

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-517222

(P2007-517222A)

(43) 公表日 平成19年6月28日(2007.6.28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/547 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/547	
<b>GO 1 N 33/552 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/552	
<b>GO 1 N 33/553 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/553	
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D
<b>GO 1 N 33/569 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	N

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-547172 (P2006-547172)	(71) 出願人	599056437
(86) (22) 出願日	平成16年12月17日 (2004.12.17)		スリーエム イノベイティブ プロパティ ズ カンパニー
(85) 翻訳文提出日	平成18年8月22日 (2006.8.22)		アメリカ合衆国, ミネソタ 55144- 1000, セント ポール, スリーエム センター
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/042489	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開番号	W02005/066634		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開日	平成17年7月21日 (2005.7.21)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	60/533,178		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成15年12月30日 (2003.12.30)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 福本 積
(31) 優先権主張番号	10/896,392	(74) 代理人	100087413
(32) 優先日	平成16年7月22日 (2004.7.22)		弁理士 古賀 哲次
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 基材、およびホスホニトリル基を含む繫留化合物によって基材に結合された化合物

## (57) 【要約】

求核試薬含有材料を固定化するために使用するための物品およびこのような物品の使用方を記述する。一態様において、本発明は、第1の表面および第2の表面を有する基材；および、該基材の第1の表面に付加されたホスホニトリル繫留基であって、該基材の第1の表面上の相補的官能基とホスホニトリル繫留化合物との反応生成物を含むホスホニトリル繫留基；を含む、物品を提供する。求核試薬含有材料を基材に固定化する方法であって、ホスホニトリル繫留化合物を提供すること；ホスホニトリル繫留化合物と反応できる相補的官能基を有する基材を提供すること；該ホスホニトリル繫留化合物を、該基材上の相補的官能基と反応させて、イオン結合、共有結合、またはそれらの組み合わせを生じさせることにより、基材に付いたホスホニトリル繫留基を調製すること；および、該基材に付いたホスホニトリル繫留基を、求核試薬含有材料と反応させて該求核試薬含有材料に固定化させること；を含む方法も記述する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

第 1 の表面および第 2 の表面を有する基材；および

前記基材の前記第 1 の表面に付着されたホスホニトリル繫留基 ( t e t h e r i n g g r o u p ) であって、前記基材の前記第 1 の表面上の官能基とホスホニトリル繫留化合物 ( t e t h e r i n g c o m p o u n d ) との反応生成物を含むホスホニトリル繫留基；

を含む、物品。

## 【請求項 2】

前記基材の前記第 1 の表面は、ダイヤモンド様ガラスを含む、請求項 1 に記載の物品。 10

## 【請求項 3】

前記ダイヤモンド様ガラスは、少なくとも 30 重量%の炭素、少なくとも 25 重量%のケイ素、および 45 重量%までの酸素を含む、請求項 2 に記載の物品。

## 【請求項 4】

前記基材は、第 1 層および第 2 層を含む多層構造であって、前記第 1 層はポリマーを含み、前記第 2 層はダイヤモンド様ガラスを含む、請求項 1 に記載の物品。

## 【請求項 5】

前記ポリマーは、約 80 nm ~ 約 0.5 μm の範囲内の孔径を有する孔を含む、微孔構造を含む、請求項 4 に記載の物品。

## 【請求項 6】

前記ポリマーは、高密度ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリフッ化ビニリデン、ポリエチレン - ビニルアルコールコポリマーおよび前述の 2 つ以上の組み合わせからなる基より選択される材料を含む熱誘導性相分離膜を含む、請求項 4 に記載の物品。 20

## 【請求項 7】

前記熱誘導性相分離膜は、約 0.5 μm ~ 0.0229 mm の孔径を有する複数の孔を含む高密度ポリエチレンを含む、請求項 6 に記載の物品。

## 【請求項 8】

前記ダイヤモンド様ガラスは、前記熱誘導性相分離膜上に被覆され、前記ダイヤモンド様ガラスは、前記熱誘導性相分離膜の前記孔内に伸びる、請求項 7 に記載の物品。

## 【請求項 9】

前記基材は、第 1 層、第 2 層および第 3 層を含む多層構造であって、前記第 1 層はポリマーを含み、前記第 2 層はダイヤモンド様炭素を含み、前記第 3 層は前記ダイヤモンド様炭素に付加されたダイヤモンド様ガラスを含む、請求項 1 に記載の物品。 30

## 【請求項 10】

前記ポリマーはポリイミドである、請求項 9 に記載の物品。

## 【請求項 11】

前記基材は、第 1 層および第 2 層を含む多層構造であって、前記第 1 層はガラスを含み、前記第 2 層は前記ガラスに付加されたダイヤモンド様ガラスを含む、請求項 1 に記載の物品。

## 【請求項 12】

前記基材は、金属または金属酸化物を含む、請求項 1 に記載の物品。 40

## 【請求項 13】

前記基材は、金、銀、チタン、白金、パラジウム、アルミニウム、銅、クロム、鉄、コバルト、ニッケル、亜鉛、ステンレススチール、インジウムスズ酸化物、およびこれらの 2 つ以上の組み合わせからなる群より選択される金属または金属酸化物を含む、請求項 1 に記載の物品。

## 【請求項 14】

前記基材は、前記金属を支持する支持層をさらに含む、請求項 12 に記載の物品。

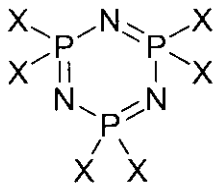
## 【請求項 15】

前記支持層は、ポリマーを含む、請求項 14 に記載の物品。 50

## 【請求項 16】

前記ホスホニトリル繫留化合物は、下記式 I :

## 【化 1】



I

10

(式中、各 X は、同じであっても異なってもよく、また求核試薬含有材料と結合するために、求核攻撃を受けやすい反応基を含む)

で表わされる構造を含む、請求項 1 に記載の物品。

## 【請求項 17】

前記基材の前記第 1 の表面は、式 I の X 基と反応できる相補的官能基を有するダイヤモンド様ガラスを含む、請求項 16 に記載の物品。

## 【請求項 18】

前記相補的官能基は、前記式  $-Si(OR^1)_{3-n}[(R^2)NH_2]_n$  (式中、n は 0 ~ 2 の整数であり、 $R^1$  は 5 未満の炭素鎖長を有するアルキルであり、 $R^2$  は、少なくとも 2 の炭素鎖長を有する別のアルキル基である) のアミノシランである、請求項 17 に記載の物品。

20

## 【請求項 19】

前記相補的官能基は、3 - アミノプロピルトリエトキシシラン、3 - アミノトリメトキシシラン、およびこれらの組み合わせからなる群より選択されるアミノシランである、請求項 17 に記載の物品。

## 【請求項 20】

各 X は塩素である、請求項 16 に記載の物品。

## 【請求項 21】

前記ホスホニトリル繫留基に付加された一官能性部分、二官能性部分、または多官能性部分をさらに含む、請求項 1 に記載の物品。

30

## 【請求項 22】

求核試薬含有材料を基材に固定化する方法であって、

ホスホニトリル繫留化合物を提供すること；

前記ホスホニトリル繫留化合物と反応できる官能基を有する基材を提供すること；

前記ホスホニトリル繫留化合物を、前記基材上の前記官能基と反応させて、イオン結合、共有結合、またはそれらの組み合わせを生じさせることにより、基材に付いたホスホニトリル繫留基を調製すること；および

前記基材に付いたホスホニトリル繫留基を、求核試薬含有材料と反応させて前記求核試薬含有材料を固定化すること；

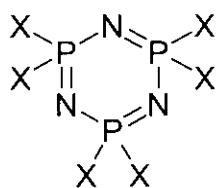
40

を含む、前記方法。

## 【請求項 23】

前記ホスホニトリル繫留化合物を提供することは、下記式 I :

## 【化 2】



I

10

(式中、各 X は同じであっても異なってもよく、また求核試薬含有材料と結合するために求核攻撃を受けやすい反応基を含む)

で表わされる化合物を提供することを含む、請求項 2 2 に記載の方法。

## 【請求項 2 4】

前記各 X は塩素である、請求項 2 3 に記載の方法。

## 【請求項 2 5】

前記ホスホトリル繫留化合物と反応できる官能基を有する基材を提供することは、第 1 の表面および第 2 の表面を有する基材を提供することを含み、前記第 1 の表面はダイヤモンド様ガラスからなる、請求項 2 2 に記載の方法。

## 【請求項 2 6】

前記ダイヤモンド様ガラスは、少なくとも 30 重量%の炭素、少なくとも 25 重量%のケイ素、45 重量%までの酸素を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

20

## 【請求項 2 7】

前記基材は、第 1 層および第 2 層を含む多層構造であって、前記第 1 層はポリマーを含み、前記第 2 層は前記ポリマーに付加されたダイヤモンド様ガラスを含む、請求項 2 2 に記載の方法。

## 【請求項 2 8】

前記ポリマーは、高密度ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリフッ化ビニリデン、ポリエチレン-ビニルアルコールコポリマーおよびこれらの 2 つ以上の組み合わせからなる群より選択される材料を含む熱誘導性相分離膜を含む、請求項 2 7 に記載の方法。

30

## 【請求項 2 9】

前記熱誘導性相分離膜は、複数の孔を中に有する高密度ポリエチレンを含み、前記孔径は約 0.5 μm ~ 0.0229 mm である、請求項 2 8 に記載の方法。

## 【請求項 3 0】

前記基材は、第 1 層、第 2 層および第 3 層を含む多層構造であって、前記第 1 層はポリマーを含み、前記第 2 層はダイヤモンド様炭素を含み、前記第 3 層はダイヤモンド様ガラスを含む、請求項 2 2 に記載の方法。

## 【請求項 3 1】

前記ポリマーはポリイミドである、請求項 3 0 に記載の方法。

## 【請求項 3 2】

前記基材は、第 1 層および第 2 層を含む多層構造であって、前記第 1 層はガラスを含み、前記第 2 層は前記ガラスに付加されたダイヤモンド様ガラスを含む、請求項 2 2 に記載の方法。

40

## 【請求項 3 3】

前記ホスホトリル繫留化合物と反応できる相補的官能基を有する基材を提供することは、第 1 の表面および第 2 の表面を有する基材を提供することを含み、前記第 1 の表面は金属または金属酸化物を含む、請求項 2 2 に記載の方法。

## 【請求項 3 4】

前記基材は、金、銀、チタン、白金、パラジウム、アルミニウム、銅、クロム、鉄、コバルト、ニッケル、亜鉛、ステンレススチール、インジウムスズ酸化物、およびこれらの

50

2つ以上の組み合わせからなる群より選択される金属または金属酸化物を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項35】

前記基材は、前記金属を支持する支持層をさらに含む、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

前記支持層はポリマーを含む、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記基材に付いたホスホニトリル繫留基と求核試薬含有材料とを反応させて前記求核試薬含有材料を固定化することは、前記ホスホニトリル繫留基を、アミン含有分析物、アミノ酸、ペプチド、DNA、RNA、タンパク質、酵素、細胞小器官、免疫グロブリン、および断片ならびにこれらの2つ以上の組み合わせから選択される求核試薬含有材料に反応させることを含む、請求項22に記載の方法。

10

【請求項38】

前記基材に付いたホスホニトリル繫留基を求核試薬含有材料と反応させて、前記求核試薬含有材料に固定化することは、前記ホスホニトリル繫留基をアミン含有材料に反応させることを含む、請求項22に記載の方法。

【請求項39】

前記アミン含有材料は抗原であり、前記抗原は、抗体にさらに結合される、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

