

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-537486

(P2005-537486A)

(43) 公表日 平成17年12月8日(2005.12.8)

| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
|----------------------------|---------------|-------------|
| GO 1 N 33/566 | GO 1 N 33/566 | 2 G O 5 4 |
| C 1 2 M 1/00 | C 1 2 M 1/00 | A 4 B O 2 9 |
| C 1 2 M 1/34 | C 1 2 M 1/34 | Z 4 B O 6 3 |
| C 1 2 Q 1/68 | C 1 2 Q 1/68 | A |
| GO 1 N 21/76 | GO 1 N 21/76 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2004-533418 (P2004-533418) | (71) 出願人 | 599116649 ツェプトゼンス アクチエンゲゼルシャフト Zeptosens AG スイス国 4108 ヴィッテルスヴィル ベンケンシュトラッセ 254 |
| (86) (22) 出願日 | 平成15年8月28日 (2003. 8. 28) | (74) 代理人 | 100078662 弁理士 津国 肇 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成17年4月27日 (2005. 4. 27) | (74) 代理人 | 100075225 弁理士 篠田 文雄 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/EP2003/009561 | (72) 発明者 | パウラク, ミヒャエル ドイツ国、79275 ローフェンブルク 、アンデルスバッハシュトラッセ 5 |
| (87) 国際公開番号 | W02004/023142 | | |
| (87) 国際公開日 | 平成16年3月18日 (2004. 3. 18) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 1502/02 | | |
| (32) 優先日 | 平成14年9月3日 (2002. 9. 3) | | |
| (33) 優先権主張国 | スイス (CH) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 0114/03 | | |
| (32) 優先日 | 平成15年1月27日 (2003. 1. 27) | | |
| (33) 優先権主張国 | スイス (CH) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分析対象物が試料中で固定化された特異的結合パートナーとして測定される分析プラットフォーム及び検出法

(57) 【要約】

本発明は、複数の天然に同一の試料を、分析対象物の形態で特異的結合反応に關与する生物学的に關連する化合物に關して試験するための分析プラットフォームならびにそれを用いて実施される、前記試料又は前記試料の希釈物を、その中に含まれる検出される分析対象物とともに、試料の元の相対分子組成と比べて相対分子組成を変化させることなく、第一の複数の特異的結合パートナーとして、固定されたキャリアとしての減衰フィールドセンサプラットフォーム上の個別計測区域の少なくとも一つの次元又は二次元アレイに適用し、一以上の特異的結合反応工程で、1種又はいくつかの検出物質を、第二の複数の特異的結合パートナーの形態で、前記個別計測区域に適用された試料と接触させて、前記第一の複数の特異的結合パートナーからの試料に含まれる1種又はいくつかの分析対象物を特異的に検出し、個別計測区域中の試料に含まれる分析対象物への検出物質の結合から生じる光電子シグナルの変化を減衰フィールドセンサプラットフォームの減衰フィールド中の局所分解によって計測し、各計測区域からの前記光電子シグナルの変化の相対量に基づいて、特異的に検出される分析対象物の存在を定量的に又は定性的に測定することを特徴とする方法に關する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多数の「ネイチャーアイデンティカル」試料を、その中に含まれかつ特異的結合反応における結合パートナーとして生物学的に関連する分析対象物に関して分析する方法であって、

前記試料を、又は元の試料と同じ相対分子組成の前記試料の希釈物を、第一の複数の特異的結合パートナーとしてその中に含まれかつ測定される分析対象物とともに、試料の元の相対分子組成と比べて相対分子組成を変化させることなく、強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォーム上の少なくとも一つの一又は二次元の計測区域アレイ中の個別計測区域に付着させ、

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

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

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

【請求項 2】

計測区域に固定化された分析対象物としての第一の複数の特異的結合パートナーの相対分子組成が、前記計測区域に適用された試料の元の相対分子組成と同一である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

個別計測区域に付着される「ネイチャーアイデンティカル」試料の又はその希釈物の付着を改善するために、減衰フィールドセンサプラットフォームが付着促進層を含み、その上に試料又はその希釈物が付着される、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

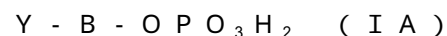
付着促進層が厚さ 200 nm 未満、好ましくは 20 nm 未満である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

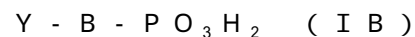
前記付着促進層が、シラン、官能化シラン、エポキシド、官能化、荷電又は極性ポリマー及び「自己組織化受動又は官能化単分子又は多分子層」、チオール、リン酸アルキル及びホスホン酸アルキル、多官能価ブロックコポリマー、たとえばポリ(L)リシン/ポリエチレングリコールの群の化合物を含む、請求項 3 又は 4 記載の方法。

【請求項 6】

前記付着促進層が、一般式 I (A)



の有機リン酸又は一般式 I (B)



の有機ホスホン酸及びそれらの塩の群の化合物(式中、B は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、ヘタリール又はヘタリールアルキル残基であり、Y は、水素又は以下の系、たとえばヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、任意には低級アルキルによって置換されているモノ-もしくはジアルキルアミノ、チオールの官能基又は系、たとえばエステル、ホスフェート、ホスホネート、スルフェート、スルホネート、マレイミド、スクシンイミジル、エポキシ又はアクリレートの負の酸性基である)を含む、請求項 3 又は 4 記載の方法。

【請求項 7】

前記「ネイチャーアイデンティカル」試料が、健常な又は罹患した細胞の抽出物(たとえばヒト、動物、バクテリア又は植物細胞抽出物)と、ヒト又は動物組織、たとえば臓器、皮膚、毛髪もしくは骨組織の抽出物又は植物組織の抽出物と、体液又はその成分、たとえば血液、血清もしくは血漿、滑液、涙液、尿、唾液、組織液、リンパ液と、からなる群

10

20

30

40

50

より選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか記載の方法。

【請求項 8】

「ネイチャーアイデンティカル」試料が、刺激（処理）された細胞の又は未処理の細胞の抽出物及び健全な又は罹患した組織の抽出物からなる群より選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか記載の方法。

【請求項 9】

前記「ネイチャーアイデンティカル」試料が、組織スライシング、バイオプシー及びレーザーキャプチャーマイクロダイセクションからなる群の方法によって生物又は組織又は細胞集合体又は細胞から採取されたものである、請求項 1 ~ 8 のいずれか記載の方法。

【請求項 10】

試料が細胞 20000 個未満の材料を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか記載の方法。

【請求項 11】

試料が細胞 10000 個未満の材料を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか記載の方法。

【請求項 12】

「ネイチャーアイデンティカル」試料に含まれる分析対象物、すなわち特にバイオポリマー、たとえば核酸又はタンパク質が天然の構造で存在する、請求項 1 ~ 11 のいずれか記載の方法。

【請求項 13】

「ネイチャーアイデンティカル」試料に含まれる分析対象物、すなわち特にバイオポリマー、たとえば核酸又はタンパク質が変性構造で存在する、請求項 1 ~ 11 のいずれか記載の方法。

【請求項 14】

「ネイチャーアイデンティカル」試料に含まれる分析対象物、すなわち特にバイオポリマー、たとえば核酸又はタンパク質が、尿素で処理されたのちの変性形態で存在し、それに含まれる分析対象物のエピトープが、対応する検出試薬、たとえば抗体への結合のために自由に接触可能である、請求項 1 ~ 11 のいずれか記載の方法。

【請求項 15】

「ネイチャーアイデンティカル」試料に分析対象物として含まれる 1 種以上の化合物の相対合計量を、リン酸化又は非リン酸化形態及び / 又はグリコール化及び / 又は非グリコール化形態におけるそれらの存在の和として測定する、請求項 1 ~ 14 のいずれか記載の方法。

【請求項 16】

「ネイチャーアイデンティカル」試料に分析対象物として含まれる 1 種以上の化合物の相対量を、リン酸化及び / 又は非リン酸化形態及び / 又はグリコール化及び / 又は非グリコール化形態でそれらが存在する場合、前記形態の 1 種以上に関して測定する、請求項 1 ~ 14 のいずれか記載の方法。

【請求項 17】

「ネイチャーアイデンティカル」試料に含まれる 1 種以上の分析対象物の活性化度を測定する、請求項 1 ~ 14 のいずれか記載の方法。

【請求項 18】

「ネイチャーアイデンティカル」試料に含まれる 1 種以上の分析対象物のリン酸化度及び / 又はグリコール化度を測定する、請求項 1 ~ 14 のいずれか記載の方法。

【請求項 19】

「ネイチャーアイデンティカル」試料に分析対象物として含まれる 1 種以上の化合物の相対量と、1 種以上の比較試料に含まれる 1 種以上の化合物の相対量との 20% 未満、好ましくは 10% 未満の差を、分析対象物としてのリン酸化及び / 又は非リン酸化形態及び / 又はグリコール化及び / 又は非グリコール化形態の 1 種以上に関して分解する、請求項 1 ~ 18 のいずれか記載の方法。

【請求項 20】

前記「ネイチャーアイデンティカル」試料及び 1 種以上の比較試料が同じ供給源から異

10

20

30

40

50

なる時期に採取されたものであり、これらの試料に分析対象物として含まれるリン酸化及び/又は非リン酸化形態及び/又はグリコール化及び/又は非グリコール化形態にある1種以上の化合物の相対量の時間変化を測定する、請求項1～19のいずれか記載の方法。

【請求項21】

前記試料の1種以上を、強固な支持体としての前記減衰フィールドセンサプラットフォームに付着させる前に、液体希釈媒体に溶解及び/又は希釈し、その後、前記減衰フィールドセンサプラットフォーム上の異なる個別計測区域に付着させる、請求項1～20のいずれか記載の方法。

【請求項22】

前記試料の1種以上を、強固な支持体としての前記減衰フィールドセンサプラットフォームに付着させる前に、液体希釈媒体に溶解し、少なくとも10倍に希釈する、請求項21記載の方法。

10

【請求項23】

前記試料の1種以上を、強固な支持体としての前記減衰フィールドセンサプラットフォームに付着させる前に、液体希釈媒体に溶解し、少なくとも30倍に希釈する、請求項21記載の方法。

【請求項24】

異なる試料が同じ生物又は同じ細胞培養物から採取されたものである、請求項1～16のいずれか記載の方法。

【請求項25】

異なる試料が同じ生物の異なる位置から採取されたものである、請求項24記載の方法

20

【請求項26】

異なる試料が異なる生物又は異なる細胞培養物から採取されたものである、請求項1～23のいずれか記載の方法。

【請求項27】

1種以上の試料を、強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォームに付着させる前に、任意には開始剤又は化学的架橋剤(たとえばグルタルアルデヒド)の存在で、ポリマー又は重合性モノマーの溶液と混合する(前記強固な支持体への付着を改善し、付着の均一さを改善するため)、請求項1～26のいずれか記載の方法。

30

【請求項28】

ポリマー、重合性モノマー又は化学的架橋剤の前記溶液が、多糖類、たとえばアガロース又はアクリルアミド又はグルタルアルデヒドなどの溶液からなる群より選択される、請求項27記載の方法。

【請求項29】

任意には開始剤又は化学的架橋剤(たとえばグルタルアルデヒド)の存在における1種以上の試料とポリマー又は重合性モノマーの溶液との混合物が、バイオアフィニティー反応の連続工程でトレーサ試薬に接触することができる試料成分が中に埋め込まれている強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォームへの三次元ネットワーク構造の固定化につながる、請求項27又は28記載の方法。

40

【請求項30】

試料を、インクジェットスポッティングと、ピン、ペンもしくは毛管による機械的スポッティングと、「マイクロコンタクトプリント」と、試料を平行な又は交差したマイクロチャネルに供給し、圧力差又は電気もしくは電磁ポテンシャルを加えることによって計測区域と流体素子接触させることと、光化学的又は写真平版固定化法と、からなる方法の群から選択される方法により、横方向に選択的に、個別計測区域で、減衰フィールドセンサプラットフォームに直接又はその上に付着された付着促進層に付着させる、請求項1～22のいずれか記載の方法。

【請求項31】

トレーサ化合物の非特異的結合を最小限にするために個別計測区域の間の領域を「不動

50

態化」する、すなわち、分析対象物に対して、及び付着された試料の他の含有物に対して、ならびに前記分析対象物のためのトレーサ化合物に対して「化学的に中性」（すなわち非結合性）である化合物を、横方向に分けられた計測区域の間に付着させる、請求項 1 ~ 30 のいずれか記載の方法。

