

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 517155

(P2003 - 517155A)

(43)公表日 平成15年5月20日(2003.5.20)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 37/00	102
G 0 1 N 37/00	102	C 1 2 N 15/00	F

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 43数)

(21)出願番号 特願2001 - 545580(P2001 - 545580)

(86)(22)出願日 平成12年12月18日(2000.12.18)

(85)翻訳文提出日 平成14年6月17日(2002.6.17)

(86)国際出願番号 PCT/FR00/03572

(87)国際公開番号 W001/044503

(87)国際公開日 平成13年6月21日(2001.6.21)

(31)優先権主張番号 99/15967

(32)優先日 平成11年12月17日(1999.12.17)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシエルシュ・シャンティフィク

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

フランス国、75794 パリ・セデックス 1 6、リュ・ミシエル・アンジュ 3

(72)発明者 ヴュヤシノヴィッチ、トドール
フランス国、エフ - 75007 パリ、リュ・ルースレット 5

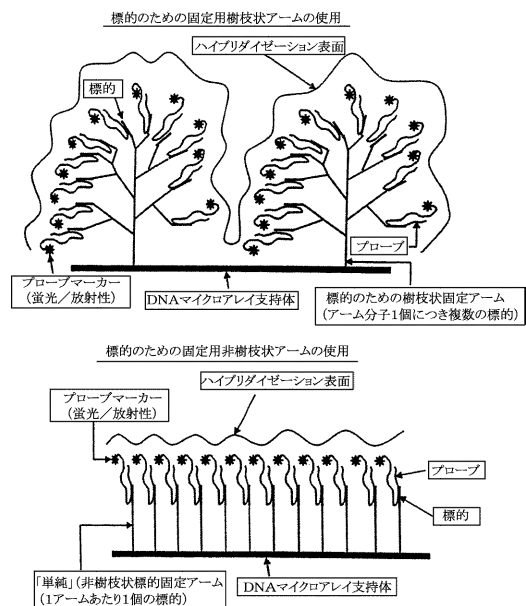
(74)代理人 弁理士 津国 肇 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 バイオチップ、調製及び使用

(57)【要約】

本発明は、バイオチップ、その製造及びその使用に関する。具体的には、樹状アーム及び/又は負電荷を有するアーム及び/又は負電荷を有する担体上に直接によって担体上に核酸を固定化することを含むバイオチップに関する。本発明の方法及びバイオチップは、例えば、目的の遺伝子の探求のために又は診断目的のため、遺伝子発現を検出するか又は分析するために用いることができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 生物起源の重合体を含む、枝分かれした形態のアームを用いて支持体上に固定化された核酸を含むことを特徴とするマイクロアレイ。

【請求項2】 アームが、1つ以上の分枝レベルを有する分枝の重合体であることを特徴とする、請求項1記載のマイクロアレイ。

【請求項3】 アームが、有機重合体であることを特徴とする、請求項1又は2に記載のマイクロアレイ。

【請求項4】 アームが、糖重合体、例えばグリコーゲン又はグリコーゲン誘導体又はアミロペクチンであることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項5】 アームが、反復したガラクトース、グルコース、マンノース、フコース、キシロース、N-アセチルガラクトサミン及び/又はN-アセチルグルコサミン単量体を含む分枝の重合体であることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項6】 アームが、グリコポリペプチド、例えばアグレカンであることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項7】 アームが、例えば免疫グロブリンといったポリペプチド化合物であることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項8】 核酸が、アームの末端に共有結合モードで固定されていることを特徴とする、請求項1～7のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項9】 アームが、共有結合モードで、分子の幹部分により支持体に固定されていることを特徴とする、請求項1～8のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項10】 支持体が、平坦及び/又は凸形表面を有することを特徴とする、請求項1～9のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項11】 支持体が、固体又は半固体支持体であることを特徴とする、請求項10記載のマイクロアレイ。

【請求項12】 支持体が、ガラス、シリカ、ポリリシン、アミノシラン及

び/又はアミノ反応性シランで構成されていることを特徴とする、請求項11記載のマイクロアレイ。

【請求項13】 核酸が、天然、合成及び/又は半合成起源の1本鎖又は2本鎖核酸であることを特徴とする、請求項1～12のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項14】 核酸が、合成オリゴヌクレオチド、PCR産物、遺伝子又は遺伝子フラグメント、プラスミド、1本鎖又は2本鎖のcDNA又はRNAの中から選択されることを特徴とする、請求項13記載のマイクロアレイ。

【請求項15】 核酸が、1本鎖核酸、特に約25～100ヌクレオチドの間、好ましくは約30～60ヌクレオチドの間の長さをもつ1本鎖核酸の分子であることを特徴とする、請求項14記載のマイクロアレイ。

【請求項16】 支持体上に核酸を固定するための、枝分かれした形態の空間的組織をもつ生物起源の重合体(特に、糖重合体、とりわけグリコーゲンから誘導された糖重合体)の使用。

【請求項17】 核酸が、ヌクレオチド約30～60個の長さを有する1本鎖核酸であることを特徴とする、請求項13記載のマイクロアレイ。

【請求項18】 1本鎖核酸が、ヌクレオチド約30～60個の長さを有する1本鎖DNAであることを特徴とする、請求項17記載のマイクロアレイ。

【請求項19】 1本鎖核酸が、ヌクレオチド約30～60個の長さをもつ1本鎖RNAであることを特徴とする、請求項17記載のマイクロアレイ。

【請求項20】 1本鎖核酸が、in vitroでの化学合成によって産生される核酸であることを特徴とする、請求項17～19のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項21】 生物起源の重合体を含む枝分かれした形態のアームを用いて、固体又は半固体支持体上に固定化されたRNAを含むことを特徴とする、請求項17～20のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項22】 生物起源の重合体を含む枝分かれした形態のアームを用いて固体又は半固体支持体上に固定化されたPCRによって産生された核酸を含むことを特徴とする、請求項17～20のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項23】 アームが負の電荷を担っていることを特徴とする、請求項1～15及び17～22のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項24】 支持体が、一定の負の電荷を担っていることを特徴とする、請求項1～15及び17～22のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項25】 遺伝子発現の調節を研究するための、請求項1～15及び17～24のいずれか1項記載のマイクロアレイの使用。

【請求項26】 遺伝子又は遺伝子フラグメントの探求のための、請求項1～15及び17～24のいずれか1項記載のマイクロアレイの使用。

【請求項27】 標的同定のための、請求項1～15及び17～24のいずれか1項記載のマイクロアレイの使用。

【請求項28】 遺伝子診断のための、請求項1～15及び17～24のいずれか1項記載のマイクロアレイの使用。

【請求項29】 下記：

a) 支持体上に枝分かれした形態のアームを固定するための工程、及び
b) a) の間に得られた枝分かれした形態のアームに対して標的分子を固定するための工程、
を含むことを特徴とする、請求項1～15及び17～24のいずれか1項記載のマイクロアレイ調製方法。

【請求項30】 a) 枝分かれした形態でアームに対する標的分子を固定するための工程；及び
b) 支持体上にa) で得た複合体を固定するための工程、
を含むことを特徴とする、請求項1～15及び17～24のいずれか1項記載のマイクロアレイ調製のための方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、生物学及び遺伝学の分野に関する。特に、本発明は、核酸マイクロアレイの調製のための新しい組成物及び方法及びそれらの使用に関する。本発明は特に、特定の核酸個体群を含みかつ/又は特定の定着分子又は特定の支持体から調製された核酸マイクロアレイを扱かうものである。本発明に従った方法及び核酸マイクロアレイは、遺伝子発現の検出又は分析、問題の遺伝子の探索又は診断などの利用分野のために使用可能である。

【0002】

「DNAマイクロアレイ」またより一般的には、核酸マイクロアレイは、例えば多数の遺伝子の転写活性の研究（遺伝子発現分析）及び（遺伝的多形現象分析を含む）多数のDNAフラグメントの配列の決定などを可能にする大規模な遺伝子分析のための小型化されたシステムである。その一般的 방식は、次の工程から成る：

【0003】

- 縮小された表面上に多数の異なるフラグメントを付着させることが可能となるように、組織的にかつ小型化された形で支持体上に核酸を固定する工程。核酸マイクロアレイは、支持体とこの支持体に取付けられた核酸フラグメントから成る集合体である。本発明においては、マイクロアレイ上に固定された核酸は、「標的」という語で識別される。特異的DNA又はRNA配列に対応する各々の核酸（又は核酸群）は、支持体（「スポット」）上の規定の位置に固定されている。好ましくは、これらのマイクロアレイは、 1 cm^2 あたり500スポット以上、好ましくは 1 cm^2 あたり1000スポット以上、さらに一層好ましくは、 1 cm^2 あたり5000スポット以上の密度をもつ。

【0004】

- 分析のための核酸個体群を（その性質又は生物起源の如何に関わらず）マイクロアレイ上にハイブリッド形成させる工程。ここでは我々は、分析用核酸を「プローブ」という語で呼んだ。ハイブリダイゼーションの間、プローブ内に存在する核酸は、これらのプローブの配列のすべて又は一部分と類似した核配列を

もつマイクロアレイ上に存在する標的に対して特異的な形で付着することになる。

【0005】

- マイクロアレイ標的の各々の上の特異的にハイブリッド形成されたプローブの数量を測定する工程。この測定は、プローブの先行する蛍光又は放射線マーキング及び各標的上のハイブリダイゼーション後に存在するマーキングの数量の読取りか、又は各標的のためのプローブ-標的ハイブリダイゼーションの数量のその他の測定方法（例えば、網羅的ではないものの、2本鎖標的-プローブ電気キャパシタンスの形成を通して誘発されたマイクロ電流の測定又は各標的上に固定されたプローブの分子質量の直接的測定）を用いることによって実施可能である。

【0006】

先行技術において、一定数の核酸マイクロアレイについて記述されてきた。しかしながら、これらの核酸マイクロアレイは、その産生及び使用をむずかしいものにする、特に利用される核酸標的の性質及び/又はマイクロアレイ調製条件に付随するいくつかの問題又は制限条件を示す。

【0007】

したがって、Affymetrix社により開発された1本鎖核酸マイクロアレイ技術は、写真平板及び固相内でのDNA合成によりマイクロアレイ支持体上で直接オリゴヌクレオチドを合成させることから成る。その他の合成方法を用いて得ることのできるこの方式は、一般に「インサイチュ合成」という表現で識別されている。しかしながら、今までのところ、この方式は、25塩基以上の長さのオリゴヌクレオチドを十分な効率で合成させることができず、（長さ25塩基以下の）これらのオリゴヌクレオチドの使用は、プローブの数多くの非特異的ハイブリダイゼーションの存在を誘発し、このシステムを用いた場合実験の再現性に信頼性がなくなる。