前記アミン含有材料は免疫グロブリンである、請求項39に記載の方法。

20

【請求項41】

前記アミン含有材料は、細菌にさらに結合される、請求項38に記載の方法。

【請求項42】

前記細菌は黄色ブドウ球菌である、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

前記基材に付いたホスホニトリル繫留基は、前記ホスホニトリル繫留基に付加された一官能性部分、二官能性部分、または多官能性部分をさらに含む、請求項22に記載の方法。

【請求項44】

前記基材に付いたホスホニトリル繫留基は、前記基材に付加された第1のホスホニトリル、前記第1のホスホニトリル基に付加された二官能性または多官能基、および前記二官能性または多官能基に付加された第2のホスホニトリル基をさらに含み、前記二官能性または多官能基は前記第1のホスホニトリル基と第2のホスホニトリル基の間に連結基を形成する、請求項22に記載の方法。

30

【請求項45】

前記基材に付いたホスホニトリル繫留基を、求核試薬含有材料と反応させて前記求核試薬含有材料を固定化することは、前記第2のホスホニトリル基を前記求核試薬含有材料に反応させることを含む、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

前記求核試薬含有材料は、アミン含有分析物、アミノ酸、ペプチド、DNA、RNA、タンパク質、酵素、細胞小器官、免疫グロブリン、および断片ならびに前述の2つ以上の組み合わせから選択される、請求項45に記載の方法。

40

【請求項47】

前記基材に付いたホスホニトリル繫留基を、求核試薬含有材料と反応させて前記求核試薬含有材料を固定化することは、前記ホスホニトリル繫留基をアミン含有材料に反応させることを含む、請求項45に記載の方法。

【請求項48】

前記アミン含有材料は抗原であり、および前記抗原は、抗体にさらに結合される、請求項47に記載の方法。

50

## 【請求項 49】

前記アミン含有材料は、免疫グロブリンである、請求項 47 に記載の方法。

## 【請求項 50】

前記アミン含有材料は、細菌にさらに結合される、請求項 47 に記載の方法。

## 【請求項 51】

前記細菌は黄色ブドウ球菌である、請求項 49 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

発明の分野

本発明は、繫留基 (tethering group) が付加された基材を含む物品および求核試薬含有材料を該基材に固定化する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

発明の背景

生物学的活性分子の基材表面への共有結合は、診断装置、アフィニティ分離、ハイスループット DNA 配列決定アプリケーション、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の精製等々の、様々な用途で有用な可能性がある。たとえば、固定化された生物学的アミン類は、疾患または遺伝的欠陥の医学的診断、または様々な生体分子の検出に使用できる。

## 【0003】

様々なリガンドのいずれかを固定化するための反応性官能基を導入することによる固体支持体 (たとえば粒状クロマトグラフィー用支持体) の修飾が知られている。求核試薬 (たとえば、 $\text{NH}_2$ 、 $\text{SH}$ 、 $\text{OH}$  等々) の、基材への付着は、繫留化合物を用いて達成することができる。繫留化合物は、連結基で隔てられた少なくとも 2 つの反応性官能基を有する。該官能基の 1 つは、該基材表面上の相補的官能基と反応させることにより、繫留化合物を、基材または支持体に固定するための手段を提供する。第 2 の反応性官能基は、求核試薬含有材料と反応するように選択することができる。酵素、抗原、および抗体を付着させるために、ヒドロキシル基を含有する支持体 (たとえばセルロース、架橋デキストラン類、ウール、およびポリビニルアルコール) を、塩化シアヌル (トリクロロトリアジン) と反応させてもよい。セファロース (Sephacrose) 等のヒドロキシル含有支持体を、トリクロロトリアジン (TCT) と反応させてもよく、これは次に、1 つまたは複数の求核試薬と結合することが可能である。塩化シアヌルで誘導体化した固体のナイロンビーズが、オリゴヌクレオチドに基づくハイブリダイゼーションアッセイに使用されてきた。TCT で被覆された紙膜およびナイロン膜もまた、DNA、RNA、およびタンパク質のトランスファーハイブリダイゼーション実験での有用性を示した。

## 【0004】

既知の繫留化合物は、一般的に、生物学的材料を含む求核試薬含有材料と極めて反応しやすい。しかし、求核試薬との反応が水溶液で実行されるとき、求核試薬含有材料に対する繫留化合物の反応は、該繫留化合物の加水分解等の、他の反応と競合する可能性がある。加水分解は、該求核試薬含有材料を基材上に不完全または不十分に固定化する結果となる可能性がある。

## 【発明の開示】

## 【0005】

発明の概要

このような基材と適合する改良された固定化基材および繫留化合物が必要である。したがって、様々な用途のいずれでも、リガンド固定化に有用な支持体および繫留化合物を提供することが望ましい。

## 【0006】

本発明は、アミン含有分析物、アミノ酸、ペプチド、DNA、RNA、タンパク質、酵素、細胞小器官、免疫グロブリン、および断片ならびにこれらの 2 つ以上の組み合わせ等

10

20

30

40

50

の、求核試薬含有材料の固定化における、物品およびこのような物品の使用方法を提供する。該求核試薬含有材料は、たとえば、抗原（抗体に結合した抗原を含む）、免疫グロブリン等々の、アミン含有材料を含んでもよい。幾つかの実施形態では、該アミン含有材料はさらに、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）等の細菌に結合させることが可能である。

【0007】

一態様において、本発明は、

第1の表面および第2の表面を有する基材；および

該基材の第1の表面に付着されたホスホニトリル繫留基であって、該基材の第1の表面上の官能基とホスホニトリル繫留化合物との反応生成物を含むホスホニトリル繫留基；  
を含む物品を提供する。

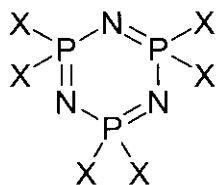
10

【0008】

幾つかの実施形態では、該ホスホニトリル繫留化合物は、下記式I：

【0009】

【化1】



20

【0010】

（式中、各Xは同じであっても異なってもよく、また、求核試薬含有材料と結合するために、求核攻撃を受けやすい反応基を含む）

で表わされる構造を含む。

【0011】

別の態様において、本発明は、求核試薬含有材料を基材に固定化する方法であって、ホスホニトリル繫留化合物を提供すること；

30

該ホスホニトリル繫留化合物と反応できる官能基を有する基材を提供すること；

該ホスホニトリル繫留化合物を該基材上の官能基と反応させて、イオン結合、共有結合、またはそれらの組み合わせを生じさせることにより、基材に付いたホスホニトリル繫留基を調製すること；および

該基材に付いたホスホニトリル繫留基を、求核試薬含有材料と反応させて該求核試薬含有材料を固定化すること；  
を含む方法を提供する。

【0012】

本発明の説明で使用される用語は、以下の意味を有すると理解される：

本明細書で使用される用語「a」、「an」、および「the」は、「少なくとも1つの」と同義的に使用され、説明される要素の1つまたは複数を意味する。

40

【0013】

本明細書で使用される用語「アシル」は、式 - (CO)R（式中、Rはアルキル基である）の一価基を指し、またここで使用される(CO)は、炭素が二重結合で酸素に付いていることを示す。

【0014】

本明細書で使用される用語「アシルオキシ」は、式 - O(CO)R（式中、Rはアルキル基である）の一価基を指す。

【0015】

本明細書で使用される用語「アシリオキシシリル」は、Siに付いたアシルオキシ基（

50

すなわち、 $\text{Si}-\text{O}(\text{CO})\text{R}$  (式中、Rはアルキルである)を有する一価基を指す。たとえば、アシリオキシシリルは、式 $-\text{Si}[\text{O}(\text{CO})\text{R}]_{3-n}\text{L}_n$  (式中、nは、0~2の整数であり、Lは、ハロゲンまたはアルコキシである)を有することができる。具体例としては、 $-\text{Si}[\text{O}(\text{CO})\text{CH}_3]_3$ 、 $-\text{Si}[\text{O}(\text{CO})\text{CH}_3]_2\text{Cl}$ 、または $-\text{Si}[\text{O}(\text{CO})\text{CH}_3]\text{Cl}_2$ などが挙げられる。

## 【0016】

本明細書で使用される用語「アルコキシ」は、式 $-\text{OR}$  (式中、Rは、アルキル基である)の一価基を指す。

## 【0017】

本明細書で使用される用語「アルコキシカルボニル」は、式 $-(\text{CO})\text{OR}$  (式中、Rはアルキル基である)の一価基を指す。 10

## 【0018】

本明細書で使用される用語「アルコキシシリル」は、Siに付いたアルコキシ基(すなわち、 $\text{Si}-\text{OR}$  (式中、Rはアルキルである))を有する基を指す。たとえば、アルコキシシリルは、式 $-\text{Si}(\text{OR})_{3-n}(\text{L}^a)_n$  (式中、nは0~2の整数であり、 $\text{L}^a$ はハロゲンまたはアシルオキシである)を有することができる。具体例としては、 $-\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 、 $-\text{Si}(\text{OCH}_3)_2\text{Cl}$ 、または $-\text{Si}(\text{OCH}_3)\text{Cl}_2$ などが挙げられる。

## 【0019】

本明細書で使用される用語「アルキル」は、アルカンの一価基を指し、直鎖、分枝鎖、環状またはそれらの組み合わせである基を含む。該アルキル基は一般に、1~30個の炭素原子を有する。幾つかの実施形態では、該アルキル基は、1~20個の炭素原子、1~10個の炭素原子、1~6個の炭素原子、または1~4個の炭素原子を含む。アルキル基の例としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシル、シクロヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチル、およびエチルヘキシルなどが挙げられるがその限りではない。 20

## 【0020】

本明細書で使用される用語「アルキルジスルフィド」は、式 $-\text{SSR}$  (式中、Rはアルキル基である)の一価基を指す。

## 【0021】

本明細書で使用される用語「アルキレン」は、アルカンの二価基を指す。該アルキレンは、直鎖、分枝鎖、環状、またはそれらの組み合わせであってもよい。該アルキレンは一般に、1~200個の炭素原子を有する。幾つかの実施形態では、該アルキレンは、1~100個、1~80個、1~50個、1~30個、1~20個、1~10個、または1~4個の炭素原子を含む。該アルキレンの基中心は、同一炭素原子上(すなわち、アルキリデン)であっても、異なる炭素原子上であってもよい。 30

## 【0022】

本明細書で使用される「アミノシラン」は、Siに付いたアミン基を有する基を指す。たとえば、アミノシランは、式 $-\text{Si}(\text{OR}^1)_{3-n}[(\text{R}^2)\text{NH}_2]_n$  (式中、nは0~2の整数であり、 $\text{R}^1$ は、5未満の炭素鎖長を有するアルキルであり、 $\text{R}^2$ は、少なくとも2の炭素鎖長を有する別のアルキル基である)を有することができる。具体例としては、3-アミノプロピルトリエトキシシラン、3-アミノトリメトキシシランなどが挙げられる。 40

## 【0023】

本明細書で使用される用語「アラルキル」化合物 $\text{R}-\text{Ar}$  (式中、Arは芳香族炭素環基であり、Rはアルキル基である)の一価基を指す。

## 【0024】

本明細書で使用される用語「アラルキレン」は、式 $\text{R}-\text{Ar}-$  (式中、Arはアリーレン基であり、Rはアルキレン基である)の二価基を指す。

## 【0025】

本明細書で使用される用語「アリール」は、一価の芳香族炭素環基を指す。該アリール 50

は、1個の芳香族環を有してもよく、該芳香族環に結合または縮合している5個までの炭素環構造を含んでもよい。他の環構造は、芳香族、非芳香族、またはそれらの組み合わせであってもよい。アリアル基の例としては、フェニル、ビフェニル、テルフェニル、アントリル、ナフチル、アセナフチル、アントラキノリル、フェナントリル、アントラセニル、ピレニル、ペリレニル、およびフルオレニルなどが挙げられるが、その限りではない。

## 【0026】

本明細書で使用される用語「アリーレン」は、結合している、縮合している、またはそれらの組み合わせの、1～5個の環を有する芳香族炭素環化合物の二価基を指す。幾つかの実施形態では、該アリーレン基は、5個までの環、4個までの環、3個までの環、2個までの環、または1個の芳香族環を有する。たとえば、該アリーレン基は、フェニレン基

