0.1 Mトリエチルアンモニウムアセレート/CH₃CN=1/4の水溶液)であった。溶出は、緩衝液A 90%/緩衝液B 10%で始め、40分後までに、緩衝液A 50%/緩衝液B 50%に進んだ。溶出を、260 nmおよび220 nmでモニターした。使用したHPLCカラムの材料は、250 mm x 4 mmのカラム中、メルクの10 μM LiChrosphere™ 100 RP-18であった。ヨードアセチル化オリゴマーが消失したあと、同じHPLC操作によって最終生成物を単離し、上記のSep Pak™カートリッジ操作を用いて脱塩した。

【0120】

(多重p-RNA-トリプタミン付着部ぐらいい対する手順)

他のp-RNA-ペプチド分子間構造は、同じp-RNAオリゴヌクレオチド構造の中で、多重トリプタミンリンカー部位によるp-RNAの修飾によって構築することができる。合成し、特性評価した、多重トリプタミンリンカー(4' C-C-I-I-I-G-G-2')をもつp-RNA配列の1例を図23に示す。ハイブリダイズしたペアに対するUV淡色性および融解特性は、また、図23に示す。1、2、および3個のトリプタミンリンカー(並んだ多重トリプタミンリンカーおよび介在するヌクレオチドを含む)をもつp-RNAの他のハイブリダイズしたペアに対する融解温度(T_m)および熱力学的性質を下の表1に示す。

【0121】

【表1】

表1

配列	融点	ハイブリダイズした p-RNA-トリプタミノオリゴマーに対する熱力学的対合データ (Kcal / モル)			
	T _m (°C) 10 μ M	ΔH_{VH}	T $\Delta S_{\text{VH}}^{298^\circ\text{K}}$	$\Delta G_{\text{VH}}^{298^\circ\text{K}}$	K(M) ^{298°K}
PRNA - CCCGGG*	68	-48.5	-35.5	-13.0	-
pRNA - CCCIGGG	63	-54.1	-41.2	-12.9	2.8、10 ⁹
pRNA - CCCIIGGG	64	-51.4	-38.6	-12.8	2.3、10 ⁹
pRNA - CCIHGG	24	-43.5	-36.9	-6.6	7.5、10 ⁴
pRNA - CCICGIGG	49	-88.5	-75.3	-13.2	4.7、10 ⁹
pRNA - CICIGIG	ハイブリッドの対合は検出されなかった				

【0122】

表1における、配列に対する溶液ハイブリダイゼーションの性質は、T_m、融解曲線および熱力学的性質を含めて、望ましい協調挙動を示した。さらに、質量分析によって配列の特性評価をした(表2参照)。それらの例は、短いp-RNAオリゴマー配列における、2個または3個の並列したトリプタミンリンカーが適切なハイブリダイゼーション性質を表現していることを証明する。

【0123】

【表2】

表2

配列	MH ⁺ 実測値	MH ⁺ 計算値
pRNA - CCCIGGG	2243.4	2243.4
pRNA - CCCIIGGG	2597.5	2597.5
pRNA - CCHIIGG	2303.6	2302.7
pRNA - CCICGIGG	2597.6	2597.5
pRNA - CICIGIG	2301.4	2302.7

【0124】

多重トリプタミン p - RNA - ペプチドコンジュゲート (4' - CCC - I * - I * - GGG - 2'、*は2個の - Cys - Phe - Pro - Tyr - Trp - Glyペプチド) の例を図24に示す。NH₂ - Cys - Phe - Pro - Tyr - Trp - Gly - CO₂Hペプチドを、ヘテロ2官能のリンカー(ヨード酢酸のスクシンイミジルエステル)により、システインアミノ酸のチオール基を通してトリプタミンの第一アミノ基に結合させた。p - RNA - ペプチド構造の質量分光分析も、図24および下の表3に示す。

【0125】

【表3】

表3

配列	M-3H] ³⁺ 実測値	M-3H] ³⁺ 計算値
pRNA - CCCI [*] I [*] GGG	1407.9	1406.2

【0126】

2個の p - RNAペプチド配列が相補的捕捉 p - RNAペプチド配列にハイブリッドするとき、二重のトリプタミン p - RNA構造は、4個のペプチド残基1個の超分子構造に組み込まれるのを可能にする(これを図25に示す)。UV淡色性曲線は、二重鎖の p - RNA - ペプチド構造の融点(T_m)が約50であることを示す。これは、これらの p - RNA配列に対して予測されたT_mと合致

する。ハイブリダイゼーションが大きく、かさばったペプチド構造の存在下で起こるという事実は、トリプタミンリンカー配置がペプチドの付着のために好ましい立体化学を生み出すことを示唆する。さらに、トリプトファン蛍光の測定を用いて、溶液中の p-RNA ハイブリッドの生成を追うことができた。

【0127】

(実施例4 - p-RNA - ペプチドトリアド分子間構造に対するエレクトロニックストリンジェンシーの例証)

この実験は、p-RNA配列の組合せ(#70:#72、#71:#72、および#71:#72)に対するエレクトロニックT_mを測定するためにエレクトロニックストリンジェンシーを使用することを含む。

p-RNAの配列を下に示す：

#70 4' - I - G - A - A - G - G - 2'

#71 4' - G - G - G - G - G - I - 2'

#72 4' - C - C - T - T - C - I - C - C - C - C - C - 2'

#70配列は#72配列の4'末端に相補的であり、#71配列は#72配列の2'末端に相補的である。3個すべてが一緒に#70/#71:#72をハイブリダイズしたとき、#72配列中の1個の不对塩基だけが残る。それは塩基位置6のトリプタミン(I)である。#70配列の4'-末端(I)および#71配列の2'-末端(I)も不对のままである。(トリプタミン(I)部分がペプチド配列または他のリガンド結合構造を加えるための付着点である)。

【0128】

p-RNA配列#70:#72のハイブリダイズした組合せに対するサーマルT_mは49であった；#71:#72は、49であった；そして、十分に対合した構造#70/#71:#72は、49であった。p-RNA配列#70:#72のハイブリダイズした組合せに対するエレクトロニックT_mは、230ナノアンペア(nA)であった；#71:#72は、215nAであった；そして、#71:#72は、250nAであった。これらの結果は、サーマルT_mとエレクトロニックT_mの間に合理的コンシステンシーがあることを示す。実際、エレクトロニックストリンジェンシーは、全構造#70/#71:#72を、高

いT_m、G：Cリッチの#70：#72ハイブリッド対からよりよく区別するようである。何らかの塩基スタッキング効果のために十分に対合した構造#70/#71：#72のさらなる非常に大きい安定化があるという（エレクトロニックT_mからの）弱い証拠があるだけである。これは利点である、なぜなら、ペプチド配列（トリアド）および結合したリガンド分子（超分子複合体）をもつ安定化した全構造をより容易に検出し、認識することができることを意味するからである。

【0129】

（実施例5 - 金属（ニッケル）リガンド結合p-RNA - ペプチド三つ組超構造に対するエレクトロニックT_mの変化を通じた超分子の構造の例証）

これらの実験は、特定のp-RNA - ペプチド超分子の構造「トリアド」への特定リガンド結合がそのサーマルおよび/またはエレクトロニックT_mの上昇によって認識することができる、さらに安定な構造、「超分子の」構造を生じる基本的な概念を示すようにデザインされている。この例では、ニッケル(Ni²⁺)は、p-RNA - ペプチド構造（その中のペプチド配列はヒスチジンリッチである）に対する特異的金属リガンドとして使われている（ヒスチジンのイミダゾールR基は、金属イオン、特にニッケルの強い結合剤であると予想される）。この実験において使用される捕捉p-RNA構造は、p-RNA配列#72（例を見る）から誘導され、ペプチドを付着していない#72 p-RNA捕捉配列、Cap-72-Np成分、ヘキサペプチドN-Cys-His-His-His-His-Gly-C(-CHHHHG)を付着した#72 p-RNA捕捉配列、キャップ-72-CHHHHG成分およびヘキサペプチドN-Cys-Phe-Pro-Ser-Phe-Gly-C(-CFPSFG)を付着した#72 p-RNA捕捉配列、キャップ-72-CFPSFG成分を含んだ。#71 p-RNA配列は、ヘキサペプチドN-Cys-His-His-His-His-Gly-C(-CHHHHG)で誘導体化し、Cy3-71-CHHHHG成分を生成させるために蛍光色素(Cy3)でも誘導体化した。#70 p-RNA配列は、70-CHHHHG成分を生成させるためにヘキサペプチドN-Cys-His-His-His-His-Gly-C(-CHHHHG)で誘導体化

した。5個のハイブリダイズした「トリアド」超構造全部の生成を示した。それらには、(1) 70 - CHHHHG / Cy3 - 71 - CHHHHG : キャップ - 72 - Np ; (2) 70 - CHHHHG / Cy3 - 71 - CHHHHG : キャップ - 72 - CHHHHG ; (3) 70 - CHHHHG / Cy3 - 71 - CHHHHG : キャップ - 72 - CFPSFG、が含まれる。さらなる実験において、3種の捕捉 p - RNA # 72 配列 (キャップ - 72 - Np、キャップ - 72 - CHHHHG および キャップ - 72 - CFPSFG) の、70 - BTR (ポジピテキサスレッド蛍光団) 配列および 70 - CHHHHG 成分ならびに Cy3 - 71 および Cy3 - 71 - CHHHHG 成分とのハイブリダイゼーションを示した。

【0130】

ELOCタイプ実験は、CHHHHGリガンド結合CHHHHGペプチド含む全 p - RNA - ペプチド「トリアド」に対する特異的金属リガンドとして NiCl₂ (10 μM) の添加を用いて、遂行した。10 μmNiCl₂で、70 - CHHHHG / Cy3 - 71 - CHHHHG : キャップ72 - Npでハイブリダイズした「トリアド」エレクトロニックT_mは、シグナル減失50%での260 nA ~ 280 nA範囲 (Niなし) から20%だけのシグナル減失の700 nA (Niあり) に上昇した。これは、Niリガンドが存在するとき非常に安定化した「超分子複合体」を示す。対照的にCy3 - 71 - CHHHHG : キャップ - 72 - NPを溶液中にNiが存在する場合と存在しない場合でハイブリダイズさせたが、エレクトロニックT_mには変化は観察されなかった。

【0131】

(実施例 6 - 10 , 000 部位のマイクロエレクトロニックアレイ上での p - RNA の 400 テスト部位への中等度密度アドレス指定の例証)

個々の部位の電流制御を使用する 10 , 000 の部位をもつ APEX チップは、アガロース : ストレプトアビジン浸透層で被覆した。300 部位を、正電位および 100 ナノアンペア (nA) の電流で同時に電子的にバイアスをかけた。p - RNA # 92 1 M を含む溶液を、バイアスをかけた部位の上に覆い、p - RNA を、浸透層に固定したストレプトアビジンと 4' - ビオチンの間に結合することによって固定した。p - RNA # 92 を含む溶液を除去し、1 M の p - RN

A # 7 2 を含む溶液で置換し、そしてさらに100部位に、電子的に100ナノアンペアの電流での正電荷でバイアスをかけ、p - RNAは、4' - ビオチンの、固定したストレプトアビジンへの結合によって固定した。p - RNA # 7 2 を含む溶液を除去し、蛍光色素シアニン3で標識したp - RNA # 9 1 1Mを含む溶液で置換した。

9 2 4' ビオチン - C - C - C - T - T - C - T - I - C - C - C - C - C - G - 2'

9 1 4' C - G - G - G - G - G - I - Cy 3 - 2'

7 2 4' ビオチン - C - C - T - T - C - I - C - C - C - C - C - 2'

【0132】

前記の2つのp - RNA結合例によって表される400部位に100ナノアンペアの電流での正電位で電子的にバイアスをかけ、そして、可動性p - RNAオリゴマー (Cy 3 標識した# 9) を、固定した捕捉鎖# 9 2 および# 7 2 で30秒間ハイブリダイズさせた。p - RNA # 9 1 を含む液を除去し、チップは洗浄して、残渣液を除去し、ついで蛍光計で像を出した。得られた像は、p - RNAオリゴマー# 9 1 がその適合する相補鎖# 9 2 にだけハイブリダイズし、非相補的鎖# 7 2 にはハイブリダイズしないことを立証した。これは、ハイブリダイゼーションで媒介された鎖の認識をもつ、中等度スケールの電子的に媒介されたハイブリダイゼーションを例証する (図14参照)。

【0133】

(例7 - p - RNA 繋ぎ鎖を介する新しい免疫試薬固定化技術の例証)

この実験については、相補的p - RNA構成の下記の対を、ストレプトアビジンおよびヤギアンチヒトF (ab')₂抗体からなるタンパク複合体のための固定化繋ぎ鎖として使用した:

8 0 4' ビオチン - I - G - G - G - A - A - G - G - G - 2'

8 1 4' ビオチン - C - C - C - T - T - C - C - C - 2'

5 4 4' ビオチン - T - A - G - G - C - A - I - T - 2'

7 9 4' ビオチン - A - I - T - G - C - C - T - A - 2'

【0134】

p-RNA # 81を用いて、APEXチップをカバーする浸透層中に固定されたストレプトアビジンにp-RNA # 81のビオチンを結合することによってp-RNA # 80に対する捕捉配列を提供することができた。ついで、p-RNA # 80のビオチンを用いてヤギ抗ヒトF(ab')₂抗体に化学的に接合していた可動性のストレプトアビジンに結合させた。ヤギ抗ヒトF(ab')₂抗体を用いて、ヒトIgG F(ab')₂抗体であるその特異的抗原標的を捕捉した。

【0135】

同様に、p-RNA # 54および# 79の相補的対を用いて、もう一つの固定化繋ぎ鎖を生成させた。p-RNA # 54は、浸透層中に固定されたストレプトアビジンにその4'ビオチンを結合させることによってAPEXチップを覆っている浸透層に固定した。p-RNA # 79を、その相補鎖# 54にハイブリダイズさせ、# 79の4'ビオチンを用いて、ストレプトアビジンとヤギ抗ヒトF(ab')₂抗体の可溶化した複合体のストレプトアビジンの半分を固定した。ついで、ヤギ抗ヒトF(ab')₂抗体を、ヒトIgG F(ab')₂抗体である、その標的抗原を捕捉するために免疫吸着剤として使用した。

【0136】

それぞれの捕捉p-RNA捕捉鎖(# 81または# 54)の選択性は、p-RNAの相補鎖(それぞれ、# 80または# 79)が溶液中でストレプトアビジン-ヤギアンチヒト抗体タンパク質複合体に結合し、それから捕捉物を含むAPEXチップにハイブリダイズされたとき、p-RNAはそれらのそれぞれの相補的固定化捕捉鎖だけに結合したタンパク複合体に付着したと、証明された。これは、均一溶液中に同時に存在する免疫学的試薬の地理的ソーティングを可能にする基礎を示す。

【0137】

(実施例8 - 個別の検体検出と組み合わせさせた同時多重均一アッセイを達成するための新しい方法の例示)

例7からのp-RNA配列の相補的ペア、例3からの免疫学的な試薬を使用し、そしてヒト絨毛膜性ゴナドトロピンのネズミのモノクローン抗-サブユニット

に、化学的に結びつけられたストレプトアビジンからなる第二のタンパク複合体を含めて、2つの異なる抗原の同時免疫学的検出が成し遂げられた。p-RNA捕捉鎖は、2個の抗原標的が適当なp-RNA捕捉鎖によって区別して検出されるように、それらのそれぞれの相補鎖の間で成功裏に認識された。蛍光的に標識した抗原が抗体と相互作用するところでのように、任意にサンドイッチフォーマット検出を利用することができる。

【0138】

これは、多重同時免疫反応が、個々の免疫反応の各々の特定の抗原標的の個々の検出と結びついて、溶液中で実行される可能性を示す。抗原標的検出の分離は、それらのそれぞれの補体が選択的抗原標的検出を達成するp-RNA鎖の選択性を利用することによって達成される。検出は、直接検出（たとえば、電氣的、光学的または他の直接検出）による、あるいは、蛍光標識した抗体の使用を通してのような、サンドイッチフォーマットによることができる。

【0139】

（実施例9 - サブライブラリーによるターゲッティングからのデータのデコンボリューションに対する解析アルゴリズムの例示）

以下は、薬物/リガンド結合実験の後、ELOCコンビナトリルアレイから出てくる、大量のデータをデコンボリューションし、解析するために用いられるアルゴリズムのタイプの説明であるこの種の解析は、ELOCアレイの分子ディスククリプター性質を決定するために重要である。マリノフスキーとハウワリー（E. R. マリノフスキーおよびD. G. ハウワリー、「化学における因子分析」、ジョンワイリーアンドサンズ、ニューヨーク、1980年）は、測定値の元のデータを再現するために結合することのできる因子と呼ばれる測定値のような測定データの一セットから同じ次元の抽象的なデータのセットを見つける、モデルから独立したアプローチのための数学的技法を記述した。これらの因子の数学的誘導は、各因子が他の因子によって説明されないデータセットにおける最大量の分散を説明するようなものである。