【請求項 32】

分析対象物に対して、及び付着された試料の他の含有物に対して、ならびに前記分析対象物のためのトレーサ化合物に対して「化学的に中性」（すなわち非結合性）である前記化合物が、アルブミン、特にウシ血清アルブミンもしくはヒト血清アルブミン、カゼイン、非特異的ポリクロナールもしくはモノクロナールの異種もしくは実験的に非特異的な抗体（特にイムノアッセイのために測定される分析対象物の場合）、洗浄剤、たとえば Tween 20、分析されるポリヌクレオチドとでハイブリダイズしない断片化された天然もしくは合成 DNA、たとえばニシンもしくはサケ精子の抽出物又は非荷電であるが親水性のポリマー、たとえばポリエチレングリコールもしくはデキストランからなる群より選択される、請求項 31 記載の方法。 10

【請求項 33】

個別計測区域に付着される試料に含まれかつ測定される分析対象物が、タンパク質、たとえばモノクロナール又はポリクロナール抗体及び抗体断片、ペプチド、酵素、グリコペプチド、オリゴ糖、レクチン、抗体に対する抗原、さらなる結合部位で官能化されたタンパク質（「タグタンパク質」、たとえば「ヒスチジンタグタンパク質」）及び核酸（たとえば DNA、RNA）からなる群の化合物である、請求項 1 ~ 32 のいずれか記載の方法。 20

【請求項 34】

個別計測区域に付着される試料に含まれかつ測定される分析対象物が、サイトゾル又は膜結合細胞タンパク質からなる群の化合物、特に細胞におけるシグナル伝達の過程に関与するタンパク質、たとえばキナーゼである、請求項 33 記載の方法。

【請求項 35】

個別計測区域中の試料に含まれる分析対象物へのトレーサ化合物の結合の結果として、前記減衰フィールドセンサプラットフォームの一部としての薄い金属層で表面プラズモンを生成するための共振条件の局所変化により、横方向分解的に測定される光電子シグナルの変化を生じさせる、請求項 1 ~ 34 のいずれか記載の方法。 30

【請求項 36】

共振条件の前記変化が、前記減衰フィールドセンサプラットフォームの一部である薄い金属層で表面プラズモンを生成するための励起光の照射のための共振角の変化によって示される、請求項 35 記載の方法。

【請求項 37】

共振条件の前記変化が、前記減衰フィールドセンサプラットフォームの一部である薄い金属層で表面プラズモンを生成するための照射励起光の共振波長の変化によって示される、請求項 35 記載の方法。

【請求項 38】

個別計測区域中の試料に含まれる分析対象物へのトレーサ化合物の結合の結果として、前記減衰フィールドセンサプラットフォーム上のこれらの領域の有効屈折率の局所変化により、横方向分解的に測定される光電子シグナルの変化を生じさせる、請求項 1 ~ 37 のいずれか記載の方法。 40

【請求項 39】

個別計測区域中の試料に含まれる分析対象物へのトレーサ化合物の結合の結果として、前記減衰フィールドセンサプラットフォームの減衰フィールド内に位置する、ルミネセンス可能な分子からの一以上のルミネセンスの局所変化により、横方向分解的に測定される光電子シグナルの変化を生じさせる、請求項 1 ~ 34 のいずれか記載の方法。

【請求項 40】

一以上のルミネセンスの前記変化が、個別計測区域に含まれる分析対象物のための 1 種 50

以上のトレーサ化合物にルミネセンス標識として結合している、ルミネセンス可能な分子又はナノ粒子から生じる、請求項 39 記載の方法。

【請求項 41】

異なる発光波長及び / 又は異なる励起スペクトル、好ましくは異なる発光波長及び同一の励起波長を有する 2 種以上のルミネセンス標識を分析対象物検出に適用する、請求項 40 記載の方法。

【請求項 42】

異なる発光減衰時間を有する 2 種以上のルミネセンス標識を分析対象物検出に適用する、請求項 40 又は 41 記載の方法。

【請求項 43】

試料中の異なる分析対象物を検出するために 2 種以上のルミネセンス標識を適用する、請求項 41 又は 42 記載の方法。

10

【請求項 44】

計測区域中の異なる分析対象物を検出するために 2 種以上のルミネセンス標識を適用する、請求項 41 ~ 43 のいずれか記載の方法。

【請求項 45】

励起光を 1 fs ~ 10 分の間隔のパルスで照射し、計測区域からの発光を時間分解的に計測する、請求項 39 ~ 44 のいずれか記載の方法。

【請求項 46】

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームが、一以上の層を含む光学導波管を含む、請求項 38 ~ 45 のいずれか記載の方法。

20

【請求項 47】

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームが、一以上の層を含む平面光学導波管を含み、この導波管が、連続的であるか、個別の導波領域に分割されている、請求項 46 記載の方法。

【請求項 48】

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームが、本質的に光学的に透明な導波層 (a) を、層 (a) よりも低い屈折率を有する第二の同じく本質的に光学的に透明な層 (b) の上に有し、任意には層 (a) と (b) との間に、同じく層 (a) よりも低い屈折率を有する同じく本質的に光学的に透明な中間層 (b) を有する平面光学薄膜導波管を含む、請求項 47 記載の方法。

30

【請求項 49】

プリズムカプラと、重複する減衰フィールドを有する光学導波管を連結したものを含む減衰カプラと、導波層の前面 (末端) の正面に配設された合焦レンズ、好ましくは円柱レンズを有する前面 (パッド) カプラと、格子カプラと、からなる群からの 1 個以上の光学内結合要素を使用して、1 個以上の光源からの励起光を、減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層に内結合させる、請求項 1 ~ 48 のいずれか記載の方法。

【請求項 50】

減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層への励起光の内結合を、前記導波層中に形成される 1 個以上の格子構造 (c) を使用して実施する、請求項 49 記載の方法。

40

【請求項 51】

減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層中を誘導された光の外結合を、前記導波層中に形成された、格子構造 (c) と類似した又は異なる格子周期及び格子深さを有する 1 個以上の格子構造 (c) を使用して実施する、請求項 1 ~ 50 のいずれか記載の方法。

【請求項 52】

1 個以上の光源からの励起光を、1 個以上の格子構造 (c) を使用して前記減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層に内結合させ、誘導波として減衰フィールドセンサプラットフォーム上に位置する計測区域に向けて送り、さらに、前記誘導波の減衰フィールドで発生する、ルミネセンス可能な分子からのルミネセンスを、1 個以上の検出器を使

50

用して局所分解的に計測し、1種以上の分析対象物の相対濃度をこれらのルミネセンスシグナルの相対強度から測定する、請求項50又は51記載の方法。

【請求項53】

—以上のルミネセンスの測定に加えて、計測区域における有効屈折率の変化を測定する、請求項39～52のいずれか記載の方法。

【請求項54】

—以上のルミネセンスの測定及び/又は励起波長における光シグナルの測定を偏光選択的な計測として実施する、請求項35～53のいずれか記載の方法。

【請求項55】

—以上のルミネセンスを励起光の偏光とは異なる偏光で計測する、請求項39～54のいずれか記載の方法。 10

【請求項56】

多数の「ネイチャーアイデンティカル」試料を、その中に含まれる、バイオアフィニティー反応における結合パートナーとして生物学的に関連する分析対象物に関して分析するための分析プラットフォームであって、

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームと、

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

を含み、

前記個別計測区域が、第一の複数の特異的結合パートナーとして測定される分析対象物を含む、前記「ネイチャーアイデンティカル」試料又は、それに由来する、元の試料と同じ相対分子組成の希釈物の付着によって生成され、第一の複数の特異的結合パートナーを形成する1種以上の固定化結合パートナーが、前記「ネイチャーアイデンティカル」試料に含まれる1種以上の分析対象物そのものである分析プラットフォーム。 20

【請求項57】

計測区域に固定化された分析対象物としての第一の複数の特異的結合パートナーの相対分子組成が、前記計測区域に適用された試料の元の相対分子組成と同一である、請求項56記載の分析プラットフォーム。

【請求項58】

個別計測区域に付着される「ネイチャーアイデンティカル」試料又はその希釈物の付着を改善するために、減衰フィールドセンサプラットフォームが付着促進層を含み、その上に試料又はその希釈物が付着される、請求項56又は57記載の分析プラットフォーム。 30

【請求項59】

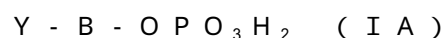
付着促進層が厚さ200nm未満、好ましくは20nm未満である、請求項58記載の分析プラットフォーム。

【請求項60】

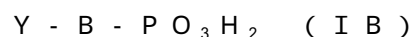
前記付着促進層が、シラン、官能化シラン、エポキシド、官能化、荷電又は極性ポリマー及び「自己組織化受動又は官能化単分子又は多分子層」、チオール、リン酸アルキル及びホスホン酸アルキル、多官能価ブロックコポリマー、たとえばポリ(L)リシン/ポリエチレングリコールの群の化合物を含む、請求項58又は59記載の分析プラットフォーム。 40

【請求項61】

前記付着促進層が、一般式I(A)



の有機リン酸又は一般式I(B)



の有機ホスホン酸及びそれらの塩の群の化合物(式中、Bは、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、ヘタリール又はヘタリールアルキル残基であり、Yは、水素又は以下の系、たとえばヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、任意には低級アルキル 50

によって置換されているモノ - もしくはジアルキルアミノ、チオール、官能基又は系、たとえばエステル、ホスフェート、ホスホネート、スルフェート、スルホネート、マレイミド、スクシンイミジル、エポキシ又はアクリレートの負の酸性基である)を含む、請求項 58 又は 59 記載の分析プラットフォーム。

【請求項 62】

前記「ネイチャーアイデンティカル」試料が、健常な又は罹患した細胞の抽出物(たとえばヒト、動物、バクテリア又は植物細胞抽出物)と、ヒト又は動物組織、たとえば臓器、皮膚、毛髪もしくは骨組織の抽出物又は植物組織の抽出物と、体液又はその成分、たとえば血液、血清もしくは血漿、滑液、涙液、尿、唾液、組織液、リンパ液と、からなる群より選択される、請求項 56 ~ 61 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

10

【請求項 63】

前記「ネイチャーアイデンティカル」試料が、刺激(処理)された細胞の又は未処理の細胞の抽出物及び健常な又は罹患した組織の抽出物からなる群より選択される、請求項 56 ~ 61 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項 64】

前記「ネイチャーアイデンティカル」試料が、組織スライシング、バイオプシー及びレーザーキャプチャーマイクロダイセクションの群の方法によって生物又は組織又は細胞集合体又は細胞から採取されたものである、請求項 56 ~ 63 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項 65】

付着された試料が細胞 20000 個未満の材料を含む、請求項 56 ~ 64 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

20

【請求項 66】

付着された試料が細胞 1000 個未満の材料を含む、請求項 56 ~ 65 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項 67】

「ネイチャーアイデンティカル」試料に含まれる分析対象物、すなわち特にバイオポリマー、たとえば核酸又はタンパク質が天然の構造で存在する、請求項 56 ~ 66 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項 68】

「ネイチャーアイデンティカル」試料に含まれる分析対象物、すなわち特にバイオポリマー、たとえば核酸又はタンパク質が変性構造で存在する、請求項 56 ~ 66 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

30

【請求項 69】

「ネイチャーアイデンティカル」試料に含まれる分析対象物、すなわち特にバイオポリマー、たとえば核酸又はタンパク質が、尿素で処理されたのちの変性形態で存在し、それに含まれる分析対象物のエピトープが、対応する検出試薬、たとえば抗体への結合のために自由に接触可能である、請求項 56 ~ 66 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項 70】

前記「ネイチャーアイデンティカル」試料の 1 種以上が、強固な支持体としての前記減衰フィールドセンサプラットフォームに付着される前に、液体希釈媒体に溶解及び/又は希釈されており、試料の異なる希釈物が、前記減衰フィールドセンサプラットフォーム上の異なる個別計測区域に付着されている、請求項 56 ~ 69 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

40

【請求項 71】

前記試料の 1 種以上が、強固な支持体としての前記減衰フィールドセンサプラットフォームに付着される前に、液体希釈媒体に溶解され、少なくとも 10 倍に希釈されている、請求項 70 記載の分析プラットフォーム。