【0008】

この問題に関しては、（例えば核酸マイクロアレイのためのプローブ標的複合体といった）2つの核酸フラグメントの間のハイブリダイゼーションの特異性が

、そのハイブリダイゼーションの実施条件、これらの核酸の塩基組成物、それらの配列類似性又は同一性及びそれらの同一配列の長さにより左右されるというのは、周知のことである。したがって、2つのフラグメント間の同一配列が長くなればなるほどハイブリダイゼーションはより特異的なものとなる。しかしながら、いったん配列によって可変的であるものの一般に1000塩基以上のものである一定の長さを超過すると、二次分子構造がハイブリダイゼーション反応(分子それ自体への上のフォールディングさらには分子の自己ハイブリダイゼーション)の実施を妨害する可能性がある。

【0009】

したがって、効率が良く感応性の高いハイブリダイゼーション読取りと適合性の条件下で、すべてのタイプの核酸で構成されたマイクロアレイの産生を可能にする技術を発見することが有用であろう。しかしながら、マイクロアレイ支持体上への核酸の付着は、特に占有される立体空間及び支持体上の現行の物理的及び化学的付着モードのため、なおも1つの課題であり続けている。

【0010】

非常に小さな表面上へ多数の分子の被着(マイクロアレイ上の各被着の「スポット」)に付随する立体空間占有の問題は、1つの重要な課題である。実際、被着分子(標的)の数及び密度は、分析すべき核酸分子(プローブ)の密度に関するハイブリダイゼーション測定を可能にするのに十分なものであることが不可欠である。しかしながら、この密度は、標的の占有された空間のため、標的に対するプローブ分子のアクセスを妨害するほど大きいものであってはならない。

【0011】

その上、核酸マイクロアレイ上の標的の付着条件も同じ位に重要である。事実、この固定は、理想的には共有結合型のもので安定していなければならないが、プローブ上の標的のハイブリダイゼーション能力を削減してはならない。この観点からみると、理想的状況は、標的漂着がその長さ上ではなく、標的の末端のうちの方(5又は3)で行なわれることである。最後に、占有立体空間及びその長さ全体に沿った標的の利用可能性に関するかぎり、ただし技術的実現可能性も含めて、マイクロアレイ支持体上に直接標的を固定するのが良いか又は中間

「アーム」（その性質又はサイズの如何に関わらず重合体分子）を通してそれらを固定するのがよいかの問題はなお決定されていない。

【0012】

本発明は、ここで先行技術の技法及び製品に関する課題及び限界に対する有利な解決法を紹介している。これらの解決法は、特に、支持体上の標的付着条件ならびに利用される固定用分子の性質及び／又は物理的及び／又は化学的特性に向けられている。本発明は同様に、標的分子の特定の個体群、特に既定のサイズの標的核酸個体群が上に被着されるマイクロアレイをも記述している。

【0013】

本発明は、特に、マイクロアレイ支持体上に標的核酸を固定するための新しいアプローチについて記述している。これは、以下に定義するとおりのあらゆるタイプの標的核酸及び以下で定義するとおりのあらゆるタイプの支持体を用いてセットアップ可能である。その上、これは、マイクロアレイ支持体上で直接合成された（インサイチュ合成された）標的核酸、又は独立して合成され次に別の時点にマイクロアレイ上で固定された標的核酸のいずれを用いても同様に良好にセットアップできる。その上、ポリヌクレオチド以外の目的の分子を用いてセットアップすることも可能である。

【0014】

より特定的には、最初の態様に従うと、マイクロアレイ上に標的を固定するため、本発明は、枝分かれした形態の空間構造（一次又は二次分子構造）をもつアーム（又は「リンカー」分子）の使用に関するものである。特に、本発明は一般に、マイクロアレイ支持体上の標的固定「アーム」といったような、単数又は複数いずれの自由度を有するかとは無関係に樹枝方式に従って組織された空間構造をもつあらゆる分子の使用を扱っている。

【0015】

したがって、本発明の第1の目的は、それが枝分かれした形態のアームを用いて支持体上に固定化された核酸を含むことを特徴とするマイクロアレイに関する

。

【0016】

本発明のもう1つの態様は、1本鎖核酸がヌクレオチド約25～100個、好ましくは約30～60個の間の長さを有する、支持体上に固定された1本鎖核酸で構成されたマイクロアレイに関する。

【0017】

本発明のもう1つの態様は同様に、均等な負の電荷を担う支持体上の又は負の電荷を担うアームを用いた固定化された核酸を含むマイクロアレイにも関する。

【0018】

本発明は、同様に、遺伝子分析、配列決定、遺伝子研究、診断などのための上述のとおりマイクロアレイの調製及び使用にも関する。

【0019】

本発明をより良く理解できるようにするため、以下に一覧される定義が提供される。特に指示のないかぎり、本特許出願の中で利用されるその他の技術的用語は、その通常の意味に従って解釈されるべきである。

【0020】

マイクロアレイ：本発明に従うと、マイクロアレイは、標的核酸が上に被着されるあらゆる支持体を表わす。一般に、核酸は、好ましくは共有結合によって支持体上に固定化されている。これらは支持体上に直接固定化されてもよいし、あるいはまた「アーム」を中間使用して間接的に固定化されてもよい。これには、標的が予め産生され次に支持体上に固定されるか、又は（写真平板又は固相中のDNA合成を含め）支持体上に標的が直接合成されるようなマイクロアレイが関与しうる。本発明のマイクロアレイは、少ない又は非常に多数の標的を内含することができ、標的により占有された合計支持体表面のサイズは変動しうる。

【0021】

一般に、「アーム」（又は「スペーサ」又は「リンカー」という語は、標的核酸を支持体に固定するのに使用され得るあらゆる分子を表わす。これは、特異的な形でプローブ核酸とハイブリッドを形成する能力をもたない分子に関する。したがってこれは好ましくは、基本的に非核性の分子に関する。本発明のマイクロアレイの構成においては、わずか1つの「アーム」又は「スペーサ」又は「リンカー」、あるいは異なる構造をもつ「アーム」の混合物がマイクロアレイによ

り使用され得る。しかしながら一般的には、均質なシグナルを得るためには、単一アレイ上で単一のタイプのアームを使用することが好ましい。一例としては、アーム分子は、タンパク質、糖質又は脂質の性質をもつ有機分子であってもよいし、あるいはまた非有機合成重合体であってもよい。

【0022】

本発明の状況下では、マイクロアレイ支持体上に存在する「標的」核酸は、異なる性質及び起源のものであり得る。したがって、これらは、天然、合成及び/又は半合成起源の1本鎖又は2本鎖核酸であり得る。特に、これらは、合成オリゴヌクレオチド、PCR産物、遺伝子又は遺伝子フラグメント、プラスミド、1本鎖又は2本鎖のcDNA、RNAなどであってもよい。これらは、生検材料といったような生体標本、細胞標本、特にヒトといった哺乳動物組織又は器官の標本、植物、動物、ウイルス又は細菌起源の標本から分離された核酸个体群でありうる。これにはオリゴヌクレオチドが関与することから、これらのオリゴヌクレオチドは、DNA又はRNAのいずれの性質のものであるかに関わらず、ヌクレオチド25~100個の間の長さをもつ1本鎖核酸としてさらに特定の定義づけされる。

【0023】

マイクロアレイ支持体の性質はさまざまであり得る。したがって、それには、直接的又は間接的のいずれでも標的核酸を受入れる能力をもつあらゆる支持体が関与しうる。特に、支持体は、平坦な表面及び/又は凸状表面で構成され得、また固体又は半固体の性質を有することができる。さらに、支持体は、可変的な形状及びサイズを有することができる。例えば、円形、矩形、正方形などの支持体が存在する。支持体表面積は、好ましくは、300~3000mm²、好ましくは400~1800mm²の間にある。例えば、支持体として使用可能な材料としては、ガラス、シリカ、(特にアンモニア脱保護処理後のガラス質シリカ)、ポリリン、アミノシラン及び/又はアミノ反応性シランが内含される。

【0024】

添付図面は、さまざまな本発明の方法を立証している。

【0025】

前述のように、本発明の第1の目的は、枝分かれした形態のアームを用いて支持体上に固定化された核酸を含むことを特徴とするマイクロアレイに関する。

【0026】

我々の知るところでは新規であるこの方式は、分子の立体占有空間に関連する問題を制限することができるという利点を示す。実際、このような「アーム」の樹枝の先末端に標的核酸を固定することによって、観察下のプローブ核酸に対するこれらの標的の提示表面の増加が得られる（図1参照）。さらに、これにより、DNAマイクロアレイ支持体に直接固定すべき分子の数を削減することができる（これらの「アーム」の幹のみが固定される）。こうして、標的が支持体上に直接固定されるか又は線形「アーム」を用いて固定される状況に比べて、標的立体占有空間を削減しながら、マイクロアレイの各「スポット」上で強い標的核酸密度を得ることが可能となる。

【0027】

先行技術においては、支持体上にオリゴヌクレオチドを固定するための複数の物理的性質が提案されてきた。例えば非制限的な例として、一方ではオリゴヌクレオチドの末端のうちの1つに共有結合するその能力のため、また他方ではさまざまなアレイ支持体に共有結合により固定されるその能力のために選択された、原子26個～105個の長さの線形オリゴエチレングリコールに言及することができる。しかしながら、これまでのところは、提案されてきたアームはすべて、線形一次構造を示しかつ/又は合成のものである（WO 00/43539及びWO 99/10362参照）。本発明は、好ましくは生物起源の重合体に基づいて、支持体特に枝分かれした形態状のアームに対し核酸を固定するために非線形アームを使用することができるということを立証している。

【0028】

より特定的には、アームは、好ましくは形状が細長い樹枝状の空間組織をもつ重合体から成る。有利には、重合体は、1つ以上の分枝レベルをもつ分枝の重合体である。

【0029】

樹枝状アームは、異なる有機分子、特に（天然に存在する）有機分子、その誘

導体又は有機部分と合成部分から成る混合化合物から調製されうる。

【0030】

1つの特定の実施形態においては、本発明に従ったアームは、生物起源の有機重合体を含む。アームの調製に使用される生体化合物は、分離、化合又は多量体化された形又は必要とあらば合成分子又は重合体又は反応性化学基を用いて官能化又は改質されている、糖、ポリペプチド、糖タンパク質、糖ポリペプチド、免疫グロブリンなどでありうる。

【0031】

これには、天然に存在する有機化合物が関与することから、これらは生体抽出物又は人工的に合成された抽出物から精製され得る。第1の有利な実施形態に従うと、有機重合体は、糖又は多糖類重合体である。

【0032】

マイクロアレイ調製、又はより一般的には核酸の固定化のためのこのような糖重合体の使用には、特にその化学的物性及びその一次及び二次構造のため、広範な利点及び有利性がある。

【0033】

このように、多糖類は親水性であり、このことは、標的上のプローブハイブリダイゼーション、特にヌクレオチド性(DNA, RNA; プローブ又は誘導体(PNA))にとって有利な条件である。実際、後者は親水性であり、それらのハイブリダイゼーションは水溶液中で行なわれる。疎水性固着重合体は、ハイブリダイゼーション溶液に対する相反効果のため、ハイブリダイゼーションを妨害する危険性がある。