10

## 【0027】

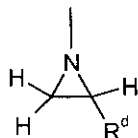
本明細書で使用される用語「アジド」は、式 - N<sub>3</sub> の基を指す。

## 【0028】

本明細書で使用される用語「アジリジニル」は、下記式：

## 【0029】

## 【化2】



20

## 【0030】

(式中、R<sup>d</sup>は、水素またはアルキルである。)  
を有するアジリジンの環状一価基を指す。

## 【0031】

本明細書で使用される用語「ベンゾトリアゾリル」は、トリアゾリル基に縮合したベンゼン基を有する一価基を指す。ベンゾトリアゾリル基の式は、C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>N<sub>3</sub>-である。

30

## 【0032】

本明細書で使用される用語「カルボニル」は、式 - (CO) - の二価基を指す。

## 【0033】

本明細書で使用される用語「カルボニルイミノ」は、式 - (CO)NR<sup>4</sup> - (式中、R<sup>4</sup>は水素、アルキル、またはアリアルである)の二価基を指す。

## 【0034】

本明細書で使用される用語「カルボニルオキシ」は、式 - (CO)O - の二価基を指す。

## 【0035】

本明細書で使用される用語「カルボニルオキシカルボニル」は、式 - (CO)O(CO) - の二価基を指す。このような基は、無水化合物の一部である。

40

## 【0036】

本明細書で使用される用語「カルボニルチオ」は、式 - (CO)S - の二価基を指す。

## 【0037】

本明細書で使用される用語「カルボキシ」は、式 - (CO)OH の一価基を指す。

## 【0038】

本明細書で使用される用語「クロロアルキル」は、少なくとも1個の水素原子が塩素原子で置換されたアルキルを指す。

## 【0039】

本明細書で使用される用語「シアノ」は、式 - CN の基を指す。

50

## 【0040】

本明細書で使用される用語「ジスルフィド」は、式 - S - S - の二価基を指す。

## 【0041】

本明細書で使用される用語「エチレン性不飽和」は、式 - C Y = C H<sub>2</sub> (式中、Yは水素、アルキル、またはアリールである)の炭素 - 炭素二重結合を有する一価基を指す。

## 【0042】

本明細書で使用される用語「フルオロアルキル」は、少なくとも1個の水素原子がフッ素原子で置換されたアルキルを指す。

## 【0043】

本明細書で使用される用語「ハロアルキル」は、少なくとも1個の水素原子が、F、Cl、Br、またはIから選択されるハロゲンで置換されたアルキルを指す。ペルフルオロアルキル基は、ハロアルキル基の下位集合である。

10

## 【0044】

本明細書で使用される用語「ハロカルボニルオキシ」は、式 - O ( C O ) X (式中、Xは、F、Cl、Br、またはIから選択されるハロゲン原子である)の一価基を指す。

## 【0045】

本明細書で使用される用語「ハロカルボニル」は、式 - ( C O ) X (式中、Xは、F、Cl、Br、またはIから選択されるハロゲン原子である)の一価基を指す。

## 【0046】

本明細書で使用される用語「ハロシリル」は、ハロゲンに付いたSi (すなわち、Si - X (式中、Xはハロゲンである))を有する基を指す。たとえば、該ハロシリル基は、式 - S i X<sub>3-n</sub> ( L<sup>b</sup> )<sub>n</sub> (式中、nは0 ~ 2の整数であり、L<sup>b</sup>は、アルコキシ、またはアシルオキシから選択される)を有するものであってもよい。幾つかの具体例としては、基 - S i C l<sub>3</sub>、- S i C l<sub>2</sub> O C H<sub>3</sub>、および - S i C l ( O C H<sub>3</sub> )<sub>2</sub>などが挙げられる。

20

## 【0047】

本明細書で使用される用語「ヘテロアルキレン」は、1つまたは複数の炭素原子がイオウ、酸素、またはN R<sup>d</sup> (式中、R<sup>d</sup>は水素またはアルキルである)で置換された二価のアルキレンを指す。該ヘテロアルキレンは、直鎖、分枝鎖、環状、またはそれらの組み合わせであってもよく、また400個までの炭素原子および30個までのヘテロ原子を含むことができる。幾つかの実施形態では、該ヘテロアルキレンは、300個までの炭素原子、200個までの炭素原子、100個までの炭素原子、50個までの炭素原子、30個までの炭素原子、20個までの炭素原子、または10個までの炭素原子を含む。

30

## 【0048】

本明細書で使用される用語「ヒドロキシ」は、式 - O Hの基を指す。

## 【0049】

本明細書で使用される用語「イソシアナト」は、式 - N C Oの基を指す。

## 【0050】

本明細書で使用される用語「メルカプト」は、式 - S Hの基を指す。

## 【0051】

本明細書で使用される「求核試薬」または「求核試薬含有材料」は、反応性酸素、イオウおよび/または窒素含有基たとえば置換されたアミノ基を含む部分を指す。求核試薬含有材料の例としては、アミノ基、アルキルまたはアリール置換アミノ基、アルキルアミノ基、アリールアミノ基、オキシアルキル基、オキシアリール基、チオアルキル基、およびチオアリール基等の部分を有するもの、アミノ基を含有する染料、たとえばニトロ染料、チアゾール染料を含むアゾ染料、アクリジン染料、オキサジン染料、チアジン染料およびアジン染料、インジゴイド類、アミノアントラキノン類、芳香族ジアミン類、アミノフェノール類、アミノナフトール類ならびにNおよびO - アジジルまたはアルキル、これらのアルキル誘導体またはアリール誘導体、ニトラミン類、チオフェノール類、またはアミノメルカプタン類の残基などが挙げられる。典型的な求核試薬含有材料は、以下の部分を含む：O C H<sub>2</sub> C O O H ; N H C H<sub>2</sub> C O O H ; S C H<sub>2</sub> C O O H ; N H C<sub>2</sub> H<sub>4</sub> S O<sub>3</sub> H ; O

40

50

$C_4H_8N(C_2H_5)_3$ ;  $NHC_6H_4SO_3H$ ;  $OC_6H_4COOH$ ;  $SC_6H_4COOH$ ;  $NHC_2H_4OH$ ;  $OC_2H_4OH$ ; および  $NHC_3H_6NH(C_2H_4OH)_2$ 。

【0052】

本明細書で使用される用語「オキシ」は、式 - O - の二価基を指す。

【0053】

本明細書で使用される用語「ペルフルオロアルキル」は、水素原子の全てがフッ素原子で置換されているアルキル基を指す。ペルフルオロアルキル基は、フルオロアルキル基の部分集合である。

【0054】

本明細書で使用される用語「ホスファト」は、式 -  $OP_3H_2$  の一価基を指す。

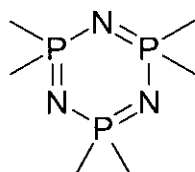
10

【0055】

本明細書で使用される「ホスホニトリル部分」または「ホスホニトリル基」は、下記一般式：

【0056】

【化3】



20

【0057】

の構造を指す。

【0058】

本明細書で使用される「ホスホニトリル繫留化合物」または「ホスホニトリル繫留基」は、少なくとも1つのホスホニトリル部分または基を有する繫留化合物または繫留基を指す。

【0059】

本明細書で使用される用語「ホスホノ」は、式 -  $PO_3H_2$  の一価基を指す。

30

【0060】

本明細書で使用される用語「ホスホラミド」は、式 -  $NHPO_3H_2$  の一価基を指す。

【0061】

本明細書で使用される用語「一級芳香族アミノ」は、式 -  $ArNH_2$  (式中、Arはアリアル基である) の一価基を指す。

【0062】

本明細書で使用される用語「二級芳香族アミノ」は、式 -  $ArNR^hH$  (式中、Arはアリアル基であり、 $R^h$ はアルキルまたはアリアルである) の一価基を指す。

【0063】

本明細書で使用される用語「三級アミノ」は、式 -  $NR_2$  (式中、Rはアルキルである) の基を指す。

40

【0064】

本明細書で使用される用語「繫留化合物」は、少なくとも2つの反応基を有する化合物を指す。該反応基の1つ(すなわち、基材反応性官能基)は、基材表面上の相補的官能基と反応して、繫留基を形成することができる。もう1つの反応基は、求核試薬含有材料か、あるいは別の繫留化合物(またはその誘導体またはオリゴマー)または求核試薬含有材料と結合することができる別の部分のいずれかと、反応することができる。該繫留化合物の2つの反応基が反応した結果、基材と、該基材上に固定化されるアミン含有材料等の求核試薬含有材料との間に、結合基が形成される。

50

## 【0065】

本明細書で使用される用語「繫留基」は、繫留化合物と、繫留化合物を有する基材表面上の相補的官能基との反応により生じる、基材に付着した基を指す。

## 【0066】

前述の概要は、本発明の全ての可能な実施形態を包める意図はない。当業者は、好ましい実施形態の詳細な説明、様々な実施例および添付の特許請求の範囲を含む、開示内容の残りを考えるとき、本発明の特徴および利点をより十分に理解するであろう。

## 【0067】

好ましい実施形態の詳細な説明

本発明は、求核試薬含有材料を基材に固定化するための物品および方法を提供する。基材と少なくとも1つの求核試薬含有材料との間の繫留化合物用の、反応性官能基を有するホスホニトリル化合物を開示する。本発明で有用な繫留化合物は、求核攻撃を受けやすい反応基を含む。繫留化合物上の反応性官能基の少なくとも1つは、該繫留化合物を基材の表面に付ける手段を提供する。残りの官能基は、求核試薬含有材料、たとえばアミン官能タンパク質、酵素、他の生体分子等々と、それぞれ反応することができる。加えて、該官能基は、求核試薬含有基と反応することができるか、あるいは他の部分、たとえば他の類似した繫留化合物か、または構造が単純であっても複雑であってもよく（たとえば、分岐鎖、直鎖等）、またやはり求核試薬含有材料と結合することができるさらなる反応基を一般に含む他の反応性部分に、さらに連結することができる。

10

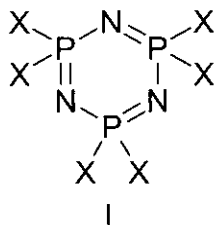
## 【0068】

本発明の実施形態では、生物学的分子を、該基材表面に結合するための繫留化合物は、ホスホニトリル基を含み、下記式 I :

20

## 【0069】

## 【化4】



30

## 【0070】

の一般組成のものであってもよい。

ここで、

各 X は、同じであっても異なってもよく、また求核試薬含有材料と結合するために、求核攻撃を受けやすい反応基を含む。一般的に、X はハロゲンを含み、最も一般的には、X は塩素である。

## 【0071】

本発明で有用なホスホニトリル繫留化合物は、式 I における各 X が塩素である塩化ホスホニトリル三量体（「PNC」）を含む。PNC を基材に繫留する際に、該塩素の少なくとも1つを基材表面の部分と反応させて、PNC 部分を該基材に結合する。該 PNC が該基材に結合されるとき、該ホスホニトリル繫留化合物は、それぞれ、求核試薬含有材料、たとえば生物学的に活性な材料と反応して、ホスホニトリル部分を介して該生物学的に活性な材料を該基材に連結することができる、さらなる反応基を含む。

40

## 【0072】

本発明の幾つかの実施形態では、該ホスホニトリル繫留基は、もっぱら PNC 分子に由来してもよい。幾つかの実施形態では、該ホスホニトリル繫留基は、PNC のオリゴマーまたは誘導体であると考えられる化合物に由来してもよい。式 I を参照すると、もっぱら