【請求項 72】

前記試料の 1 種以上が、強固な支持体としての前記減衰フィールドセンサプラットフォーム

50

ームに付着される前に、液体希釈媒体に溶解され、少なくとも30倍に希釈されている、請求項70記載の分析プラットフォーム。

【請求項73】

異なる付着試料が同じ生物又は同じ細胞培養物から採取されたものである、請求項56～72のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項74】

異なる付着試料が同じ生物の異なる位置から採取されたものである、請求項73記載の分析プラットフォーム。

【請求項75】

異なる付着試料が異なる生物又は異なる細胞培養物から採取されたものである、請求項56～72のいずれか記載の分析プラットフォーム。 10

【請求項76】

1種以上の試料が、強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォームに付着される前に、任意には開始剤又は化学的架橋剤（たとえばグルタルアルデヒド）の存在で、ポリマー又は重合性モノマーの溶液と混合される（前記強固な支持体への付着を改善し、付着の均一さを改善するため）、請求項56～75のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項77】

ポリマー、重合性モノマー又は化学的架橋剤の前記溶液が、多糖類、たとえばアガロース又はアクリルアミド又はグルタルアルデヒドなどの溶液からなる群より選択される、請求項76記載の分析プラットフォーム。 20

【請求項78】

任意には開始剤又は化学的架橋剤（たとえばグルタルアルデヒド）の存在における1種以上の試料とポリマー又は重合性モノマーの溶液との混合物が、バイオアフィニティー反応の連続工程でトレーサ試薬に接触することができる試料成分が中に埋め込まれている強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームへの三次元ネットワーク構造の固定化につながる、請求項76又は77記載の分析プラットフォーム。

【請求項79】

アレイが、50個を超える、好ましくは500個を超える、もっとも好ましくは5000個を超える計測区域を含む、請求項56～78のいずれか記載の分析プラットフォーム 30

【請求項80】

アレイの計測区域が、1平方センチメートルあたり10個を超える、好ましくは100個を超える、もっとも好ましくは1000個を超える密度で配設されている、請求項56～79のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項81】

多数の計測区域アレイが強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォーム上に設けられている、請求項56～80のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項82】

少なくとも5個、好ましくは少なくとも50個の計測区域アレイが強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォーム上に設けられている、請求項81記載の分析プラットフォーム。 40

【請求項83】

トレーサ化合物の非特異的結合を最小限にするために個別計測区域の間の領域が「不動態化」されている、すなわち、分析対象物に対して、及び付着された試料の他の含有物に対して、ならびに前記分析対象物のためのトレーサ化合物に対して「化学的に中性」（すなわち非結合性）である化合物が、横方向に分けられた計測区域の間に付着されている、請求項56～82のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項84】

分析対象物に対して、及び付着された試料の他の含有物に対して、ならびに前記分析対 50

象物のためのトレーサ化合物に対して「化学的に中性」（すなわち非結合性）である前記化合物が、アルブミン、特にウシ血清アルブミンもしくはヒト血清アルブミン、カゼイン、非特異的ポリクロナールもしくはモノクロナールの異種もしくは実験的に非特異的な抗体（特にイムノアッセイのために測定される分析対象物の場合）、洗浄剤、たとえば Tween 20、分析されるポリヌクレオチドとでハイブリダイズしない断片化された天然もしくは合成 DNA、たとえばニシンもしくはサケ精子の抽出物又は非荷電であるが親水性のポリマー、たとえばポリエチレングリコールもしくはデキストランからなる群より選択される、請求項 83 記載の分析プラットフォーム。

【請求項 85】

個別計測区域に付着される試料に含まれかつ測定される分析対象物が、タンパク質、たとえばモノクロナール又はポリクロナール抗体及び抗体断片、ペプチド、酵素、グリコペプチド、オリゴ糖、レクチン、抗体に対する抗原、さらなる結合部位で官能化されたタンパク質（「タグタンパク質」、たとえば「ヒスチジンタグタンパク質」）及び核酸（たとえば DNA、RNA）からなる群の化合物である、請求項 56 ~ 84 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

10

【請求項 86】

個別計測区域に付着される試料に含まれかつ測定される分析対象物が、サイトゾル又は膜結合細胞タンパク質からなる群の化合物、特に細胞におけるシグナル伝達の過程に關与するタンパク質、たとえばキナーゼである、請求項 56 ~ 84 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

20

【請求項 87】

減衰フィールドセンサプラットフォームが、薄い金属層と、任意にはその下に位置する、好ましくは < 1.5 の屈折率の中間層、たとえば二酸化ケイ素又はフッ化マグネシウムとを含み、金属層及び任意に設けられる中間層の厚さが、照射される励起光及び/又は生成されるルミネセンスの波長で表面プラズモンを励起することができるように選択されている、請求項 56 ~ 86 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項 88】

金属が、金及び銀からなる群より選択される、請求項 87 記載の分析プラットフォーム。

【請求項 89】

金属層が厚さ $10\text{ nm} \sim 1000\text{ nm}$ 、好ましくは $30\text{ nm} \sim 200\text{ nm}$ である、請求項 87 記載の分析プラットフォーム。

30

【請求項 90】

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームが、一以上の層を含む光学導波管を含む、請求項 56 ~ 89 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項 91】

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームが、一以上の層を含む平面光学導波管を含み、この導波管が、連続的であるか、個別の導波領域に分割されている、請求項 90 記載の分析プラットフォーム。

【請求項 92】

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームが、本質的に光学的に透明な導波層 (a) を、層 (a) よりも低い屈折率を有する第二の同じく本質的に光学的に透明な層 (b) の上に有し、任意には層 (a) と (b) との間に、同じく層 (a) よりも低い屈折率を有する同じく本質的に光学的に透明な中間層 (b) を有する平面光学薄膜導波管を含む、請求項 91 記載の分析プラットフォーム。

40

【請求項 93】

減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層が 1 個以上の光学結合要素と光学的に接触して、1 個以上の光源からの励起光を前記導波層に内結合することを可能にし、前記光学結合要素が、プリズムカプラと、重複する減衰フィールドを有する光学導波管を連結したものを含む減衰カプラと、導波層の前面（末端）の正面に配設された合焦レンズ、好

50

ましくは円柱レンズを有する前面（バット）カプラと、格子カプラからなる群より選択される、請求項 56～92 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

【請求項 94】

1 個以上の格子構造（c）が減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層に設けられて、1 個以上の光源からの励起光の内結合を可能にする、請求項 93 記載の分析プラットフォーム。

【請求項 95】

格子構造（c）と類似した又は異なる格子周期及び格子深さを有する格子構造（c）が減衰フィールドセンサプラットフォームの導波層に設けられて、前記導波層中を誘導された光の外結合を可能にする、請求項 56～94 のいずれか記載の分析プラットフォーム。

10

【請求項 96】

薬学的研究、コンビナトリアルケミストリー、臨床及び臨床前開発におけるスクリーニング法での化学的、生化学的又は生物学的分析対象物の測定のための定量及び/又は定性分析のための、アフィニティスクリーニング及び研究における運動パラメータのリアルタイム結合研究及び測定のための、特に DNA 及び RNA 分析学のための分析対象物の定性的及び定量的測定ならびにゲノムにおけるゲノム又はプロテオーム差、たとえば単一ヌクレオチド多形の測定のための、タンパク質-DNA 相互作用の計測のための、mRNA 発現及びタンパク質（生）合成の制御機構の測定のための、毒性発生研究及び発現プロファイルの決定、特に生物学的及び化学的マーカ化合物、たとえば mRNA、タンパク質、ペプチド又は小分子有機（メッセンジャ）化合物の測定のための、ならびに医薬品研究開発、ヒト及び動物の診断、農薬製品研究開発における抗体、抗原、病原体又はバクテリアの決定のための、症候性及び前症候性植物診断のための、医薬品開発及び治療薬選択における患者層別化のための、特に食品及び環境分析学における病原体、有害薬剤及び細菌、特にサルモネラ、プリオン及びバクテリアの決定のための、請求項 1～55 のいずれか記載の方法及び/又は請求項 56～95 のいずれか記載の分析プラットフォームの使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、多数の「ネイチャーアイデンティカル」試料を、その中に含まれる、特異的結合反応における結合パートナーとして生物学的に関連する分析対象物に関して分析するための分析プラットフォームならびにそれを用いて実施される方法であって、

30

前記試料を、又は元の試料と同じ相対分子組成の前記試料の希釈物を、第一の複数の特異的結合パートナーとしてその中に含まれかつ測定される分析対象物とともに、試料の元の相対分子組成と比べて相対分子組成を変化させることなく、強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォーム上の少なくとも一つの一又は二次元の計測区域アレイ中の個別計測区域に付着させ、

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

40

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

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

【0002】

このようにして、センサプラットフォームの減衰フィールド中の個別計測区域において、試料に含まれる分析対象物へのトレーサ化合物の結合から生じる光電子シグナルの変化を、たとえば、測定される分析対象物（既知又は未知の濃度及び/又は量）を含む異なる

50

計測区域から同時に計測されるシグナルと、測定される対応する分析対象物を含まない計測区域からのシグナルとの比較から測定することができる。また、前記シグナル変化の測定には、未知の濃度の分析対象物を含む計測区域からのシグナルと、既知の濃度の分析対象物を含む計測区域からのシグナルとを使用することもできる。また、対応するトレーサ化合物が適用され、それが計測区域に含まれる対応する分析対象物に結合する間及びその後で連続的にシグナルを取得する場合には、対応する計測区域からのシグナルの時間変化から、対応するシグナル変化を測定することもできる。

【0003】

また、以下（特に本特許出願の請求の範囲に関して）（「ネイチャーアイデンティカル」）試料とは、明示的に断らない限り、常に2種以上、すなわち多数の（「ネイチャーアイデンティカル」）試料をいう。 10

【0004】

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

【0005】

公知の分析分離法は一般に、所与の物理化学的パラメータにしたがって、たとえば分子量又は分子電荷と質量との比にしたがって、所与の試料に含まれる可能な最大数の化合物を可能な最短時間で分離するように最適化されているが、バイオアフィニティー関連の測定法は、可能な最大の特異性を有する生物学的又は生化学的又は合成認識要素により、複雑な含有物の試料の中の対象となっている対応する（単一の）分析対象物を高い選択性で認識し、それと結合することに基づく。したがって、多くの異なる化合物の測定は、相応に多数の異なる特異的認識要素の適用を要する。 20

【0006】

バイオアフィニティー反応に基づく測定法は、均質溶液中で実施することもできるし、強固な支持体の表面で実施することもできる。特定の方法に依存して、分析対象物が認識要素に及び任意にはさらなるトレーサ化合物に結合したのち、また、任意には異なる処理工程の合間に、認識要素と、測定される分析対象物と、試料の及び任意に適用されるさらなる指示試薬の残留部分から任意に得られるさらなるトレーサ化合物と、の間で形成した複合体を分離するために、洗浄工程が必要であるかもしれない。 30

【0007】

今日、強固な支持体上の横方向に分けられた個別計測区域に固定化された認識要素として対応する相補的核酸を使用することにより、試料中の多くの異なる核酸を同時に測定する方法が比較的広く使用されている。たとえば、非常に高いフィーチャ密度（共通の強固な支持体上の計測区域の密度）を有する認識要素として、簡単なガラス又は顕微鏡プレートに基づくオリゴヌクレオチドのアレイが公知である。たとえば、米国特許第5,445,934号（Affymax Technologies）には、1平方センチメートルあたり1000個を超えるフィーチャ密度を有するオリゴヌクレオチドのアレイが記載され、特許請求されている。 40

【0008】

最近、多数のタンパク質の同時測定のための、類似したアレイ及びそれに基づく方法が頻繁に、たとえば米国特許第6,365,418号で記載されている。

【0009】

核酸及び他のバイオポリマー、たとえばタンパク質の両方を測定するためのこのようないわゆる「マイクロアレイ」の開示は、分析対象物認識のためのアレイを生成するために多数の特異的認識要素を個別計測区域に固定化し、次いで、おそらくは複雑な混合物中に分析対象物を含む分析される試料と接触させる方法を記載している。この公知の開示によると、異なる特異的認識要素をできるだけ純粋な形態で独立した個別計測区域に設けて、一般に異なる分析対象物が異なる認識要素を有する計測区域に結合するようにしている。 50