【0034】

その上、多糖類、特に記述されているものは、ヒドロキシル官能基(OH)の存在のため、鎖の末端(すべての末端)で共有結合を作り出すことができるようにするラジカルを有する。例えば、共有結合は、多糖類及び糖タンパク質の合成に介入する糖供与体ポリヌクレオチド内に存在するものといったホスフェート結合(C-P-C又はC-P-P-C又はC-P_n-C)でありうる。考えられる1つの固着例は、天然グリコーゲン合成の工程、特にニリン酸ウリジングルコー

スを形成するためのUDP Gluc - ピロホスホリラーゼ酵素の存在下での三リン酸ウリジン (UTP) とグルコース - 1 - ホスフェートの反応に基づくものである (UDP Gluc、図2)。これは同様に、糖タンパク質内に存在するものといったような窒素結合 (C - N - C - C) (図3)、同様に或る種の糖タンパク質又は多糖類構造自体においてそうであるように、酸素結合 (C - O - C) をも意味しうる (図4参照)。単純な形で、この特性は、多糖類とその他の重合体 (例えば、タンパク質、その他の多糖類又は核酸) の間の共有結合の樹立を可能にする。

【0035】

例えばグルコース供与体としての天然のグリコーゲン合成の中間段階の1つの間での天然の「ヌクレオチド糖」複合体の形成 (この明確なケースにおいて、糖 - ヌクレオチド結合は、グルコース - リボース結合をもつ二リン酸ウリジングルコースを結果としてもたらずジホスフェート結合である、図2参照) は、糖と核酸の間このタイプの相互作用及び共有結合の樹立を例示している。一例としては、多糖類 - ポリヌクレオチド結合は、糖1が多糖類の末端にあり糖2がポリヌクレオチドの5'末端にあるヌクレオチドのものとして、1' - 5'、糖1 - 糖2タイプの連鎖の介入を誘発しうる。

【0036】

本発明に従って多糖類を使用することのもう1つの利点は、その一次及び二次構造に起源するものである。実際、本発明で使用される多糖類は、多分岐のものである (図5参照)。さらに、それらのサイズ (グリコーゲンについて直径21 nm) は、DNAマイクロアレイの小型化されたフォーマットに完全に適しており、分岐の間の距離 (天然グリコーゲンについては約13個のグルコース残基) により有利にも分岐の重合体の末端上に固定された標的の過度の立体空間占有を回避することができる。実際には、2 ~ 5残基毎の分岐が、プローブハイブリダイゼーションを妨害することになる。その上グリコーゲンと同様、多糖類は、本発明に従って、プローブにより提示される表面に適合された球形形状を有する。(図5及び6参照)。

【0037】

最後に、糖ベースの重合体の使用は同様に共有結合様式でかつ上述のもののような化学結合のうちの1つのおかげで、その末端のうちのいずれかによってか又は好ましくはその核によって、マイクロアレイ支持体に対する糖の固定をも可能にする。この結合は、支持体上の直接結合であってもよく、また特にタンパク質タイプのものである定着分子を介する間接的結合であってもよい。したがって、天然グリコーゲンの場合には、これはその核による共有結合様式で1つのタンパク質、グリコゲニンに（ここではチロシン残基により）連鎖される。したがって、問題のケースでは、多糖類は、これらの利用分野で糖タンパク質の形で使用される。

【0038】

このタイプの分子の特定の例が、グリコーゲン分子、特に人間の体内の内因性グリコーゲンである。この分子は、共通の幹からの数多くの分岐を伴う糖重合体であり、これらの分岐は同じく糖重合体である。本特許出願の特定の1目的は、こうして、この用途のためのグリコーゲン又はグリコーゲン誘導体の使用に関する。

【0039】

グリコーゲンは、上述の特性すべてを有している。それは市販されており、安価である（図5、6及び7参照：グリコーゲン-ポリヌクレオチドアレイ）。グリコーゲン分子は、本発明で考慮されている用途と相容れる制限された占有空間を維持する一方で人工的重合体合成によって得ることが極めて困難な非常に大きい固定能力を表わし、60以上のプローブを固定するための60以上の自由グルシド末端を提示することができる。

【0040】

このような生体糖ベースの化合物のその他の例としては、アミロペクチン又は、でんぷん構造から誘導されるその他のあらゆる重合体（図8参照）、グリコサミノグリカン（特にムコ多糖類）ならびに、分枝の構造を形成することのできる組成物中に含有される単数又は複数の糖（ガラクトース、グルコース、マンノース、フコース、キシロース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミンなど）の如何に関わらずその他すべての多糖類がある。

【0041】

重合体又は樹枝状有機化合物は同様に、糖タンパク質ベースの重合体であってもよい。このような分子は、天然に存在し、その特性の1つは、多糖類がそのまわりに共有結合によって連鎖され得る（残基として作用し、上に多糖類鎖が固定されているアミノ酸に応じてO結合又はN結合）タンパク質核をもつ構造にある（図3及び4を参照のこと）。これらの多糖類は、変動する数、特に2以上の数で固定され得る。これらの利用分野におけるその使用の一般的 방식に影響を及ぼすことなく、単一の糖タンパク質が、異なる長さ、分岐間の異なる残基数及び残基の異なる化学的性質（ペントース、ヘキソースなど）をもつ複数の多糖類を提示できる。これらの分子の一般的構造は、分岐のものであってよい。問題のケースでは、捕捉プローブ（DNA、RNA、PNA）は、多糖類鎖の末端に対し共有結合様式で固定される。マイクロアレイ支持体上の糖タンパク質結合は、タンパク質核レベルでか又は多糖類鎖レベルのいずれかで形成され得るが、この場合には、好ましくはタンパク質核レベルで、さらに一層好ましくは、それ自体支持体上に直接固定された中間定着分子に対してか又は支持体に対して直接、アミノ酸基とのO結合又はN結合を伴って形成されうる。

【0042】

これらの分子は、前述したグリコーゲン-グリコゲニン複合体の場合にそうであるように、本発明に従った核酸マイクロアレイの状況下でのその応用にとって必要な特性を有している。その他の糖タンパク質の場合、空間的特徴は変動しうる（分子サイズ、分岐数及び分岐間の残基数）が、なおもグリコーゲン又はアグレガンについて列挙したものと同一規模（係数10）のものであり続け、したがって核酸マイクロアレイのためのその使用に適合するものである。

【0043】

本発明は同様に、鎖自体が分岐のでないが、分子の外部構造が包括的に球形にとどまりかつ周辺の数多くのプローブ固定部位（ウニ類タイプの一般構造参照）及びグリコーゲン又はアグレガンのものに類似した分子サイズを有する問題のケースにおいて、複数の多糖類鎖を提示する糖タンパク質とも機能する。

【0044】

これらの化合物の特定の例としては、共有結合連鎖を伴うグリコサミノグリカンを含むタンパク質であるプロテオグリカンがある。これらの分子中では、タンパク質は分子の「タンパク質核」を形成し、グリコサミノグリカンはその分岐を形成する。好ましくは、本発明では、アグレカンの使用が選択される。アグレカン（図9参照）は、天然に、特に軟骨内に存在する糖タンパク質である。それは、ヒアルロン酸といったような中央モチーフ（重合体）上にクラスタ化した多数のプロテオグリカン分子というその天然の形で存在することができ、このクラスタは中央重合体との共有結合を介してか又はそれを介さずに形成されており、また、本発明と相容性ある一般構造特性をもちかつ糖であるその自由端が標的に連鎖され得る多分岐の「超分子」の形成を導いている。最後にプロテオグリカンは、これらが核酸（DNA，RNA）である場合に標的-プローブハイブリダイゼーションの特異性に有利に作用し得ることから、全体的に負モードで帯電している。

【0045】

もう1つの特定の実施形態においては、重合体はアミノ酸重合体であっても、また求核性攻撃に対し反応するアミノ基をもつあらゆるタイプの分子であってもよく、また核酸に対し共有結合様式で連鎖され得るその他のタイプの化学基であってもよい。

【0046】

したがって有機重合体は、分岐型構造をもつ（同じくジスルフィド連鎖といったような共有結合により互いに連鎖された複数のサブユニットから成る）タンパク質又はタンパク質複合体のベースをもつ重合体であり得る。

【0047】

ポリペプチド化合物の特定の1例は、（A型免疫グロブリンの場合（図10参照）のように）それらが単純又は複合形態のいずれであるかに関わらず、免疫グロブリン（Ig）により代表される。免疫グロブリンは、天然の分子であることから、適切なクローン（モノクローナル免疫グロブリン）の選択の後、容易に大量産生できる。この利用分野では、免疫グロブリンは、捕捉プローブのための定着分子として使用される。プローブは、免疫グロブリンのFab末端に対して、免

疫グロブリンがプローブの一部に対し向けられている場合には従来の抗原 - 抗体型の結合によって、また好ましくは（ポリヌクレオチドの）糖 - （Igの）アミノ酸型の共有結合を通して連鎖される。

【0048】

当然のことながら、当業者であれば、本発明において使用するのに必要とされる特徴、すなわち、目的の分子（これは例えば核酸でありうる）と多重結合を作り出す可能性、優れたアクセス可能性を確保し密度の増大を可能にする枝分かれした形態状ならびにハイブリダイゼーション反応との干渉の不在、を伴う生物起源のその他の化合物を選択することができる。

【0049】

本発明を実現するためには、固定用アームとして使用すべき分子の幹は、好ましくは共有結合様式でマイクロアレイ支持体に付着され、標的核酸は、好ましくは共有結合様式で、分子樹枝のうちの複数のもの又はすべてのものの末端において固定される（又は直接合成される）。図1は、この種のアームを用いて構築された核酸マイクロアレイの空間的表示を、線形アームを用いて構築されたマイクロアレイと比較して示している。好ましくは、当業者によって適合され得る密度で、同じマイクロアレイ上に単一のタイプのアーム分子が使用される。しかしながら当然のことながら、同じく核酸マイクロアレイ上に異なる構造及び/又は長さ及び/又は形状をもつ分子を使用することができるということがわかる。

【0050】

核酸は、例えば、その攻撃の性質の如何に関わらず、求核性攻撃に対し反応性をもつアミノ基を通してアームに固定され得る。例えば、露光作用下で核酸とN₃アミノ基を共有結合様式で連鎖させることが可能である。さらに一般的には、重合体アームは好ましくは、そのアームの鎖末端に、その性質の如何に関わらず、活性化可能でかつ1つの核酸の鎖末端上のホスフェート基（又はその他のもの）と共有結合様式で連鎖される能力をもつ1つの化学基を含有している。活性化能力をもつこの化学基は、重合体合成中に存在でき、そうでなければその後の段階で添加することができる。それは、重合体合成中又は重合体上へのその付着の間に、直接活性をもっていてよく、そうでなければ、その後の工程で化学的に活