50

PNCに由来する繋留基は、各Xが塩素である式Iの化合物である。

【0073】

本発明での使用に適するホスホニトリル三量体のオリゴマーは、該X基の少なくとも1つが塩素である式Iの化合物を含む。

【0074】

本発明のホスホニトリル繋留基に含めるのに適当なPNC誘導体は、該官能基が一般的に求核試薬である一官能基、二官能基または他の多官能基を含んでもよい部分で少なくとも1つのXが置換されている式Iの化合物を含む。このような官能基は、全体または一部として、脂肪族（直鎖または分枝鎖）であっても芳香族であってもよい、有機部分であってもよい。幾つかの実施形態では、該ホスホニトリル部分を該基材に付ける前に、一官能性、二官能性および/または多官能性部分をホスホニトリル部分に結合してもよい。幾つかの実施形態では、該ホスホニトリル部分が基材に既に付けられた（たとえば、結合された）後で、一官能性、二官能性および/または多官能性部分をホスホニトリル部分に結合してもよい。

10

【0075】

該ホスホニトリル部分がPNCに由来する実施形態では、塩素（式IのXは全て塩素である）の反応は一般的に逐次的であり、各塩素の反応性は、PNC上に残存する塩素の数、PNCと反応させる部分の性質（たとえば、求核性、立体障害）および反応条件（温度、水の存在、化学量論または反応物質等）によって異なる。たとえば、式Iの基Xの1つを該基材表面の部分と反応させて、該ホスホニトリル部分を該基材に結合する場合、残りの未反応のX基は、依然として、一官能性、二官能性および/または多官能性部分を含む求核試薬含有材料と反応できる。

20

【0076】

一官能基は、式Iの化合物のX基の1つと反応できる反応基（たとえば、求核試薬）を有する部分を含むが、概して、さらなる反応基を含まない。幾つかの実施形態では、一官能基は、本発明の基材または繋留基に必要なまたは望ましい、1つまたは複数の所望の特性を有する基を含んでもよい。適当な一官能基は、反応生成物を親水性または疎水性にさせる基、ある種の溶媒における溶解度を高める基、分子間相互作用を増強する基、等々を含む。例としては、一官能性有機アルコール、アミン類およびメルカプタン類などが挙げられる。

30

【0077】

二官能基は、ホスホニトリル部分と反応できる第1の反応基および該ホスホニトリル部分とやはり反応できる第2の反応基を含むか、またはそれが、たとえばPNC等の、式Iの第2の化合物を含む別の化合物または部分と反応できる点で、連結基であってもよい。幾つかの実施形態では、二官能基は、ホスホニトリル部分を互いに連結して、二官能性連結基を介して互いに連結される少なくとも2つのホスホニトリル部分からなる繋留基を形成することができる連結基を含む。このような構造において、該ホスホニトリル部分は、たとえば、他の求核試薬含有材料とこのような生物学的活性分子を結合することができる未反応基（たとえば、式Iによる未反応のX基）を含む。幾つかの実施形態では、該未反応基は、1つまたは複数の二官能性連結基を介して一緒に繋留または連結された1つ、2つ、またはそれより多い、ホスホニトリル部分に塩素を含んでもよい。幾つかの実施形態では、該二官能基は、同一ホスホニトリル部分の2つの反応基（式Iの2つのX基）と反応することができる。

40

【0078】

適当な二官能性部分は、2つの反応基、たとえば2つの求核基を有する化合物を含む。具体的な二官能性部分としては、たとえば、4,7,10-トリオキサ-1,13-トリデカンジアミン、1,6-ヘキサンジアミン、メチル-オキシラン、p-フェニレンジアミン、2-アミノエタノール、4,4-チオビスベンゼンチオール、ジメチル-1,6-ヘキサンジアミン等がある。他の二官能性部分は、当業者に周知であり、また本発明は、あらゆる観点で、前述の特定の部分に限定されない。

50

## 【0079】

多官能性部分はまた、基材に結合した第1のホスホニトリル部分と結合できる第1の反応基、および同一ホスホニトリル部分あるいは式Iの他のホスホニトリル部分または化合物（たとえば、TCI）を含む他の化合物または部分と反応することができる第2、第3および可能な他のさらなる反応基を含む点で、連結基も含んでもよい。幾つかの実施形態では、多官能基は、2つ以上のホスホニトリル部分を互いに連結して、多官能性連結基を介して一緒に連結された2つ以上のホスホニトリル部分からなる分枝した繫留基を形成することができる連結基を含む。このような構造では、該ホスホニトリル部分は、他の求核試薬含有材料、たとえば1つまたは複数の生物学的活性分子と結合することができる未反応基（たとえば、式Iによる未反応のX基）を含む。幾つかの実施形態では、該未反応基は、1つまたは複数の多官能性連結基を介して一緒に繫留または連結された1つ、2つまたはそれより多いホスホニトリル部分に塩素を含んでもよい。幾つかの実施形態では、該多官能性連結基は、第1のホスホニトリル基の複数の反応基と反応し、次いで他のホスホニトリル基または他の基の他の反応基と反応することが可能である。

10

## 【0080】

適当な多官能性部分は、2つより多い反応基（たとえば、求核基）を有する化合物を含む。幾つかの実施形態では、該多官能性部分は、オリゴマー部分またはポリマー部分であってもよい。具体的な多官能性部分としては、たとえば、加水分解した2-エチル-4,5-ジヒドロ-オキサゾールホモポリマー、ポリエチレンイミン（線状構造および分枝構造を含む）、ならびに当業者に周知の他の部分などがある。

20

## 【0081】

当然のことながら、前述の説明は、本明細書に記載の特定の一官能基、二官能基または他の多官能基に限定されると解釈してはならない。本発明は、少なくとも1つのホスホニトリル部分を含む繫留化合物および繫留基を含むことを意図する。

## 【0082】

本発明は、本明細書に記載されているような、基材に付けられたホスホニトリル繫留基を含む物品を提供する。該基材に付いた繫留基は、基材表面の相補的官能基「G」と、式Iの化合物のX基の少なくとも1つとの反応生成物である。該基材に付いた繫留基は、別の分子または材料（たとえば、求核試薬含有材料）と反応して該材料を捕捉し、それを該基材に繫留することができる少なくとも1つ、一般的には2つ以上の反応基を有する。

30

## 【0083】

該基材は、該ホスホニトリル繫留化合物を付着させることができる固相材料である。該基材は、式Iの化合物を、該基材表面に付着させるときに使用される可能性がある溶液または溶剤に溶解しない。一般的に、ホスホニトリル繫留化合物は、該基材の外側部のみに付着され、該基材の残りの部分は、ホスホニトリル繫留基を該基材に付着させる工程で修飾されない。該基材が、該基材にくまなく分布している基「G」を有するのであれば、一般的に、外側部（たとえば、表面上または表面付近）の基のみが、式Iによる化合物のX基と、通常、反応できる。

## 【0084】

該基材は、薄膜、シート、膜、フィルター、不織繊維、織った繊維、中空または中実のビーズ、ピン、平板、チューブ、ロッド、パイプ、またはウエハーを含むがその限りではない、有用な形態を有することができる。該基材は、多孔性であっても無孔性であってもよく、剛性であっても柔軟であっても、透明であっても不透明であっても、透き通っていても有色でもよく、また反射質であっても非反射質であってもよい。適当な基材材料としては、たとえば、ポリマー材料、ガラス、セラミック、金属、金属酸化物、水和金属酸化物、またはそれらの組み合わせなどがある。

40

## 【0085】

該基材は、単層または単一材料であってもよく、1つまたは複数の材料の多層を有してもよい。たとえば、該基材は、該基材の外層が式Iの化合物におけるX基と反応できる相補的官能基を含む最外層を支持する、1つまたは複数の内層または第1層を有することが

50

できる。幾つかの実施形態では、外層表面を化学的に修飾するかまたは別の材料で被覆して、式 I による基を含むホスホニトリル基と反応できる相補的官能基を含む外層を提供することが可能である。

【0086】

基材または基材の一部としての使用に適当なポリマー材料としては、ポリオレフィン類、ポリスチレン類、ポリアクリレート類、ポリメタクリレート類、ポリアクリロニトリル類、ポリ酢酸ビニル類、ポリビニルアルコール類、ポリ塩化ビニル類、ポリオキシメチレン類、ポリカーボネート類、ポリアミド類、ポリイミド類、ポリウレタン類、フェノール類、ポリアミン類、アミノ-エポキシ樹脂、ポリエステル類、シリコーン類、セルロース系ポリマー、多糖類、またはそれらの組み合わせなどがあるが、その限りではない。幾つかの実施形態では、該ポリマー材料は、式 I による化合物における基 X を含むホスホニトリル基と反応できる相補的官能基を有するモノマーを使用して調製されるコポリマーである。たとえば、該モノマーは、カルボキシ基、メルカプト基、ヒドロキシ基、アミノ基、またはアルコキシシリル基を含むことができる。

10

【0087】

幾つかの実施形態では、適当なポリマー材料は、最初に均質なポリマー溶液を流延し、冷却器インターフェース（たとえば、水浴または冷却した流延ホイール）に暴露して、温度を下げることにより溶液塗膜で相分離を誘導する、位相反転法である熱誘導性相分離（「TIPS」）によって生じるものを含む。適当な TIPS フィルムまたは膜は、幅広い物理的フィルム特性および顕微鏡的孔径を有することが可能である。これらは、様々なポリマーのいずれかで調製された、比較的剛性の基材であっても非剛性の基材であってもよい。米国特許第 4,539,256 号明細書、米国特許第 5,120,594 号明細書、および米国特許第 5,238,623 号明細書の教示に従って製造された TIPS 膜は、全て本発明での使用に適する。該 TIPS 膜は、たとえば、高密度ポリエチレン（HDPE）、ポリプロピレン、ポリフッ化ビニリデン（PVDF）、ポリエチレン-ビニルアルコールコポリマー（たとえば、テキサス州ハウストンのエバル・カンパニー・オブ・アメリカ（EVALCA）から EVAL F101A の商用名で販売されている）を含んでもよい。該膜は、親水性ポリマー（たとえば、ポリエチレン-ビニルアルコールコポリマーまたは EVAL）で被覆された TIPS HDPE 膜またはポリプロピレン膜、あるいはポリジアルジメチルアンモニウムクロライドまたは四級化ジメチルアミノエチルアクリレートを組み込んだポリマー等の、親水性の強塩基性の、プラスに帯電したコーティングで被覆された TIPS ポリプロピレン支持体等の、材料の組み合わせを含んでもよい。本発明での使用に適する TIPS 膜のもう 1 つの例は、ミネソタ州セントポールのスリーエム・カンパニー（3M Company of St. Paul, Minnesota）から販売されている HDPE 膜である。このような膜の特徴としては、約 0.09  $\mu\text{m}$  の孔径と約 0.9 ミル（0.023 mm）の厚さなどがある。概して、TIPS 技術は、約 80 nm ~ 約 0.5  $\mu\text{m}$  の範囲内の孔径を含むもの等の、精密濾過および限外濾過範囲の孔径を有する幅広い物理的フィルム特性を提供することができる。

20

30

【0088】

材料の組み合わせを固体支持体メンバーとして使用することが可能であり、また前述の説明は、前述の材料単独および他の材料との組み合わせを含むと理解されたい。

40

【0089】

本発明の幾つかの実施形態は、TIPS 膜に塗布されたまたは別のポリマー基材上に塗布されたダイヤモンド様ガラス（DLG）コーティングを有する多層基材を使用してもよい。該 DLG コーティングは、EP 1 266 045 B1（デイビッド（David）ら）に記載されている方法に従って、プラズマ蒸着法による等の、公知の技術を使用して、塗布することが可能である。TIPS 基材を用いる実施形態では一般に、DLG が TIPS 膜の孔内に及ぶように、該 TIPS 膜の全表面に DLG コーティングを塗布する。前述の通り、TIPS 膜の製造に、他の材料を使用してもよく、また本発明での使用に適する基材を提供するために、DLG コーティングを、このような他の材料に同様に塗布