【0140】

行列として表現することができるデータのセットはどれも、因子分析によって

処理することができる (P. M.フレデリクス、J. B. リー、P. R. オズボーンおよびD. A. J. スウィンケルス、「FT-IRスペクトルを用いる材料のキャラクタリゼーション。パート2：数学的かつ統計学的考察」、Applied Spectroscopy、39巻、2(1989年)、311頁)。そのようなデータは、各カラムが1セットの測定された値(強度対時間、電圧、濃度など)を含む行列として処理することができる。実験を通して、10,000試験部位(コンビナトリアルチップ/アレイの上で)で検出された強度の30個のモーメントまたはスナップショットから来る条件(温度、pH、イオン強度、ストリンジェンシーなど)の変数を含むデータ行列は、時間、温度または他の変化するパラメータの30個のモーメントを通して出てくるシグナルの動的表現となるであろう。強度測定値は、第一番目に、光学フォーカスにおいて発見される分子の表現として考えられるので、線形相関モデルの使用は、場所ごとの類似のチップイベントのクラスター解析のためにならびに、ノイズの逓減および生み出された大きいデータセットにとっての合理的時間における、理想化されたシグナルの発展およびシグナル相関の再構成(再結合)のために、非常に有用であると分かる。

【0141】

因子分析フォーマットを用いるデータ処理のシミュレーションは、カラム1中のモーメント1、カラム2中のモーメント2(条件)、等々での、10,000のテスト部位(コンビナトリアルテストチップ/アレイの上で)で測定した強度を示す。したがって、最大30因子セットに対する、(f)選ばれた直交性因子によるデータセットの再構成は、次式によって与えられる：

データマトリックス[10000×30]=可変ローディングマトリックス(要因)
[10000×f]×スコアマトリックス[f×30]。

【0142】

因子スコアは、各因子(1~30)に帰される増量因子である。SN比以下の寄与による因子は、実質的な物理的または実験的意味のない非相関的ノイズと考えられる。しかし、(形態または強度における)類似事象を示すチップ位置は、その主要な因子において類似の寄与を示すであろう。第一の2因子カラム(可変

ローディングマトリックス)のプロットは、しばしば事象に関しての位置類似性を確認するための十分な情報をもたらす。図26は、一組30点(トータル1に規格化された、30条件-時間、温度、ストリンジェンシーなど-による)の3位置での規格化された強度から出発する典型的測定値のシミュレーションを示す。図27は、根底にある理想化されたシグナル生成を示す。実際、我々は、成長とシグモイド減衰をもつ7位置、単純なシグモイド減衰をもつ3位置、および実験を通じて線形強度減衰をもつ残りの9990位置、に対する対合する事象の実現可能なシグナルを計算した。図28は、上に述べたような、第一の主要な原因となる因子だけのプロットにおいての、優れたかつ顕著な集積性を示す。7つの相関する位置は左下部に一つのクラスターとしての類似事象を示し、上右側にある3つの位置は、同一の線形的シグナル生成をもつ集積した事象の一群からなる。上の線形方程式および $f = 2$ を使用しての、事象の再計算は、3つの位置に対する理想化されたノイズ逡減事象をもたらす。この手順は、結合における類似性、共通ペプチド配列の群形成およびサブユニットの同じセットに相当するが、固定化した化学種と可溶性サブユニットに関して違ったふうに分散しているペプチド配列を確認するという可能性を調べるために、前もって処理されたデータでもって使用することができる。

【0143】

明晰さと理解のために、上記の発明を、図と実例によってやや詳細に記載したが、添付した特許請求の範囲の精神またはスコープから反れることなく、ある種の変更および修飾をなしうることは、当業者にとって本発明の教示の光において容易に明らかである。

【図面の簡単な説明】

【図1】

基本的なp-RNAユニット構造およびp-RNA分子のリン酸ジエステル骨格構造を示す。

【図2】

p-RNAの平面的またはラダー様構造と比較したDNAの基本的な2本鎖ラセン構造を示す。

【図3】

コンビナトリアルE L I A Sプロセスのためにハイブリダイゼーションシステムまたは対合システムを形成するのに使用される3つのp - RNA配列(A、BおよびC)の基本的な構造を示す。

【図4】

E L I A Sプロセスのための分子間リガンド結合超分子構造を生成する、p - RNAペプチドから誘導された(A、BおよびC)3つの構造の基本的な形を示す。

【図5】

リガンド分子とp - RNA - ペプチド「トリアド」構造の間の基本的な超分子複合体の生成を示す。分子間構造は、リガンド結合分子のある場合およびない場合の両方で生成することができる。しかし、結合されたリガンド分子をもつ分子間構造が通常より安定な形である。

【図6】

超分子の複合体がマイクロエレクトロニックアレイ上の特定のテスト部位の上で生成する、E L O Cプロセスの基本的な要点を示す。

【図7】

完全にハイブリダイズされた7量体p - RNA(A)、7量体p - RNA(B)および相補的14量体p - RNA(C)のための構造全体を示す。

【図8】

六量体ペプチド「トリアド」構造の次元幾何学および立体構造を示す。該図はまた、ペプチド「トリアド」の収束点からのアミノ酸R基の相対的な距離を示す。

【図9】

ビオチンリガンド分子を結合している全p - RNA - ペプチドトリアド超構造の分子模型を示す。ビオチン部分はC P K空間配置モデルを使用して作られている。

【図10】

図10 aはアセチルコリン分子の基本的な構造を示す。図10 bはマイナスに

荷電した結合ポケット内の望ましいペプチドトリアド結合構造中のアセチルコリン分子を示す。図10cは正に荷電した結合ポケットをもつ望ましくないペプチドトリアド結合構造を示す。

【図11】

図11aはデュプレックスペプチドリガンド結合構造をもつ分子間リガンド結合超分子構造体を示す。図11bはクアドラプレックスのペプチドリガンド結合構造をもつ分子間リガンド結合超分子構造を示す。図11cは複合的なトリアドペプチドリガンド結合構造をもつ、分子間リガンドを結合する超分子構造を示す。

【図12】

分子ディスクリプターアレイ表面の一例を示す。その表面において、あるテスト部位領域が薬物有効性に関する超分子複合体生成を示し、他の領域は毒性または無効性に関係している。

【図13】

図13は分子間リガンドを結合している超分子の構造を示す。ここで、好ましくないp-RNA-ペプチド構造(図13a)を曲げて、特異的薬物分子を結合することができるより良いコンフォメーション(図13b)に導くエレクトロニック乱れが用いられる。

【図14】

p-RNAの相補的および非相補的配列をもつ30個のミクロンテスト部位を有する10,000個のテスト部位のマイクロエレクトロニックアレイの一部の位置指定およびその後の、蛍光標識の相補的p-RNA配列とのハイブリダイゼーションを示す。

【図15】

ELOCフォーマット1(一過的動的平衡トリアド生成プロセスとしても知られている)を示す。

【図16】

図16a、bおよびcはELOCフォーマット2または均一なトリアド生成プロセスを示す。

【図17】

ELOCフォーマット3または不均一のトリアド生成プロセスを示す。

【図18】

合成抗体としてp-RNA-ペプチドトリアドを使用する多重化を示す。

【図19】

p-RNA抗体接合体およびマイクロエレクトロニックアレイを使用しているモジュラーイムノアッセイを示す。

【図20】

図20aはテキサスレッド(4'-I-G-A-A-G-G-G-TR-2')、I=トリプタミンおよびTR=テキサスレッド)で2'末端の位置に標識した、合成した7量体p-RNAの構造を示す。図20bは図20aの分子のマスペクトルを示す。

【図21】

ビオチンを結合した相補的B92配列(4'-ビオチン-C-C-C-T-T-C-T-I-C-C-C-C-G-2')でハイブリッドされた、テキサスレッドを標識したTR90配列(4'-I-G-A-A-G-G-G-TR-2')の構造を示す。また、ハイブリダイズされた対の熱変性に対するUV淡色性曲線を示す。

【図22】

テキサスレッドを標識したTR90配列(4'-I-G-A-A-G-G-G-TR-2')およびシアニン-3蛍光染料標識したCy3-91配列(4'-Cy3-C-G-G-G-G-I-2') (両方ともビオチンを結合した相補的B92配列(4'-ビオチン-C-C-C-T-T-C-T-I-C-C-C-C-C-G-2')でハイブリッドされている)の構造を示す。また、ハイブリダイズされた対の熱変性に関するUV淡色性データを示す。

【図23】

合成され、特性評価された、多重トリプタミンリンカー(4'-C-C-I-I-I-G-G-2')をもつp-RNA配列の1例を示す。また、ハイブリッドされたペアに関するUV淡色性および融解特性を示す。

【図24】

図24 aはトリプタミンリンカーを介して付着した2個のペプチド鎖をもつ二重トリプタミン p - RNA構造を示す。図24 bは図24 aの分子のマススペクトルを示す。

【図25】

図25 aは1個の超分子構造に組み込まれた4個のペプチド残基を示す。図25 bはUV淡色性曲線を示す。それは、2本鎖 p - RNA - ペプチド構造の融解が約50 で起ることを示している。

【図26】

典型的ノイズの重なった、一組30点(30個の条件 - 時間、温度、ストリンジェンシーなどによる。ここでは合計1に正規化されている)の、3個の位置での正規化された強度から始まる典型的測定のシミュレーションを示す。

【図27】

基本的な、理想化されたシグナル発生グラフを示す。

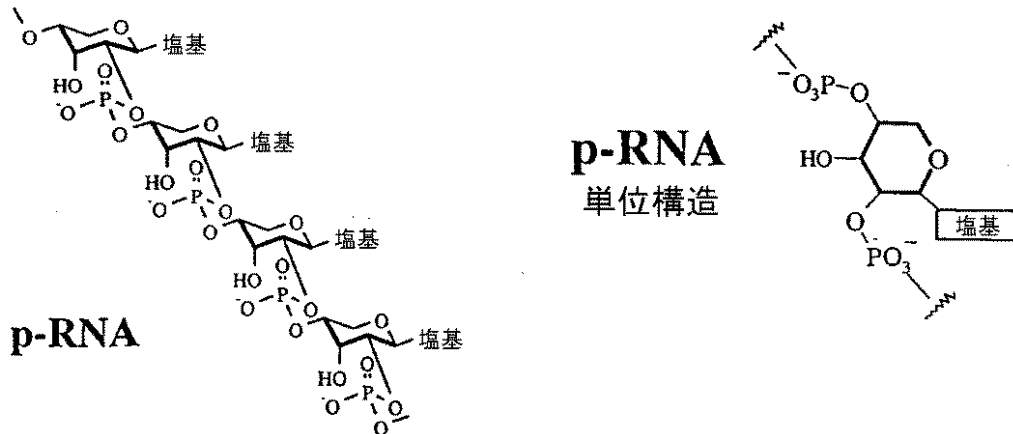
【図28】

絶対値で $\pm 25\%$ (50%)のノイズのシミュレーションを付けた、10,000部位のアレイ上の、シグナル発生因子分析集団のプロットを示す(因子1(縦軸)対因子2(水平軸)を示す)。

【図1】

Figure 1 - p-RNA 構造

ピラノシル-RNA



有利な特性：

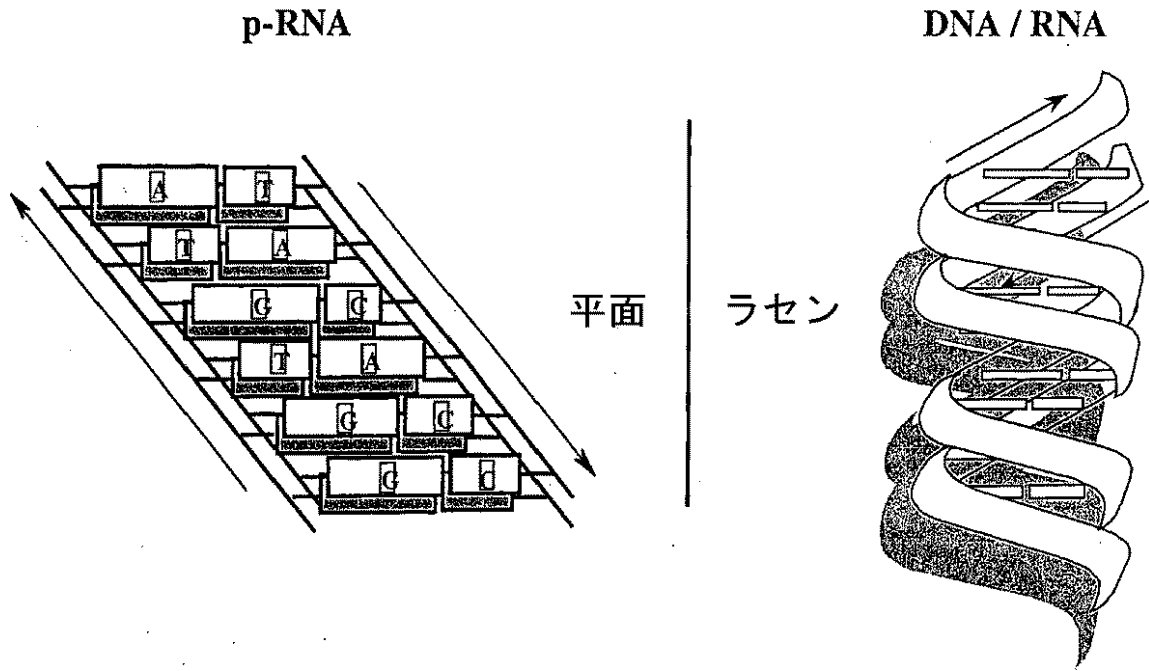
専らワトソン-クリック対合態様

専ら反平行ストランド向き

- DNAまたはRNAにおけるよりも安定なデュプレックス
- デュプレックスは準線状ラダー構造を有する。
- 対合はエナンチオ選択的である。
- 酸素なくして複製する能力
(かくして、RNAに対して前生物的先祖か?)
- DNAまたはRNAとの対合無し