【0010】

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

【0011】

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

10

【0012】

適当な解離条件下、固定化されたオリゴヌクレオチドと、試料中に供給される相補的オリゴヌクレオチドと、の間で形成されるハイブリッドを高い効率で解離させ、ひいては認識面を「再生」することができることと記載されているが、100%の再生を保証することはほとんどできない。タンパク質とのバイオアフィニティー複合体の場合、多くの場合、複合体生成工程は可逆性ですらない。すなわち、認識面を再生することはできない。

20

【0013】

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

【0014】

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

30

【0015】

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

40

【0016】

米国特許第6,287,768号で提案されている方法は異なる試料からのRNAを同時に測定する機会を開くが、なおも、多数の入念な試料準備工程を、特に生物学的試料マトリックスからの単離、次いで分子サイズによる試料の分離を要する。RNAの例を参照してしか記載されていない特許請求された方法が、少なくとも、元の試料マトリックスからの単離及びサイズによるバイオポリマーの分離を要するという事実を考慮すると、この分離工程の後及び分析工程の前の相対分子組成が元の試料の相対分子組成と異なるということが予想されなければならない。

【0017】

50

ここで及び以下、「変化のない相対分子組成」の限定句は、分析で測定される分析対象物の濃度の比が変化のないままであることを意味する。この命名にしたがって、この限定句を使用する場合、対応する測定法で測定されない溶媒もしくはマトリックス分子又は他の分子の含有量の変化は無視される。

【0018】

これらの方法で提供される検出工程が一般に、分析対象物が試料中で測定されるのに必要な検出限界を達成するのに十分な感度を有しないという事実を、先に挙げた分析法に前記の分離又は富化工程を含める理由と見なすことができる。

【0019】

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

10

【0020】

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

20

【0021】

光波が、光学的により希薄な媒体、すなわちより低い屈折率の媒体によって包囲された光学導波管の中に結合すると、その光波は、導波層の界面における全反射によって誘導される。このような構造では、電磁エネルギーの一部が低屈折率媒体に浸透する。この一部が減衰フィールドと呼ばれる。減衰フィールドの強度は、導波層そのものの厚さに、及び導波層の屈折率とそれを包囲する媒体の屈折率との比に、非常に大きく依存する。薄い導波管の場合、すなわち、誘導される光の波長と同じ又はそれよりも小さい層厚さの導波管の場合、誘導される光の個別モードを区別することができる。このような方法には、分析対象物との相互作用が隣接媒体中への減衰フィールドの浸透深さ（数百ナノメートルかの

30

【0022】

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

【0023】

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

40

【0024】

光学導波管中を誘導される光波の減衰フィールドにおける分析対象物測定の種々の方法を区別することができる。たとえば、使用される計測原理にしたがって、一方で蛍光法又はより一般的なルミネセンス法と、他方には屈折法とに区別することができる。これに

50

関して、表面プラズモン共振の発生のために投射される励起光の共振角が計測される量とみなされるならば、より低い屈折率の誘電層の上の薄い金属層中に表面プラズモン共振を発生させる方法を屈折法の群に含めることができる。また、表面プラズモン共振は、ルミネセンス計測で、ルミネセンスを増幅するために、又はシグナル対バックグラウンド比を改善するために使用することができる。表面プラズモン共振を発生させ、それをルミネセンス計測及び導波構造と組み合わせるための条件は、文献、たとえば米国特許第5,478,755号、第5,841,143号、第5,006,716号及び第4,649,280号に記載されている。

【0025】

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

10

【0026】

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

20

【0027】

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

【0028】

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

30

【0029】

近年、ルミネセンス検出と組み合わせて、透明な支持材上の厚さわずか数百ナノメートルの導波膜に基づく高屈折薄膜導波管によって感度が相当に高められた。たとえばWO95/33197には、回折光学要素としてのレリーフ格子によって励起光を導波膜中に結合する方法が記載されている。減衰フィールドの浸透深さ内に位置する、ルミネセンス可能な物質から等方的に発せられるルミネセンスを、適切な計測構造、たとえばフォトダイオード、光電子増倍管又はCCDカメラを使用して計測する。また、減衰的に励起された放射線のうち導波管中に逆結合した部分を、格子のような回折光学要素によって外結合し、計測することができる。この方法は、たとえばWO95/33198に記載されている。

40

【0030】

過去数年間、任意には適切に適合された流体素子構造と組み合わせた「マイクロアレイ」のための感知プラットフォームとしての平面薄膜導波管の新たな開発が、たとえば、本出願にすべてを取り込む国際特許出願WO00/75644、WO00/113096、WO00/143875で知られるようになった。WO01/79821には、導波管の表面の2光子励起を可能にする薄膜導波構造が記載されている。WO01/88511には、屈折計測法に基づく分析対象物測定の画像法を提供する格子導波構造及びそれに基づく計測法が記載されている。同じく両開示を本特許出願の一部として取り込む。多数の分析対象物を測定するための生物学的又は生化学的又は合成認識要素が、支持基材上の既知

50

の場所の個別計測区域上に、一以上の計測区域アレイの一部として固定化されるということが上述の各構造に共通である。

【0031】

驚くことに今、減衰フィールドセンサプラットフォームの物理化学的パラメータ（たとえば関与する層の厚さ、屈折率）の適切な選択により、減衰フィールドセンサプラットフォーム表面での分子相互作用の検出のために達成可能な感度が、その表面における高い励起光強度及び同時にその強い励起フィールドの、隣接媒体への減衰フィールドの浸透深さへの制限の結果として、多数の試料又はそれらの試料の希釈物を、前記試料又はその希釈物を前記減衰フィールドセンサプラットフォームに直接付着させたのち、残留試料マトリックスから事前に単離することなく、その中に含まれる分析対象物に関して分析するのに十分な高さになるということがわかった。したがって、強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォーム上の計測区域に付着される試料が「元の試料」と比べて「変化のない相対分子組成」（先に記した定義のとおり）を有する逆転検定アーキテクチャが可能になる。

10

【0032】

本発明の本質において、「ネイチャーアイデンティカル」試料は、その中で測定される分析対象物に関して、それが得られた元の試料と同じ相対分子組成（先に記した定義によると「変化のない相対分子組成」）を有する、分析される化合物の混合物と限定される。この定義によると、元の試料もまた「ネイチャーアイデンティカル」試料である。元の試料は、たとえば、不均一に分布した異なる分子又は化合物を含む生物学的細胞であることができる。より多数の細胞からたとえば遠心分離、ろ過又はレーザー捕捉式顕微解剖によって事前に選択された1個以上の細胞の集団から得られた試料もまた「元の試料」と呼ばれる。

20

【0033】

以下、明示的に断らない限り、実施される試料準備工程のための（単一の）細胞の呼称は多数の細胞をも指す。

【0034】

通常はさらなる分析工程のために必要である第一の準備工程で、細胞を溶解させることができる。中に含まれる化合物の均一な分布を示す派生した溶解産物もまた、その中で測定される分析対象物の相対分子組成が変化のないままであるならば、「ネイチャーアイデンティカル」試料と呼ばれる。特に、「ネイチャーアイデンティカル」試料に特徴的であることは、それが「元の試料」の全プロテオームを含有するということである。溶解産物は、適当な溶媒、たとえば緩衝液に溶解させることができ、その中に含まれるバイオポリマーの消化を防ぐため、公知の添加物、たとえば酵素阻害剤のような安定剤を含有することができる。この定義による「ネイチャーアイデンティカル」試料はまた、クロマトグラフィにおける試料の「スパイクング」と比較しうる、測定される分析対象物に類似した既知の濃度の化合物（標準物質として）を添加物として含有することができる。このような添加物は、たとえば較正のために使用することができる。さらには、「ネイチャーアイデンティカル」試料は、たとえば計測区域に固定化された分析対象物分子の制御された表面密度を確立するために使用することができる、試料マトリックスに、たとえばウシ血清アルブミン（BSA）に類似するが、測定される分析対象物とは異なる化合物の添加物を含有することができる。「ネイチャーアイデンティカル」試料に含まれる分析対象物、すなわち特にバイオポリマー、たとえば核酸又はタンパク質は、天然の形態で存在してもよいし、たとえば尿素又は界面活性剤（たとえばSDS）で「元の試料」を処理したのちの変性形態で存在してもよい。

30

40

【0035】

「ネイチャーアイデンティカル」試料に含まれる分析対象物、すなわち特にバイオポリマー、たとえば核酸又はタンパク質は、好ましくは、尿素で処理されたのちの変性形態で存在するが、含まれる分析対象物のエピトープは、対応する検出試薬への、たとえば抗体への結合のために自由に接触可能である。これは、尿素での処理による第三級及び第四級

50

構造の破壊によって可能になる。

【0036】

驚くことに、本発明の方法の感度は、「ネイチャーアイデンティカル」試料を高度に希釈することさえでき、混合物に含まれる化合物を、任意には非常に低い濃度及び単一の計測区域で利用可能な相応に少ない量にもかかわらず、公知の従来法では不可能である高い精度で測定することができるような感度である。これには、本発明の方法の場合、試料に含まれ、測定される付着分析対象物が、固定化の後でさえ、元の試料中と同じ相対分子組成で存在するという有意な利点がある。したがって、本発明の方法は、他の方法では一般的な富化及び分離工程を避けることができるため、元の試料の全体の分子組成を表す分析結果を提供することができる。

10

【0037】

本発明の本質において、分析される試料に含まれる種々の化合物から区別することができる、このために適用される特異的検出試薬とで結合することができる分子種又は化合物を「分析対象物」と呼ぶ。たとえば、リン酸化形態の化合物又は種だけを検出し、非リン酸化形態を検出しないならば、この定義によると、化合物又は種のこれら二つの形態は2種の異なる分析対象物に相当する。リン酸化化合物又は種が別の検出試薬によって認識され、それと結合するならば、これらの条件下、対応するリン酸化化合物又は種はともに1種の分析対象物である。この定義によると、分析対象物のためのトレーサ化合物としての特異的結合パートナーは、たとえば、検出される化合物のリン酸化又はグリコシル化（又は相応に非リン酸化及び/又は非グリコシル化）形態を排他的に認識し、それに結合するよう

20

【0038】

トレーサ化合物としての特異的結合パートナーはまた、検出される化合物が一定の三次元構造で存在するならばその化合物だけに結合するよう選択することもできる。たとえば、多くの抗体は、測定される化合物の特異的部分領域（エピトープ）が特殊な三次元構造で提供されている場合、それらの領域だけを認識し、それらに結合する。測定される化合物の構造状態に依存して、これらの部分的領域（エピトープ）は、対応するトレーサ化合物の結合のために接触可能であってもよいし、隠蔽されていてもよい。特異的結合パートナーはまた、検出される化合物の、接触性が対応する化合物の三次元構造から独立している領域だけに結合するよう選択してもよい。したがって、適切に選択されたトレーサ化合物の使用により、試料中で検出され、特定の構造状態を示す化合物の合計量の相対量を決定することが可能である。

30

40

【0039】

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

【0040】

本発明の本質においては、空間的に分けられた又は個別の計測区域は、バイオアフィニティ検定における1種以上の試料中の1種以上の分析対象物の測定のための、そこに固定化された結合パートナーによって占有される閉鎖区域によって画定される。これらの区

50

域は、任意の幾何学形状、たとえば円、矩形、三角形、楕円などの形状であることができる。

【0041】

種々のこのような計測区域は、たとえば、支持基材に付着された多数の異なる試料を含むこともできるし、1種以上の試料の異なる付着された希釈物を含むこともできる（常に異なる個別計測区域に付着される）。個別計測区域に付着させる材料はまた、たとえば、選択的微視的準備によって、たとえば「レーザキャプチャーマイクロダイセクション」による細胞集合体からの個々の細胞の選択的捕捉によって用意することができる。

【0042】

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

10

【0043】

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

20

【0044】

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

【0045】

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

前記試料を、又は元の試料と同じ相対分子組成の前記試料の希釈物を、第一の複数の特異的結合パートナーとしてその中に含まれる、測定される分析対象物とともに、試料の元の相対分子組成と比べて相対分子組成を変化させることなく、強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォーム上の一以上の一又は二次元の計測区域アレイ中の個別計測区域に付着させ、

30

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

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

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

40

【0046】

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

50

フォームが付着促進層を含み、その上に試料が付着されるならば、それは好ましい。

【0047】

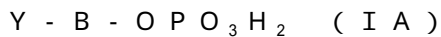
付着促進層は、厚さが好ましくは200nm未満、特に好ましくは20nm未満である。