50

してもよい。

【0090】

適当なガラスおよびセラミック基材材料は、たとえば、ナトリウム、ケイ素、アルミニウム、鉛、ホウ素、リン、ジルコン、マグネシウム、カルシウム、ヒ素、ガリウム、チタン、銅、またはそれらの組み合わせを含むことができる。ガラスは一般に、様々なタイプのケイ酸塩含有材料を含む。

【0091】

幾つかの実施形態では、該基材は、国際公開第01/66820 A1号パンフレット（その開示内容を全体として、参照により本明細書に援用する）に記載されているようなダイヤモンド様ガラスの層を含む。該ダイヤモンド様ガラスは、炭素、ケイ素、および水素、酸素、フッ素、イオウ、チタン、または銅から選択される1つまたは複数の元素を含む、非晶質材料である。幾つかのダイヤモンド様ガラス材料は、プラズマ法を使用して、テトラメチルシラン前駆物質から作られる。疎水性材料を製造し、酸素プラズマでさらに処理して、表面上のシラノール濃度を調節することができる。

10

【0092】

ダイヤモンド様ガラスは、薄膜の形態であってもよく、該基材における別の層上または材料上のコーティングの形態であってもよい。幾つかの用途では、該ダイヤモンド様ガラスは、少なくとも30重量%の炭素、少なくとも25重量%のケイ素、および45重量%までの酸素を有する薄膜の形態であってもよい。このようなフィルムは、柔軟かつ透明であり得る。幾つかの実施形態では、該ダイヤモンド様ガラスは、多層基材の外層である。一具体例では、該基材の第2層（たとえば、支持層）は、ポリマー材料であり、第1層はダイヤモンド様ガラスの薄膜である。該繋留基は、該ダイヤモンド様ガラスの表面に付着している。

20

【0093】

幾つかの多層基材では、該ダイヤモンド様ガラスは、ダイヤモンド様炭素の層上に蒸着される。たとえば、該第2層（たとえば、支持層）は、表面上に蒸着されたダイヤモンド様炭素の層を有するポリマーフィルムである。ダイヤモンド様ガラスの層は、ダイヤモンド様炭素層の上に蒸着される。幾つかの実施形態では、該ダイヤモンド様炭素は、多層基材におけるポリマー層とダイヤモンド様ガラスの層との間の接合層または下塗層である。たとえば、該多層基材は、ポリイミド層またはポリエステル層、該ポリイミドまたはポリエステル上に蒸着されたダイヤモンド様炭素の層、および該ダイヤモンド様炭素上に蒸着されたダイヤモンド様ガラスの層を含むことができる。別の例では、該多層基材は、下記の順序で配列された多数の層を含む：ダイヤモンド様ガラス、ダイヤモンド様炭素、ポリイミドまたはポリエステル、ダイヤモンド様炭素、およびダイヤモンド様ガラス。

30

【0094】

ダイヤモンド様炭素フィルムは、たとえば、プラズマ反応器内でアセチレンから調製することができる。このようなフィルムの他の調製方法は、米国特許第5,888,594号明細書および米国特許第5,948,166号明細書ならびに論文 M.デイビッド(David)ら、ALCHE JOURNAL、37(3)、367-376頁(1991年3月)(その開示内容を、参照により本明細書に援用する)に記載されている。

40

【0095】

基材に適する金属、金属酸化物、または水和金属酸化物は、たとえば、金、銀、白金、パラジウム、アルミニウム、銅、クロム、鉄、コバルト、ニッケル、亜鉛、等々を含むことができる。該金属含有材料は、ステンレススチール、インジウムスズ酸化物等々の合金であってもよい。幾つかの実施形態では、金属含有材料は、多層基材の最上層である。たとえば、該基材は、ポリマーの第2層および金属を含有する第1層を有することができる。一例では、該第2層はポリマーフィルムであり、該第1層は、金の薄膜である。他の例では、多層基材は、チタン含有層で被覆し、次いで金含有層で被覆した、ポリマーフィルムを含む。すなわち、該チタン層は、該金の層を該ポリマーフィルムに接着するための接合層または下塗層の役割をすることができる。

50

## 【0096】

多層基材の他の例では、ケイ素支持層は、クロム層で覆われ、次いで金の層で覆われている。該クロム層は、該金属の該ケイ素層への接着を改善することができる。

## 【0097】

該基材の表面は一般に、カルボキシ、ハロゲン（たとえば、塩素）、ハロカルボニル、ハロカルボニルオキシ、シアノ、ヒドロキシ、メルカプト、イソシアナト、ハロシリル、アルコキシシリル、アシリオキシシリル、アジド、ハロアルキル、三級アミノ、一級芳香族アミノ、二級芳香族アミノ、ジスルフィド、アルキルジスルフィド、ベンゾトリアゾリル、ホスホニトリル、ホスホノ、ホスホロアミド、ホスファト、またはエチレン性不飽和基と反応できる基を含む。すなわち、該基材は、式Iの化合物における基Xと反応できる基「G」を含む（すなわち、該基材は、基Xに相補的な官能基を含む）。基材は、相補的官能基を含む外層を有するように処理された支持体材料を含むことができる。該基材は、Xと反応できる基か、または該基材表面上の部分およびXと反応して、該基材と該ホスホニトリル基を一緒に連結することにより、連結基の役割を果たすことができる中間体化合物と反応できる基を、有することが分かっている任意の固相材料から作製することができる。

10

## 【0098】

カルボキシ基またはハロカルボニル基は、ヒドロキシ基を有する基材と反応して、カルボニルオキシ含有結合基を形成することができる。ヒドロキシ基を有する基材材料の例としては、ポリビニルアルコール、コロナ処理ポリエチレン、ポリメタクリレート類のヒドロキシ置換エステル類、ポリアクリレート類のヒドロキシ置換エステル類、およびガラスまたはポリマーフィルム等の、支持体材料上のポリビニルアルコールコーティングなどが挙げられるがその限りではない。

20

## 【0099】

カルボキシ基またはハロカルボニル基はまた、メルカプト基を有する基材と反応してカルボニルチオ含有結合基を形成することもできる。メルカプト基を有する基材材料の例としては、ポリアクリレート類のメルカプト置換エステル類、ポリメタクリレート類のメルカプト置換エステル類、およびメルカプトアルキルシランで処理したガラスなどが挙げられるがその限りではない。

## 【0100】

加えて、カルボキシ基またはハロカルボニル基は、一級芳香族アミノ基、二級芳香族アミノ基、または二級脂肪族アミノ基と反応して、カルボニルイミノ含有付着基を形成することができる。芳香族一級アミノ基または二級アミノ基を有する基材材料の例としては、ポリアミン類、ポリメタクリレートのアミン置換エステル類、ポリアクリレートのアミン置換エステル類、ポリエチレンジアミン類、およびアミノアルキルシランで処理したガラスなどが挙げられるがその限りではない。

30

## 【0101】

ハロカルボニルオキシ基は、ヒドロキシ基を有する基材と反応してオキシカルボニルオキシ含有結合基を形成することができる。ヒドロキシ基を有する基材材料の例としては、ポリビニルアルコール、コロナ処理ポリエチレン、ポリメタクリレート類のヒドロキシ置換エステル類、ポリアクリレート類のヒドロキシ置換エステル類、およびガラスまたはポリマーフィルム等の、支持体材料上のポリビニルアルコールコーティングなどが挙げられるがその限りではない。

40

## 【0102】

ハロカルボニルオキシ基はまた、メルカプト基を有する基材と反応して、オキシカルボニルチオ含有結合基を形成することもできる。メルカプト基を有する基材材料の例としては、ポリメタクリレート類のメルカプト置換エステル類、ポリアクリレート類のメルカプト置換エステル類、およびメルカプトアルキルシランで処理したガラスなどが挙げられるがその限りではない。

## 【0103】

50

加えて、ハロカルボニルオキシ基は、一級芳香族アミノ基、二級芳香族アミノ基、または二級脂肪族アミノ基を有する基材と反応して、オキシカルボニルイミノ含有結合基を形成することができる。芳香族一級アミノ基または二級アミノ基を有する基材材料の例としては、ポリアミン類、ポリメタクリレートのアミン置換エステル類、ポリアクリレートのアミン置換エステル類、ポリエチレンイミン類、およびアミノアルキルシランで処理したガラスなどが挙げられるがその限りではない。

【0104】

ヒドロキシ基は、イソシアネート基を有する基材と反応して、オキシカルボニルイミノ含有結合基を形成することができる。イソシアネート基を有する適当な基材としては、支持体材料上の2-イソシアナトエチルメタクリレートポリマーのコーティングなどが挙げられるがその限りではない。適当な支持体材料としては、ガラスおよびポリマー材料、たとえばポリエステル類、ポリイミド類、等々がある。

10

【0105】

ヒドロキシ基はまた、カルボキシ、カルボニルオキシカルボニル、またはハロカルボニルを有する基材と反応して、カルボニルオキシ含有結合基を形成することもできる。適当な基材としては、支持体材料上のアクリル酸ポリマーまたはコポリマーのコーティング、あるいは支持体材料のメタクリル酸ポリマーまたはコポリマーのコーティングなどが挙げられるがその限りではない。適当な支持体材料としては、ガラスおよびポリマー材料、たとえばポリエステル類、ポリイミド類、等々がある。他の適当な基材としては、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、またはそれらの組み合わせとのポリエチレンのコポリマーなどがある。

20

【0106】

メルカプト基は、イソシアネート基を有する基材と反応することができる。メルカプト基とイソシアネート基との反応は、チオカルボニルイミノ含有結合基を形成する。イソシアネート基を有する適当な基材としては、支持体材料上の2-イソシアナトエチルメタクリレートコポリマーのコーティングなどが挙げられるがその限りではない。適当な支持体材料としては、ガラスおよびポリマー材料、たとえばポリエステル類、ポリイミド類、等々がある。

【0107】

メルカプト基はまた、ハロカルボニル基を有する基材と反応して、カルボニルチオ含有結合基を形成することもできる。ハロカルボニル基を有する基材としては、たとえば、クロロカルボニル置換ポリエチレンなどがある。

30

【0108】

メルカプト基はまた、ハロカルボニルオキシ基を有する基材と反応して、オキシカルボニルチオ含有結合基を形成することもできる。ハロカルボニル基を有する基材としては、ポリビニルアルコールのクロロホルミルエステル類などがある。

【0109】

加えて、メルカプト基は、エチレン性不飽和基を有する基材と反応して、チオエーテル含有結合基を形成することができる。エチレン性不飽和基を有する適当な基材としては、ブタジエンから誘導されるポリマー類およびコポリマー類などが挙げられるがその限りではない。

40

【0110】

PNC等のホスホニトリル部分は、求核試薬官能性を有するガラス、ダイヤモンド様ガラス、金属、金属酸化物およびポリマー基材を含む、求核試薬含有材料と反応することができる。DLG表面は、PNC部分と反応するために必要な官能性を提供するであろう、アミノシラン(たとえば、3-アミノプロピルトリエトキシシラン、3-アミノトリメトキシシラン)等の、求核試薬を含む表面を含むように処理することが可能である。このような表面はまた、多孔性ポリマーコーティング(たとえば、本明細書に記載のTIPS材料)を含んでもよい。ポリマー基材はまた、たとえば、アンモニアグラフト化焼結ポリエチレン、アミノ化ポリエステルブローメルト繊維膜、ヒドロキシル化ポリプロピレン、ポ

50

リエステル、およびポリエチレンブローメルト繊維膜、およびアミノメチル化スチレンジビニルベンゼンも包含することができる。PNC材料はまた、金属または金属酸化物材料と反応することも可能である。

【0111】

イソシアネート基は、ヒドロキシ基を有する基材と反応して、オキシカルボニルイミノ含有結合基を形成することができる。ヒドロキシ基を有する基材材料の例としては、ポリビニルアルコール、コロナ処理ポリエチレン、ポリメタクリレート類またはポリアクリレート類のヒドロキシ置換エステル類、およびガラスまたはポリマーフィルム上のポリビニルアルコールコーティングなどが挙げられるがその限りではない。