性化され得る。

【0051】

例えばin vitroでのオリゴヌクレオチド合成又は金属支持体上へのオリゴヌクレオチドの固定のため、一方ではヌクレオチド又は核酸、他方では非核支持体の間に共有結合を樹立するのに用いられる一定数の化学的様式が、先行技術において記述されてきている。これらの技術は、本発明の状況下では、特に上述のようなアームを用いて固定することによってDNAアレイ上に核酸を固定する目的で使用することができる。これには、ストレプトアビジンタイプといったようなシステムを用いて付着を実現する可能性が含まれる。

【0052】

支持体上のアームの付着は、幹の末末端において理想的には共有結合型の結合を作り出すべく支持体分子と相互作用しうる活性化能力をもつ化学基を用いて実施され得る。

【0053】

上述のように、本発明に従った樹枝状アームの使用は、標的核酸密度に関して数多くの利点を提供する。例えば、直径2 μmの「スポット」の場合：

【0054】

- 非樹枝状固定用アーム（アーム / 標的の化学量論的分子比 = 1）を用いた支持体上への標的の固定又は支持体上への標的の直接的固定というケース「A」においては、標的提示表面（つまりプローブが標的上でハイブリッド形成された状態となるようにアクセスできる表面）は次のとおりである：

$$(\quad) \times (\text{半径})^2 = (\quad) \times \quad^2 = (\mu\text{m}^2)$$

【0055】

- 樹枝状固定用アームを用いて支持体上に標的を固定するケース「B」においては、各アームが標的提示表面レベル（アーム上の標的の固定用表面）で半球形構造を形成すること、また換言すると、合計標的提示表面が以下のとおりであることが推定できる：

$$(1/2) \times (4) \times (\quad) \times (\text{半径})^2 = 2 \times (\quad) \times \quad^2 = 2 \times (\mu\text{m}^2)$$

【0056】

したがって、これは、一定の標的密度について、ケース「A」の提示表面の倍加に等しい。又は反対に、「スポット」あたり同じ数量の標的については、密度を2分の1に削減すること、したがって標的に対するプローブアクセスを改善すること（立体占有空間の削減）と等価である。この方式を拡張すると、樹枝状アームの表面の形状が細長い場合、標的の提示表面は同じ要領で増大させられる。

【0057】

さらに、樹枝状アーム上の標的の固定密度は、原則的に、マイクロアレイ支持体上で固定する直接的標的を通して又は線形アーム（非樹枝状）を用いて固定する標的によって得られるものよりもはるかに高いが、これは、アレイ「スポット」あたりの付着された標的の数が同じである場合、アーム自体の立体占有空間は、線形アームと比較して樹枝状のアームの場合により少ないからである。したがって、現実には、この方式に従うと、標的密度は2倍以上増大すべきであり、そうでなければ標的立体占有空間が2分の1以上縮減するはずである。

【0058】

したがって、本発明のこの態様は、一方では、（アレイ「スポット」あたりの標的密度を増大させる（ひいては標的上のプローブハイブリダイゼーションの測定のため検出感度を増大させる）こと、そして他方では、同時に標的の立体占有空間を削減する（ひいては、標的上のプローブのハイブリダイゼーションを容易にし、これによってまた検出感度を増大させる）ことを可能にする。

【0059】

前述のように、このタイプのアームを含む核酸マイクロアレイは、平坦な及び/又は凸状の表面をもつ支持体で構成され得、かつ固体又は半固体の性質をもつものであり得る。その上、これらの支持体は、ガラス、シリカ、ポリリジン、アミノシラン及び/又はアミノ反応性シランといったような材料又は、以下で詳述するような負に帯電した支持体を含むことができる。さらに、アームの樹枝上に固定化された標的核酸は同様にさまざまな性質、組成及び起源のものでありうる。こうしてこれらは、天然、合成及び/又は半合成起源の1本鎖又は2本鎖核酸でありうる。特に、これには、合成オリゴヌクレオチド、PCR産物、遺伝子、又は遺伝子フラグメント、プラスミド（又はコスミド、YAC、ファージなどと

いったようなその他のベクター)、1本鎖又は2本鎖cのDNA又はRNAが関与しうる。さらに、核酸の長さも同様に変動し得る。しかしながら、核酸長が約1000個未満の塩基(又は塩基対)であることが好ましい。

【0060】

1つの特定の実施形態においては、標的核酸は、1本鎖核酸、特に1000個未満の塩基という長さをもつ1本鎖核酸で構成されている。

【0061】

特定の1実施形態においては、標的核酸は、好ましくは、1000未満の塩基という長さをもつ1本鎖RNAで構成されている。これは特に、生体標本から取られた全RNA又はmRNAに関係すると考えられる。実際、本発明は、マイクロアレイ標的としての1本鎖RNAの使用を初めて記述するものである。これは、本発明の利用分野のもう1つの特定の目的を構成する。

【0062】

本発明のもう1つの変形形態においては、本発明には、1本鎖DNA及び1本鎖DNAとRNAの混合物が関与する。

【0063】

本発明の好ましい実施形態においては、標的1本鎖核酸は約25~100個、好ましくは約30~60個のヌクレオチドという長さを有する。

【0064】

この点に関して、本発明の特定の目的は同様に、1本鎖核酸が約25~100個好ましくは約30~60個の間のヌクレオチドという長さをもつ、支持体上に固定された1本鎖核酸から成る核酸にも関する。本発明は同様に、当該利用分野において「長いオリゴヌクレオチド」という語により本出願の中で呼称された約30~60個の間のヌクレオチドという長さをもつ1本鎖核酸の(フラグメントの)固体群の、標的核酸としての使用にも関する。

【0065】

第1の特定の変形形態に従うと、1本鎖核酸は、約30~60個の間のヌクレオチドという長さをもつ1本鎖DNAである。

【0066】

もう1つの特定の變形形態に従うと、1本鎖核酸は、約30～60個の間のヌクレオチドといった長さをもつ1本鎖RNAである。

【0067】

有利には、これらは、当業者にとっては見慣れた技術（合成装置）に従って、*in vitro*での化学合成によって産生された核酸である。その後の工程で、これらのオリゴヌクレオチドは、支持体上に固定化される。

【0068】

現時点で入手可能な製品とは異なり、この長さをもつ核酸の（フラグメントの）使用により、マイクロアレイ上のその対応する標的上で特異的プローブハイブリダイゼーションを得ることが可能となる。実際、上述のとおり、先行技術の中に記述されているように25個以下の塩基という長さをもつオリゴヌクレオチドを使用した場合、プローブの数多くの非特異的ハイブリダイゼーションが存在したり、ひいてはこのシステムを用いた実験の再現性レベルが満足できないのになる。これとは反対に、特に30～60個の間のヌクレオチドという長さをもつ本発明に従ったより長いオリゴヌクレオチドを使用した場合、絶対的なハイブリダイゼーション特異性を得ることができる。

【0069】

長いオリゴヌクレオチドは、ひとたび合成された時点で、秩序ある要領でマイクロアレイ支持体上に固定され得る。固定は、直接的（長いオリゴヌクレオチドが直接支持体上に固定される）であっても間接的（支持体上に固定された以前に定義され記述された「アーム」上での長いオリゴヌクレオチドの共有結合による固定）であってもよい。長いオリゴヌクレオチドを間接的に固定することの利点は、立体占有空間がより大きいものである直接固定の状況に比べて、オリゴヌクレオチド配列に対するプローブアクセス可能性が増大するという点にある。しかしながら、長いオリゴヌクレオチドの直接的固定も可能であり、オリゴヌクレオチドアレイの再現性ある使用にとって十分なハイブリダイゼーション特異性を提供することができる。使用される固定様式がいかなるものであろうと（直接又は間接）、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドに対する十分なアクセスを伴うプローブを提供するため、その全長にわたってではなく、その末端（5' 又

は3)のうちの1つで固定される。その上、間接的固定の場合、アーム上のその1つの末端で長いオリゴヌクレオチドを固定し次に支持体上にある秩序ある形でオリゴヌクレオチド-アーム複合体を被着させるか、又は、アームを予め支持体に付着させその後アーム-支持体複合体上に秩序ある形で長いオリゴヌクレオチドを被着させアームに固定する、という2つの選択肢が可能である。

【0070】

この実施形態においては、使用される支持体及びアームのタイプは、前述のものと同じでありうる。本発明に従ったこのタイプの化学的に合成された長いオリゴヌクレオチドの使用は、PCRにより産生されたより短い1本鎖標的及び/又は2本鎖及びより長い標的の使用に比べ、いくつかの利点を提供する。

【0071】

まず第1に、標的の性質が1本鎖であることから、標的上でのプローブのハイブリダイゼーション反応収量を改善することができる。実際、標的が2本鎖である場合、この反応中に、多数の標的が自らの上でハイブリッド形成することになる(標的の第2のストランドはハイブリダイゼーションのためプローブと競合状態にある)。

【0072】

したがって、標的の直接的化学合成はPCR標的合成に比べはるかに簡単に管理できる。第1のケースでは、マイクロアレイ上に被着すべき標的の配列を知ることしか必要でなく、これに対し第2のケースでは、PCRを通して特異的増幅を実施するために、これらの配列を含有する核酸を実質的に(一般にクローンの形で)被着させなくてはならない。

【0073】

その上、PCRを用いた増幅は、たとえそれが最終的反応産物中では少数であるにせよ、大部分のケースで混入するフラグメントの存在を伴う異種の2本鎖核酸個体群を産生する。こうして、非特異的なプローブ-標的ハイブリダイゼーションひいては、ハイブリダイゼーション速度測定中の背景雑音放射が存在することになる。これとは反対に、直接的1本鎖標的合成は、非常に均質な核酸配列フラグメントを得ること、そして終結時点ではより純粋でひいては非特異性の低い

プローブ - 標的ハイブリダイゼーションを伴う標的を得ることが可能となる。この特異性は、樹枝状であるか否かに関わらずマイクロアレイがアームを内含するとき及び以下で記述するように帯電している場合にさらに一層保証される。

【0074】

最後に、1本鎖プローブの化学合成は、精製された標的を得るために自動化できるのに対し、PCRを通して産生された2本鎖標的は、支持体上に固定される前に精製されなくてはならない。

【0075】

本発明に従うと、長い合成オリゴヌクレオチドアレイは、先行技術において記述された製品及び方法に比べて多大な技術的利点を表わす。この利点は、核酸マイクロアレイが樹枝状アーム又は帯電したアーム又は支持体を内含する場合に、より一層大きくなる。

【0076】

実際、本発明は同様に、提示条件ひいては標的上のプローブハイブリダイゼーションを容易にするべく核酸マイクロアレイ上のアーム及び/又は核酸の空間的配置を制御するための新しいアプローチについて記述している。特に、本発明は、今や、ハイブリダイゼーション条件特にマイクロアレイの選択性及び感応性を改善するべく、アーム（これらがタンパク質、グルシド又は脂質の性質をもつ有機重合体又は非有機合成重合体のいずれであるかに関わらず）又はマイクロアレイ支持体の電気的特性を測定する（そして修正する）ことが可能である、ということ立証できる。

【0077】

本発明のこの態様は、その一次構造が線形であるか樹枝状であるかにかかわらず、またマイクロアレイ支持体の性質がいかなるものであれ、アレイ支持体上のオリゴヌクレオチド固定用アームの考えられるすべての性質に対して適用可能である。