【0048】

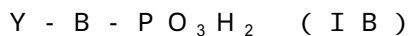
種々の材料が付着促進層の生成に適している。たとえば、付着促進層は、シラン、官能化シラン、エポキシド、官能化、荷電又は極性ポリマー及び「自己組織化受動又は官能化単分子又は多分子層」、チオール、リン酸アルキル及びホスホン酸アルキル、多官能価ブロックコポリマー、たとえばポリ(L)リシン/ポリエチレングリコールの群の化合物を含むことができる。

【0049】

前記付着促進層はまた、一般式I(A)



の有機リン酸又は一般式I(B)



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

【0050】

本発明の方法は、好ましくは、計測区域に固定化された分析対象物としての第一の複数の特異的結合パートナーの相対分子組成が、前記計測区域に適用された試料の元の相対分子組成と同一であるように設計される。この要件は、たとえば、計測区域に付着させる試料の物質質量が、強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォーム上に単分子層を形成するのに必要な物質質量に等しい又はそれ未満である場合に満たされる。同時に、強固な支持体の表面のサブ単分子層被覆の場合、トレーサ試薬と接触させるための分析対象物としての第一の複数の固定化特異的結合パートナーの最適な接触性が得られる。事前に付着される付着促進層が方向づけられた固定化につながるならば、たとえば付着される試料に含まれる抗体がそのF₂部分で結合して固定化されて、その特異的結合エピトープの接触性を生じさせるならば、接触性をさらに改善することができる。

【0051】

本発明の方法の高い感度のおかげで、使用される試料の非常に小さな量を分析することが可能である。ここでいう試料の量とは、個別計測区域に付着される材料の合計量をいうものと解釈されなければならない。試料は、たとえば、細胞20000個未満の材料を含むことができ、それでも高い精度で分析することができる。付着される試料は、細胞1000個未満の材料を含むことさえできる。必要な細胞の量は、細胞100個未満の材料又は細胞わずか1~10個の材料を含むことさえでき、それでも確実に分析することができる。また、細胞1個の含有に相当する材料を細胞当量と呼ぶ。検出される分析対象物が比較的豊富な含有物である場合、分析に必要なこのような小さな細胞当量が求められる。また、試料が1μl未満の量を有することが可能である。試料は、10nl未満又は1nl未満の量を有することさえできる。

【0052】

本発明の方法は、「ネイチャーアイデンティカル」試料に分析対象物として含まれる1種以上の化合物の相対合計量を、リン酸化又は非リン酸化形態における、及び/又はグリコール化及び/又は非グリコール化形態におけるそれらの存在の和として測定することを可能にする。分析対象物として「ネイチャーアイデンティカル」試料に含まれる1種以上の化合物の相対量が、リン酸化及び/又は非リン酸化形態で、及び/又はグリコール化及

10

20

30

40

50

び／又は非グリコール化形態でそれらが存在する場合、１種以上の前記形態に関して測定されるならば、それは好ましい。

【 0 0 5 3 】

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

10

【 0 0 5 4 】

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

20

【 0 0 5 5 】

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

30

【 0 0 5 6 】

試料に含まれる分析対象物の元の濃度が十分に高いならば、前記試料を、強固な支持体としての前記減衰フィールドセンサプラットフォームに付着させる前に、液体希釈媒体に溶解及び／又は希釈することができ、その後、試料の異なる希釈物を前記減衰フィールドセンサプラットフォーム上の異なる個別計測区域に付着させることができる。この場合、前記試料は、少なくとも１０倍又は３０倍もしくは１００倍にさえ希釈することができる。

【 0 0 5 7 】

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

40

【 0 0 5 8 】

異なる試料は、特に、同じ生物の異なる位置から採取することができる。そして、たとえば、前記試料が採取された生物中で測定される分析対象物の相対分子組成の不均一さに関する情報を、対応する個別計測区域における分析から得ることができる。このような手法は、たとえば、ガン性生物の調査にとって非常に重要である。

【 0 0 5 9 】

しかし、異なる試料を異なる生物又は異なる細胞培養物から採取することもできる。たとえば、試料は、医薬品で処理された生物及び処理されていない生物から採取することが

50

できる。そして、試料の相対分子組成に対する当該医薬品の影響を、核酸分析学における発現分析の方法に類似した方法で検査することができる。

【0060】

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

10

【0061】

また、本発明の方法のこの特殊な変形態様に特徴的であることは、任意には開始剤又は化学的架橋剤（たとえばグルタルアルデヒド）の存在における1種以上の試料とポリマー又は重合性モノマーの溶液との混合物が、バイオアフィニティー反応の連続工程でトレーサ試薬が接触することができる試料成分が中に埋め込まれている強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームへの三次元ネットワーク構造の固定化につながるということである。したがって、単分子層よりも高い減衰フィールドセンサプラットフォームの表面被度を達成することができ、それが、分析対象物検出工程での計測可能なシグナルのさらなる増強につながる。ここで、生成されるポリマーネットワーク構造が媒体中への減衰フィールドの浸透深さを超えないということが重要である。理由は、減衰フィールドセンサプラットフォームの表面からこの距離を超えると、分析対象物検出は不可能であり、したがって、分析の結果が試料の元の相対分子組成に一致するということが保証されないからである。

20

【0062】

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

30

【0063】

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

【0064】

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

40

【0065】

一般性を失うことなく、個別計測区域に付着される試料に含まれかつ測定される分析対

50

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

10

【0066】

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

【0067】

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

20

【0068】

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

【0069】

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

30

【0070】

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

【0071】

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

40

【0072】

たとえば、本発明の方法のこのような変形態様は、たとえば化合物のリン酸化及び非リン酸化形態を、特に一つの（共通の）計測区域内で、この場合は直接標識されている（た

50

例えば緑色及び赤色発光ルミネセンス標識で) 2種の対応する異なる特異的結合パートナーをトレーサ化合物として使用することにより、同時に検出するのに特に適している。

【0073】

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

【0074】

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

10

【0075】

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

【0076】

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームは、好ましくは、一以上の層を含む光学導波管を含む。これは、たとえば、いくつかの層を含む光ファイバ導波管であってもよい。しかし、好ましくは、それは、減衰フィールドセンサプラットフォームの連続面として設けられるか、あるいはまた、たとえば、全体を本出願に取り込む特許出願WO 96 / 35940に記載されているように、個別の導波領域に分割されていてもよい平面光学導波管である。

20

【0077】

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

【0078】

1個以上の光源からの励起光は、プリズムカプラと、重複する減衰フィールドを有する光学導波管を連結したものを有する減衰カプラと、導波層の前面(末端)の正面に配設された合焦レンズ、好ましくは円柱レンズを有する前面(バット)カプラと、格子カプラと、

30

【0079】

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

【0080】

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

【0081】

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

40

【0082】

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

【0083】

50

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

【0084】

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

強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームと、

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

を含み、

前記個別計測区域が、第一の複数の特異的結合パートナーとして測定される分析対象物を含む、前記「ネイチャーアイデンティカル」試料又は、それに由来する、元の試料と同じ相対分子組成の希釈物の付着によって生成され、第一の複数の特異的結合パートナーを形成する1種以上の固定化結合パートナーが、前記「ネイチャーアイデンティカル」試料に含まれる1種以上の分析対象物そのものである分析プラットフォームである。

【0085】

「ネイチャーアイデンティカル」試料に含まれるタンパク質は、天然の組成物として存在することもできるし、たとえば、「元の試料」を尿素又は界面活性剤(たとえばSDS)で処理したのちの変性組成物として存在することもできる。

【0086】

「ネイチャーアイデンティカル」試料は、好ましくは、尿素で処理したのちの変性形態で存在するが、その中に含まれる分析対象物のエピトープは、対応する検出試薬、たとえば抗体への結合のために自由に接触可能である。これは、尿素での処理による第三級及び第四級構造の破壊によって可能になる。

【0087】

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

【0088】

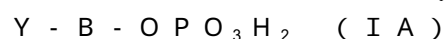
ここで、付着促進層の厚さは、好ましくは200nm未満、特に好ましくは20nm未満である。

【0089】

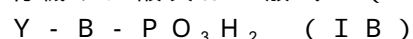
付着促進層は、シラン、官能化シラン、エポキシド、官能化、荷電又は極性ポリマー及び「自己組織化受動又は官能化単分子又は多分子層」、チオール、リン酸アルキル及びホスホン酸アルキル、多官能価ブロックコポリマー、たとえばポリ(L)リシン/ポリエチレングリコールの群の化合物を含むことができる。

【0090】

前記付着促進層が、一般式 I (A)



の有機リン酸又は一般式 I (B)



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

10

20

30

40

50

利であることがわかった。

【0091】

計測区域に固定化された分析対象物としての第一の複数の特異的結合パートナーの相対分子組成が、前記計測区域に適用された試料の元の相対分子組成と同一であるならば、それは好ましい。

【0092】

付着された「ネイチャーアイデンティカル」試料は、健全な又は罹患した細胞の抽出物（たとえばヒト、動物、バクテリア又は植物細胞抽出物）と、ヒト又は動物組織、たとえば臓器、皮膚、毛髪もしくは骨組織の抽出物又は植物組織の抽出物と、体液又はその成分、たとえば血液、血清もしくは血漿、滑液、涙液、尿、唾液、組織液、リンパ液と、からなる群より選択することができる。

10

【0093】

特に、「ネイチャーアイデンティカル」試料はまた、刺激（処理）された細胞又は未処理の細胞の抽出物と、健全組織又は患部組織の抽出物と、からなる群より選択することができる。

【0094】

前記試料は、組織スライシング、バイオプシー及びレーザキャプチャーマイクロディセクションの群の方法により、生物又は組織又は細胞集合体又は細胞から採取されたものであってもよい。

【0095】

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

20

【0096】

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

【0097】

前記「ネイチャーアイデンティカル」試料の1種以上は、生物又は組織又は細胞集合体又は細胞から採取され、さらなる希釈なしに前記強固な支持体に直接（すなわち細胞の溶解ののち）付着させたものであってもよい。

30

【0098】

前記「ネイチャーアイデンティカル」試料の1種以上が、強固な支持体としての前記減衰フィールドセンサプラットフォームに付着される前に、液体希釈媒体に溶解及び/又は希釈されており、試料の異なる希釈物が、前記減衰フィールドセンサプラットフォーム上の異なる個別計測区域に付着されていることが可能である。その場合、試料は少なくとも10倍に希釈されていることができる。本発明の分析プラットフォームの高い感度は、試料を30倍又は100倍に希釈し、それでもなお、この顕著な希釈もにかかわらず、単一の計測区域内の複数の分析対象物を定量的に測定することを可能にする。

【0099】

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

40

【0100】

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

【0101】

本発明の分析プラットフォームの特殊な実施態様は、1種以上の試料が、強固な支持体としての減衰フィールドセンサプラットフォームに付着される前に、任意には開始剤又は化学的架橋剤（たとえばグルタルアルデヒド）の存在で、ポリマー又は重合性モノマーの溶液と混合される（前記強固な支持体への付着を改善し、付着の均一さを改善するため）ことを含む。方法のこの実施態様は、たとえば、試料液体の蒸発過程中に計測区域内の試

50

料材料の分布の不均一さの形成を回避させて、より良好な「スポット形態」を生じさせ、ひいては結果の分析を容易にするのを支援することができる。ポリマー、重合性モノマー又は化学的架橋剤の前記溶液が、多糖類、たとえばアガロース、アクリルアミド、グルタルアルデヒドなどの溶液からなる群より選択されるならば、それは好ましい。

【0102】

また、本発明の分析プラットフォームのこのような特殊な実施態様に特徴的であることは、任意には開始剤又は化学的架橋剤（たとえばグルタルアルデヒド）の存在における1種以上の試料とポリマー又は重合性モノマーの溶液との混合物が、特異的結合反応の連続工程でトレーサ試薬が接触することができる試料成分が中に埋め込まれている強固な基材としての減衰フィールドセンサプラットフォームへの三次元ネットワーク構造の固定化につながるということである。したがって、単分子層よりも高い減衰フィールドセンサプラットフォームの表面被度を達成することができ、それが、分析対象物検出工程で計測可能なシグナルのさらなる増強につながることができる。ここで、生成されるポリマーネットワーク構造は媒体中への減衰フィールドの浸透深さを超えないことが重要である。理由は、減衰フィールドセンサプラットフォームの表面からこの距離を超えると、分析対象物検出は不可能であり、したがって、分析の結果が試料の元の相対分子組成に一致するということが保証されないからである。