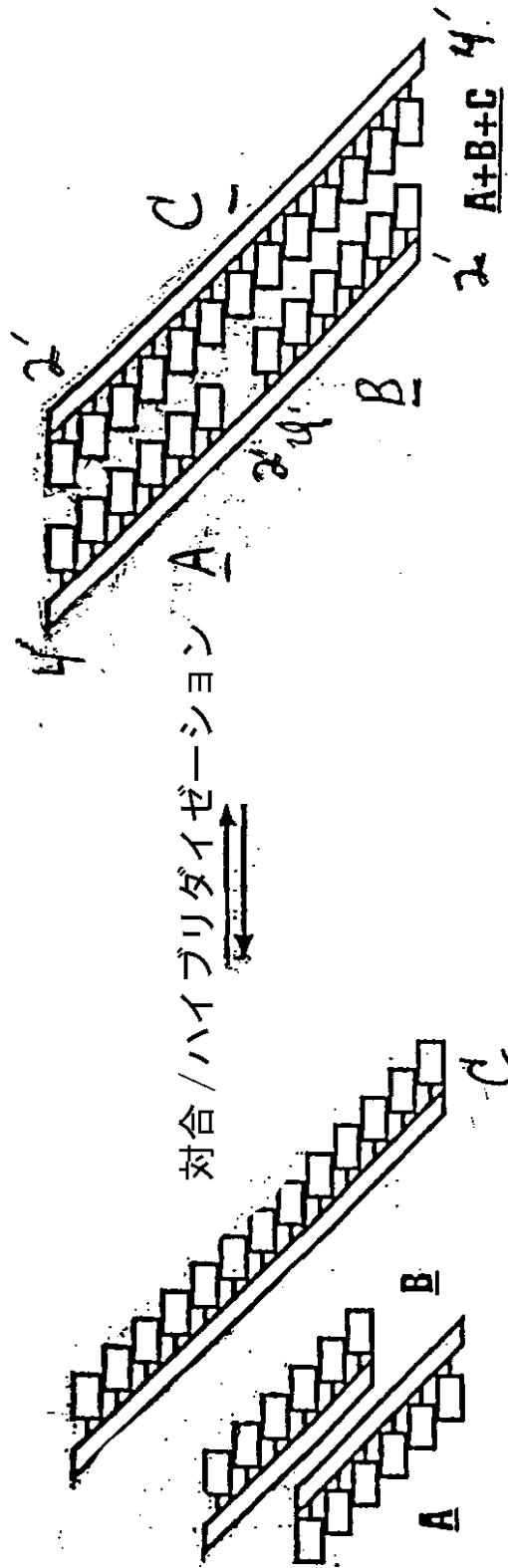
【図2】

Figure 2 - p-RNA平面およびDNAラセン構造



【図3】

Figure 3- p-RNAの成分A, BおよびC



p-RNA 成分
A, BおよびC

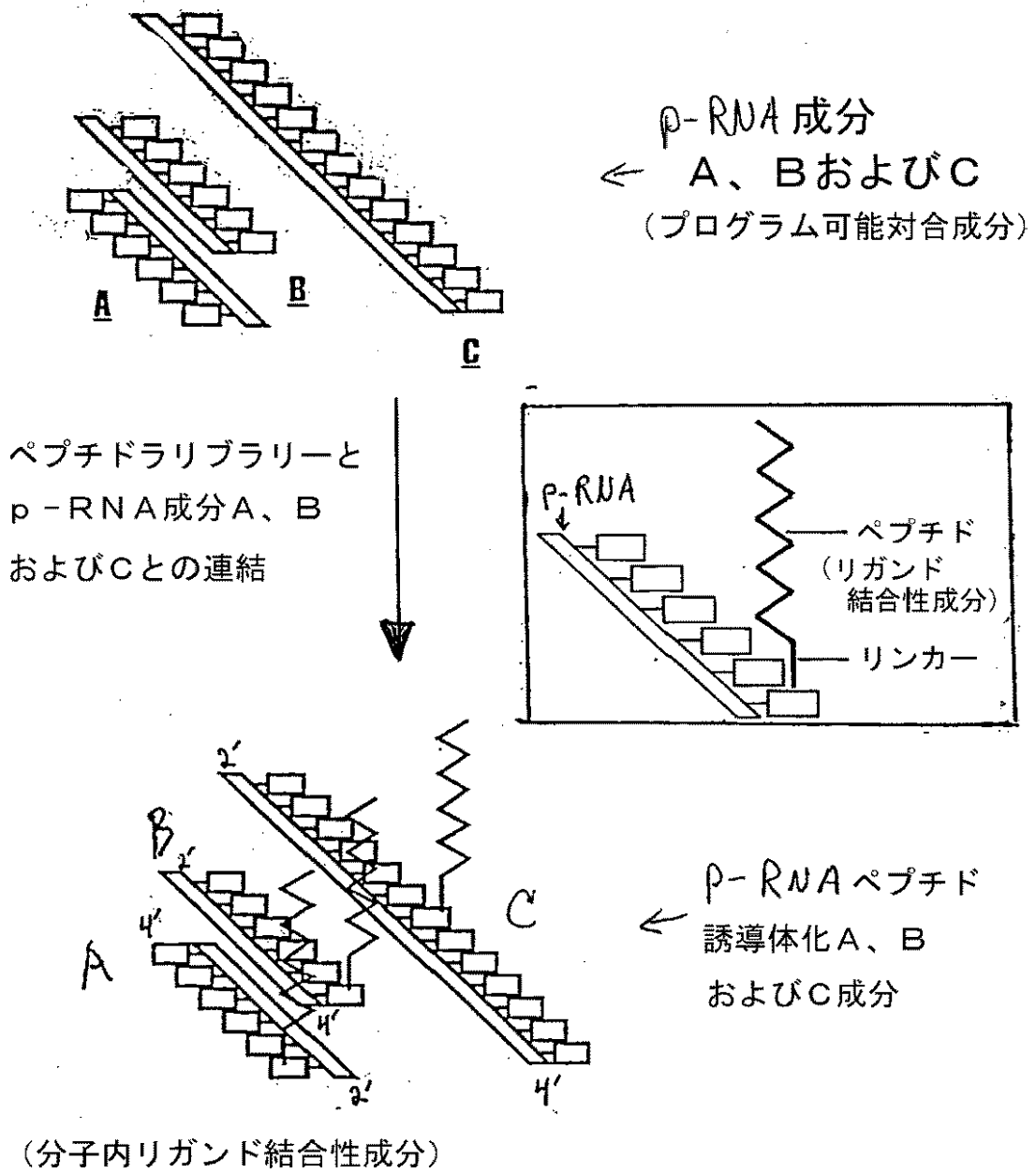
対合およびハイブリダイゼーション

p-RNA 成分
A, BおよびC

非対合

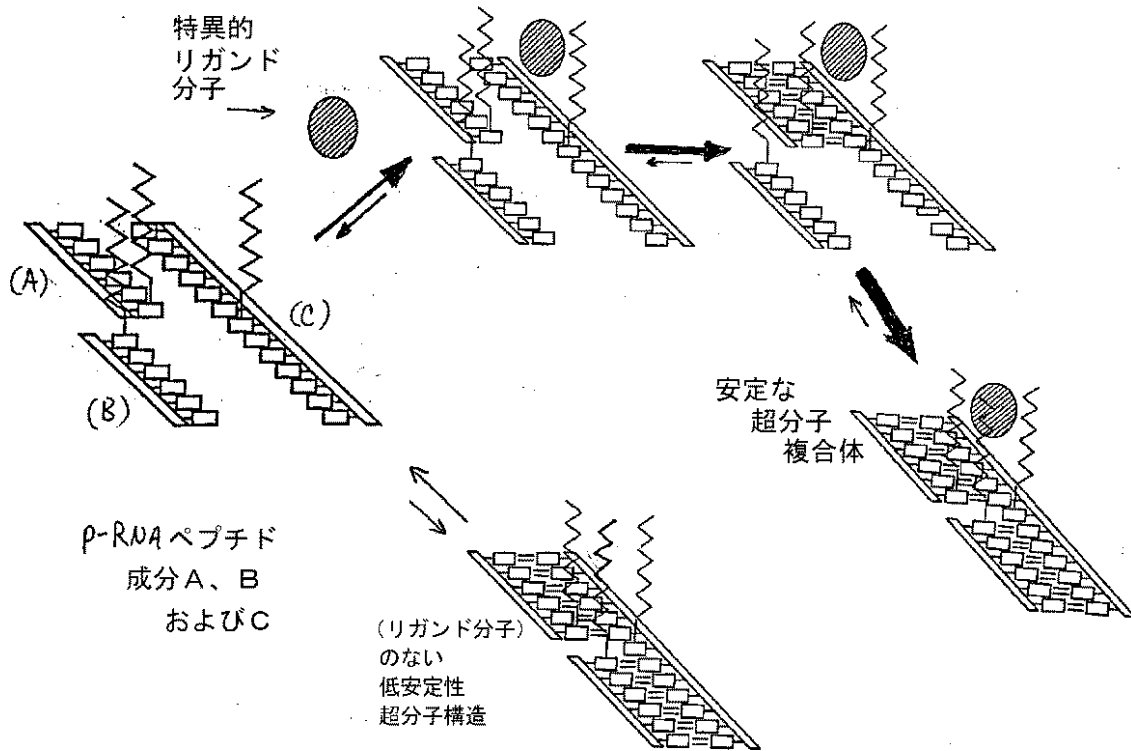
【図4】

Figure 4- p-RNAペプチド誘導体化A, B およびC成分



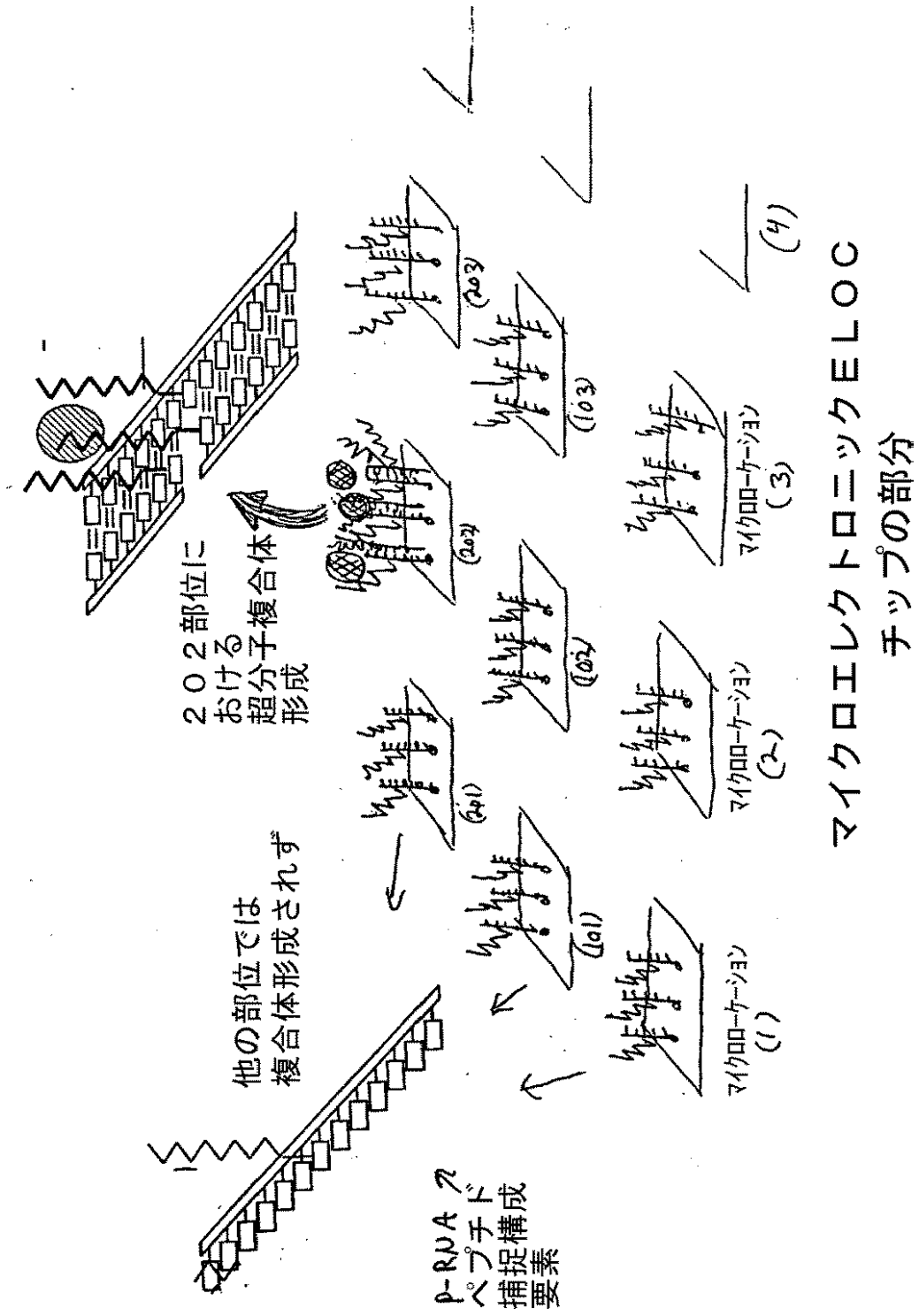
【図5】

Figure 5- リガンド分子とでの超分子複合体形成



【図6】

Figure-6 アレイ上でのELOCプロセスおよび超分子複合体



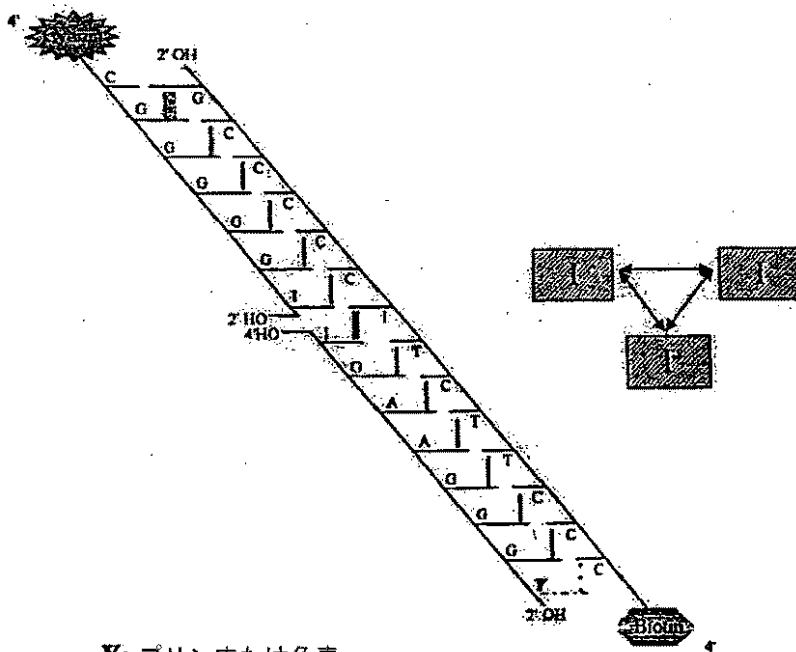
【図7】

Figure 7 - 十分にハイブリダイズした7量体
p-RNA A、7量体 p-RNA B、および相補的
捕捉 p-RNA C

オリゴ 90: 4' IGAAGGGY 2'

オリゴ Cy91: 4'シアニン-CGGGGGI 2'

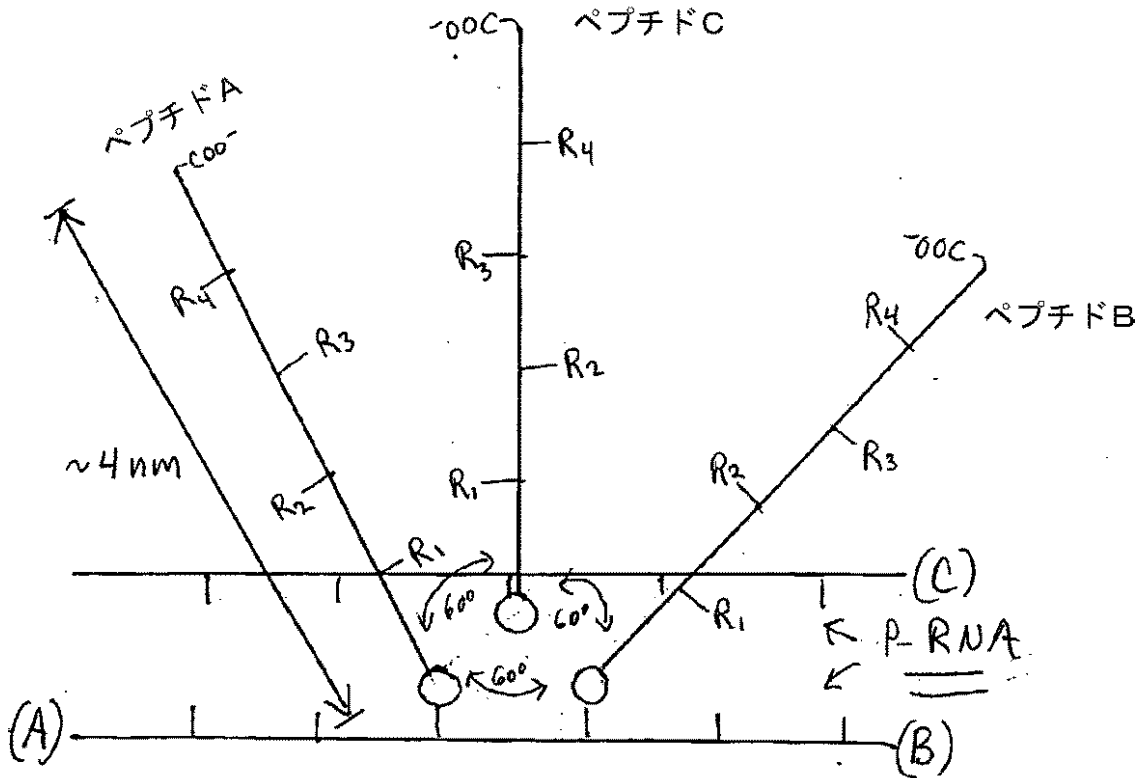
オリゴ Biot92: 4'ビオチン-CCCTTCTICCCCCG 2'



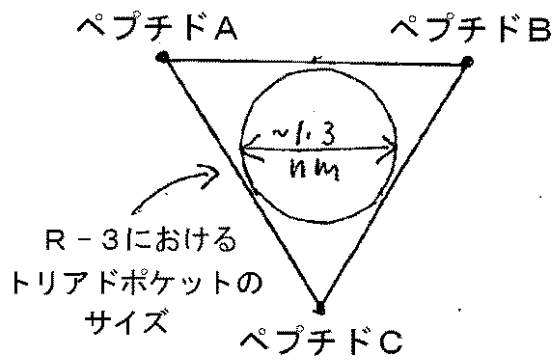
Y: プリンまたは色素

【図8】

Figure 8- 六量体ペプチドトリアドの寸法幾何学

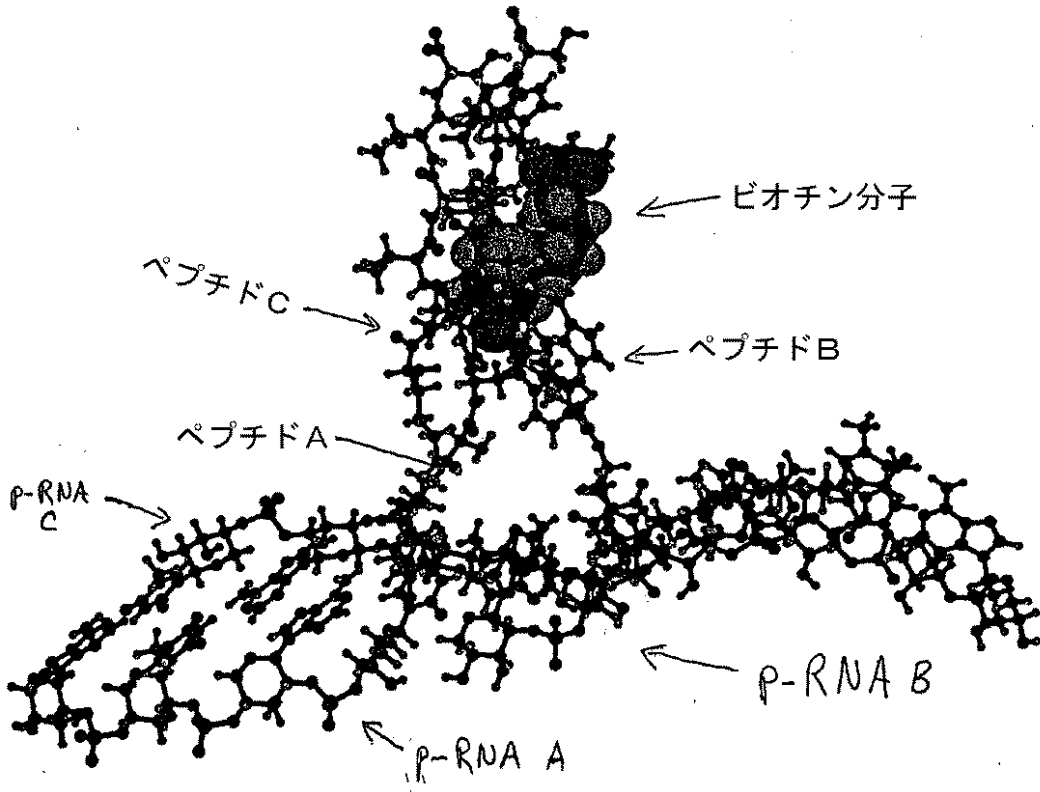


- アミノ酸R基
- $R_1 \sim 0.6 \text{ nm}$
 - $R_2 \sim 0.96 \text{ nm}$
 - $R_3 \sim 1.3 \text{ nm}$
 - $R_4 \sim 1.7 \text{ nm}$