【0078】

実際、核酸が負に帯電していることは、（それらが、通常の条件下でそのpKaよりも高いpHをもつ環境内にある弱酸であるということ、その酸性官能基が

ヌクレオチド糖の間の結合を確実にするホスフェート基上にあるということを理由として)、周知の事実である。核酸配列間の相互作用は、簡略化された形で以下のように要約することができる。すなわち、一方では、これらの配列は、(共通の親和性とみなすことのできる)相補的塩基の間に水素結合及びファンデルワールス引力を樹立することより互いの間でハイブリッド形成され得、他方では、ホスフェート基レベルでの負の電荷のため互いに反発し合う可能性がある。2つの1本鎖分子の間で安定したハイブリダイゼーションを得るためには、水素及びファンデルワールス結合と結びつけられた引力は、負の電荷と結びつけられた反発力よりも強くなくてはならず、これは、相補的隣接塩基の数が反発力よりも強い引力を得るのに充分である場合に当てはまることである。考慮に入れるべきもう一つのパラメータは、分子フォールディング(二次及び三次構造)の原子応力のパラメータである。この核酸に関する一般的 방식は、その長さの如何にかかわらず、あらゆる1本鎖分子内で同じように有効である。これらの方式は、このような一定の分子の自らハイブリッド形成するか否かの能力又はその能力の欠如を説明する可能性を提供している。マイクロアレイ支持体上にアームを固定する標的に関するかぎり、これらは同様に、二次構造及び立体占有空間原子応力の対象にもなるが、核酸について記述したもののような引力又はハイブリダイゼーション現象は全く提示しない。アーム上のこれらの応力は同様に、核酸ストランドがそれらの末端(単複)に固定されているという事実によっても影響される。

【0079】

固定された標的が1本鎖オリゴヌクレオチドであるか(その長さとは無関係に)又は2本鎖DNAであるか(これが全プラスミドに関係するか又は重合体連鎖反応産物に関係するかとは無関係に)にかかわらず、マイクロアレイの新規作成によって発生する問題の1つは、分析されその対応する標的上で特異的にハイブリッド形成されるべきプローブ分子へのこれらの標的のアクセス可能性にある。

【0080】

このアクセス性が、ハイブリダイゼーション反応収量ひいてはプローブ分析の感度及び特異性の条件を決定する。このプローブ-標的ハイブリダイゼーションアクセス性は、特にマイクロアレイ上に固定された標的の立体占有空間によって

、また立体占有空間に起因する互いに近接して存在する標的間の相互作用（部分的ハイブリダイゼーション）によって、及びその二次構造（標的の分子内フォールディング）によって低減させられる。立体占有空間に付随する問題は、低い特異性核酸率を検出し（検出感度）ハイブリダイゼーションシグナルの数量化を妨害しうるハイブリダイゼーション能力飽和効果を低減させることができるように、各アレイ「スポット」上に高密度で標的を被着させる必要性があることによつて生み出されるものである。一般的方式が、対応するプローブ分子に比べて過剰な数で標的の分子数を被着させることから成っている理由はここにある。

【0081】

本発明は、これら課題に対する解決法を提供する。実際、本発明は、標的が高密度レベルを有するようなケースを含め、標的間のイオン干渉を低減させ、こうしてより優れたハイブリダイゼーションを保証する特別のアーム又は支持体の使用について記述している。より特定的には、当該出願は、マイクロアレイ支持体上に標的を固定するためには、負の電荷又は負に帯電した支持体と共に固定用アームを使用することが可能であることを立証している。

【0082】

したがって、本発明のもう1つの目的は、負の電荷をもつアームを用いて支持体上に固定化された核酸を含むマイクロアレイに関する。本発明のもう1つの目的は、均等な負の電荷を担う支持体上に固定化された核酸を含む核酸マイクロアレイに関する。

【0083】

本発明は同様に、負に帯電した分子又は負に帯電した支持体の、核酸マイクロアレイの調製を目的とした使用にも関する。標的上でプローブハイブリダイゼーションの実験的条件下で均等な形で負に帯電した固定用アームを使用することにより、有利には以下の現象が得られる：

【0084】

- アームは、隣接アームに対し電氣的反発力を及ぼし、結果としてそれ自身の上へのフォールディングを減らし、特に標的上に固定されたその末端のレベルでのその立体占有空間を同時に低減させる；

- アームは、その末端に固定された標的に対して電気的反発力を及ぼし、結果として標的をそれ自体外向きに配置するように押す、すなわちマイクロアレイ支持体から外へ移動するようにし、プローブがそれらによりアクセスしやすい状態にする；

- これらの相互的反発力は結果として、隣接するプローブを互いから離れるように移動させ、前記プローブがそれらによりアクセスしやすくし、さらにファンデルワールス力又は水素結合に付随する相互誘引のリスクを低減させることによりそれらの間の誘引相互作用を制限することになる。

- アームに固定された標的に隣接して及ぼされるこの負の電場は、第2の標的構造を解体する傾向をもち（換言すると、それらを整列させる）、その結果、標的はそれ自体の上へのフォールディングを低減させ、プローブがそれらによりアクセスしやすくする。

- マイクロアレイ支持体に最も近いところに位置設定されアームにより形成された層は、包括的に負に帯電し、こうして（同じく負に帯電した）プローブに対し電気的反発力を及ぼしこうしてプローブ-標的の非特異的ハイブリダイゼーション現象を減少させる。このことはまた、ハイブリダイゼーション結果の分析中の背景雑音を低減させその結果同時にDNAマイクロアレイ技術による分析の感度及び特異性を増大させる一助ともなる。

【0085】

こうして、本発明のこの特定の態様は、当該技術の方法に対する明確な技術的改良ひいてはより優れたマイクロアレイ選択性及び感度を提供する。

【0086】

当然のことながら、本発明のこの態様は、アームが使用されるアレイに制限されていない。反対に、それは、標的が中間アームなしで支持体に直接固定されているような状況下で均等な形で負に帯電したマイクロアレイ支持体を使用するためにも応用できる。この方法は、支持体上の負の電荷が予め適用されているか又は支持体上に標的が付着された後に適用されるかとは無関係に有効である。これは、電流を印加できるマイクロ電極上に標的を被着させることから成る方式の場合には支持体上の電荷が均等でないことから、それとは異なる方式である。

【0087】

本発明のこの態様では、マイクロアレイは、上述のとおり異なるタイプの核酸個体群全体で構成されていてよく、負に帯電したアームは同様に上述のような枝分かれした形態状で構成されていてよい。

【0088】

本発明は同様に、生物起源の重合体を含む枝分かれした形態のアームを用いて支持体上に核酸を固定化（又は固定）する段階を含む上述のとおりマイクロアレイ調製プロセスにも関する。

【0089】

この調製プロセスは、支持体上に樹枝状アームを固定する初期工程とそれに続く、樹枝状アームへの標的分子の第2の固定工程を含むことができる。本発明のもう1つの実施形態に従うと、核酸マイクロアレイ調製プロセスは、標的分子が枝分かれした形態状アーム上に固定されている初期工程及びそれに続く、初期段階の間に得られた複合体を支持体上に固定する第2の工程を含むことができる。

【0090】

本発明は同様に、実験、治療、診断目的での上述のような核酸マイクロアレイの使用にも関する。特に本発明は、上述のマイクロアレイを以下の目的で使用することに関する：

- 遺伝子発現の調節の研究
- 遺伝子又は遺伝子フラグメントの探求
- 標的の固定、又は
- 遺伝子診断。

【0091】

これらの応用分野では、マイクロアレイは、一般に予めマーキングされた「プローブ」核酸個体群と接触させられ、次に、当業者にとっては見慣れた技術に従って核酸マイクロアレイ上のプローブのハイブリダイゼーションプロファイルが決定される。こうして、本発明の1つの目的は同様に、好ましくはマーキングされたポリヌクレオチド個体群を本発明に従った核酸マイクロアレイと接触させる段階及びハイブリッド形成を実証する段階を含むポリヌクレオチド分析のための

プロセスにも関する。

【0092】

当然のことながら、本発明は上述の特定の産生方法に制限されず、当業者の通常のノウハウの中に内含される変形実施形態をも網羅するものであるということが理解される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

樹枝状標的のための固定用アームの使用；標的のための非樹枝状固定用アームの使用。

【図2】

Harper Biochimie, R.K.Murray, D.K.Granner, P.M.Mayes, V.W.Rodwell, Publisher Mc Graw-Hill International (UK) Ltd.に従ったウリジンジスルフェートグルコース (UDP Gluc)。