【0112】

イソシアネート基はまた、メルカプト基と反応して、チオカルボニルイミノ含有結合基を形成することもできる。メルカプト基を有する基材材料の例としては、ポリメタクリレート類またはポリアクリレート類のメルカプト置換エステル類およびメルカプトアルキルシランで処理したガラスなどが挙げられるがその限りではない。

【0113】

加えて、イソシアネート基は、一級芳香族アミノ基、二級芳香族アミノ基、または二級脂肪族アミノ基と反応して、尿素含有結合基を形成することができる。一級または二級芳香族アミノ基を有する適当な基材としては、ポリアミン類、ポリエチレンイミン類、およびガラス等の支持体材料上、またはリエステルもしくはポリイミド等のポリマー材料上の、アミノアルキルシランのコーティングなどが挙げられるがその限りではない。

【0114】

イソシアネート基はまた、カルボキシと反応してO-アシルカルバモイル含有結合基を形成することができる。カルボン酸基を有する適当な基材としては、ガラスまたはポリマー支持体上のアクリル酸ポリマーまたはコポリマーのコーティングあるいはメタクリル酸ポリマーまたはコポリマーのコーティングなどが挙げられるがその限りではない。コポリマーとしては、ポリエチレンおよびポリアクリル酸またはポリメタクリル酸を含むコポリマーなどが挙げられるがその限りではない。適当なポリマー支持体材料としては、リエステル類、ポリイミド類、等々がある。

【0115】

ハロシリル基、アルコキシシリル基、またはアシリオキシシリル基は、シラノール基を有する基材と反応して、ジシロキサン含有結合基を形成することができる。適当な基材としては、様々なガラス類、セラミック材料、またはポリマー材料から調製されるものなどがある。これらの基はまた、表面上に金属酸化物基を有する様々な材料と反応して、シラン含有リンケージを形成することもできる。適当な金属としては、銀、アルミニウム、銅、クロム、鉄、コバルト、ニッケル、亜鉛、等々などが挙げられるがその限りではない。幾つかの実施形態では、該金属は、ステンレススチールまたは別の合金である。ポリマー材料は、シラノール基を有するように調製することができる。たとえば、シラノール基を有する市販のモノマーとしては、ウィスコンシン州ミルウォーキーのアルドリッチ・ケミカル・カンパニー(Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI)から販売されている3-(トリメトキシシリル)プロピルメタクリレートおよび3-アミノプロピルトリメトキシシランなどがある。

【0116】

アジド基は、たとえば、炭素-炭素三重結合を有する基材と反応して、トリアゾールジイル含有結合基を形成することができる。アジド基はまた、ニトリル基を有する基材と反応して、テトラゼンジイル含有結合基を形成することもできる。ニトリル基を有する基材としては、ガラスまたはポリマー材料等の支持体材料上のポリアクリロニトリルのコーティングなどが挙げられるがその限りではない。適当なポリマー支持体材料としては、たとえば、リエステル類およびポリイミド類などがある。ニトリル基を有する他の適当な基材としては、アクリロニトリルポリマーまたはコポリマーおよび2-シアノアクリレートポリマーまたはコポリマーなどがある。

10

20

30

40

50

## 【0117】

アジド基はまた、歪んだオレフィン基と反応して、トリアゾールジイル含有付着基を形成することができる。オレフィン基を有する適当な基材としては、ペンダント・ノルボルネニル官能基を有するコーティングなどがある。適当な支持体材料としては、ポリエステル類およびポリイミド類等の、ガラスおよびポリマー材料などが挙げられるがその限りではない。

## 【0118】

アジリジニル基は、メルカプト基と反応して、 $\beta$ -アミノアルキルチオエーテル含有結合基を形成することができる。メルカプト基を有する基材材料の例としては、ポリメタクリレート類またはポリアクリレート類のメルカプト置換エステル類およびメルカプトアルキルシランで処理したガラスなどが挙げられるがその限りではない。

10

## 【0119】

加えて、アジリジニル基は、カルボキシ基と反応して、 $\beta$ -アミノアルキルオキシカルボニル含有結合基を形成することができる。カルボキシを有する適当な基材としては、ガラスまたはポリマー支持体上の、アクリル酸ポリマーまたはコポリマーのコーティング、あるいはメタクリル酸ポリマーまたはコポリマーのコーティングなどが挙げられるがその限りではない。コポリマーとしては、ポリエチレンおよびポリアクリル酸またはポリメタクリル酸を含むコポリマーなどが挙げられるがその限りではない。適当なポリマー支持体材料としては、ポリエステル類、ポリイミド類、等々がある。

## 【0120】

ハロアルキル基は、たとえば、三級アミノ基を有する基材と反応して、四級アンモニウム含有結合基を形成することができる。三級アミノ基を有する適当な基材としては、ポリジメチルアミノスチレンまたはポリジメチルアミノエチルメタクリレートなどが挙げられるがその限りではない。

20

## 【0121】

同様に、三級アミノ基は、たとえば、ハロアルキル基を有する基材と反応して、四級アンモニウム含有結合基を形成することができる。ハロアルキル基を有する適当な基材としては、たとえば、支持体材料上のハロアルキルシランのコーティングなどがある。支持体材料としては、ガラスおよびポリエステル類およびポリイミド類等のポリマー材料などが挙げられるがその限りではない。

30

## 【0122】

一級芳香族アミノまたは二級芳香族アミノ基は、たとえば、イソシアネート基を有する基材と反応して、オキシカルボニルイミノ含有結合基を形成することができる。イソシアネート基を有する適当な基材としては、ガラスまたはポリマー支持体上の2-イソシアナトエチルメタクリレートポリマーまたはコポリマーのコーティングなどが挙げられるがその限りではない。適当なポリマー支持体としては、ポリエステル類、ポリイミド類、等々などがある。

## 【0123】

一級芳香族アミノまたは二級芳香族アミノ基はまた、カルボキシ基またはハロカルボニル基を含有する基材と反応して、カルボニルイミノ含有結合基を形成することもできる。適当な基材としては、支持体材料上のアクリル酸またはメタクリル酸ポリマーコーティングなどが挙げられるがその限りではない。該支持体材料は、たとえば、ガラスまたはポリエステル類またはポリイミド類等のポリマー材料であってもよい。他の適当な基材としては、ポリエチレンおよびポリメタクリル酸またはポリアクリル酸のコポリマーなどがある。

40

## 【0124】

ジスルフィドまたはアルキルジスルフィド基は、たとえば、金属表面と反応して、金属スルフィド含有結合基を形成することができる。適当な金属としては、金、白金、パラジウム、ニッケル、銅、およびクロムなどが挙げられるがその限りではない。該基材はまた、インジウムスズ酸化物等の合金または誘電体材料であってもよい。

50

## 【0125】

ベンゾトリアゾリルは、たとえば、金属または金属酸化物表面を有する基材と反応することができる。適当な金属または金属酸化物としては、たとえば、銀、アルミニウム、銅、クロム、鉄、コバルト、ニッケル、亜鉛、等々がある。該金属または金属酸化物は、ステンレススチール、インジウムスズ酸化物、等々の合金を包含することができる。

## 【0126】

ホスホニトリルは、基材の表面と関連したアミノ官能性を有する基材と反応することができる。アミノシランで処理したガラス表面およびダイヤモンド様ガラス表面は、ホスホニトリル部分と反応したり、ホスホニトリル部分に付着したりするのに適する。このようなDLG基材において、該アミノ官能性は、求核攻撃により、該ホスホニトリル部分上のX基（たとえば、塩素）と反応することができる相補的官能基「G」を提供する。結果として生じる系で、該X基は、アミノ官能基と置き換えられ、その結果、該ホスホニトリル部分を該基材に繫留する。

10

## 【0127】

ホスホノ、ホスホロアミド、またはホスファトは、たとえば、金属または金属酸化物表面を有する基材と反応することができる。適当な金属または金属酸化物としては、たとえば、銀、アルミニウム、銅、クロム、鉄、コバルト、ニッケル、亜鉛、等々がある。金属または金属酸化物は、ステンレススチール、インジウムスズ酸化物、等々の合金を包含することができる。

## 【0128】

エチレン性不飽和基は、たとえば、メルカプト基で置換されたアルキル基を有する基材と反応することができる。該反応は、ヘテロアルキレン含有結合基を形成する。適当な基材としては、たとえば、ポリアクリレート類またはポリメタクリレート類のメルカプト置換アルキルエステル類などがある。

20

## 【0129】

エチレン性不飽和基はまた、化学蒸着法を使用して形成されるケイ素基材等の、ケイ素表面を有する基材と反応することもできる。このようなケイ素表面は、白金触媒の存在下でエチレン性不飽和基と反応してアルキレン基に結合したケイ素を有する結合基を形成することができる-SiH基を含むことができる。

## 【0130】

加えて、エチレン性不飽和基は、炭素-炭素二重結合を有する基材と結合してアルキレン含有結合基を形成することができる。このような基材としては、たとえば、ブタジエンから誘導されるポリマーなどがある。

30

## 【0131】

本発明による物品は一般的に、基材に付いた官能基が、Xと反応して、イオン結合、共有結合、またはそれらの組み合わせを形成することができる基である、該基材表面上の相補的基材-官能基と、式I（たとえば、PNC）のホスホニトリル化合物との反応生成物を含む、基材および基材に付いた繫留基を含む。幾つかの実施形態では、1つの相補的基材官能基が反応して、1つのホスホニトリル化合物と複数の結合を形成することが可能である。基材に付いた官能基上の未反応基（たとえば、未反応の塩化物）は、求核試薬含有材料とのさらなる反応に利用できる。

40

## 【0132】

該基材上に複数の反応基が存在するのであれば、一般的に、複数のホスホニトリル繫留基が、該基材に付着される。さらに、該基材は、ホスホニトリル繫留化合物と反応していない過剰の反応基を、該基材表面上に有することができる。

## 【0133】

該ホスホニトリル繫留化合物と反応できる基材上の基としては、ヒドロキシ、メルカプト、一級芳香族アミノ基、二級芳香族アミノ基、二級脂肪族アミノ基、アミノシラン、アジド、カルボキシ、カルボニルオキシカルボニル、イソシアネート、八口カルボニル、八口カルボニルオキシ、シラノール、およびニトリルなどがあるがその限りではない。

50

## 【0134】

基材表面への繫留化合物の付着（すなわち、形成）は、たとえば、ホスホニトリル繫留化合物の付着前および付着後の、基材上の液体の接触角測定法（たとえば、繫留基が基材表面に付着するとき、該接触角は、変化する可能性がある）、偏光解析法（たとえば、該付着した層の厚さを測定することができる）、飛行時間型質量分析法（たとえば、繫留基が基材に付着するとき、表面濃度は、変化する可能性がある）、およびフーリエ変換赤外分光法（たとえば、繫留基が基材に付着するとき、反射率および吸光度は、変化する可能性がある）等の技術を使用して、検出することができる。

## 【0135】

本発明の物品の幾つかの実施形態では、ホスホニトリル繫留基におけるハロゲン含有部分を、アミン含有材料と反応させ、アミン含有材料を該基材に固定化させる。幾つかの実施形態では、該アミン含有材料は、たとえば、アミノ酸、ペプチド、DNA、RNA、タンパク質、酵素、細胞小器官、免疫グロブリン、またはそれらの断片等の、生体分子である。他の実施形態では、該アミン含有材料は、アミン含有分析物等の、非生物学的アミンである。固定化アミンの存在は、たとえば、質量分析法、接触角測定法、赤外分光法、および偏光解析法を使用して決定することができる。加えて、該アミン含有材料が生物学的に活性な材料であれば、様々なイムノアッセイおよび光学顕微鏡的技術を使用することができる。