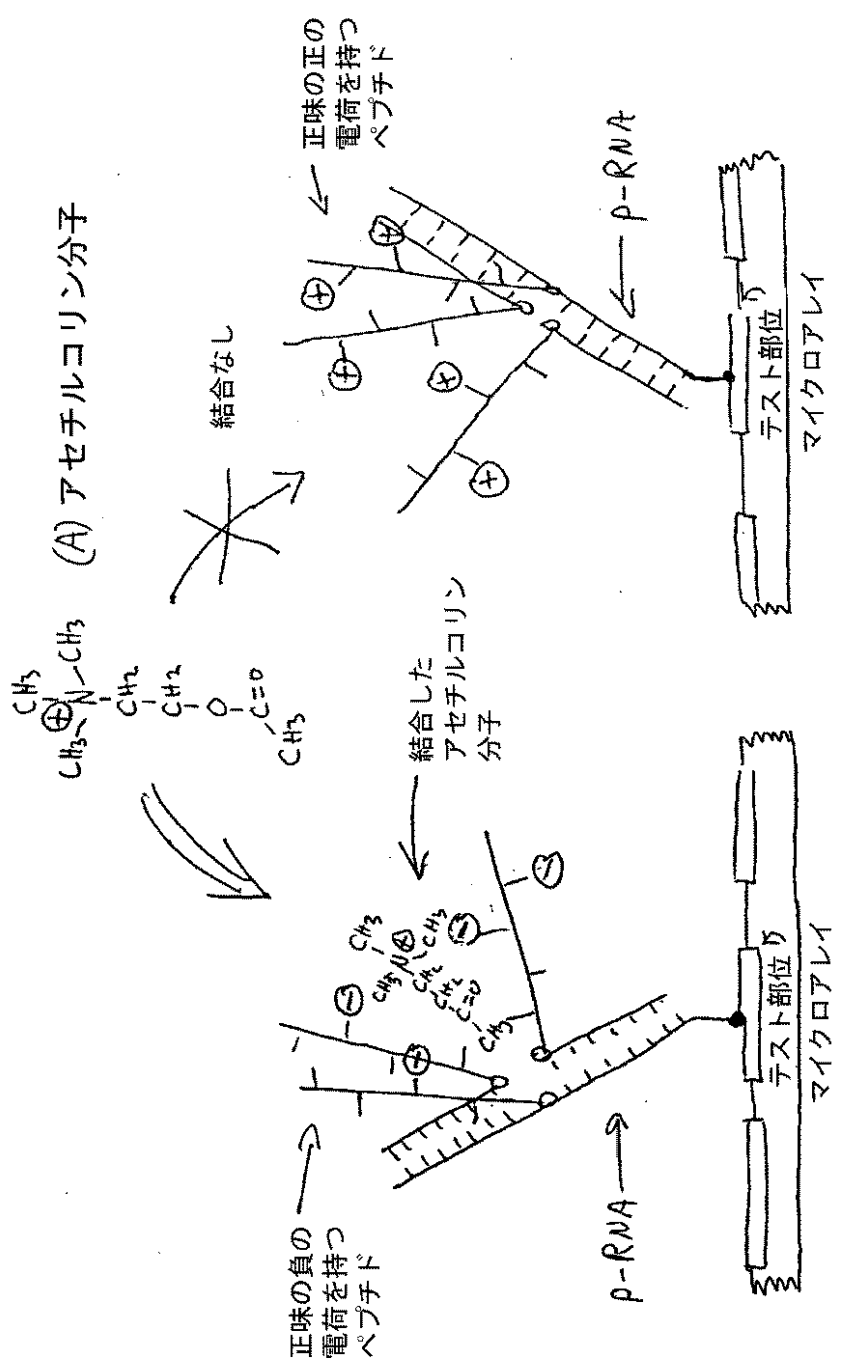
【図9】

Figure 9 - ビオチン分子を結合させるp-RNA-ペプチド
「トリアド」超構造複合体



【図10】

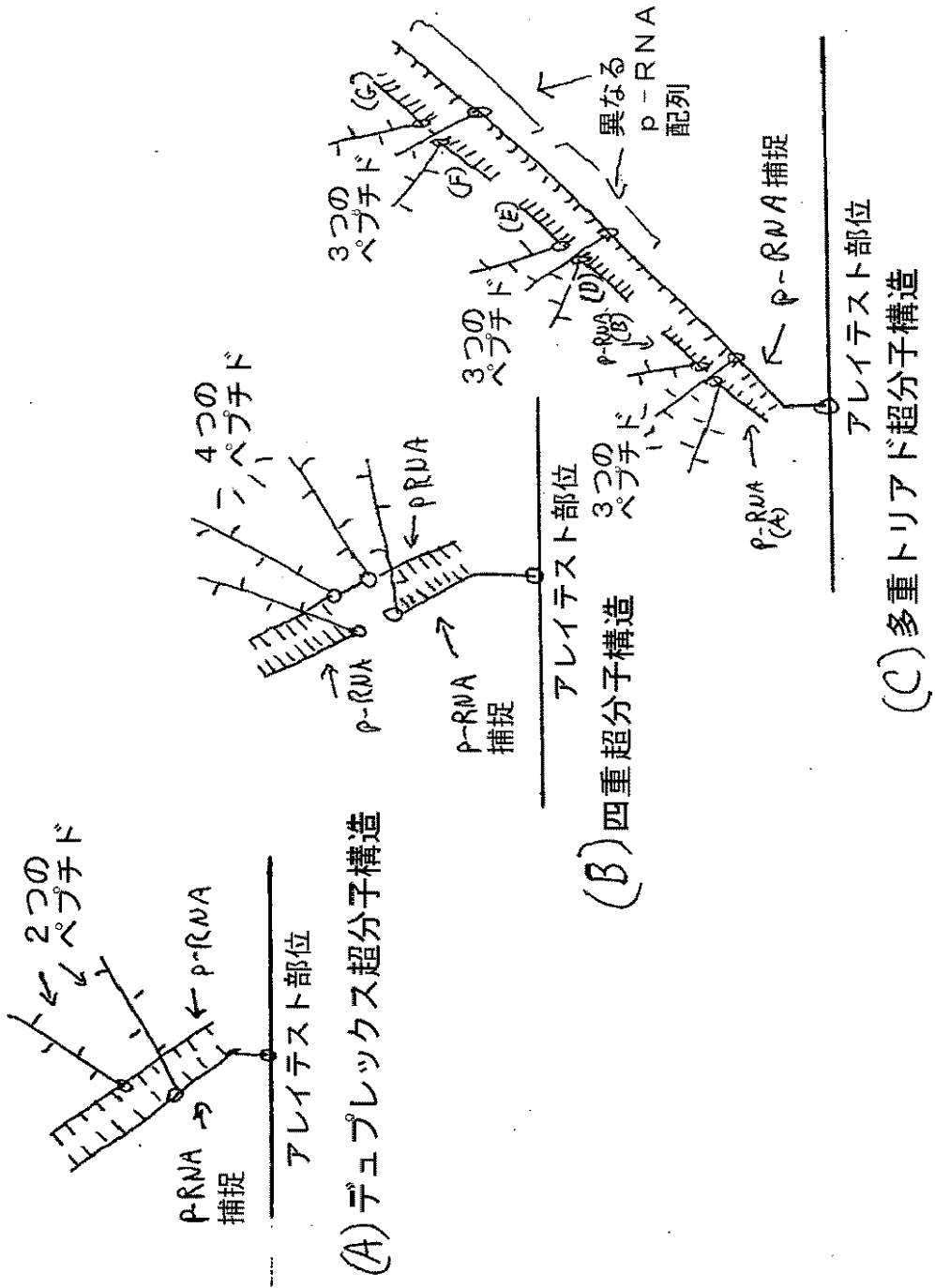
Figure 10 - アセチルコリンを結合させるのに好都合なおよび不都合なペプチドトリアド