10

【0103】

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

20

【0104】

ここで、各計測区域は、他の計測区域に固定化された試料と類似している又は異なる固定化「ネイチャーアイデンティカル」試料又は比較試料を含むことができる。

【0105】

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

【0106】

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

30

【0107】

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

40

【0108】

また、トレーサ化合物の非特異的結合を最小限にするために個別計測区域の間の領域が「不動態化」されている、すなわち、分析対象物に対して、及び付着された試料の他の含有物に対して、ならびに前記分析対象物のためのトレーサ化合物に対して「化学的に中性

50

」(すなわち非結合性)である化合物が、横方向に分けられた計測区域の間に付着されているならば、それは有利である。

【0109】

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

10

【0110】

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

【0111】

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

20

【0112】

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

30

【0113】

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

【0114】

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

40

【0115】

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

【0116】

本発明の分析プラットフォームは、好ましくは、減衰フィールドセンサプラットフォーム

50

ムの導波層が1個以上の光学結合要素と光学的に接触して、1個以上の光源からの励起光を前記導波層に内結合することを可能にするように設計されており、前記光学結合要素は、プリズムカプラと、重複する減衰フィールドを有する光学導波管を連結したものを含む減衰カプラと、導波層の前面(末端)の正面に配設された合焦レンズ、好ましくは円柱レンズを有する前面(パット)カプラと、格子カプラからなる群より選択される。

【0117】

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

【0118】

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

【0119】

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

【0120】

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

【0121】

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

【0122】

実施例

1. 分析プラットフォーム

1.1. 減衰フィールドセンサプラットフォーム

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

【0123】

減衰フィールドセンサプラットフォームを入念に清浄したのち、付着促進層としてのモノドデシルホスフェート(DDP)の単分子層を、水溶液(0.5mM DDP)からの沈

10

20

30

40

50

降により、自発性自己組織化によって金属酸化物層の表面に生成した。はじめは親水性であった金属酸化物面のこの表面改質により、多数の「ネイチャーアイデンティカル」試料が上に付着される疎水面（水に対して約100°の接触角）を得て、分析対象物を含有する「ネイチャーアイデンティカル」試料を特異的結合反応における分析対象物検出のための特異的結合パートナーとして付着させた。

【0124】

10行×9列に配設された90個の計測区域（スポット）をそれぞれが有する6個の同一のマイクロアレイを、インクジェットスポットタ（モデルBCA1、Perkin Elmer、米マサチューセッツ州ボストン）を使用して、疎水性付着促進層を設けられた減衰フィールドセンサプラットフォームに付着させた。各スポットは、容量280plの小滴1個をチップ面に付着させることによって生成した。

10

【0125】

1.2. 試薬及び計測区域アレイの生成

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

20

【0126】

次いで、上記のように処理した細胞培養物及び未処理の細胞培養物を、それぞれ4℃に冷却し、350Gの遠心力での遠心処理によってペレットに成形した（細胞数約 10^7 個）。ここで、細胞を、損傷することなく、媒体から簡単に分離した。次いで、上澄み液をデカントし、溶解緩衝液（7M尿素、2Mチオ尿素、4%CHAPS、1%DTT、4mM

30

【0127】

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

40

【0128】

本発明の方法に対する参照法として、ウェスタンブロット分析を実施した。

【0129】

上記の準備工程によって得られた試料を、再び約1mg/mlの総タンパク質濃度まで10倍希釈したのち、「ネイチャーアイデンティカル」試料として個別計測区域に付着させて、付着促進層を設けられた減衰フィールドセンサプラットフォーム上に計測区域アレイを生成した。

【0130】

50

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

【0131】

「ネイチャーアイデンティカル」試料及びCy5-BSAの付着ののち、分析プラットフォームを周囲温度及び相対湿度100%で2時間貯蔵し、次いで周囲空気中で乾燥させた。次いで、タンパク質でコーティングされていない減衰センサプラットフォーム上の自由な疎水領域を、50mMイミダゾール/100mM NaCl(pH7.4)中BSA(30mg/ml)の溶液とで、表面のインキュベーションによってウシ血清アルブミン(BSA)で飽和させた。そして、生成された計測区域を有する減衰フィールドセンサプラットフォームを水洗し、窒素流中で乾燥させ、4で貯蔵したのち、本発明の検出法を実施した。

10

【0132】

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

20

【0133】

2. 分析検出法

2.1. 検定アーキテクチャ

個別計測区域に付着された「ネイチャーアイデンティカル」試料としての固定化細胞溶解産物中の通常の状態(すなわち、たとえばリン酸化されている又はされていない)の特定のタンパク質の検出及び/又は特に活性化(たとえばリン酸化)された状態の特定のタンパク質の検出を、対応する検出試薬を検定工程として順次に適用することによって実施したのち、得られた蛍光シグナルを計測した。第一の検定工程の準備として、ポリクロナル分析対象物特異的ウサギ抗体(抗体A1(#2261):ホスホ(Ser)PKC基質、抗体A2(#9611):ホスホ(Ser/Thr)Akt基質、抗体A3(#9101):ホスホp44/42MAPキナーゼ(Thr202/Tyr204)、抗体A4(#9102):p44/42MAPキナーゼ(Thr202/Tyr204)(すべての抗体は、Cell Signaling Technology社、米マサチューセッツ州Beverlyから得た)を通常、検定緩衝液(50mMイミダゾール、100mM NaCl、0.1%BSA、0.05%Tween 20、pH7.4)中に1:500の比に希釈した。これら4種の異なる抗体溶液それぞれ30 μ lを計測区域の6個の同一アレイの1個に適用したのち、周囲温度で一晩インキュベートした(第一検定工程)。各アレイを検定緩衝液で洗浄することにより(5 \times 100 μ l)、特異的に結合していない過剰な抗体を除去した。

30

40

【0134】

この検定に使用した4種の異なる抗体は基本的に性質が異なるものであった。抗体A1及びA2は、セリン又はセリン/トレオニンでリン酸化されている異なるタンパク質を認識し、それに結合し、これらのタンパク質キナーゼは基質として働く。これは、ウェスタンブロットの多数のバンドから認めることができる(図2A及び「2.4.結果」)。抗

50

体 A 3 及び A 4 は、同じ種の化合物、すなわち p 4 4 / 4 2 M A P キナーゼ (E r k 2 と呼ぶ) を認識し、それに結合するが、抗体 A 3 はそのリン酸化「活性化」形態 (p E r k 2) だけを認識し、抗体 A 4 は、両形態 (非リン酸化形態 E r k 2 及びリン酸化形態 p E r k 2) を認識し、それらに結合する。

【 0 1 3 5 】

第二の検定工程は、前述の抗体 A 1 ~ A 4 すべてに結合する C y 5 標識抗ウサギ抗体 (Amersham Biosciences、スイス Dubendorf) を使用して、固定化「ネイチャーアイデンティカル」試料を含む個別計測区域に含まれる結合した分析対象物特異的抗体の検出のために実施した。この C y 5 標識抗体を、通常は検定緩衝液中 1 0 nM の濃度でアレイに適用し (各 3 0 μ l)、次いで、周囲温度の暗所で 2 時間インキュベートした。次いで、アレイを 10 検定緩衝液で洗浄して (1 0 0 μ l ずつで 5 回) 特異的に結合していない C y 5 抗ウサギ抗体を除去した。そして、このようにして準備した分析プラットフォームを貯蔵したのち、励起によって検出工程を実施し、得られた蛍光シグナルを ZeptoREADER (商標) を使用して検出した (以下参照) 。

10

【 0 1 3 6 】

2 . 2 . 計測区域アレイからの蛍光シグナルの検出

異なる計測区域アレイからの蛍光シグナルを、ZeptoREADER (商標) (Zeptosens社、Benkenstrasse 254, CH-4108 Witterswil) を使用する自動連続計測に付した。計測区域アレイごとに、本発明の分析プラットフォームを、光を五酸化タンタル導波層に内結合し、計測区域で利用可能な励起光を最大にするための共振条件とのマッチングに関して調節した。次いで、アレイごとに、対応するアレイからの蛍光シグナルのイメージを生成し、異なる露光時間及び生成するイメージの数を選択した。本例の計測の場合、励起波長は 6 3 3 nm であり、C y 5 の蛍光波長における蛍光の検出は、冷却したカメラと、カメラのレンズの正面に配置した、散乱光を抑制するための干渉フィルタ (透過 6 7 0 \pm 2 0 nm) とを使用して実施した。生成された蛍光イメージを制御コンピュータのディスクに自動的に保存した。光学システム (ZeptoREADER (商標)) のさらなる詳細は、全体を本出願に取り込む国際特許出願 P C T / E P 0 1 / 1 0 0 1 2 に記載されている。

20

【 0 1 3 7 】

2 . 3 . 評価及び参照

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

30

【 0 1 3 8 】

カメラの個々のピクセルからの未加工データは、センサプラットフォーム上の画像化区域に対応する、デジタル化計測データの二次元マトリックスに対応した。データ分析のために、まず、二次元座標格子を手作業でイメージ点 (ピクセル) に重畳して、各スポットのイメージ画分が個々の二次元グリッド要素に含まれるようにした。この格子要素の中で、ユーザ指定可能な半径 (通常は 9 0 μ m) を有する調節可能な円形の「対象区域」 (A O I) を各スポットに割り当てた。異なる A O I の場所は、イメージ解析ソフトウェアによるピクセルのシグナル強度の関数として個々に決定した。ユーザがはじめに指定した A O I の半径は保存される。選択した分析区域内のピクセル値 (シグナル強度) の算術平均をスポットごとの平均総シグナル強度として測定した。

40

【 0 1 3 9 】

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

50

計算した。

【0140】

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

【0141】

2.4. 結果

本発明の方法に対する比較法としてのウェスタンブロット分析の結果が図2Aに示されている。図の下寄り部分は、表面受容体に対する抗体CD23（「CD3」）及びCD28（「CD28」）で処理された細胞培養物を用いて得られた結果を示し、図の上寄り部分は、比較試料として、処理されていない培養物を用いて得られた結果を示し、いずれの結果も、前述の抗体A1～A4とでインキュベートした後のものである。

【0142】

ウェスタンブロット分析により、抗体A1及びA2が、セリン又はセリン/トレオニンでリン酸化されている異なるタンパク質を認識し、それに結合し、これらのタンパク質キナーゼが基質として働くことが確認された。これは、ウェスタンブロットの多数のバンドから明らかである。抗体A3及びA4は、同じ種の化合物、すなわちp44/42MAPキナーゼ（Erk2とも呼ぶ）を認識し、それに結合するが、抗体A3はそのリン酸化「活性化」形態（pErk2）だけを認識し、抗体A4は、両形態（非リン酸化形態Erk2及びリン酸化形態pErk2）を認識し、それらに結合する。したがって、処理された試料にA3を加えた場合、未処理の試料にA3を加えた場合よりもより強いバンドが発生すると予想される（この未処理の試料に検出可能な量のpErk2が含まれていればの話だが）。事実、このようなバンドは、未処理の試料のウェスタンブロットでは見えない。処理された試料の場合、二つの場合それぞれで一つのバンドが予想される。これらの予想は、図2Aに示す結果によって完全に確認されている。

【0143】

本発明の分析プラットフォームを使用して本発明の方法によって得られた結果が図2Bに示されている。棒グラフは、比較のため、表面受容体に対する抗体CD23（「CD3」）及びCD28（「CD28」）で処理された細胞培養物を用いて得られた結果（塗りつぶした棒）と、未処理の培養物（「陰性コントロール」）を用いて得られた結果とを示す。それらから生成された「ネイチャーアイデンティカル」試料それぞれを、上記のように減衰フィールドセンサプラットフォーム上の6個の類似した計測区域アレイに付着させたのち、異なる抗体A1～A4の溶液と接触させた。前述の4種の抗体A1～A4の1種をそれぞれが含有する異なる溶液を、共通の減衰フィールドセンサプラットフォーム上の異なる試料区画に配設された4個の類似したアレイに適用したのち、2.1に記載したようにCy5標識抗ウサギ抗体を加えた。各場合に、上記方法にしたがって参照され、アレイ内の5個の類似した計測区域から導出されたシグナル強度の平均値がその標準偏差とともに図2Bに示されている。