10

## 【0136】

他の材料を、アミン含有材料に結合することができる。たとえば、相補的RNAまたはDNA断片を、固定化されたRNAまたはDNA断片とハイブリダイズすることができる。別の例では、抗原が、固定化された抗体に結合でき、または抗体が、固定化された抗原に結合できる。より具体的な例では、黄色ブドウ球菌等の細菌が、固定化された生体分子に結合できる。

20

## 【0137】

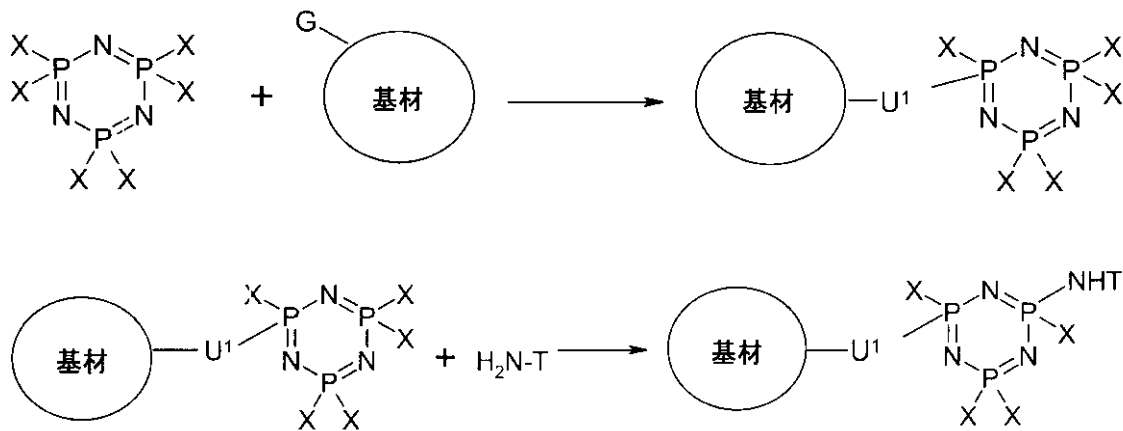
本発明の別の態様は、求核試薬含有材料を基材に固定化する方法を提供する。本方法は、該基材表面上の相補的官能基を、ホスホニトリル部分と反応させ（たとえば、式Iの化合物における反応基Xの少なくとも1つを反応させる）；該ホスホニトリル部分の少なくとも1つの反応基（たとえば、式Iの残りの反応基Xの1つまたは複数）を、求核試薬含有材料と反応させて、該基材と該求核試薬含有材料との間にホスホニトリル結合基を形成することにより、基材に付いた繫留基を調製することを含む。一実施形態では、該求核試薬含有材料は、アミン含有材料であり、該アミン含有材料を固定化する方法を、反応スキームAに示す。

30

## 【0138】

## 【化5】

## 反応スキーム A



10

## 【0139】

(式中、 $U^1$ は、式Iの化合物における1つのX基を、該基材表面上の相補的官能基Gと反応させることにより形成される付着基であり；Tは、該アミン含有材料の残りである(たとえば、基Tは、アミン基を除く該アミン含有材料の全てを表す))。H<sub>2</sub>N-Tは、任意の適当なアミン含有材料である。幾つかの実施形態では、H<sub>2</sub>N-Tは、生体分子である。

20

## 【0140】

前述の反応スキームAの変形もまた、本発明の範囲内である。一官能性部分がホスホニトリル部分に結合されている実施形態では、方法は、該基材表面上の相補的官能基を、ホスホニトリル基(たとえば、式Iの化合物における反応基Xの少なくとも1つ)と反応させ、該ホスホニトリル基(たとえば、式Iの残りの反応基Xのもう1つ)を、1つまたは複数の一官能性部分と反応させて、基材に結合されたホスホニトリル部分と、やはり該ホスホニトリル部分に結合された一官能性部分を含む繫留基を形成することにより、基材に付いた繫留基を調製することを含む。求核試薬含有材料を、該ホスホニトリル部分に結合して、求核試薬含有材料を該基材に繫留することが可能である。

30

## 【0141】

二官能性部分を有する実施形態では、該二官能性部分を、基材表面に繫留される第1のホスホニトリル部分に結合する。また該二官能性部分を、第2のホスホニトリル部分に結合し、該第2のホスホニトリル部分を、求核試薬含有材料に結合して、該求核試薬含有材料を該基材に繫留することも可能である。多官能性部分を含む実施形態では、該多官能性部分を該基材表面に繫留される第1のホスホニトリル部分に結合し、また該多官能性部分を第2、第3、または他のさらなるホスホニトリル部分に結合することが可能である。次には、第1、第2、第3または他のホスホニトリル部分の反応基を、求核試薬含有材料と反応させて求核試薬含有材料に結合し、該求核試薬含有材料を該基材に繫留することが可能である。加えて、多官能性部分を、1つのホスホニトリル基上の多数の反応基と反応させることが可能である。

40

## 【0142】

したがって、求核試薬含有材料を基材に固定化する方法であって、

ホスホニトリル繫留化合物(たとえば、式Iによる化合物)を提供すること；

ホスホニトリル繫留化合物と反応できる相補的官能基を有する基材を提供すること；

該ホスホニトリル繫留化合物を、該基材上の該相補的官能基と反応させて、イオン結合

50

、共有結合、またはそれらの組み合わせを生じさせることにより、基材に付いたホスホニトリル繫留基を調製すること；および

該基材に付いたホスホニトリル繫留基を求核試薬含有材料と反応させて、該求核試薬含有材料に固定化すること；  
を含む方法を提供する。

【0143】

本発明の化合物は、たとえば、アミン含有材料等の求核試薬含有材料を固定化するために使用される。幾つかの実施形態では、該アミン含有材料は、アミン含有分析物である。他の実施形態では、該アミン含有材料は、たとえば、アミノ酸、ペプチド、DNA、RNA、タンパク質、酵素、細胞小器官、免疫グロブリン、またはその断片等の、生体分子である。固定化された生物学的アミン含有材料は、疾患または遺伝的欠陥の医学的診断で有用な可能性がある。該固定化されたアミン含有材料はまた、生物学的分離または様々な生体分子の存在の検出にも使用することができる。加えて、固定化されたアミン含有材料は、バイオリクター内で使用したり、他の材料を調製するための生体触媒として使用したりすることができる。該基材に付いた繫留基を使用して、アミン含有分析物を検出することができる。

10

【0144】

生物学的アミン含有材料は、多くの場合、固定化された抗体が、抗原と結合できるか、または固定化された抗原が抗体にできるように、該基材に付いた後も活性のままであることができる。アミン含有材料は、細菌に結合することができる。より具体的な例では、該固定化されたアミン含有材料は、黄色ブドウ球菌に結合することができる（たとえば、該固定化されたアミン含有材料は、該細菌に特異的に結合できる部分を有する生体分子であってもよい）。

20

【0145】

本発明の実施形態を、以下の非限定的実施例でさらに説明する。

【実施例】

【0146】

実施例 1

ダイヤモンド様ガラス(DLG)で被覆された官能化多孔性膜を作製した。DLGコーティングを、TIPS膜の孔内まで伸ばすために、EP 1 266 045 B1(デイビッドら)に記載されている通りに、プラズマ法を使用して、約0.09 μmの孔径および約23 μmの厚さを有する5 cm<sup>2</sup>の高密度ポリエチレン熱誘導性相分離(HDPE TIPS)膜(ミネソタ州セントポールのスリーエム・カンパニー(3M Company, St. Paul, MN)から入手した)に、ダイヤモンド様ガラス(DLG)を被覆した。該DLG被覆TIPS膜を、2容量%の3-アミノプロピルトリエトキシシラン(ミズーリ州セントルイスのシグマ・アルドリッチ(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))、水1 mlおよび0.1 N酢酸数滴を含むエタノール50 mlに入れた。この溶液中で10分後、該膜を取り出し、エタノールで洗浄し、乾燥させた。

30

【0147】

昇華により精製したPNC(ミズーリ州セントルイスのシグマ・アルドリッチ(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))0.2 gを含むトルエン溶液20 ml中に該膜を入れることにより、PNC三量体を、該官能化膜上に繫留した。塩素を置き換えることにより、該アミノシランのアミノ基をホスファゼン環と反応させ、タンパク質分子等の生物学的活性分子への付着に利用できる残りの塩素をそのままにしておく。該膜を、PBS緩衝液中にグルコースオキシダーゼ10 mgを含むグルコースオキシダーゼ溶液中に3時間入れた。該膜を取り出し、水および緩衝液で洗浄し、続いてあらゆるイオン結合したタンパク質を除去するためにドデシル硫酸ナトリウムで洗浄した。

40

【0148】

該表面上に固定されていたタンパク質総量を決定するために、市販のタンパク質アッセイキットおよび手順書(イリノイ州ロックフォードのピアス・ケミカルズ(Pierc

50

e Chemicals, Rockford, IL)) を使用して、実施例 1 からの膜に対して、ピシンコニン酸分析 (BCA) を実施した。1 cm<sup>2</sup> の TIPS 多孔性膜に固定化された総タンパク質量は、212 μg / 1.5 mg の膜であると決定された。

【0149】

膜における活性酵素の量を決定するために、グルコースオキシダーゼアッセイを実施した。該アッセイは、シグマ・アルドリッチ (Sigma-Aldrich) から入手した手順を使用する、グルコースオキシダーゼアッセイキットを利用した。活性な酵素量は、最初は 25.5 μg / 1.5 mg の膜であると決定された。5 日後、活性酵素の量は、23.3 μg / 1.5 mg の膜であった。

【0150】

酵素活性は、該膜表面の繋留基への、該酵素の共有結合に起因するのであって、溶液中の非付着酵素によるものではないことを証明するために、実験を行った。上述の通りに作製した 1 cm<sup>2</sup> の基材をグルコースオキシダーゼアッセイ溶液中に 30 秒間入れ、450 nm における吸光度を測定した。次いで、該溶液から膜を約 30 秒間取り出し、吸光度を再度調べた。溶液から取り出した後の膜で、吸光度の上昇は認められず、したがって、遊離の浮遊酵素がないことを示した。該膜を溶液中に戻し、溶液中の酵素と該基材表面の繋留基との間で、さらに反応させた。さらなる吸光度測定値を 60 分間収集し、データを表 1 にまとめた。

【0151】

【表 1】

表 1  
450 nm における吸光度

時間 (分)	吸光度 (nm)
0	0
10	0.31979
20	0.36018
30	0.47089
40	0.49865
50	0.62823
60	0.64694

【0152】

実施例 2

以下の条件を使用して、スライドガラスを DLG 処理した。各スライドガラスを、酸素プラズマで 10 秒間エッチングし、テトラメチルシランと酸素プラズマとの混合物に 20 秒間暴露し、続いて酸素プラズマにさらに 10 秒間暴露した。次いで、該 DLG 被覆スライドガラスを、3 - アミノプロピルトリエトキシシラン 1% を含むエタノール溶液に 10 分間入れた。その後、スライドガラスを取り出し、エタノールで洗浄し、窒素気流下で乾燥させた。乾燥したスライドガラスをトルエン中塩化ホスホニトリル (ミズーリ州セントルイスのシグマ・アルドリッチ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)) と反応させた。反応時間を、数分から 1 時間まで変えた。該 DLG 基材に付着させたアミノプロピルトリエトキシシランへの PNC の付着をモニターし、確認するために、接触角を測定した。アミンは、20 度という低い接触角を有するが、これは PNC と反応すると 45 度に増加し、約 10 分で安定化した。PNC の付着に関する接触角データを表 2 に示す。

【0153】

10

20

30

40

【表 2】

表 2

時間(分)	接触角
0	19.3
1	22.3
5	45.3
20	44.3
30	47.3
60	46.6

10

## 【0154】

10分間反応させたサンプルを、1mMリシン溶液(シグマ・アルドリッチ(Sigma Aldrich))に該サンプルを暴露することによって、さらに反応させた。リシンのアミノ基をPNCに反応させることによって接触角は減少し、これはDLG被覆スライドとリシンとの接触後約10分以内に安定化した。接触角データを表3に記載する。