(B) アセチルコリンについての好都合な ペプチドトリアド結合部位
 (C) アセチルコリンについての不都合な ペプチドトリアド結合部位

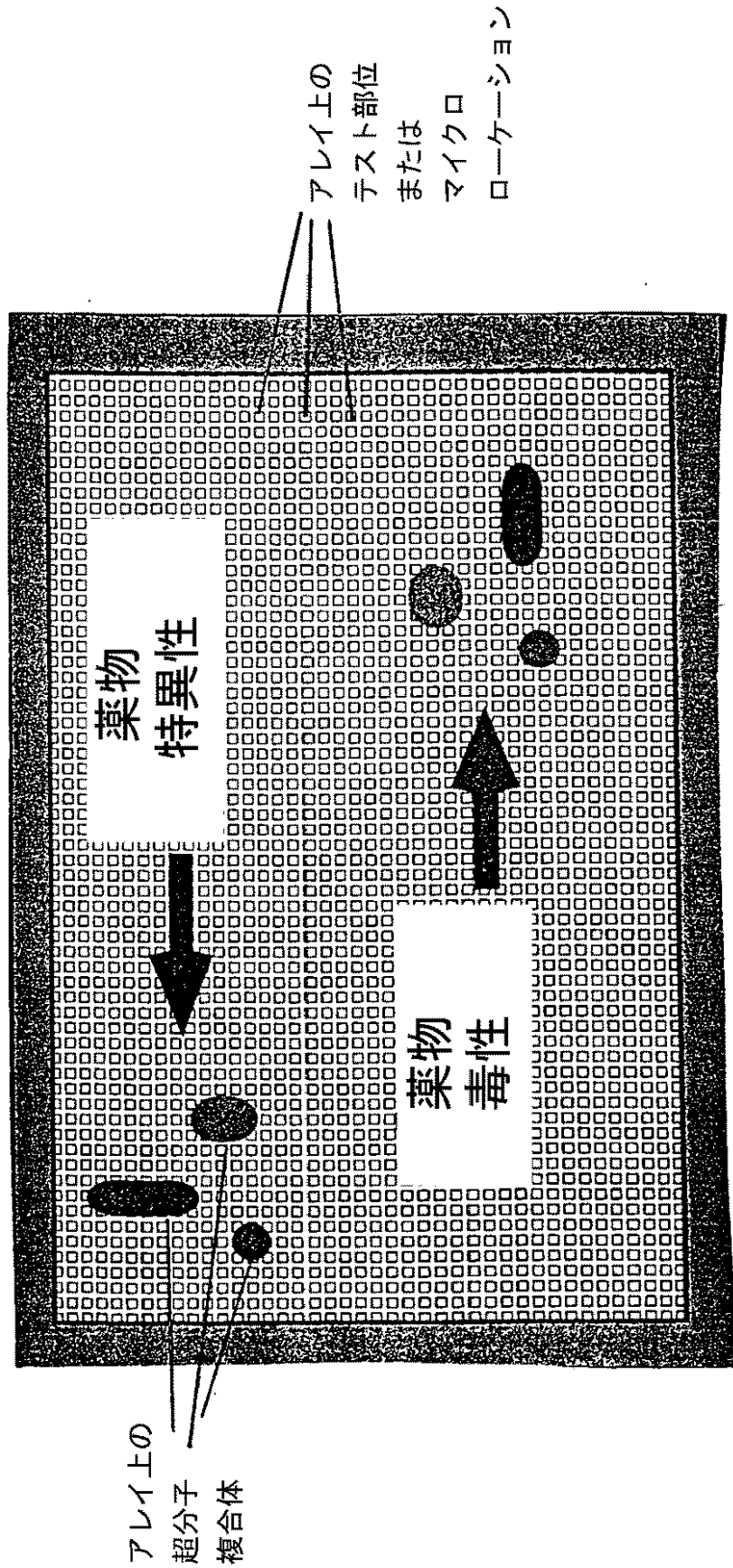
【図11】

Figure 11 - 他の超分子構造



【図12】

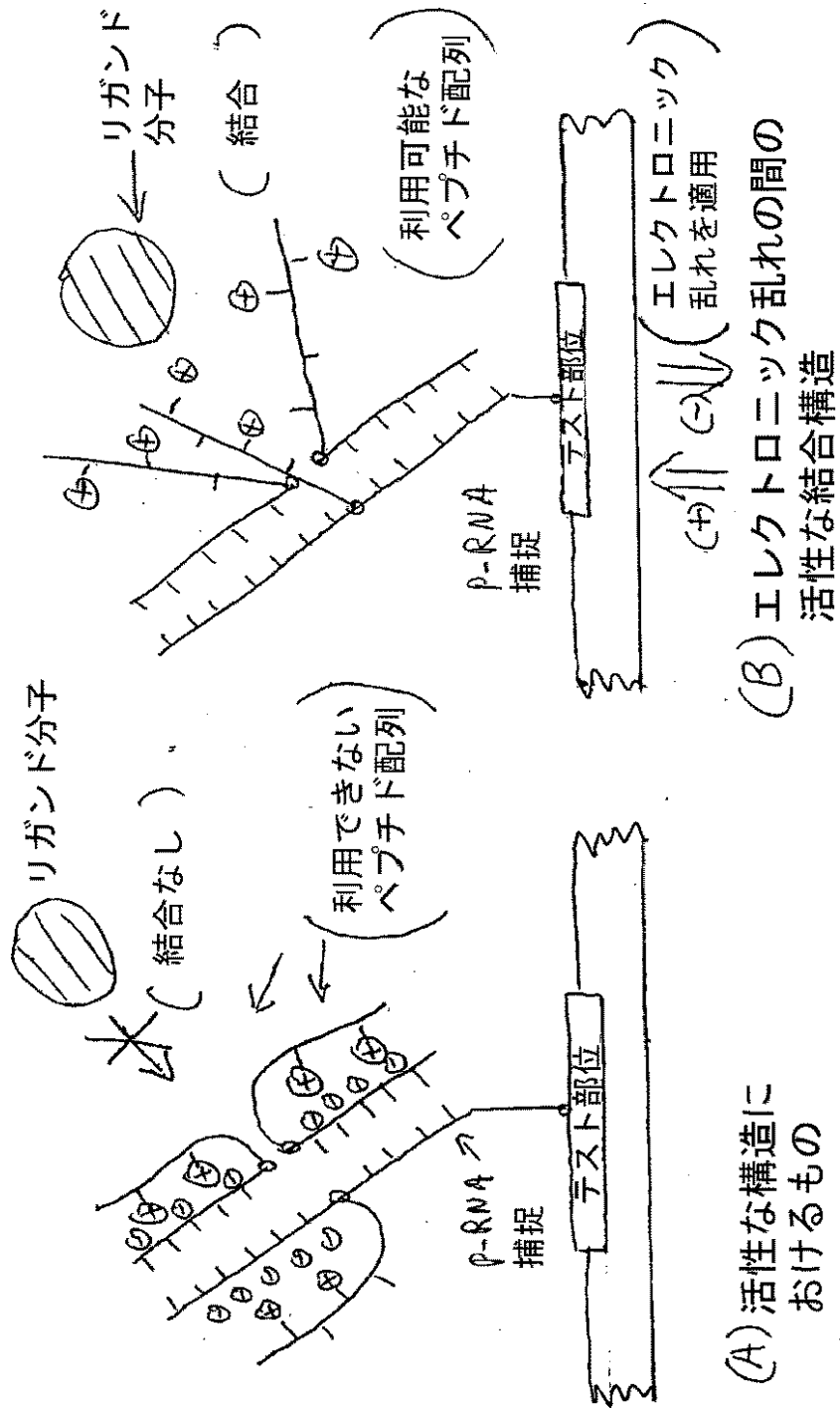
Figure 12 - 分子ディスプレイアレイ



マイクロエレクトロニックアレイの部分

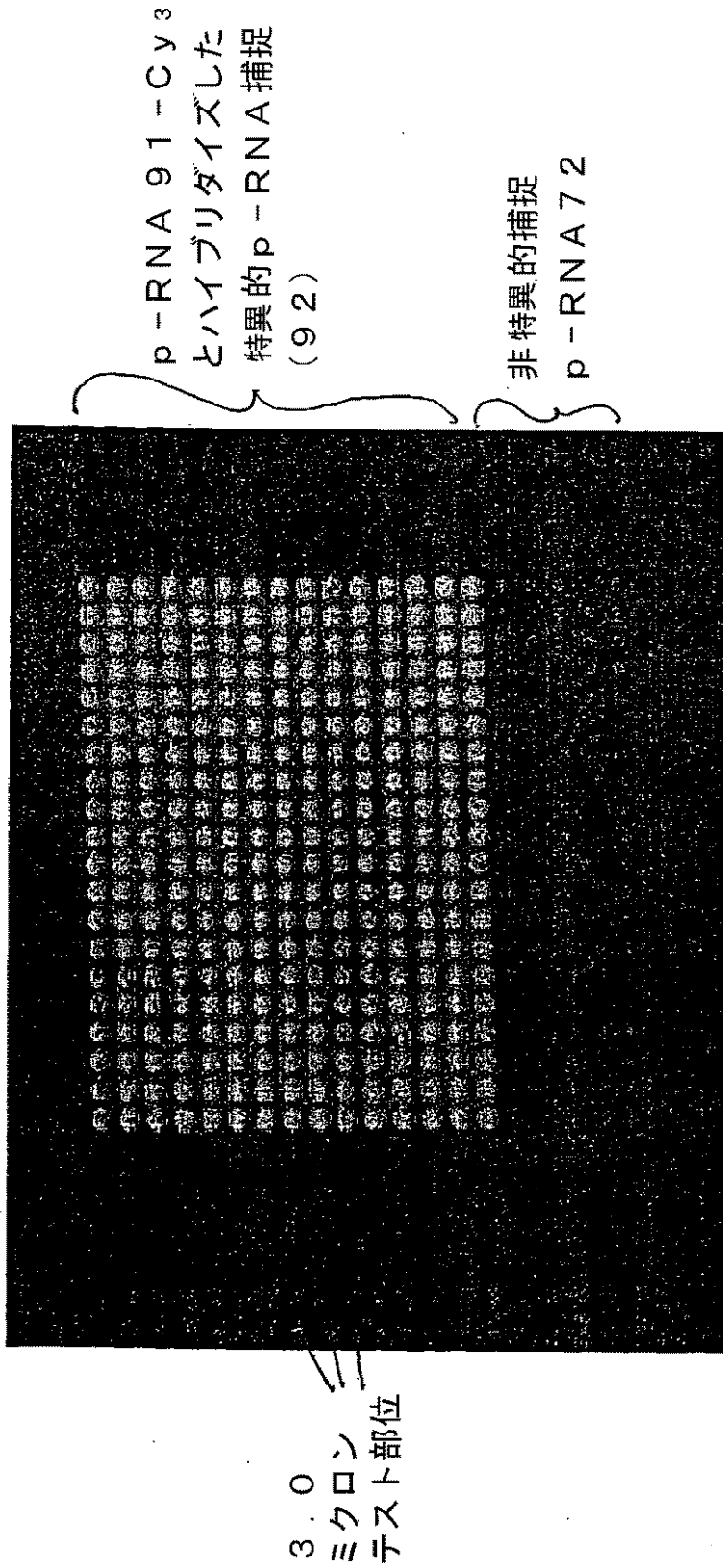
【図13】

Figure 13 - リガンド結合を改良するための エレクトロニック乱れ



【図14】

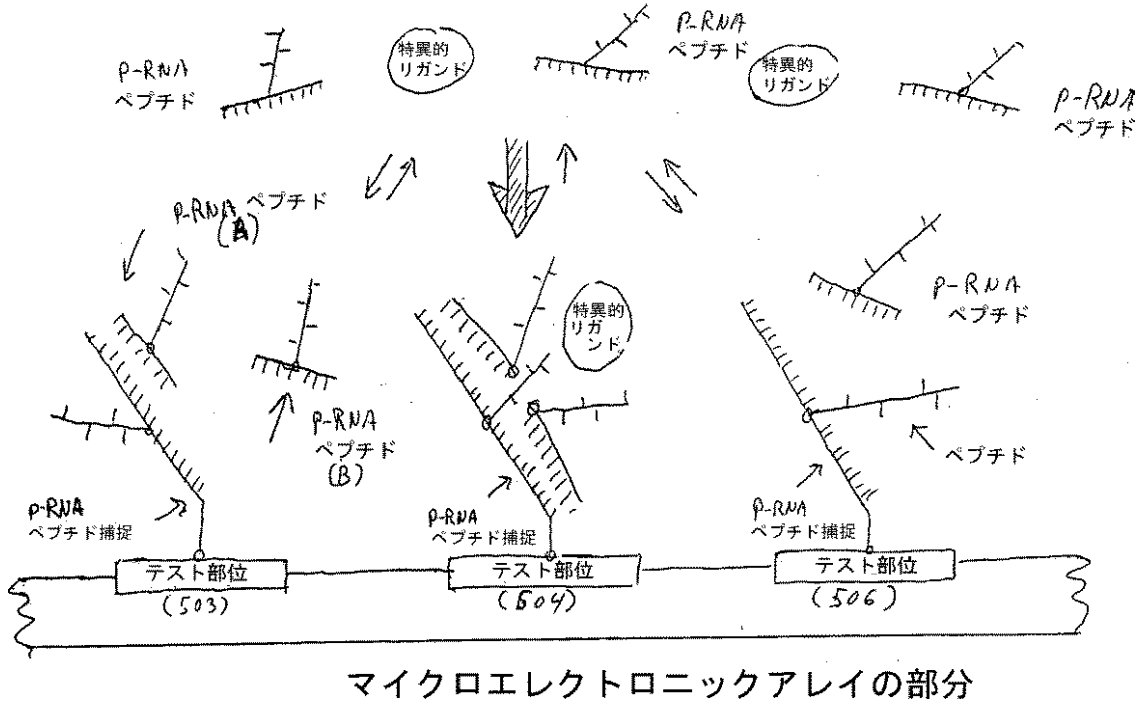
Figure/4-10000 部位マイクロエレクトロニックアレイ
上での特異的 p-RNA ハイブリダイゼーション