【0144】

得られたシグナル強度は、考慮した特定の分析対象物の濃度と相関していた（高いシグナル強度が高い濃度に対応）。表面受容体に対する抗体CD3（「CD3」）及びCD28（「CD28」）でジャーカット細胞培養物を処理（「刺激」）した結果、ホスホ（Ser）PKC基質及びホスホ（Ser/Thre）Akt基質の相対細胞内濃度が、陰性コントロールと比較して、それぞれ2.5倍及び1.8倍に増したということがはっきりと見てとれる。pErk2の濃度はそれよりも大きく、すなわち10倍に増したが、Erk2の含量及びpErk2の含量（抗体A4を使用して検出）の和は、計測の精度の範囲内で一定のままであった。この観察は、Erk2の全含量が10分の刺激期間内での

10

20

30

40

50

発現の増加によっては増大せず、p E r k 2 の含量だけがリン酸化によって増大したことを示す。この結果は、比較法として実施したウェスタンブロット分析（図 2 A）からの結果と良好に合致しているが、ホスホ（S e r / T h r e）A k t 基質の画分の増加は、ウェスタンブロット分析の場合では、よくてもほとんど認められなかった。本発明の方法を使用して得られた結果とは対照的に、ウェスタンブロット分析は一般に、相対濃度又はその変化に関して定量的結果を提供しない。

【 0 1 4 5 】

計測区域に付着された「ネイチャーアイデンティカル」試料中、すなわち個々の計測区域に固定化されたプロテオーム中の個々の対象「マーカタンパク質」を検出する場合の本発明の方法の感度を評価するため、事前に実施した検定の結果（図 2 B に示す結果）によるとごく少量の p E r k 2（図 2 B の三番目の棒の対）しか含有しないことが明白である未処理の細胞溶解産物（陰性コントロール）を個々のアリコート溶液に分割し、それに対してこの「マーカタンパク質」を異なる濃度（0 ~ 3 6 4 5 ng/ml）で加えた。そして、これらの溶液を前記のように平面導波管チップ上に固定化し、2 . 1 で記載した検定を実施した（抗体 A 3 を使用）。

10

【 0 1 4 6 】

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

【 0 1 4 7 】

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

20

【 0 1 4 8 】

図 4 A 及び 4 B は、第二の検定と本質的に類似する第三の検定の結果を示す。結果が図 3 A 及び 3 B に示されている上記第二の検定とは対照的に、この第三の検定は、2 . 1 に記載したように、抗体 A 4 を使用して（すなわち、第二の検定に使用したアレイと類似したアレイにこの抗体を適用して）実施した。したがって、異なる p E r k 2 添加量に対応する、この化合物のリン酸化形態及び非リン酸化形態（p E r k 2 及び E r k 2）の合計量をこの検定で測定した。計測区域アレイからのシグナルの典型的な分布が図 4 A に示され、マーキングされた長方形それぞれが、所定濃度の p E r k 2 を加えた未処理の細胞溶解産物に関して 5 個の複製スポットを表している（濃度 1 . 8 倍増、図 1 に示す幾何学的配設）。この場合、1 g 総タンパク質中 $1 . 2 \times 10^{-4}$ g の p E r k 2 重量分率に相当する 1 2 0 ng/ml の検定感度（検出限界）を測定した。

30

40

【 0 1 4 9 】

さらに、異なる長さの刺激期間中の C D 3 / C D 2 8 によるジャーカット細胞の共刺激から生じる p E r k 2 濃度の異なる変化を測定することができるかどうか、また、これらの変化の差を本発明の方法によって分解することができるかどうかを決定するため、第四の実験を実施した。このために、いずれの場合もジャーカット細胞培養物を 1 μ g/ml C D 3 / C D 2 8 とともに異なる長さの期間（分単位）インキュベートしたのち溶解させた。さらに、一つのジャーカット細胞培養物をスタウロスポリン（タンパク質キナーゼ阻害剤）で処理した。最後に述べた細胞培養物は、すべてのタンパク質キナーゼの阻害のせいでこの試料中には p E r k 2 が存在しないはずであったため、陰性コントロールとして使用した。したがって、この試料に関して計測されたシグナルは、p E r k 2 を含ま

50

ない試料からのシグナルに相当する。次いで、上記のように処理した細胞溶解産物を減衰フィールドセンサプラットフォーム上にスポットティングし、抗体 A 3 を使用して 2 . 1 に記載したような検定を実施して p E r k 2 の濃度の変化を測定した。

【 0 1 5 0 】

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

10

【 0 1 5 1 】

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

【 図面の簡単な説明 】

20

【 0 1 5 2 】

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

【 図 2 A 】比較法として実施したウェスタンブロット分析の結果を示す図である。

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

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

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

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

30

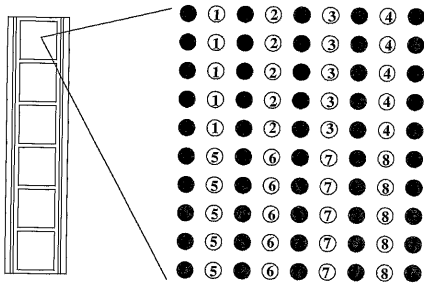
【 図 4 B 】 p E r k 2 をその添加濃度の関数として検出するための計測の結果を示す図である。

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

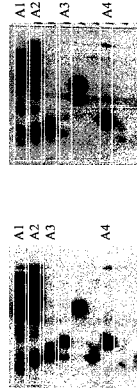
【 図 5 B 】抗体 A 4 を使用して検定を実施し、E r k 2 / p E r k 2 の相対合計含量を測定した結果を示す図である。

【 図 1 】

Fig. 1:



【 図 2 A 】



A1: ホスホ-(Ser) PKC 基質; A2: ホスホ-(Ser/Thr) Akt 基質; A3: ホスホ-p44/42 MAP キナーゼ(Thr202/Tyr204); A4: p44/42 MAP キナーゼ(Thr202/Tyr204).

【 図 2 B 】

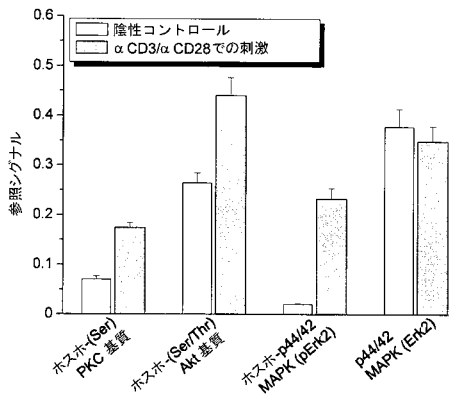


Fig. 3A:

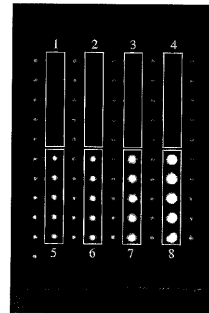
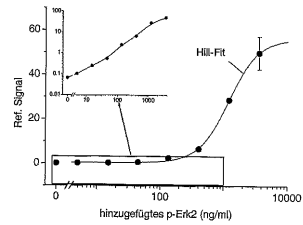


Fig. 3B:



【 図 3 B 】

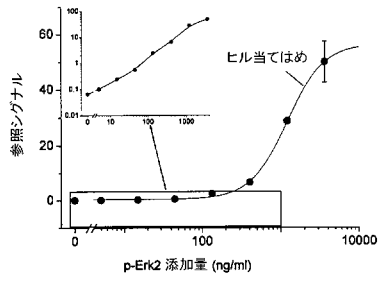


Fig. 4A:

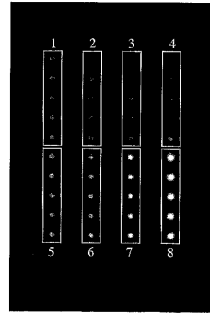
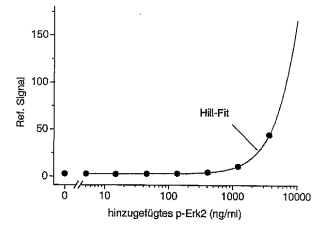
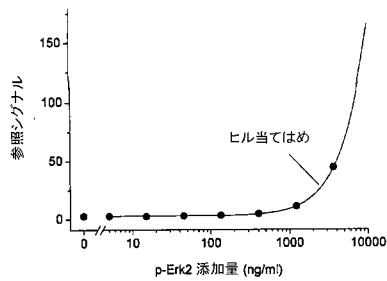


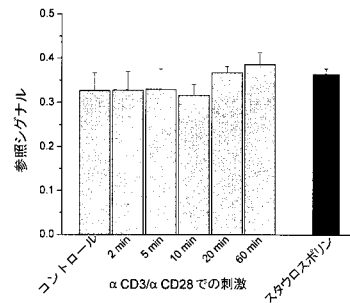
Fig. 4B



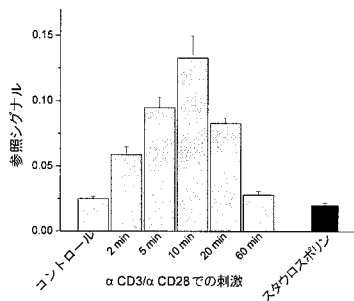
【 図 4 B 】



【 図 5 B 】



【 図 5 A 】



【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No. PCT/EP 03/09561 |
|--|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/543 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | DUVENECK, G. L. : "Novel bioaffinity sensors for trace analysis based on luminescence excitation by planar waveguides" SENSORS AND ACTUATORS, vol. B, no. 38-39, 1997, pages 88-95, XP004083676 the whole document | 1-96 |
| A | WO 97 35181 A (UNIVERSITY OF UTAH) 25 September 1997 (1997-09-25) claims 1-31 | 1-96 |
| A | WO 98 29736 A (GENOMETRIX INCORPORATED) 9 July 1998 (1998-07-09) claims 1-92 | 1-96 |
| -/- | | |
| <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. |
| <p>* Special categories of cited documents :</p> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*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)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*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</p> <p>*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</p> <p>*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.</p> <p>*&* document member of the same patent family</p> | | |
| Date of the actual completion of the international search 21 November 2003 | | Date of mailing of the international search report 16/12/2003 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Moreno de Vega, C |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/09561

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | US 5 822 472 A (NOVARTIS CORPORATION) 13 October 1998 (1998-10-13) claims 1-36 --- | 1-96 |
| X | PAWLAK, M ET AL: "Functional immobilization of biomembrane fragments on planar waveguides for the investigation of side-directed ligand binding by surface confined fluorescence" FARADAY DISCUSSIONS, no. 111, 1998, pages 273-288, XP001156169 England the whole document --- | 1-96 |
| A | US 6 078 705 A (NOVARTIS AG) 20 June 2000 (2000-06-20) claims 1-26 --- | 1-96 |
| Y | WO 01 84197 A (EDGE LIGHT BIOSCIENCES - OPTICAL CROSSLINKS) 8 November 2001 (2001-11-08) the whole document --- | 1-96 |
| Y | PAWLAK, M. ET AL: "Zeptosens' protein microarrays: A novel high performance microarray platform for low abundance protein analysis" PROTEOMICS, vol. 2, 2002, pages 383-393, XP009021061 the whole document --- | 1-96 |
| Y | WO 02 20873 A (ZEPTOSENS AG) 14 March 2002 (2002-03-14) the whole document ----- | 1-96 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/09561