【図3】

糖タンパク質内のN結合。

【図4】

糖タンパク質内のO結合。

【図5】

グリコーゲン分子を用いたマイクロアレイ上の捕捉プローブ定着（縮尺は遵守せず）。

【図6】

グリコーゲン分子を用いたマイクロアレイ上の捕捉プローブ定着（縮尺は遵守せず）。

【図7】

Harper Biochimieに従った分岐点内のグリコーゲン分子構造。

【図8】

Harper Biochimieに従った分岐1-6を示すアミノペクチン。

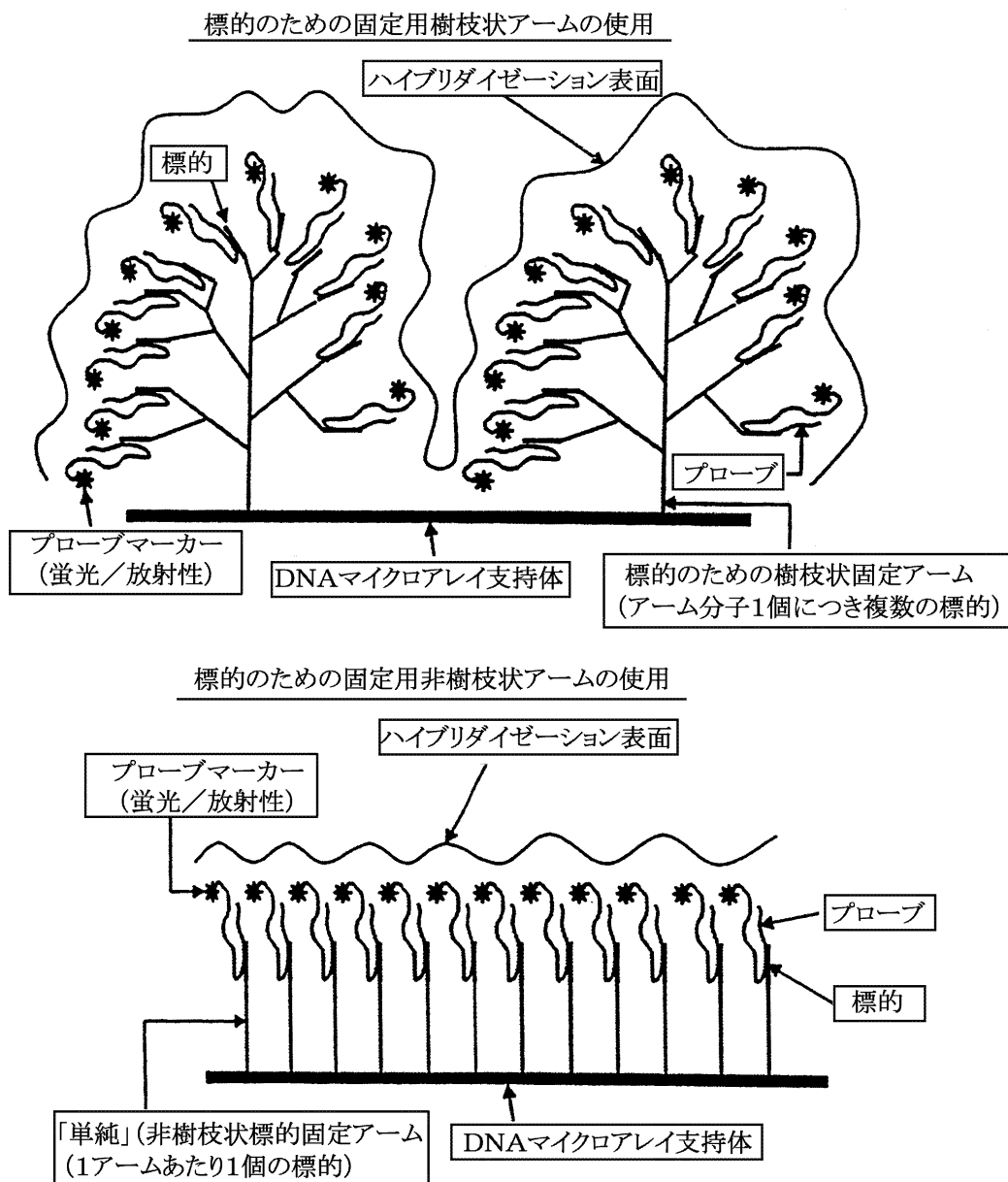
【図9】

Harper Biochimieに従ったウシ鼻軟骨のアグレカン。

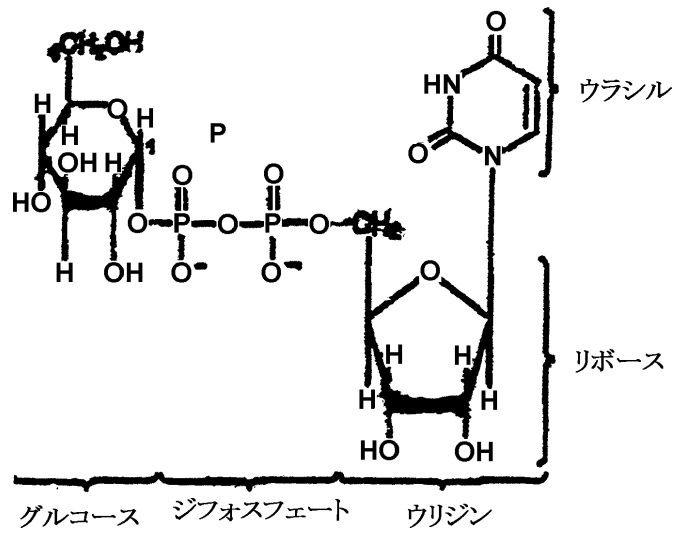
【図10】

ヒト免疫グロブリン重合体を示すダイヤグラム。ポリペプチド鎖は、太い線で表わされている。異なるポリペプチド鎖を連結するジスルフィド架橋は、細い線で表わされている。

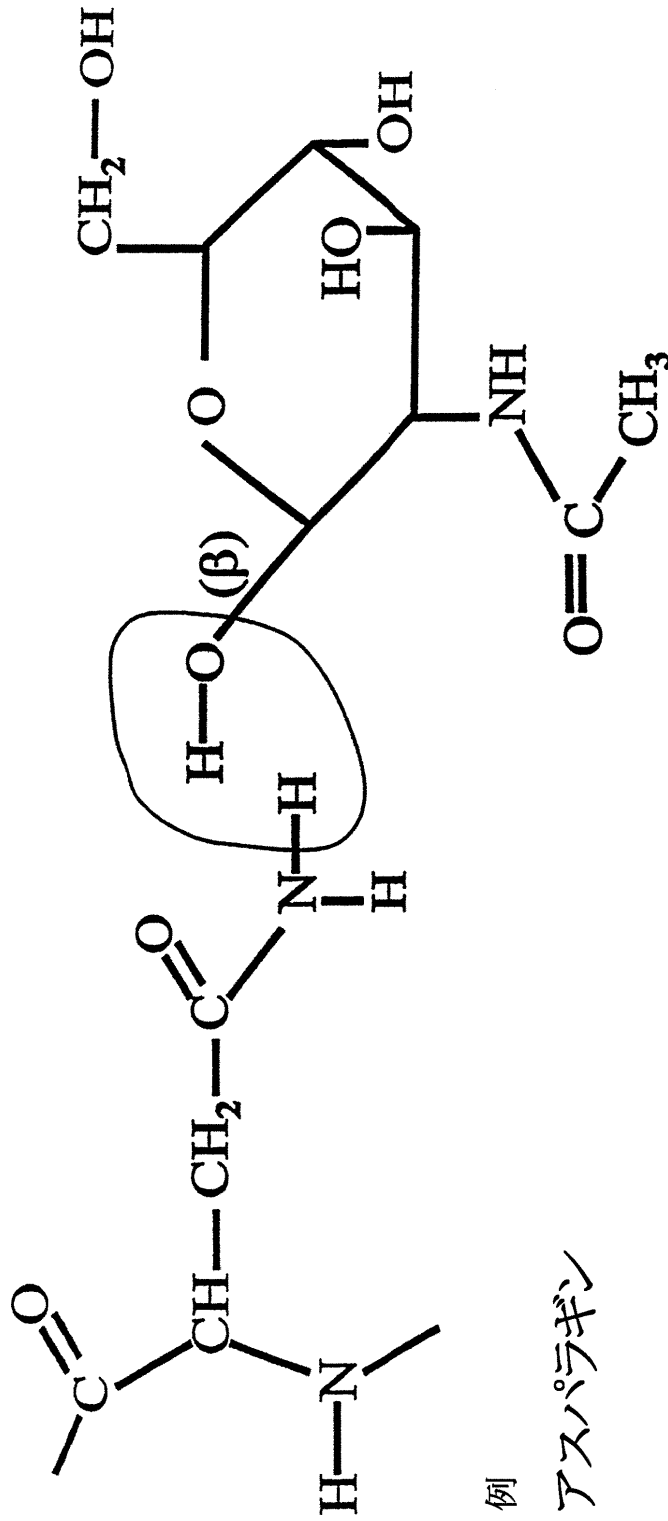
【図1】



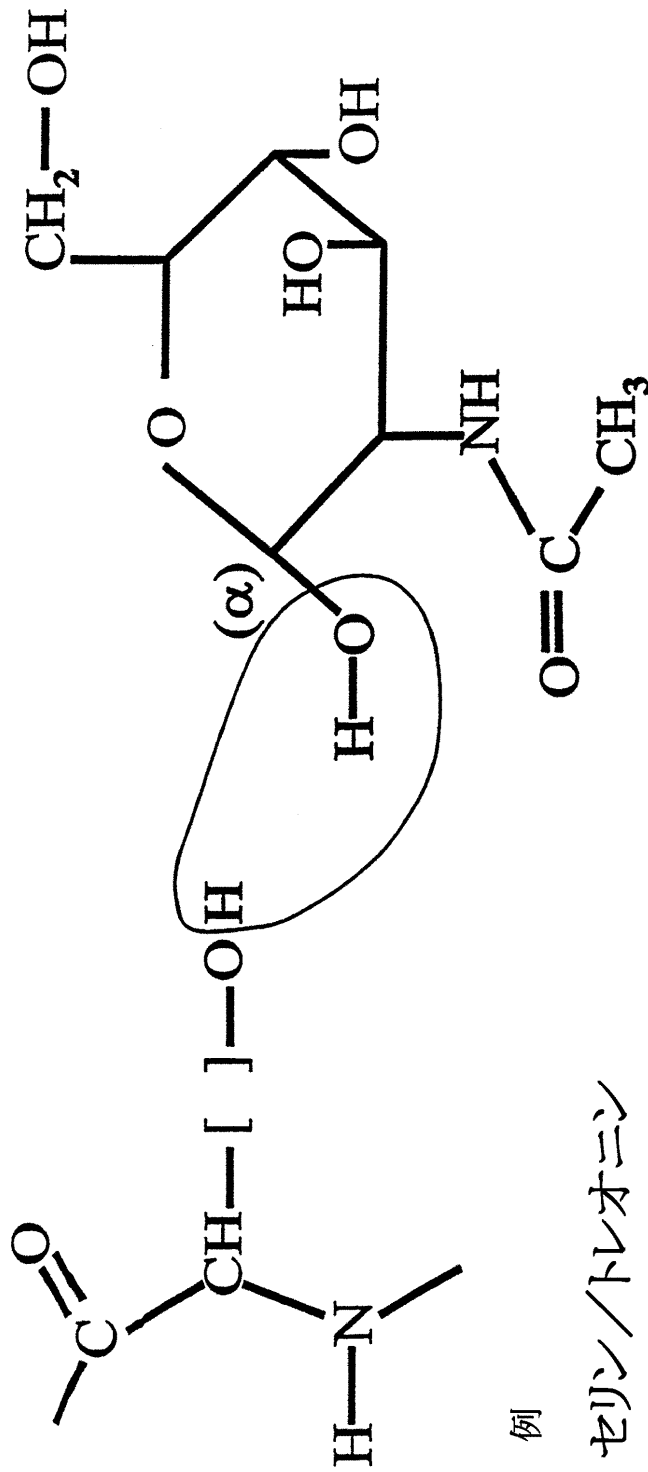
【図2】



【図3】



【図4】

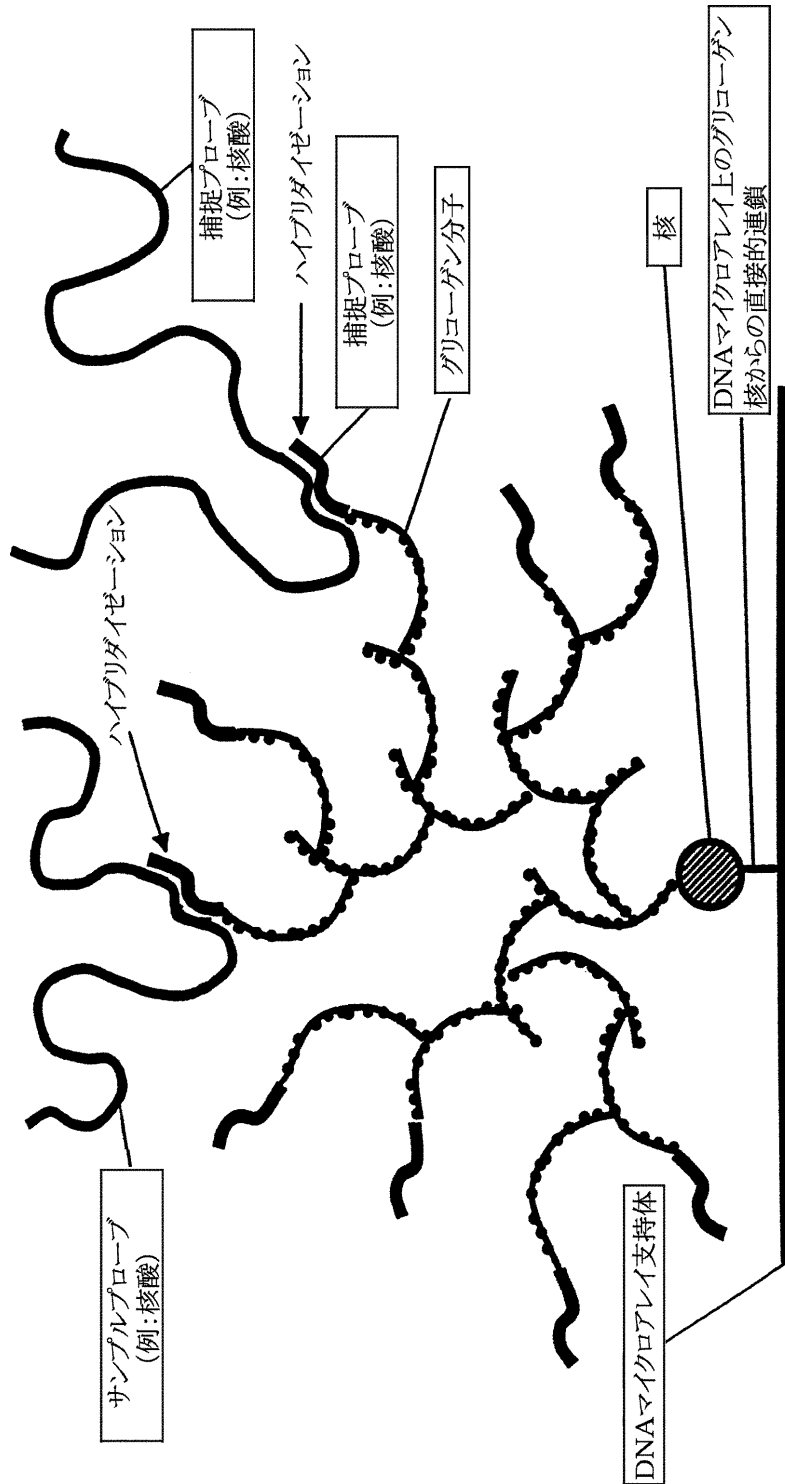


例

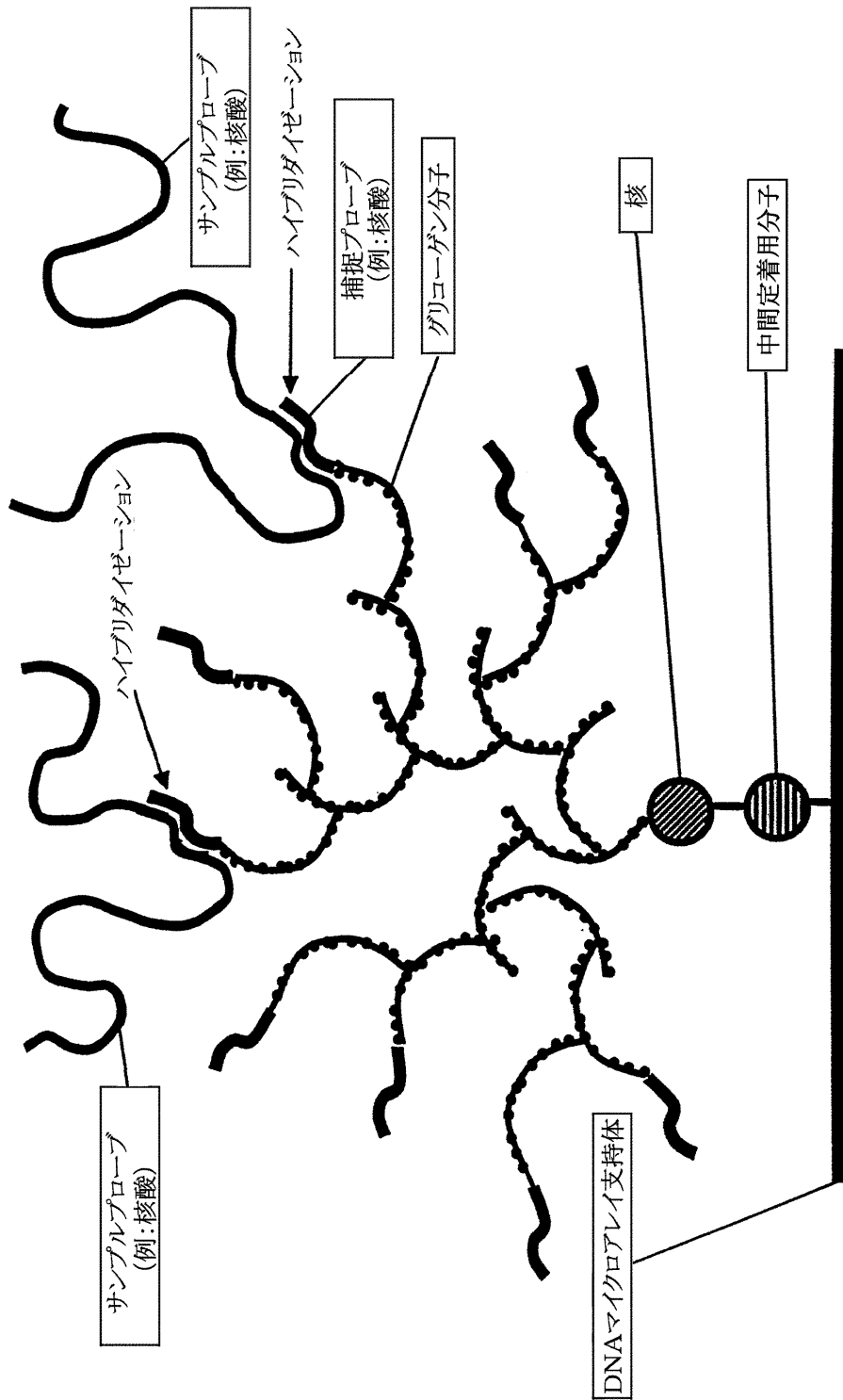
セリン/トレオニン

N-アセチル-β-D-グルコサミン

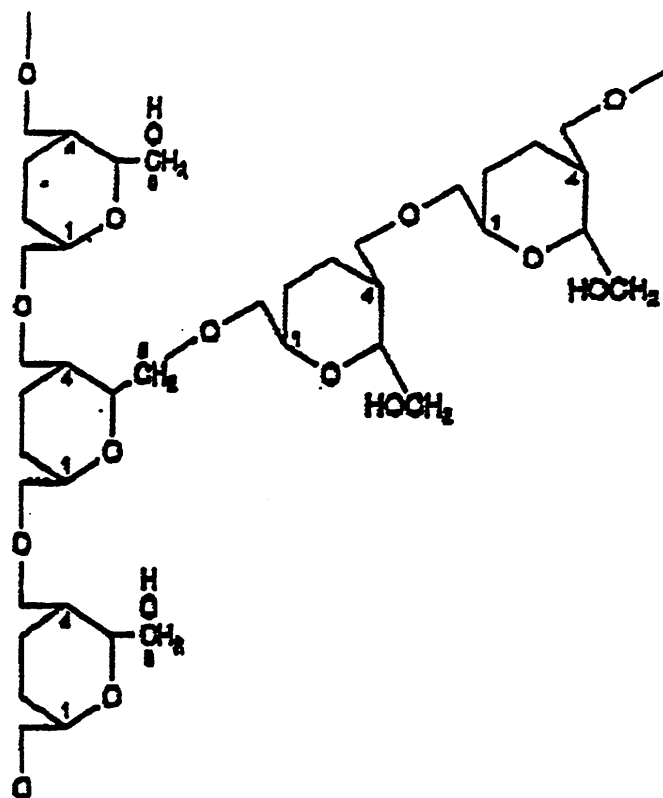
【図5】



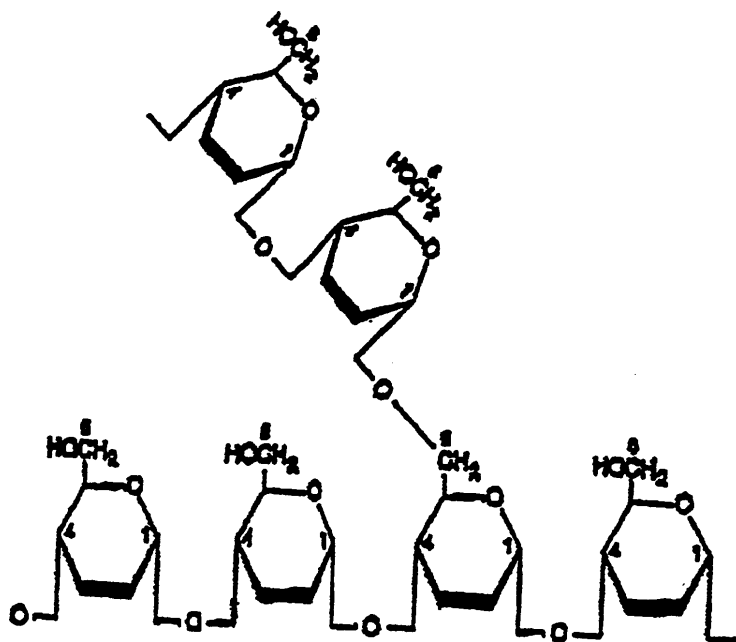
【図6】



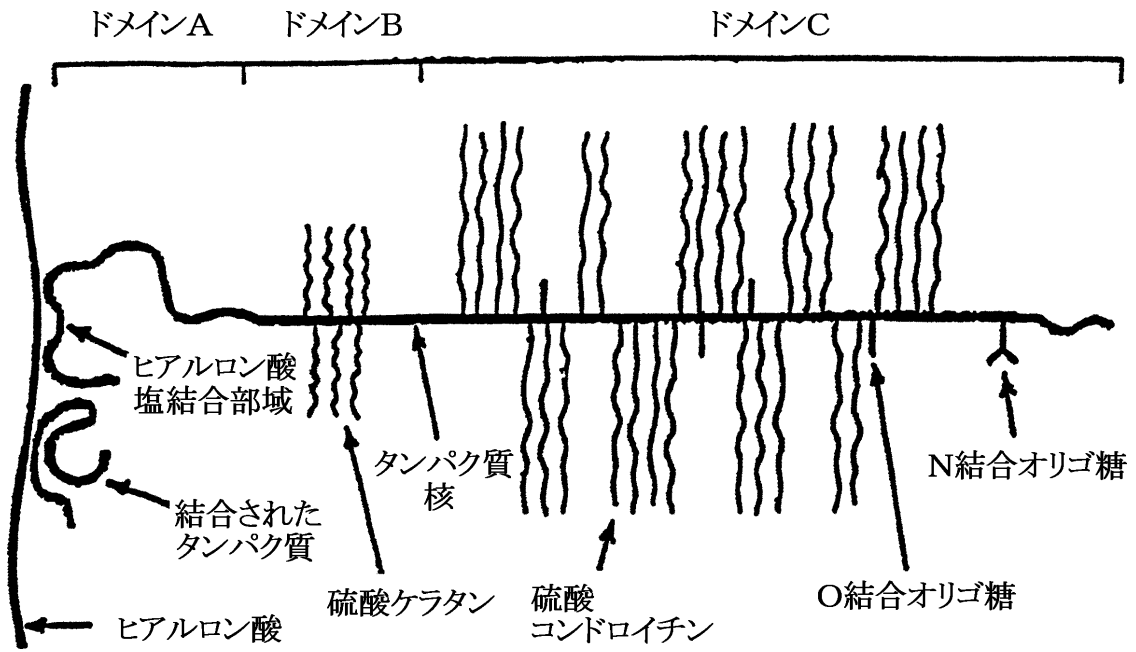
【図7】



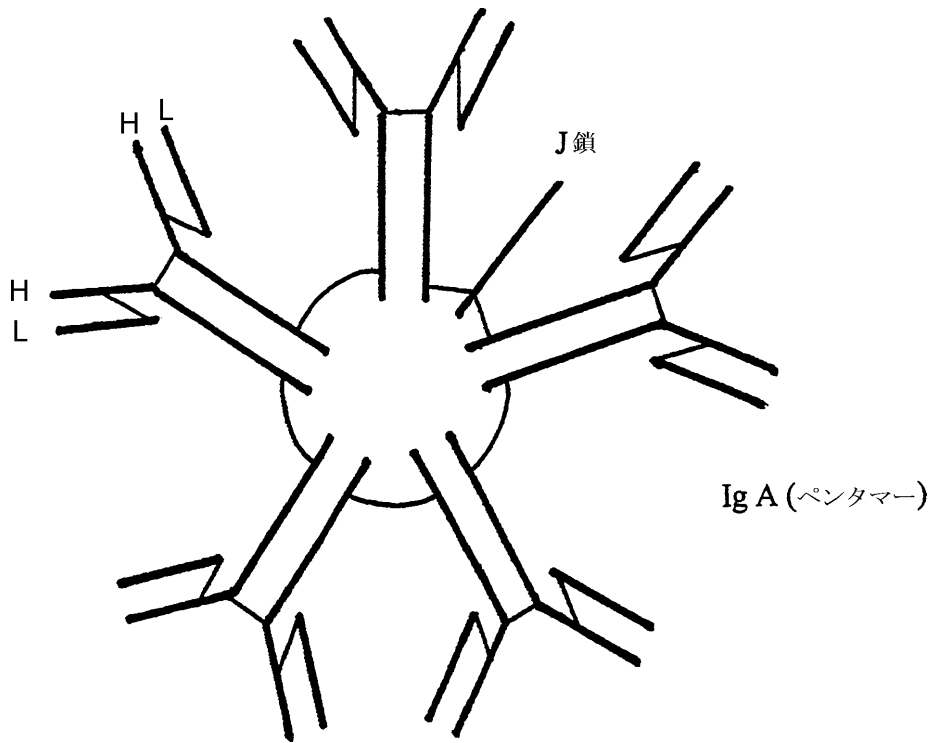
【図8】



【図9】



【図10】



【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成14年4月25日(2002.4.25)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【請求項1】 生体起源の重合体を含む、枝分かれした形態のアームを用いて支持体上に固定化された核酸を含むことを特徴とするマイクロアレイ。

【請求項2】 アームが、1つ以上の分枝レベルを有する分枝の重合体であることを特徴とする、請求項1記載のマイクロアレイ。

【請求項3】 アームが、有機重合体であることを特徴とする、請求項1又は2に記載のマイクロアレイ。

【請求項4】 アームが、糖重合体、例えばグリコーゲン又はグリコーゲン誘導体又はアミロペクチンであることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項5】 アームが、反復したガラクトース、グルコース、マンノース、フコース、キシロース、N-アセチルガラクトサミン及び/又はN-アセチルグルコサミン単量体を含む分枝の重合体であることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項6】 アームが、グリコポリペプチド、例えばアグレカンであることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項7】 アームが、ポリペプチド化合物、例えば免疫グロブリンであることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項8】 核酸が、枝分かれしたアームの末端に共有結合モードで固定されていることを特徴とする、請求項1～7のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項9】 アームが、共有結合モードで、分子の幹部分により支持体に

固定されていることを特徴とする、請求項1～8のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項10】 支持体が、平坦及び/又は凸形表面を有することを特徴とする、請求項1～9のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項11】 支持体が、固体又は半固体支持体であることを特徴とする、請求項10記載のマイクロアレイ。

【請求項12】 支持体が、ガラス、シリカ、ポリリシン、アミノシラン及び/又はアミノ反応性シランで構成されていることを特徴とする、請求項11記載のマイクロアレイ。