10000 部位マイクロエレクトロニックアレイ上の部分

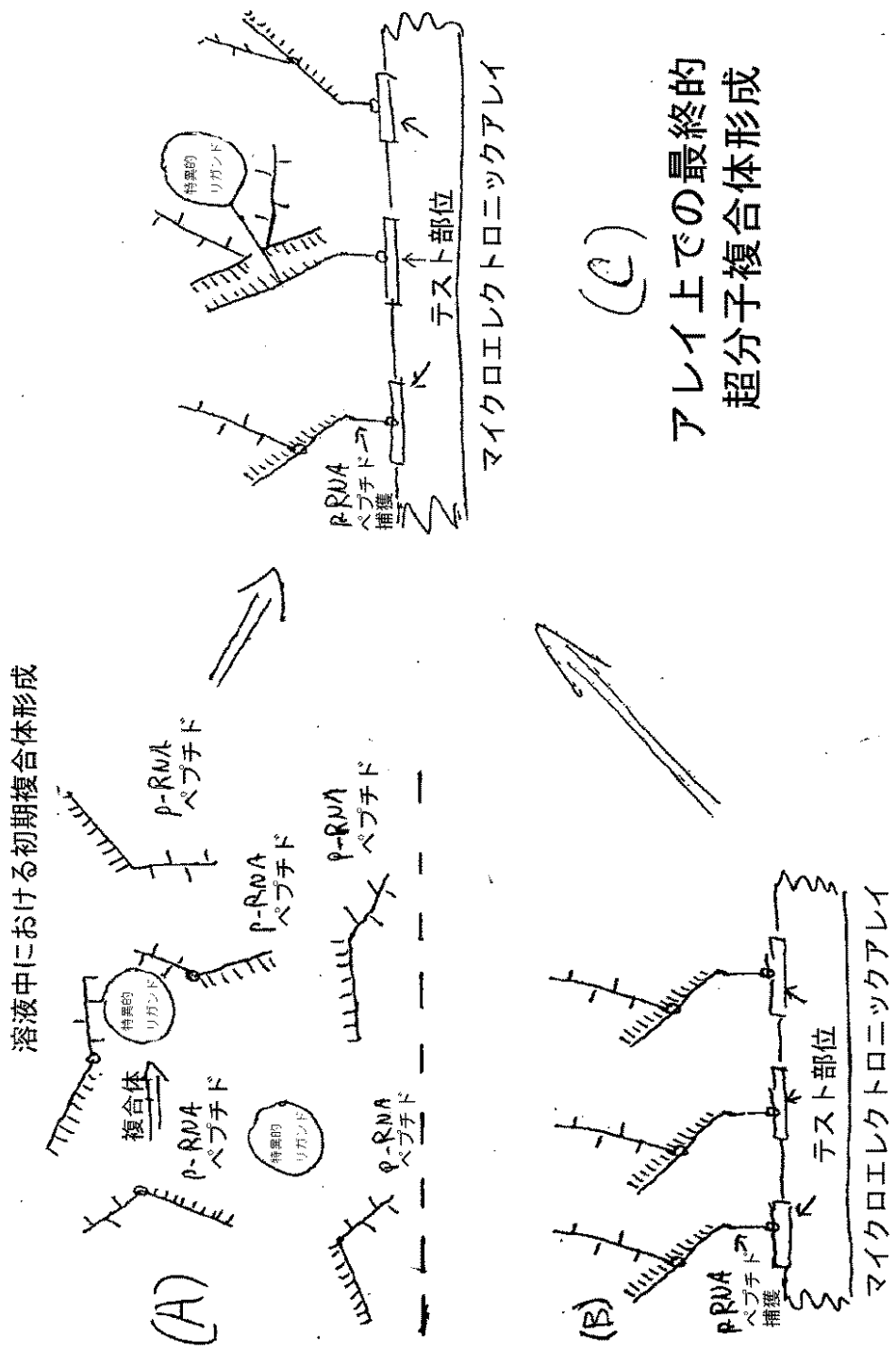
【図15】

Figure 15- ELOCフォーマット1-一過的動的平衡トリアド形成



【図16】

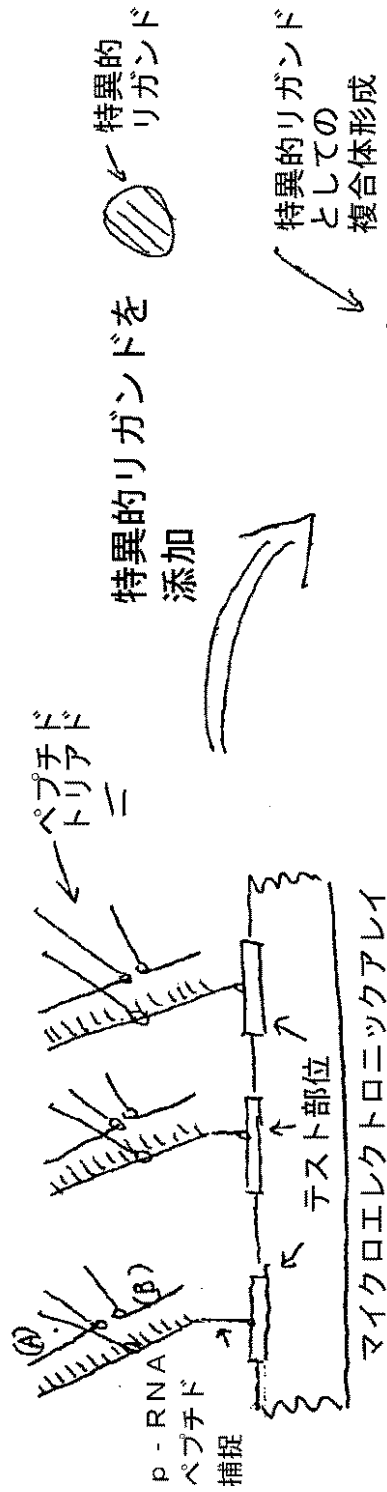
Figure 16 - ELOCフォーマット2 - 均一トリアド形成プロセス



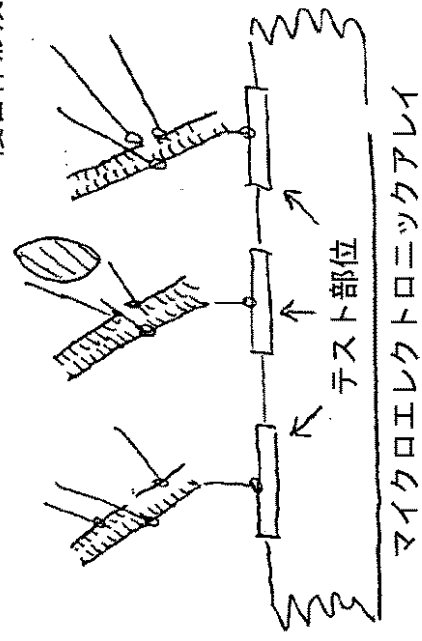
【図17】

Figure 17-E LOCフォーマット3-不均一トリアド
形成プロセス

(A) アレイ上での全ての超分子構造の初期形成

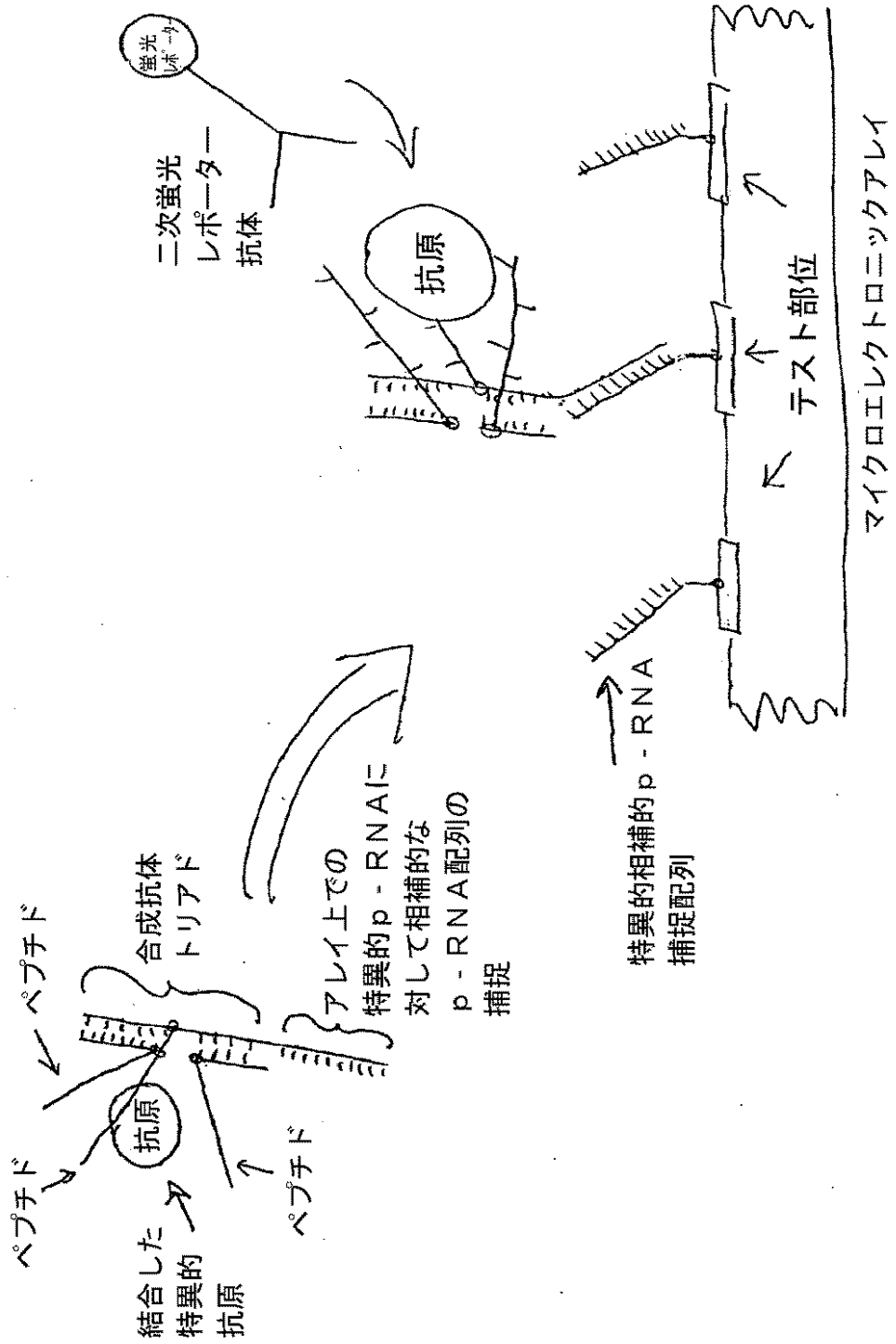


(B) アレイ上での
超分子
複合体の
二次的形成



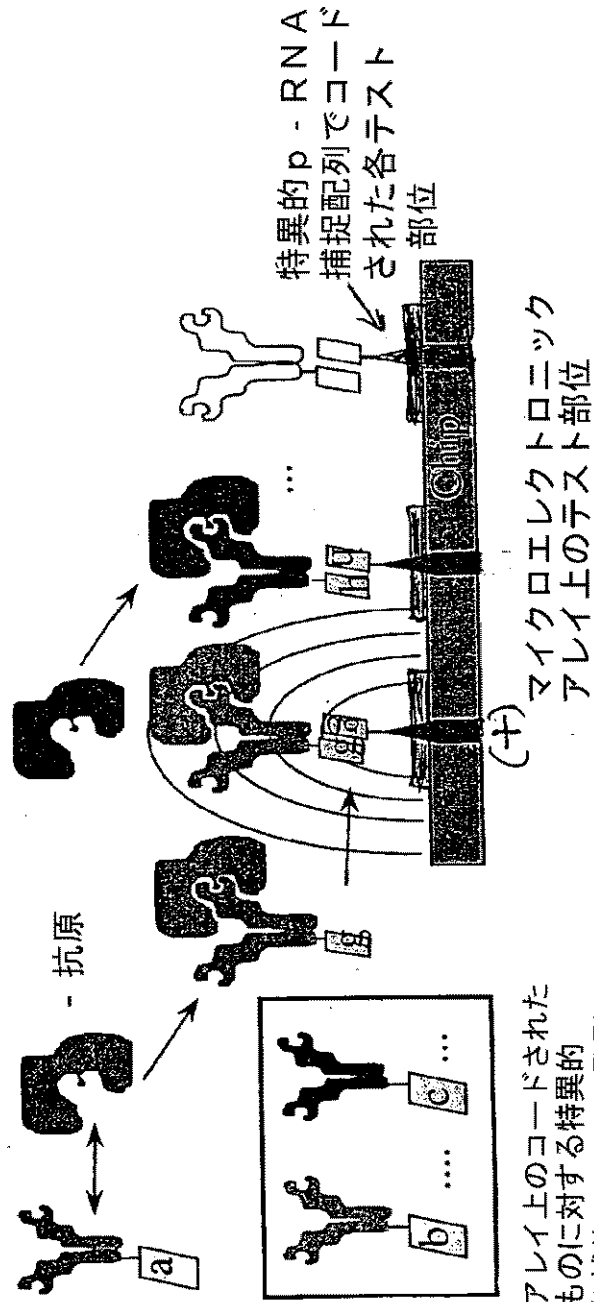
【図18】

Figure 18 - 免疫アッセイのための合成抗体としての多重 p-RNA - ペプチドトリアド



【図19】

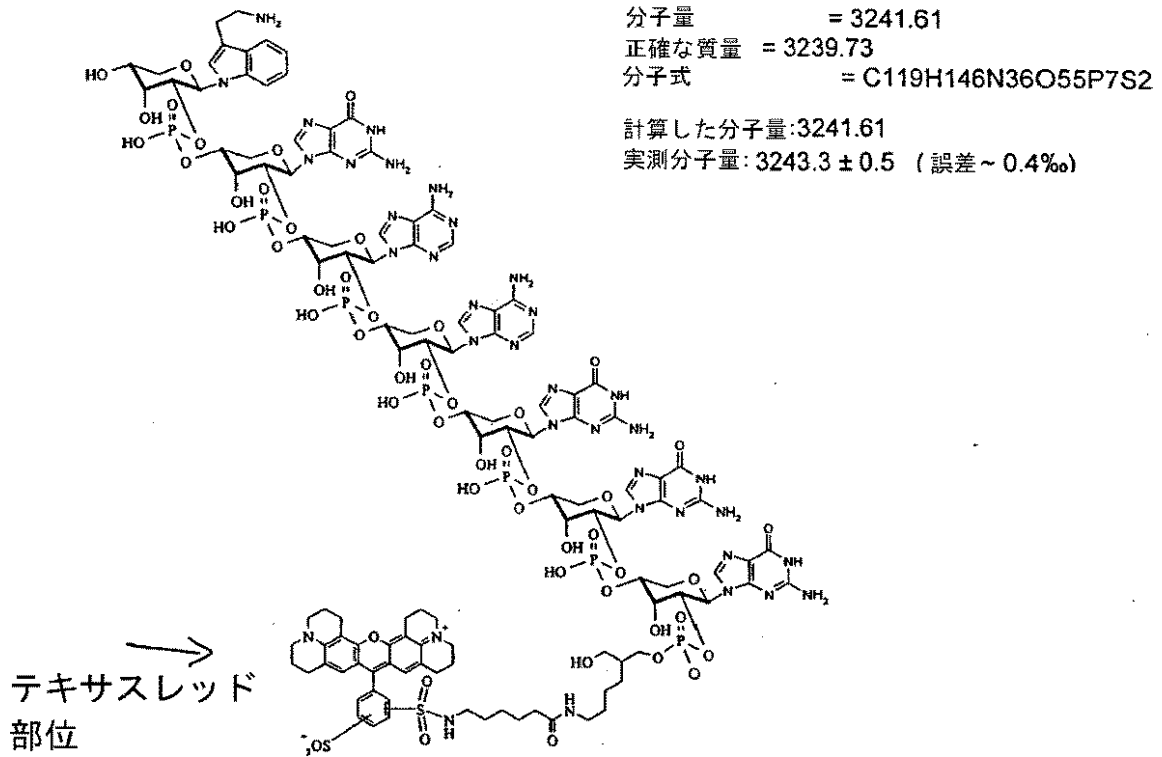
Figure-19 - マイクロエレクトロニックアレイ上のp-RNA
抗体コンジュゲートを用いるモジュラー免疫アッセイ



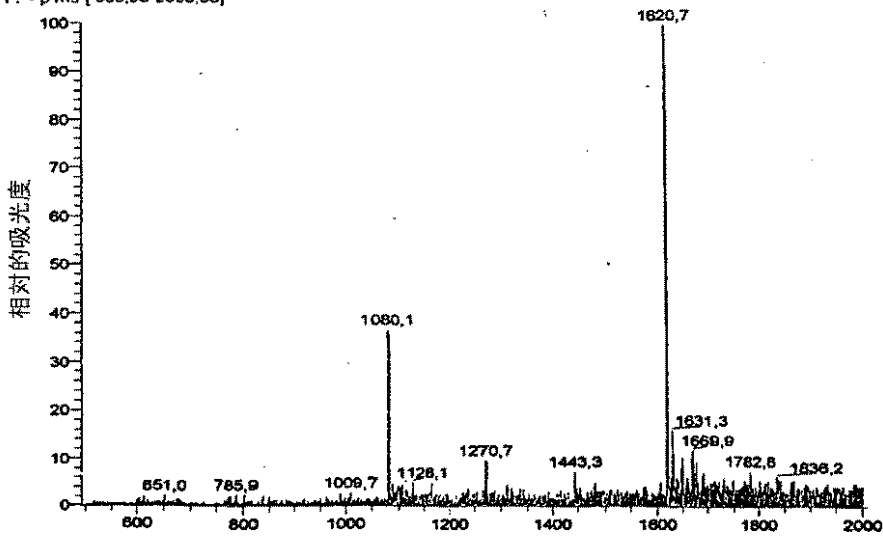
アレイ上のコードされた
ものに対する特異的
相補的p-RNA配列で
コードされた特異的抗体

【図20】

Figure 20 - TR-90-p-RNAコンジュゲート についての構造および質量分析



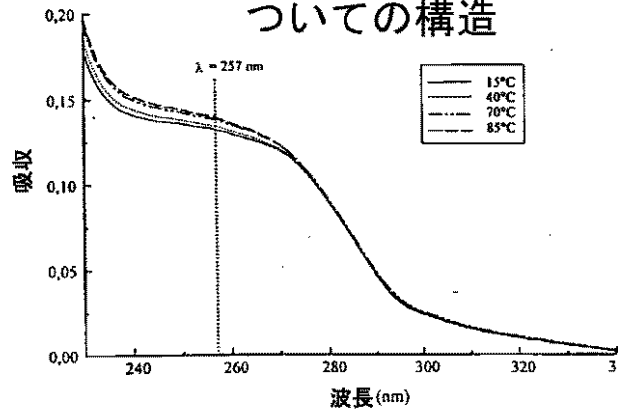
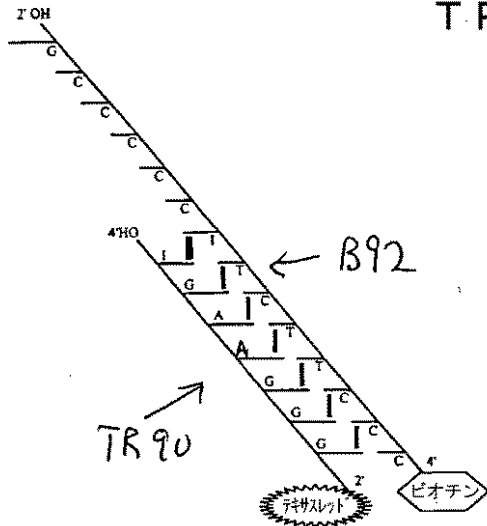
990566es1#13-15 RT: 0.49-0.56 AV: 3 NL: 6.96E3
F: - p ms [500.00-2000.00]



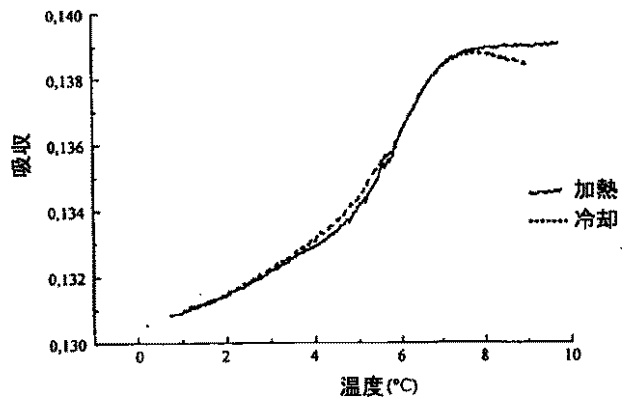
【図21】

オリゴ TR90: 4' IGAAGGG-テキサスレッド^{2'}
 オリゴ B92: 4' Biotin-CCCTTCTICCCCG^{2'}

Figure 21-ハイブリダイズした
 TR-90およびB92配列に
 ついての構造



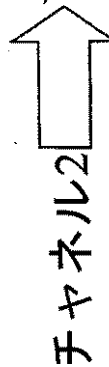
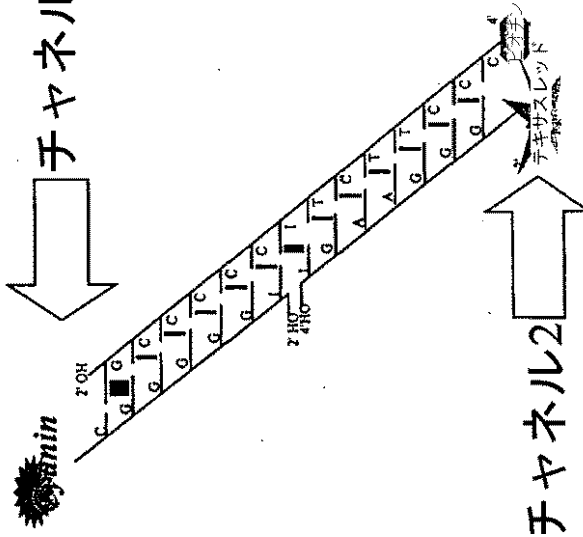
$T_m = 59\text{ }^\circ\text{C}$
 トリス/HCl 0.01M ; pH 7
 0.15 M NaCl
 $c = 5\text{ }\mu\text{M} + 5\text{ }\mu\text{M}$



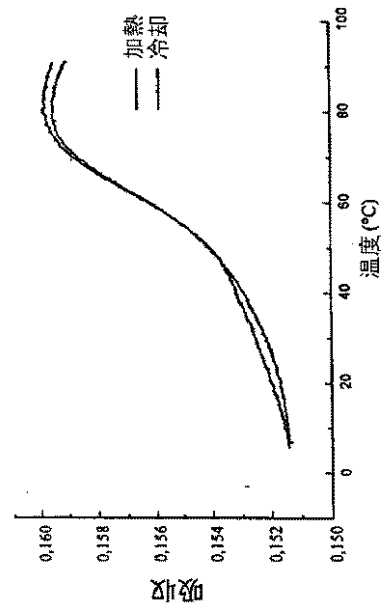
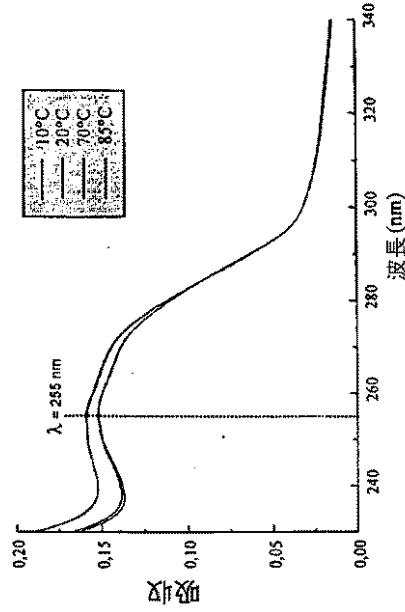
【図22】

Figure 22
 ハイブリダイズしたTR
 90、Cy3-91、
 およびB92p-RNA
 コンジュゲートについて
 の構造

オリゴ TR-90: 4' IGAAGGG-TexasRed 2'
 オリゴ Cy3-91: 4' Cyanine3-CGGGGGI 2'
 オリゴ Biot-92: 4' Biotin-CCCTTCTICCCCCG 2'

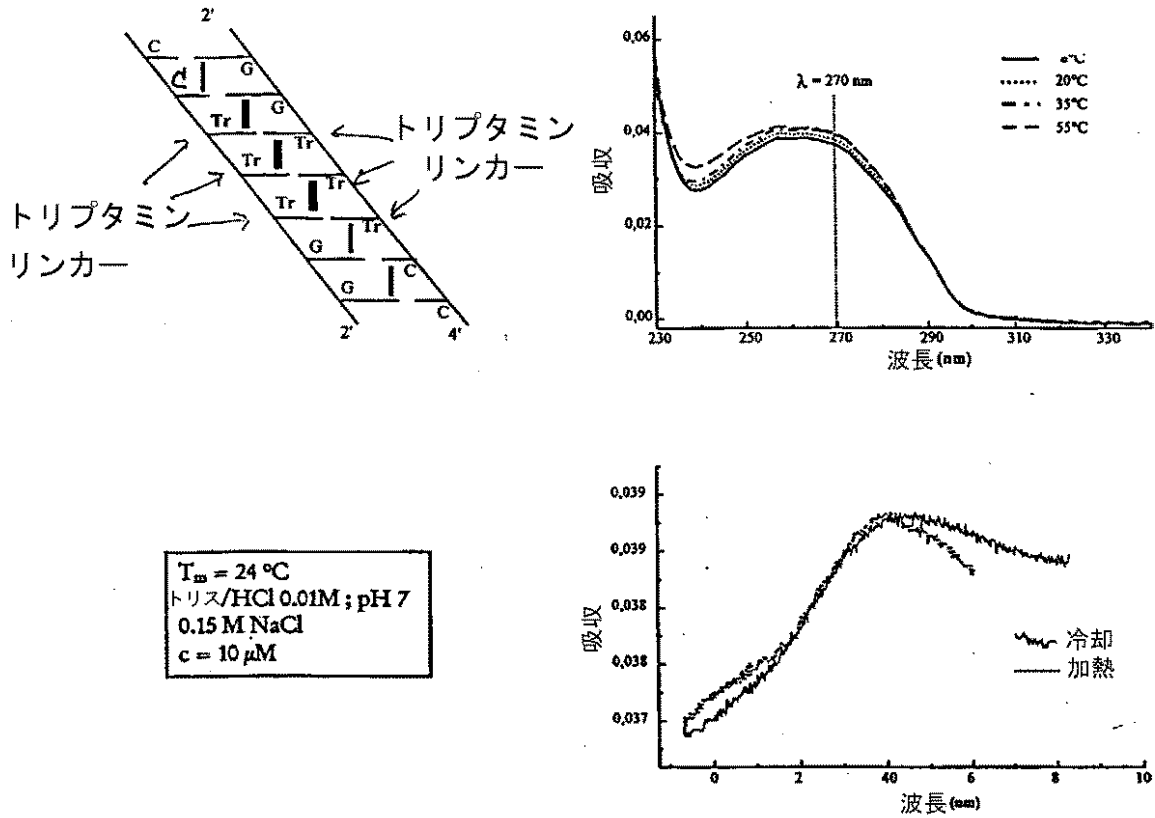


$T_m = 61^\circ\text{C}$
 トリス/HCl 10.0mM pH7
 0.15M NaCl
 0.5mM Mg²⁺ + 5mM



【図23】

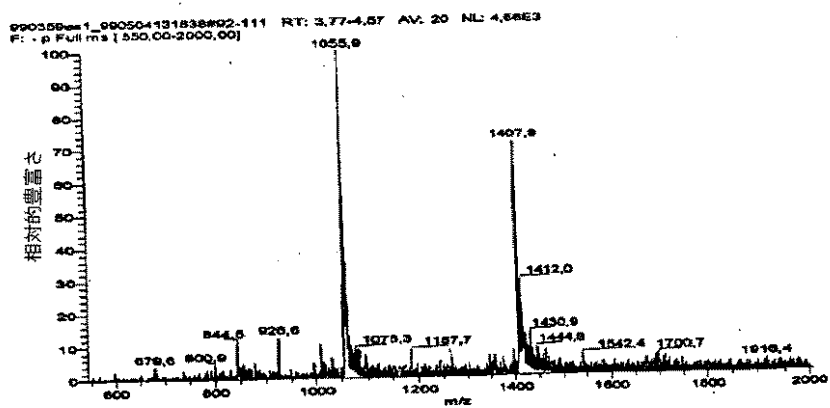
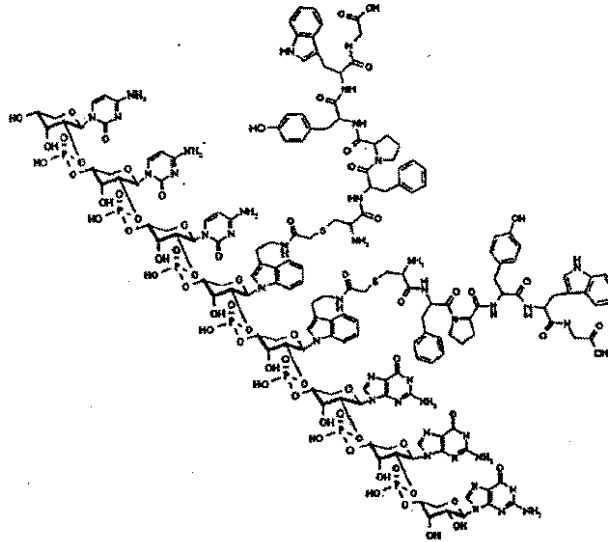
Figure 23-複数トリプタミンリンカーを持つ p-RNA配列