## 【0155】

【表 3】

20

表 3

時間(分)	接触角
0	55.2
1	27
5	15.5
20	15.3
30	19.3
60	15.7

30

## 【0156】

## 実施例 3

およそ20cm×30cmのポリイミドフィルム(「カプトン(KAPTON)E」の商用名で、デラウェア州ウィルミントンのイー・アイ・デュポン・ドゥ・ヌムール・アンド・カンパニー(E. I. du Pont de Nemours & Co., Wilmington, DE)から入手した)を先ずダイヤモンド様炭素(DLC)で被覆し、続いてダイヤモンド様ガラス(DLG)で被覆した。スリーエム(3M)811接着テープ(ミネソタ州セントポールのスリーエム・カンパニー(3M Company, St. Paul, MN))を使用して、該ポリイミドフィルムを、モデル2480 平行板容量結合反応性イオン・エッチャー(フロリダ州セント・ピーターズバーグのプラズマサーム(PlasmaTherm, St. Petersburg, FL))の電動電極に貼付した。アセチレンプラズマを使用して、DLCを該ポリイミド膜上に蒸着させた。イオン・エッチャー・チャンバを閉じ、ポンプでチャンバを0.67Pa(0.005Torr)の圧力にした。1分に500標準cm<sup>3</sup>の流量で酸素ガスをチャンバ内に導入し、チャンバ圧を6.7Pa(0.050Torr)に維持した。プラズマを発火させ、2000Wの電力で15秒間、維持した。次いで酸素ガス流を終了し、ポンプで該チャンバを0.67Pa(0.005Torr)にした。1分に200標準cm<sup>3</sup>の流量で、アセチレンガスをチャンバ内に導入し、チャンバ圧を2Pa(0.015Torr)に維持した。プラ

40

50

ズマを発火させ、1600Wの電力で10秒間、維持した。次いで、アセチレンガス流を終了し、ポンプでチャンバを0.67Pa(0.005 Torr)の圧力にさせた。

【0157】

その後、1分に500標準 $\text{cm}^3$ の流量で酸素ガスをチャンバ内に先ず導入することにより、テトラメチルシランプラズマを使用して、ダイヤモンド様ガラス(DLG)をDLC/ポリイミド基材上に蒸着させた。チャンバ圧を20Pa(0.15 Torr)に維持した。プラズマを発火させ、300Wの電力で10秒間、維持した。酸素流量を1分に500標準 $\text{cm}^3$ に維持して、1分に150標準 $\text{cm}^3$ の流量で、テトラメチルシランガスを該チャンバ内に導入した。チャンバ圧を20Pa(0.15 Torr)に維持した。プラズマを発火させ、300Wの電力で12秒間、維持した。テトラメチルシランガス流を終了した。1分後、酸素ガス流およびチャンバ圧20Pa(0.15 Torr)の両者を維持して、プラズマを発火させ、300Wの電力で20秒間、維持した。次いで、酸素ガス流を終了し、ポンプでチャンバ圧を0.67Pa(0.005 Torr)にした。次いで大気に向けてチャンバを開き、DLGコーティングが電極の方に向くように、ポリイミド/DLC/DLG基材を再配置し、前述の一連のプラズマ処理を繰り返して、両側にDLC/DLGコーティングを有するポリイミドを含む基材を提供する。

10

【0158】

それぞれ、約 $1\text{cm}^2$ ある2つのテスト基材を、前述の方法に従って作製した $20\text{cm} \times 30\text{cm}$ のポリイミド/DLC/DLG基材から切り取った。該基材の一方をコントロールとした。他方の基材を、実験用基材とし、該実験用基材を、実施例1に記載の通りに、3-アミノプロピルトリエトキシシラン(ミズーリ州セントルイスのシグマ・アルドリッチ(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))およびPNC三量体とさらに反応させた。コントロール基材は反応させず、シランならびにPNCがないままであった。

20

【0159】

コントロール基材および実験用基材を無菌培養管に入れ、該基材を、ヒトに対するマウスIgG(mIgG)(ペンシルベニア州ウエスト・グローブのジャクソン・イムノ・リサーチ・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド(Jackson Immuno Research Laboratories Inc, West Grove, PA)からカタログ番号209-005-082で購入)50 $\mu\text{g}$ を含有する、pH9に調整した、100mM CHES 2- $\{N$ -シクロヘキシルアミノエタン $\}$ スルホン酸緩衝液(ミズーリ州セントルイスのシグマ(Sigma, St. Louis, MO)からカタログ番号C-2885で購入した)1mlに入れることにより、mIgGを、コントロール基材のDLG表面および実験用基材のPNC処理表面に固定化した。一般的アッセイの固定化時間を2時間に設定し、その間、室温で120運動/分のシェーカー(IKA HS 260ベーシック)に入れた。パスツールピペットで培養管から溶液を除去し、このように処理したコントロール基材および実験用基材を、0.05%トゥイーン(Tween)20を含有するリン酸緩衝食塩(PBS)緩衝液で3回洗浄した。両基材を、無菌培養管に再度入れ、ブロッキング緩衝液(2%脱脂粉乳を含有するPBS緩衝液)1.5mlを、各培養管に加え、シェーカー上で1時間反応させた。パスツールピペットで該管から溶液を除去し、再度、各基材を前述の洗浄緩衝液で3回洗浄した。

30

40

【0160】

該mIgG抗体を、ビオチン結合ヒトIgG(hIgG-BT)と反応させた。hIgG-BTの濃度は、PBS緩衝液中、 $4\mu\text{g/ml}$ であった(ペンシルベニア州ウエスト・グローブのジャクソン・イムノ・リサーチ・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド(Jackson Immuno Research Laboratories Inc, West Grove, PA)からカタログ番号009-060-003で入手した)。該溶液1mlを、該基材が入っている培養管に入れ、シェーカー内で1時間インキュベートし、次いで、該基材を前述の通りに3回洗浄した。この反応の後に、ビオチンに特異的に結合する検出酵素であるストレプトアビジン・ホースラディッシュ・ペルオキシド(

50

SA-HRP)との反応を続けた。0.5 µg/mlのSA-HRP(ペンシルベニア州ウエスト・グローブのジャクソン・イムノ・リサーチ・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド(Jackson Immuno Research Laboratories Inc, West Grove, PA)から、カタログ番号023-060-021で購入した、pH7.4の緩衝液中)1mlを該培養管に加え、シェーカー上で30分間反応させた。再度、該サンプルを洗浄緩衝液で3回洗浄し、分光計で405nmで測定可能な酵素的変色を促進するために、濃度0.3mg/mlの着色剤2,2-アジノ-ジ(3-エチルベンズチアゾリン)スルホン酸(ABTS)1mlを該培養管に加えた。ABTSに5分間、暴露した後、1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)液1mlを加えて、反応を止めた。

10

**【0161】**

405nmで紫外可視分光光度計を使用して、処理済のコントロール基材および処理済の実験用基材の両者について、吸光度を測定した。コントロールを用いたサンプルの吸光度は0.1であった。実験用基材を用いたサンプルの吸光度は0.2であった。

**【0162】****実施例4**

1cm<sup>2</sup>の基材(ポリイミド/DLC/DLG)サンプルを作製し、実施例3に記載の通りに、シランおよびPNCで官能化した。シランまたはPNC処理をしないポリイミド/DLC/DLG基材を、「コントロール」基材として使用した。4.52mg/ml溶液中、黄色ブドウ球菌に特異的なウサギIgG(ニューヨーク州ウェストベリーのアクキュレート・ケミカル・アンド・サイエンティフィック(Accurate Chemical and Scientific, Westbury, New York)から購入した)を、コントロール基材を含む、基材の表面上に固定化した。次いで、該基材をガラス板上に(テーピングで)固定し、濃度5×10<sup>8</sup>cfu/mlの黄色ブドウ球菌を含有するPBS緩衝液50µlをピペット操作で加え、およそ30分間、放置した。該サンプルを洗浄し、次いで、各サンプルをアクリジン・オレンジに10分間、暴露することによって染色した。該アクリジン・オレンジ(モレキュラー・プローブズ(Molecular probes)からA3568の商用名で入手した)を、使用前に、蒸留水で10mg/mlから0.1mg/mlの濃度に希釈した。

20

**【0163】**

このようにして染色した基材を、オリンパス(Olympus)モデルFV-300共焦点顕微鏡(ミネソタのリーズ・プレシジョン(Leeds Precision, Inc, Minnesota))で見た。非官能化コントロール基材と比較するとき、PNC官能化基材は、より高レベルの染色された細菌を含むことが観察され、該PNC官能化基材は、非官能化コントロールサンプルに比べて、より多くの黄色ブドウ球菌を結合したことを示した。

30

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PC1/US2004/042489

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC 7 G01N33/543 G01N33/552 G01N33/545		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/091304 A2 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS, FR.) 6 November 2003 (2003-11-06) the whole document	1, 21, 22, 38-40, 43
A	CHANDRASEKHAR, VADAPALLI ET AL: "Pyrazolylcyclotriphosphazene Containing Pendant Polymers: Synthesis, Characterization, and Phosphate Ester Hydrolysis Using a Cu(II)-Metalated Cross-Linked Polymeric Catalyst" INORGANIC CHEMISTRY, 41(20), 5162-5173 CODEN: INOCAJ; ISSN: 0020-1669, 2002, XP002320139 Scheme 3 page 5170	1
----- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
4 March 2005		17/03/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Döpfer, K-P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US2004/042489

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199313 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1993-104293 XP002320140 &amp; JP 05 043600 A (KANEBO LTD) 23 February 1993 (1993-02-23) abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US2004/042489

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03091304	A2	06-11-2003	FR 2838737 A1 24-10-2003
			AU 2003246839 A1 10-11-2003
			EP 1501842 A2 02-02-2005
JP 5043600	A	23-02-1993	NONE

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
	G 0 1 N 33/569	B
	G 0 1 N 33/569	E

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

(74) 代理人 100127085

弁理士 越阪部 倫子

(72) 発明者 ラクシュミ, プリンダ ピー.

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 3 3 - 3 4 2 7, セント ポール, ポスト オフィス ボックス 3 3 4 2 7

专利名称(译)	基质和通过包含磷腈基团的束缚化合物与基质结合的化合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007517222A</a>	公开(公告)日	2007-06-28
申请号	JP2006547172	申请日	2004-12-17
[标]申请(专利权)人(译)	明尼苏达州采矿制造公司		
申请(专利权)人(译)	3M创新公司		
[标]发明人	ラクシュミ布林ダビー		
发明人	ラクシュミ,布林ダ ビー.		
IPC分类号	G01N33/547 G01N33/552 G01N33/553 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/543 G01N33/545		
CPC分类号	G01N33/54353 Y10T428/249953 Y10T428/28 Y10T428/2804 Y10T428/2852		
FI分类号	G01N33/547 G01N33/552 G01N33/553 G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/569.B G01N33/569.E		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬		
优先权	60/533178 2003-12-30 US 10/896392 2004-07-22 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

描述用于固定含亲核试剂的物质的物品以及使用这些物品的方法。在一个方面，本发明提供了一种具有第一表面和第二表面的基底；并且，安装于所述衬底的所述第一表面上的磷腈系链基团，磷腈包括的互补官能团和磷腈系链化合物的反应产物中的基片的第一表面上还有一个锚定小组；一种将含亲核基团的材料固定在基质上的方法，包括：提供磷腈系化合物；提供具有能够与磷腈系化合物反应的互补官能团的基质；通过使磷腈系化合物与基质上的互补官能团反应以制备离子键，共价键或其组合，制备与基质连接的磷腈锚定基团；