【請求項13】 核酸が、天然、合成及び/又は半合成起源の1本鎖又は2本鎖核酸であることを特徴とする、請求項1～12のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項14】 核酸が、合成オリゴヌクレオチド、PCR産物、遺伝子又は遺伝子フラグメント、プラスミド、1本鎖又は2本鎖のcDNA又はRNAの中から選択されることを特徴とする、請求項13記載のマイクロアレイ。

【請求項15】 核酸が、1本鎖核酸、特に約25～100ヌクレオチドの間、好ましくは約30～60ヌクレオチドの間の長さを有する1本鎖核酸の分子であることを特徴とする、請求項14記載のマイクロアレイ。

【請求項16】 支持体上に核酸を固定するための、枝分かれした形態の空間的組織を有するグリコーゲンから誘導された糖重合体の使用。

【請求項17】 核酸が、ヌクレオチド約30～60個の長さを有する1本鎖核酸であることを特徴とする、請求項13記載のマイクロアレイ。

【請求項18】 1本鎖核酸が、ヌクレオチド約30～60個の長さを有する1本鎖DNAであることを特徴とする、請求項17記載のマイクロアレイ。

【請求項19】 1本鎖核酸が、ヌクレオチド約30～60個の長さを有する1本鎖RNAであることを特徴とする、請求項17記載のマイクロアレイ。

【請求項20】 1本鎖核酸が、in vitroでの化学合成によって産生される核酸であることを特徴とする、請求項17～19のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項21】 生物起源の重合体を含む枝分かれした形態のアームを用いて、固体又は半固体支持体上に固定化されたRNAを含むことを特徴とする、請求項17～20のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項22】 生体起源の重合体を含む枝分かれした形態のアームを用いて固体又は半固体支持体上に固定化された、PCRによって産生された核酸を含むことを特徴とする、請求項17～20のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項23】 アームが負の電荷を担っていることを特徴とする、請求項1～15及び17～22のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項24】 支持体が、一定の負の電荷を担っていることを特徴とする、請求項1～15及び17～22のいずれか1項記載のマイクロアレイ。

【請求項25】 遺伝子発現の調節を研究するための、請求項1～15及び17～24のいずれか1項記載のマイクロアレイの使用。

【請求項26】 遺伝子又は遺伝子フラグメントの探求のための、請求項1～15及び17～24のいずれか1項記載のマイクロアレイの使用。

【請求項27】 標的同定のための、請求項1～15及び17～24のいずれか1項記載のマイクロアレイの使用。

【請求項28】 遺伝子診断のための、請求項1～15及び17～24のいずれか1項記載のマイクロアレイの使用。

【請求項29】 下記：

- a) 支持体上に枝分かれした形態のアームを固定するための工程、及び
- b) a) の間に得られた枝分かれした形態のアームに対して標的分子を固定するための工程

を含むことを特徴とする、請求項1～15及び17～24のいずれか1項記載のマイクロアレイ調製方法。

【請求項30】 a) 枝分かれした形態におけるアームに対し標的分子を固定するための工程、及び

- b) 支持体上にa) で得た複合体を固定するための工程、

を含むことを特徴とする、請求項1～15及び17～24のいずれか1項記載のマイクロアレイ調製方法。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 00/03572

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
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 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 925 785 A (WANG CHANG-NING J ET AL) 15 May 1990 (1990-05-15) column 1-3; figure 6 column 7-11; claims; example 1	1-30
X	FR 2 726 286 A (GENSET) 3 May 1996 (1996-05-03) page 5-6; claims	1-3, 8-30