自己対合性 p-RNAオリゴマー⁴ CCTrTrTrGG²の熱力学的データ

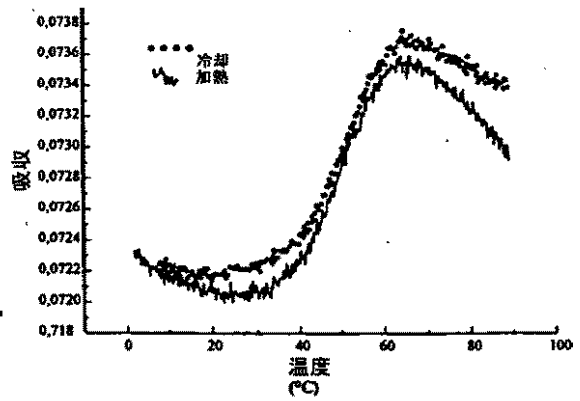
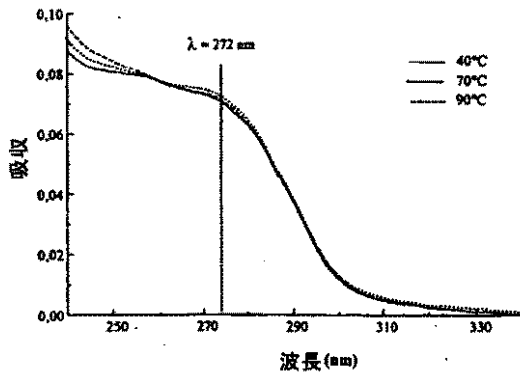
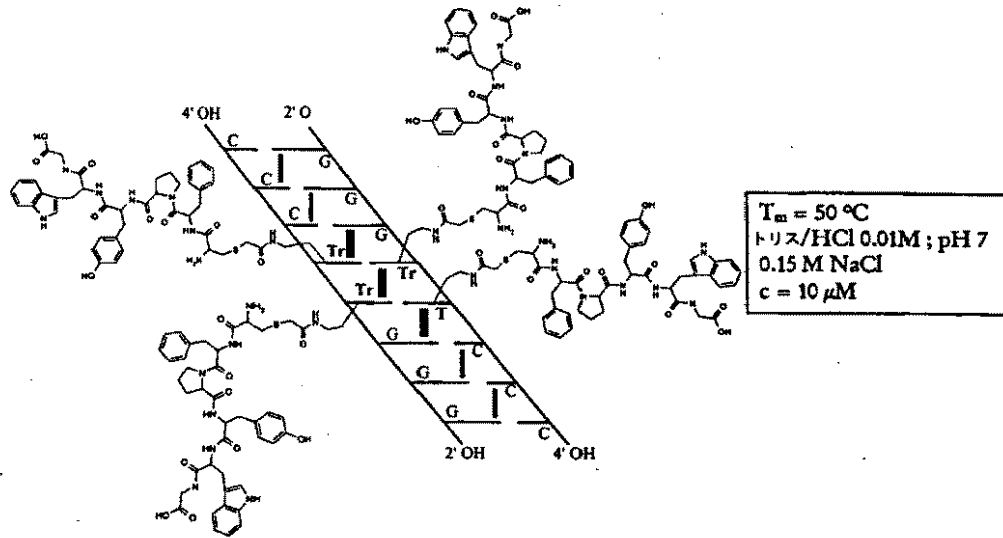
【図24】

Figure 24- トリプタミンリンカーを介する2つの
ペプチドを持つp-RNA



【図25】

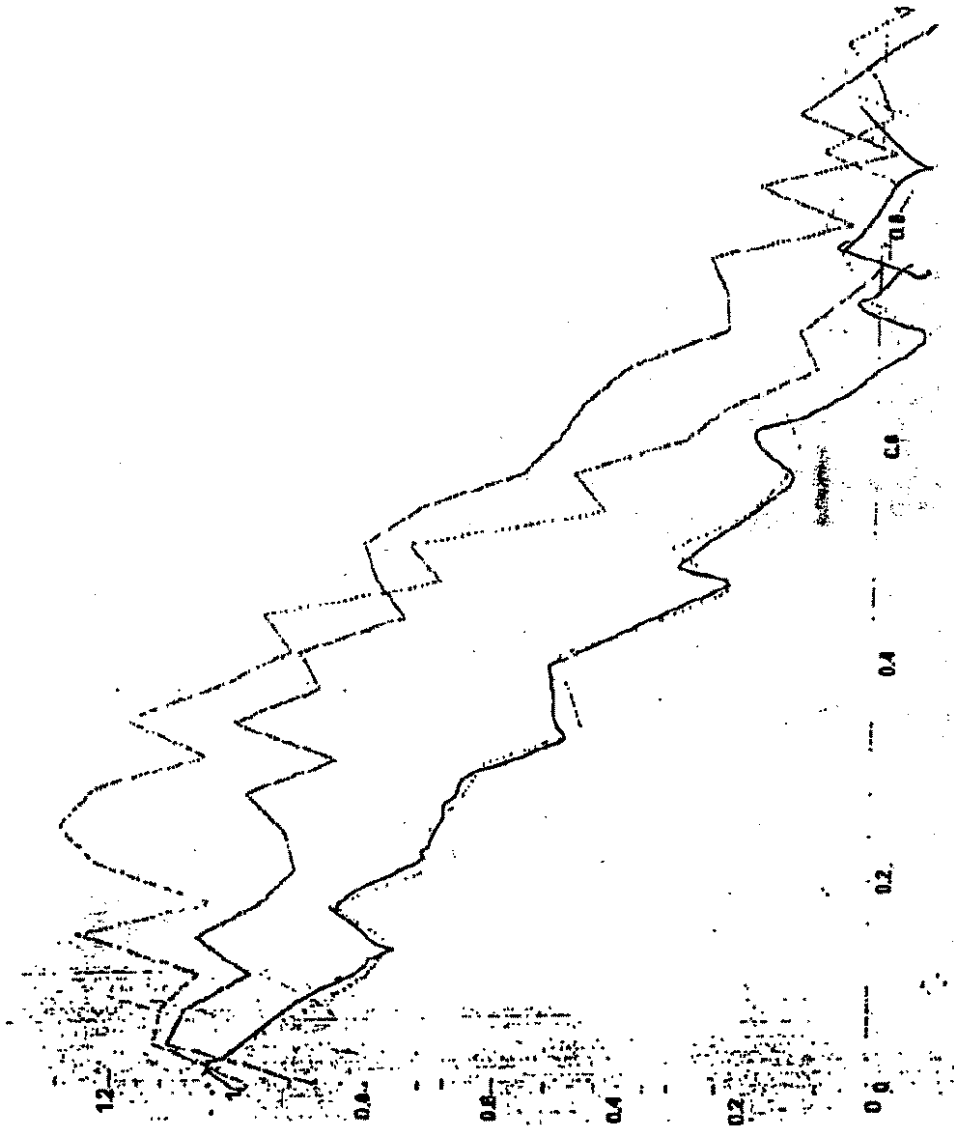
Figure 25-4つのペプチドを持つp-RNA
ハイブリッド構造



p-RNAペプチドコンジュゲートの熱力学的データ

【図26】

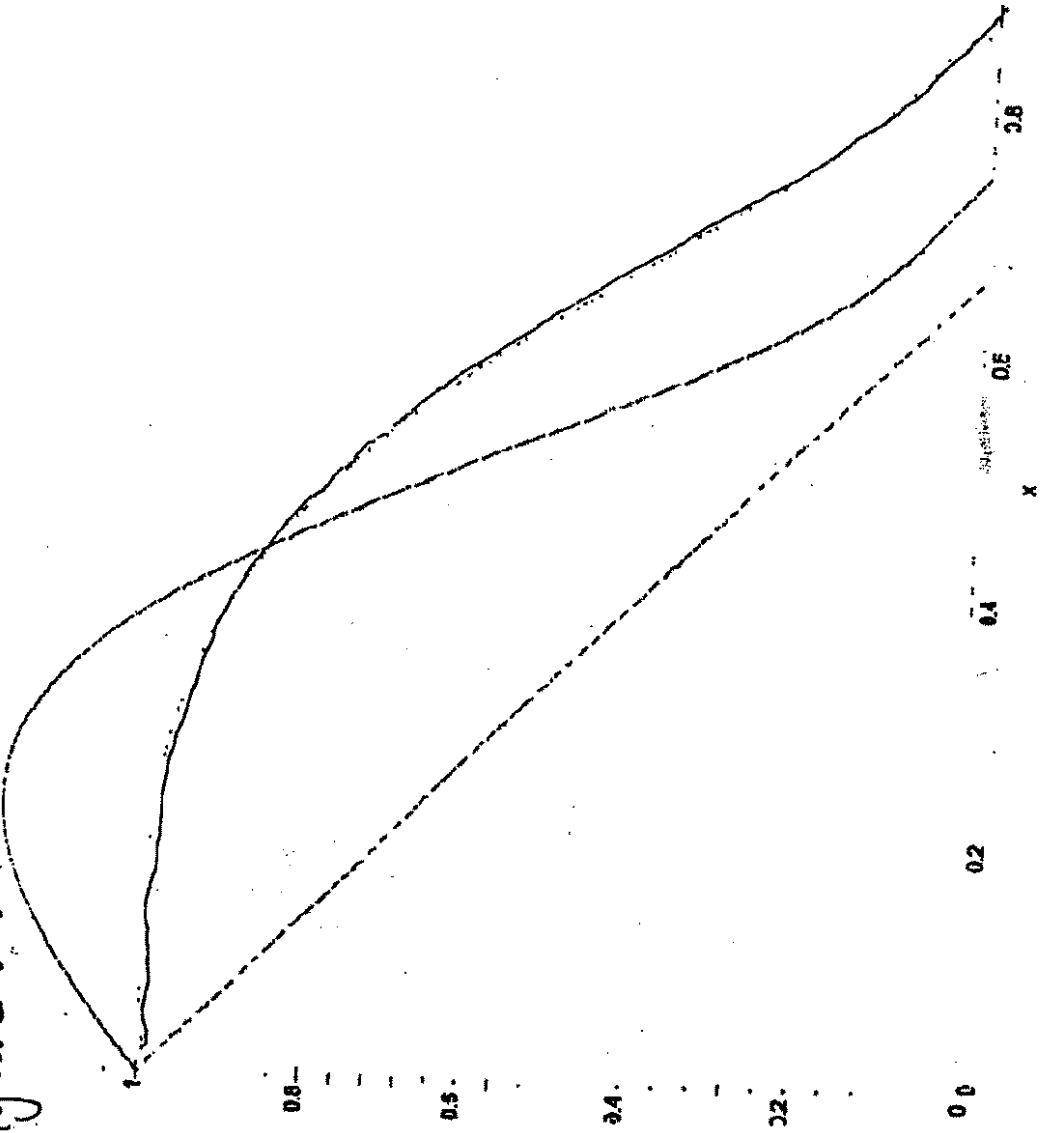
Figure 26-ノイズが伴う測定のシュミレーション



er

【図27】

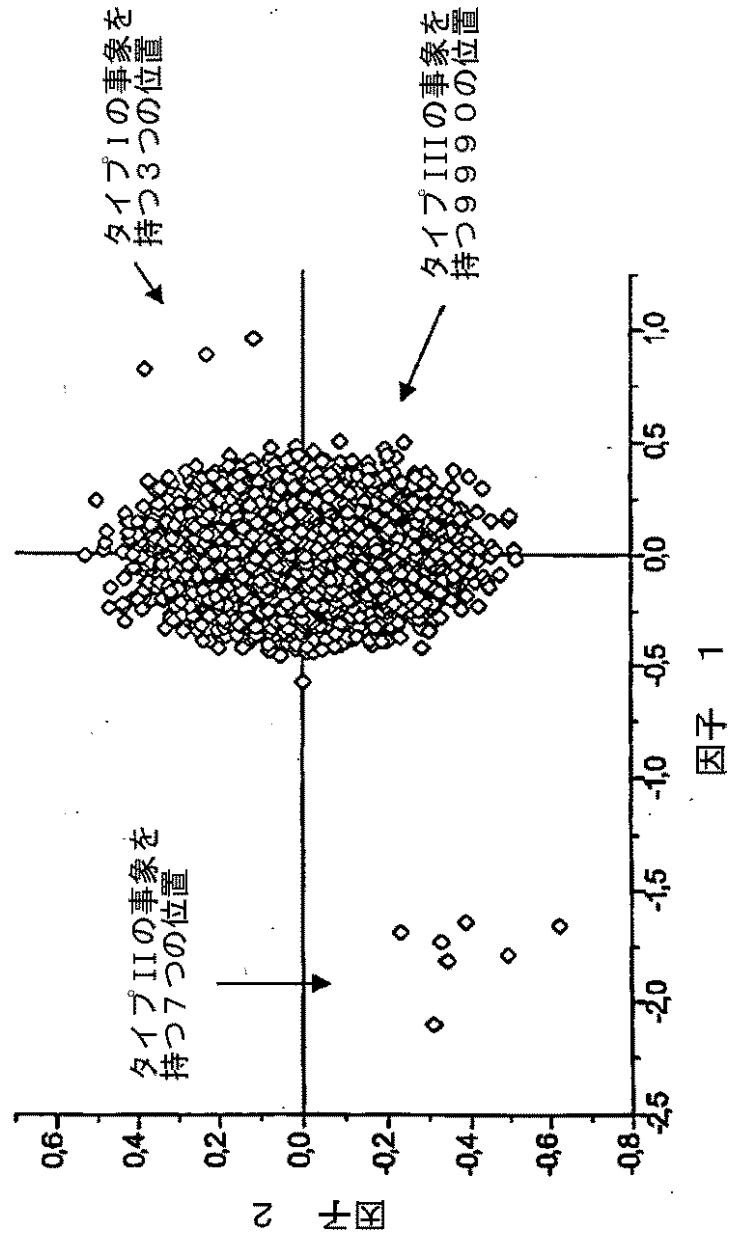
Figure 27 - 理想化されたシグナルの発生



【図28】

Figure 28

絶対 $\pm(50\%)$ のノイズのシミュレーション
での、10000の異なるチップ位置事象についての
シグナル発生の因子分析クラスターリング



【手続補正書】

【提出日】平成14年3月18日(2002.3.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 i . 各マイクロロケーションが浸透層で覆われた電極を含むエレクトロニックマイクロロケーションのアレイ、ここに、該電極は、超分子複合体の形成および/または安定性に影響するように正または負の電荷を運搬するようにバイアスをかけることができ、

i i . 該マイクロロケーションにて連結した捕捉分子間リガンド結合成分、ここに、該分子間リガンド結合成分は捕捉プログラム可能对合成分および分子リガンド結合成分を含み、該プログラム可能对合成分は、相補的プログラム可能对合成分と安定な可逆的または非可逆的な特異的相互作用を形成できるコード可能な一連のサブユニットであり、該捕捉プログラム可能对合成分は種々の既知のマイクロロケーションにて同一であって、該分子リガンド結合成分は種々のマイクロロケーションにて異なり、

i i i . 該捕捉分子間リガンド結合成分と流体接触するまたは直接的に接触する、該捕捉プログラム可能对合成分の少なくとも一部に相補的なプログラム可能对合成分および分子リガンド結合成分を含む第1の分子間リガンド結合成分、および

i v . 該捕捉分子間リガンド結合成分と流体接触するまたは直接的に接触する、該捕捉プログラム可能对合成分の少なくとも一部に相補的なプログラム可能对合成分および分子リガンド結合成分を含む少なくとも第2の分子間リガンド結合成分、