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 9735181 | A | 25-09-1997 | AU 2334497 A | 10-10-1997 |
| | | | CA 2248189 A1 | 25-09-1997 |
| | | | EP 0890093 A1 | 13-01-1999 |
| | | | JP 2000507350 T | 13-06-2000 |
| | | | NO 984355 A | 13-11-1998 |
| | | | WO 9735181 A1 | 25-09-1997 |
| | | | US 6287871 B1 | 11-09-2001 |
| WO 9829736 | A | 09-07-1998 | AU 6646398 A | 31-07-1998 |
| | | | CA 2389358 A1 | 09-07-1998 |
| | | | EP 1249705 A2 | 16-10-2002 |
| | | | EP 0990142 A1 | 05-04-2000 |
| | | | JP 2001510339 T | 31-07-2001 |
| | | | JP 2003107097 A | 09-04-2003 |
| | | | US 6083763 A | 04-07-2000 |
| | | | WO 9829736 A1 | 09-07-1998 |
| | | | US 6331441 B1 | 18-12-2001 |
| | | | US 6312960 B1 | 06-11-2001 |
| | | | US 6479301 B1 | 12-11-2002 |
| | | | US 5822472 | A |
| AT 216491 T | 15-05-2002 | | | |
| AU 2317995 A | 21-12-1995 | | | |
| AU 689604 B2 | 02-04-1998 | | | |
| AU 2734695 A | 21-12-1995 | | | |
| CA 2190362 A1 | 07-12-1995 | | | |
| CA 2190643 A1 | 07-12-1995 | | | |
| CN 1149335 A | 07-05-1997 | | | |
| CN 1149336 A | 07-05-1997 | | | |
| CZ 9603471 A3 | 11-06-1997 | | | |
| CZ 9603472 A3 | 12-03-1997 | | | |
| DE 69505370 D1 | 19-11-1998 | | | |
| DE 69505370 T2 | 01-04-1999 | | | |
| DE 69526438 D1 | 23-05-2002 | | | |
| DE 69526438 T2 | 31-10-2002 | | | |
| DK 760944 T3 | 05-08-2002 | | | |
| WO 9533197 A1 | 07-12-1995 | | | |
| EP 0759159 A1 | 26-02-1997 | | | |
| EP 0760944 A1 | 12-03-1997 | | | |
| ES 2174948 T3 | 16-11-2002 | | | |
| FI 964664 A | 24-01-1997 | | | |
| FI 964684 A | 27-01-1997 | | | |
| HU 76407 A2 | 28-08-1997 | | | |
| HU 76406 A2 | 28-08-1997 | | | |
| WO 9533198 A1 | 07-12-1995 | | | |
| JP 10501616 T | 10-02-1998 | | | |
| JP 10501617 T | 10-02-1998 | | | |
| PL 317379 A1 | 01-04-1997 | | | |
| PL 317402 A1 | 14-04-1997 | | | |
| SK 151296 A3 | 09-07-1997 | | | |
| SK 151396 A3 | 09-07-1997 | | | |
| US 5959292 A | 28-09-1999 | | | |
| ZA 9504325 A | 27-11-1995 | | | |
| ZA 9504327 A | 27-11-1995 | | | |
| US 6078705 | A | 20-06-2000 | AU 5763296 A | 29-11-1996 |
| | | | BR 9608503 A | 06-07-1999 |
| | | | CA 2219769 A1 | 14-11-1996 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP 03/09561

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| US 6078705 | A | WO 9635940 A1 | 14-11-1996 |
| | | EP 0824684 A1 | 25-02-1998 |
| | | JP 11505610 T | 21-05-1999 |
| | | PL 323257 A1 | 16-03-1998 |
| | | US 6289144 B1 | 11-09-2001 |
| | | ZA 9603731 A | 12-11-1996 |
| WO 0184197 | A | 08-11-2001 | AU 6109401 A |
| | | | CA 2407701 A1 |
| | | | EP 1285290 A1 |
| | | | JP 2003532123 T |
| | | | WO 0184197 A1 |
| | | | US 2002110839 A1 |
| WO 0220873 | A | 14-03-2002 | AU 8985901 A |
| | | | WO 0220873 A2 |
| | | | EP 1315968 A2 |

| INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT | | Internationale Aktenzeichen PCT/EP 03/09561 |
|---|--|---|
| A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/543 | | |
| Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK | | |
| B. RESEARCHIERTE GEBIETE | | |
| Researchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N | | |
| Researchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen | | |
| Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS | | |
| C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| A | DUVENECK, G. L. : "Novel bioaffinity sensors for trace analysis based on luminescence excitation by planar waveguides" SENSORS AND ACTUATORS, Bd. B, Nr. 38-39, 1997, Seiten 88-95, XP004083676 das ganze Dokument | 1-96 |
| A | WO 97 35181 A (UNIVERSITY OF UTAH) 25. September 1997 (1997-09-25) Ansprüche 1-31 | 1-96 |
| A | WO 98 29736 A (GENOMETRIX INCORPORATED) 9. Juli 1998 (1998-07-09) Ansprüche 1-92 | 1-96 |
| | -/-- | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie | | |
| * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist | | |
| Datum des Abchlusses der internationalen Recherche 21. November 2003 | | Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts 16/12/2003 |
| Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 51 651 epo.nl, Fax (+31-70) 340-3016 | | Bevollmächtigter Bediensteter Moreno de Vega, C |

INTERNATIONALEFORSCHERCHENBERICHT

International Aktenzeichen

PCT/EP 03/09561

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|---|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| A | US 5 822 472 A (NOVARTIS CORPORATION) 13. Oktober 1998 (1998-10-13) Ansprüche 1-36 --- | 1-96 |
| X | PAWLAK, M ET AL: "Functional immobilization of biomembrane fragments on planar waveguides for the investigation of side-directed ligand binding by surface confined fluorescence" FARADAY DISCUSSIONS, Nr. 111, 1998, Seiten 273-288, XP001156169 England das ganze Dokument --- | 1-96 |
| A | US 6 078 705 A (NOVARTIS AG) 20. Juni 2000 (2000-06-20) Ansprüche 1-26 --- | 1-96 |
| Y | WO 01 84197 A (EDGE LIGHT BIOSCIENCES - OPTICAL CROSSLINKS) 8. November 2001 (2001-11-08) das ganze Dokument --- | 1-96 |
| Y | PAWLAK, M. ET AL: "Zeptosens' protein microarrays: A novel high performance microarray platform for low abundance protein analysis" PROTEOMICS, Bd. 2, 2002, Seiten 383-393, XP009021061 das ganze Dokument --- | 1-96 |
| Y | WO 02 20873 A (ZEPTOSENS AG) 14. März 2002 (2002-03-14) das ganze Dokument ----- | 1-96 |

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Patentzeichen

PCT/EP 03/09561

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9735181 | A | 25-09-1997 | AU 2334497 A 10-10-1997 |
| | | | CA 2248189 A1 25-09-1997 |
| | | | EP 0890093 A1 13-01-1999 |
| | | | JP 2000507350 T 13-06-2000 |
| | | | NO 984355 A 13-11-1998 |
| | | | WO 9735181 A1 25-09-1997 |
| | | | US 6287871 B1 11-09-2001 |
| WO 9829736 | A | 09-07-1998 | AU 6646398 A 31-07-1998 |
| | | | CA 2389358 A1 09-07-1998 |
| | | | EP 1249705 A2 16-10-2002 |
| | | | EP 0990142 A1 05-04-2000 |
| | | | JP 2001510339 T 31-07-2001 |
| | | | JP 2003107097 A 09-04-2003 |
| | | | US 6083763 A 04-07-2000 |
| | | | WO 9829736 A1 09-07-1998 |
| | | | US 6331441 B1 18-12-2001 |
| | | | US 6312960 B1 06-11-2001 |
| | | | US 6479301 B1 12-11-2002 |
| US 5822472 | A | 13-10-1998 | AT 172300 T 15-10-1998 |
| | | | AT 216491 T 15-05-2002 |
| | | | AU 2317995 A 21-12-1995 |
| | | | AU 689604 B2 02-04-1998 |
| | | | AU 2734695 A 21-12-1995 |
| | | | CA 2190362 A1 07-12-1995 |
| | | | CA 2190643 A1 07-12-1995 |
| | | | CN 1149335 A 07-05-1997 |
| | | | CN 1149336 A 07-05-1997 |
| | | | CZ 9603471 A3 11-06-1997 |
| | | | CZ 9603472 A3 12-03-1997 |
| | | | DE 69505370 D1 19-11-1998 |
| | | | DE 69505370 T2 01-04-1999 |
| | | | DE 69526438 D1 23-05-2002 |
| | | | DE 69526438 T2 31-10-2002 |
| | | | DK 760944 T3 05-08-2002 |
| | | | WO 9533197 A1 07-12-1995 |
| | | | EP 0759159 A1 26-02-1997 |
| | | | EP 0760944 A1 12-03-1997 |
| | | | ES 2174948 T3 16-11-2002 |
| | | | FI 964664 A 24-01-1997 |
| | | | FI 964684 A 27-01-1997 |
| | | | HU 76407 A2 28-08-1997 |
| | | | HU 76406 A2 28-08-1997 |
| | | | WO 9533198 A1 07-12-1995 |
| | | | JP 10501616 T 10-02-1998 |
| | | | JP 10501617 T 10-02-1998 |
| | | | PL 317379 A1 01-04-1997 |
| | | | PL 317402 A1 14-04-1997 |
| | | | SK 151296 A3 09-07-1997 |
| | | | SK 151396 A3 09-07-1997 |
| US 5959292 A 28-09-1999 | | | |
| ZA 9504325 A 27-11-1995 | | | |
| ZA 9504327 A 27-11-1995 | | | |
| US 6078705 | A | 20-06-2000 | AU 5763296 A 29-11-1996 |
| | | | BR 9608503 A 06-07-1999 |
| | | | CA 2219769 A1 14-11-1996 |

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationaler Patentkennzeichen

PCT/EP 03/09561

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| US 6078705 A | | WO 9635940 A1 | 14-11-1996 |
| | | EP 0824684 A1 | 25-02-1998 |
| | | JP 11505610 T | 21-05-1999 |
| | | PL 323257 A1 | 16-03-1998 |
| | | US 6289144 B1 | 11-09-2001 |
| | | ZA 9603731 A | 12-11-1996 |
| WO 0184197 A | 08-11-2001 | AU 6109401 A | 12-11-2001 |
| | | CA 2407701 A1 | 08-11-2001 |
| | | EP 1285290 A1 | 26-02-2003 |
| | | JP 2003532123 T | 28-10-2003 |
| | | WO 0184197 A1 | 08-11-2001 |
| | | US 2002110839 A1 | 15-08-2002 |
| WO 0220873 A | 14-03-2002 | AU 8985901 A | 22-03-2002 |
| | | WO 0220873 A2 | 14-03-2002 |
| | | EP 1315968 A2 | 04-06-2003 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
|--------------------------|----------------|------------|
| G 0 1 N 33/53 | G 0 1 N 33/53 | D |
| G 0 1 N 33/543 | G 0 1 N 33/53 | M |
| G 0 1 N 33/553 | G 0 1 N 33/543 | 5 0 1 J |
| | G 0 1 N 33/543 | 5 7 5 |
| | G 0 1 N 33/543 | 5 9 5 |
| | G 0 1 N 33/553 | |

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

(72)発明者 シック, エギンハルト

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

(72)発明者 オロシュラン, ペーター

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

Fターム(参考) 2G054 AA08 EA01

4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC01 CC02 CC03 CC08 FA12 FA15

4B063 QA01 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR40 QR56 QS34

QS36 QS39 QX02

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 分析平台和检测方法，其中分析物被测量为固定在样品中的特异性结合配偶体 | | |
| 公开(公告)号 | JP2005537486A | 公开(公告)日 | 2005-12-08 |
| 申请号 | JP2004533418 | 申请日 | 2003-08-28 |
| [标]申请(专利权)人(译) | ZEPTOSENS | | |
| 申请(专利权)人(译) | Tsueputozensu股份公司 | | |
| [标]发明人 | パウラクミヒヤエル シックエギンハルト オロシユランペーター | | |
| 发明人 | パウラク,ミヒヤエル シック,エギンハルト オロシユラン,ペーター | | |
| IPC分类号 | G01N33/566 C12M1/00 C12M1/34 C12Q1/68 G01N21/76 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/553 | | |
| CPC分类号 | G01N33/54353 G01N33/54373 | | |
| FI分类号 | G01N33/566 C12M1/00.A C12M1/34.Z C12Q1/68.A G01N21/76 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/543.501.J G01N33/543.575 G01N33/543.595 G01N33/553 | | |
| F-TERM分类号 | 2G054/AA08 2G054/EA01 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA12 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR56 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02 | | |
| 代理人(译) | 津国 肇 筱田文雄 | | |
| 优先权 | 2002001502 2002-09-03 CH 2003000114 2003-01-27 CH | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明提供了一种分析平台，用于相对于参与特异性结合反应的生物学相关化合物，以分析物的形式测试多个天然相同的样品，所述样品的样品或稀释液与其中包含的待检测分析物一起，作为第一多个特异性结合配偶体，至少一个一维或二维在一个或多个特异性结合反应步骤中应用于阵列，一个或多个使分析物与以第二多个特异性结合配偶体形式应用于所述个体测量区的样品接触，以检测来自所述第一多个特异性结合配偶体的样品中包含的1的浓度特定检测物种或多种分析物，检测物质与单个测量区域中样品中包含的分析物结合通过衰减场传感器平台的衰减场中的局部分解并基于来自每个测量区域的光电子信号的相对变化量来测量由组合产生的光电信号的变化，其特征定量或定性测量存在那。

2 B】