ここに、該捕捉の、第1のまたは第2のリガンド結合成分が核酸であるならば、該リガンド結合成分は、いずれのプログラム可能对合成分にも安定にハイブリ

ダイズしないことを特徴とする特異的リガンド分子または構造と相互作用するためのアレイベースの分子ディスプレイデバイス。

【請求項2】 超分子複合体が、少なくともあるマイクロロケーションで形成され、該超分子複合体は：該捕捉の、第1のおよび第2の分子間リガンド結合成分および特異的リガンド分子または構造を含み、ここに、特異的リガンド分子または構造の結合に際して、該捕捉の、第1のおよび第2のリガンド結合成分と該特異的リガンド分子または構造との相互作用ならびに特異的な第1のプログラム可能対合成分、第2のプログラム可能対合成分および該捕捉プログラム可能対合成分の対合を介して特異的な超分子複合体が形成される請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項3】 少なくとも1つの該プログラム可能対合成分が、ピラノシル-RNAおよびヌクレオ(nucleo)-デルタ-ペプチドよりなる群から選択された少なくとも1つの合成対合部分を含む請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項4】 該エレクトロニックマイクロアレイが独立して制御可能なエレクトロニックマイクロロケーションを有する請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項5】 エレクトロニックストリンジェンシステムをさらに含み、それによって各部位の電圧および/または電流がエレクトロニックストリンジェンを行うように変更できる請求項1記載のアレイベースのデバイス。

【請求項6】 個別のマイクロロケーションを持つアレイベースのデバイス上での超分子複合体の産生および検出のための方法であって、

i) 該アレイ上の複数のマイクロロケーションにて捕捉分子間リガンド結合成分を供し、各捕捉分子間リガンド結合成分は共通の捕捉プログラム可能対合成分を含み、ここに、該プログラム可能対合成分は、相補的なプログラム可能対合成分との安定な可逆的または不可逆的な特異的相互作用を形成できるコード可能な一連のサブユニットであって、さらに分子リガンド結合成分を含み、

ii) 少なくとも第1セットの相補的分子間リガンド結合成分と該デバイスとを接触させ、ここに、該相補的分子間リガンド結合成分は、該捕捉プログラム可

能対合成分の少なくとも一部分に相補的であり、さらに、分子リガンド結合成分を含むプログラム可能対合成分を含み、

i i i) 次いで、該デバイスと特異的なリガンド分子または構造とを接触させ、ここに、該特異的なリガンド分子または構造は、該第1セットの相補的な分子間リガンド結合成分が該デバイスと接触するに先立ち、同時にまたは後に該デバイスと接触し、

(i v) 該デバイスに対して該ストリンジェンシー条件を設けて、超分子複合体形成を行い、次いで

(v) 超分子複合体が形成されたマイクロロケーションを検出する工程を含むことを特徴とする該方法。

【請求項7】 該捕捉分子間結合成分の少なくとも2つの分子リガンド結合成分が、別々のマイクロロケーションにて異なることを特徴とする請求項6記載の方法。

【請求項8】 該捕捉分子間結合成分の少なくとも2つの分子リガンド結合成分が、別々のマイクロロケーションにて同一であり、ここに、アレイは、機能的電極が該アレイのマイクロロケーションと関連したエレクトロニックアレイであることを特徴とする請求項6記載の方法。

【請求項9】 所与の超分子複合体に關与する該分子リガンド結合成分を測定する工程をさらに含むことを特徴とする請求項6記載の方法。

【請求項10】 改良された分子デスクリプターアレイを製造する工程をさらに含み、特異的なリガンド分子または構造に結合する分子リガンド結合成分を同定した後、

i. リガンド結合成分の第2のライブラリーを供し、該ライブラリーの成分が、第1の分子デスクリプターアレイ相互作用から同定されたりガンド結合成分に基づき少なくとも部分的に選択され、該分子間リガンド結合成分中のリガンド結合成分として、第2のライブラリーを使用して第2の分子デスクリプターアレイを供給する工程を含むことを特徴とする請求項9記載の方法。

【請求項11】 該特異的なリガンド分子または構造に特異的な新しい親和性試薬を製造する工程をさらに含み、ここに、該分子リガンド結合成分の同定を利

用して、新しい親和性試薬を処方することをさらに含むことを特徴とする請求項9記載の方法。

【請求項12】 テスト分子の期待された生物学的応答が測定され、

i) 特異的なリガンド分子と定義された生物学的応答を有する少なくとも1つの既知の分子を適用し、該アレイデバイス上の各既知の基質の応答または結合パターンをモニターし、それからの応答プロフィールを発生させ、

ii) 該プロフィールが各既知の分子につき測定された後、該アレイデバイス上に形成された超分子複合体を除去し、次いで、次の既知の分子、およびその同一の第1および(必要ならば) 続いてのセットの分子間リガンド結合成分を適用し、

iii) 最終の既知の分子を適用後に形成された超分子複合体を除去し、

iv) テスト分子およびその同一の第1および(必要ならば) 続いてのセットの分子間リガンド結合成分を分子デスクリプターアレイに適用し、その応答をモニターし、次いで、

v) テスト分子の期待された生物学的応答を決定するように、既知の該分子からの応答に関連して該分子デスクリプターアレイに対するテスト分子の応答を分析する工程をさらに含むことを特徴とする請求項9記載の方法。

【請求項13】 該ストリンジェンシー条件が、該アレイ上の特異的超分子複合体ロケーションの特異性に影響するように変更されることを特徴とする請求項6記載の方法。

【請求項14】 該アレイがエレクトロニックマイクロロケーションを含むエレクトロニックアレイであり、ここに、各マイクロロケーションが、浸透層で覆われた電極を含み、該電極は超分子複合体の形成および/または安定性に影響するように正または負の電荷を運搬するようにバイアスをかけることができ、ストリンジェンシー条件がエレクトロニックストリンジェンシー条件を含むことを特徴とする請求項6ないし13のいずれか1記載の方法。

【請求項15】 該ストリンジェンシー条件が、温度、pH、イオン強度、ならびに溶剤、変性剤および/またはカオトロピック剤の添加よりなる群から選択された1以上の慣用的ストリンジェンシー条件を含むことを特徴とする請求項

6ないし13のいずれか1記載の方法。

【請求項16】 マイクロエレクトロニックアレイデバイス上で複数の免疫学的反応を行う方法であって、

i) 複数のエレクトロニックマイクロロケーションを供し、ここに、各マイクロロケーションは、浸透層で覆われた電極を含み、該電極は、免疫学的反応複合体の形成および/または安定性に影響するように正または負の電荷を運搬するようにバイアスをかけることができ、各部位は、それに対するプログラム可能对合成分カップルを有し、該プログラム可能对合成分は相補的プログラム可能对合成分と安定な可逆的または不可逆的な特異的相互作用を形成できるコード可能な一連のサブユニットであり、該プログラム可能对合成分が部位間で異なり、

ii) 複数の異なるタイプの抗体を供し、ここに、各タイプの抗体は異なるプログラム可能对合成分で標識され、異なるプログラム可能对合成分はマイクロエレクトロニック部位に結合したプログラム可能对合成分に相補的であり、

iii) 抗原を供し、

iv) マイクロエレクトロニック部位にて、該抗原および複数の標識した異なるタイプの抗体をプログラム可能对合成分と反応させ、

v) 該プログラム可能对合成分および該相補的プログラム可能对合成分とを相互作用させ、次いで

vi) 該相補的プログラム可能对合成分に結合した抗原に結合した抗体が存在する部位を決定する工程を含むことを特徴とする該方法。

【請求項17】 i. 可変エレクトロニック環境に位置する付着表面、

ii. 人工分子認識システム、ここに、該分子認識システムは少なくとも第1および第2の分子認識成分ならびに分子認識成分を連結する構造を含み、分子認識システムを形成し、さらに、少なくとも第1の成分が該付着表面に連結し、

iii. 該分子認識成分を介して該分子認識システムに結合した分子認識システムに独立な別々の分子種、

iv. ここに、該別々の分子種は、一緒に超分子複合体を形成する分子認識システムに結合し、該分子認識システムに対する該別々の分子種の結合は、分子認識システムのいずれの個々の成分に対する該別々の分子種の結合よりも安定であ

ること

を含む超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項18】 該分子認識システムの連結構造が、相補的で、コード化された対合システムを含む請求項17記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項19】 該相補的対合システムがピラノシル-RNA対合システムまたはヌクレオ-デルタ-ペプチド対合システムである請求項17記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項20】 該超分子認識システムに2つの分子認識成分が存在し、ダイアド超分子認識システムを形成する請求項17記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項21】 該超分子認識システムに3つの分子認識成分が存在し、トリアド超分子認識システムを形成する請求項17記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【請求項22】 該デバイスが複数の物理的に異なる部位を含み、各々が、可変エレクトロニック環境に位置した付着表面を含む請求項17記載の超分子複合体の形成および検出のためのデバイス。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/20847
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) :Please See Extra Sheet. US CL :Please See Extra Sheet. 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. : 422/50, 68.1, 76, 82.01, 82.02, 82.05; 435/6, 7.1, 7.2, 285.2; 436/149, 150, 806, 809 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) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98/51819 A1 (NANOGEN, INC.) 19 November 1998, see entire document, especially the abstract and the associated figure.	1, 4, 6-39, 83-86, 88-135
Y	US 5,811,239 A (FRAYNE) 22 September 1998, see entire document, note the multicomponent nucleic acid complexes.	1, 4, 6-39, 83-86 and 88-135
Y	US 5,653,939 A (HOLLIS et al) 05 August 1997, see the entire document.	1, 4, 6-39, 83-86 and 88-135
Y	US 5,632,957 A (HELLER et al) 27 May 1997, see entire document.	1, 4, 6-39, 83-86 and 88-135
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"I" later document published after the international filing date or priority date and not to conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document published on or after the international filing date	"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
"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 reasons (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"A" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 23 OCTOBER 2000	Date of mailing of the international search report 29 DEC 2000	
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 <i>Joseph W. Ricigliano</i> JOSEPH W. RICIGLIANO Telephone No. (703) 308-0196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/20847

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,605,662 A (HELLER et al) 25 February 1997, see the entire document.	1, 4, 6-39, 83-86 and 88-135.
Y	US 5,871,902 A (WEININGER et al) 16 February 1999, see entire document, note the multicomponent complexes used.	1, 3-4, 6-39, 83-86 and 88-135
Y,P	WO 99/42558 A1 (NANOGEN, INC.) 26 August 1999, see the entire document.	1, 4, 6-39, 83-86 and 88-135
Y	WO 99/29711 A1 (NANOGEN, INC.) 17 June 1999, see the entire document.	1, 4, 6-39, 83-86, 88-135.
X,P	US 6,077,668 A (KOOL) 20 June 2000, see the entire document, especially claim 15 and note the teaching of pRNAs.	2, 5, 40 and 87

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/20847**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

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

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6A(a)...

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Please See Extra Sheet.

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

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-40 and 83-135

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/20847

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7):

G01N 35/00, 15/06, 25/08, 25/18, 27/02, 27/00, 27/02, 21/29, 33/53; C12Q 1/68

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

422/50, 68.1, 76, 82.01, 82.02, 82.05; 435/6, 7.1, 7.2, 285.2; 436/149, 150, 806, 809

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

Dialog, USPAT and Derwent using WEST:
search terms: microelectronic, electrode, arrays, DNA oligonucleotides, RNA, pRNA, CNA pyranosyl, cyclohexyl, nucleic acids

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-40 and 83-135, drawn to an array device.

Group II, claim(s) 41-54, drawn to method of combinatorial selection.

Group III, claim(s) 55-60, drawn to methods of drug discovery and determining an expected biological response.

Group IV, claim(s) 61-65, drawn to methods of evolving an a descriptor array.

Group V, claim(s) 66-82 and 136-137 drawn to methods of forming complexes on an array

The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The use of microelectronic arrays is known in the art, hence the feature joining the groups does not constitute a special technical feature.

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack Unity of Invention because they are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for more than one species to be searched, the appropriate additional search fees must be paid. The species are as follows:

The species correspond to the different combinations of components used to form the supramolecular complexes. Note that many of the explicitly recited subspecies are directed subgeneric categories (e.g., a combinatorial library). Election of such a subgeneric will not provide a species for examination on the merits.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト ⁷ (参考)
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	Z
	37/00		1 0 2
	1 0 2		1 0 3
	1 0 3		
(71)出願人	アヴェンティス・リサーチ・アンド・テクノロジーズ・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング AVENTIS RESEARCH AND TECHNOLOGIES GMBH ドイツ連邦共和国デー - 65926フランクフルト・アム・メイン、ゲパウデ・ゲー810、オペラティーフェ・フォルシュング - インドゥストリーパーク・ヘーヒスト		
(72)発明者	マイケル・ジェイ・ヘラー アメリカ合衆国92024カリフォルニア州エンシニタス、ホーク・ビュー・ドライブ1614番		
(72)発明者	ノルベルト・ヴィントハーブ ドイツ連邦共和国デー - 65795ハッターシャイム、アカツィーヴシュトラーセ28番		
(72)発明者	リチャード・アール・アンダーソン アメリカ合衆国92024カリフォルニア州エンシニタス、クレスト・ドライブ1207番		
(72)発明者	ドナルド・イー・アックリー アメリカ合衆国92007カリフォルニア州カーディフ、ケンブリッジ・アベニュー2033番		
(72)発明者	ティナ・エス・ノバ アメリカ合衆国92067カリフォルニア州ランチョ・サンタ・フェ、ポスト・オフィス・ボックス3023		
(72)発明者	ハンス - ウルリッヒ・ホッペ ドイツ連邦共和国デー - 85416ランゲンバット、マイゼンシュトラーセ14番		
(72)発明者	クリスティアン・ヨット・ハモン ドイツ連邦共和国デー - 65934フランクフルト・アム・メイン、ルトマーシュトラーセ49番		
F タ-ム(参考)	2G045 AA34 AA35 BB10 BB14 BB48 BB51 DA13 DA36 FA11 FB02 FB03 FB08 FB12 FB15 4B029 AA07 FA12 4B063 QA13 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QS34		

专利名称(译)	用于组合选择分子间配体结合结构和药物筛选的微电子分子描述符阵列的装置，方法，操作和格式		
公开(公告)号	JP2003507714A	公开(公告)日	2003-02-25
申请号	JP2001517177	申请日	2000-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	内诺金有限公司 阿文蒂诺Chartis Research公司与技术GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tsunqu 阿温提斯研究技术两合公司		
申请(专利权)人(译)	Nanogen公司 安万特公司的研究与技术GESELLSCHAFT米特Beshurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	マイケルジェイヘラー ノルベルトヴィントハーブ リチャードアールアンダーソン ドナルドイーアックリー ティナエスノバ ハンスウルリッヒホッペ クリスティアンヨットハモン		
发明人	マイケル・ジェイ・ヘラー ノルベルト・ヴィントハーブ リチャード・アール・アンダーソン ドナルド・イー・アックリー ティナ・エス・ノバ ハンス・ウルリッヒ・ホッペ クリスティアン・ヨット・ハモン		
IPC分类号	G01N33/53 B01J19/00 C12M1/00 C12Q1/68 C40B30/04 C40B40/06 C40B40/10 G01N21/17 G01N21/59 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	C40B30/04 B01J19/0046 B01J2219/00653 B01J2219/00659 B01J2219/00707 B01J2219/00722 B01J2219/00725 B01J2219/00729 C12Q1/6825 C40B40/06 C40B40/10 G01N21/171 G01N21/59 G01N33/6845 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.M G01N33/53.D C12M1/00.A C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N37/00.102 G01N37/00.103		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB48 2G045/BB51 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB15 4B029/AA07 4B029/FA12 4B063/QA13 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QS34		
优先权	09/374338 1999-08-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于分子间配体结合结构的组合选择和药物筛选的微电子分子描述符阵列装置，方法，程序和形式。更具体地，这些装置和方法通过应用独特的严格性参数，迅速实现了组合产生的分子间配体结合部分，超分子结构和超分子复合物的更高阶选择性。进行。期望地，本发明涉及通过电子严格性的影响通过子库的组装来形成指数文库，这影响了超分子结构或复合物的形成和检测。此外，本发明涉及用于分子识别过程，药物发现，新亲和试剂的产生，合成抗体的产生以及用于免疫测定的微电子阵列装置，操作，方法和格式。

配列	融点	ハイブリダイズした p-RNA-トリプタミンオリゴマーに対する熱力学的対合データ (Kcal /モル)			
	T _m (°C) 10μM	ΔH _{vh}	TΔS _{vh} ^{298K}	ΔG _{vh} ^{298K}	K(M) ^{298K}
PRNA-CCCGGG*	68	-48.5	-35.5	-13.0	-
pRNA-CCCGGG	63	-54.1	-41.2	-12.9	2.8,10 ⁹
pRNA-CCCIIGGG	64	-51.4	-38.6	-12.8	2.3,10 ⁹
pRNA-CCIIIGG	24	-43.5	-36.9	-6.6	7.5,10 ⁴
pRNA-CCICIGGG	49	-88.5	-75.3	-13.2	4.7,10 ⁹
pRNA-CICIGIG	ハイブリッドの対合は検出されなかった				