X	EP 0 647 719 A (NIPPON GENE KK) 12 April 1995 (1995-04-12) the whole document	16
A	WO 91 08307 A (MICROPROBE CORP) 13 June 1991 (1991-06-13) page 4; claims page 7	1-30

-/-		
<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 *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 12 March 2001		Date of mailing of the international search report 19/03/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Palantian 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3015		Authorized officer Reuter, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/03572

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GB 2 197 720 A (NAT RES DEV) 25 May 1988 (1988-05-25) the whole document ---	1-30
A	WO 99 10362 A (SOUTHERN EDWIN MELLOR ; ISIS INNOVATION (GB); SHCHEPNOV MIKHAIL SER) 4 March 1999 (1999-03-04) page 1; figure 6 page 19-20; claims 12-15 ---	1-30
A	WO 99 61662 A (SHCHEPINOV MIKHAIL SERGEEVICH ; SOUTHERN EDWIN MELLOR (GB); ISIS IN) 2 December 1999 (1999-12-02) the whole document ---	1-30
A	HENDRICKSON EDWIN R ET AL: "High sensitivity multianalyte immunoassay using covalent DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 23, no. 3, 1995, pages 522-529, XP002151883 ISSN: 0305-1048 page 525, last paragraph -page 526; figure 1 -----	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/FR 00/03572

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4925785 A	15-05-1990	NONE	
FR 2726286 A	03-05-1996	AT 169683 T DE 69504094 D DE 69504094 T DK 787205 T EP 0787205 A ES 2122692 T WO 9613609 A JP 10507923 T	15-08-1998 17-09-1998 11-03-1999 17-05-1999 06-08-1997 16-12-1998 09-05-1996 04-08-1998
EP 0647719 A	12-04-1995	WO 9421819 A JP 5260972 A	29-09-1994 12-10-1993
WO 9108307 A	13-06-1991	AT 152777 T DE 69030672 D DE 69030672 T EP 0504321 A ES 2103795 T	15-05-1997 12-06-1997 13-11-1997 23-09-1992 01-10-1997
GB 2197720 A	25-05-1988	NONE	
WO 9910362 A	04-03-1999	EP 1007531 A	14-06-2000
WO 9961662 A	02-12-1999	NONE	

フロントページの続き

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

(72)発明者 ドュマ, シルビー

フランス国、エフ - 75006 パリ、リュ・
グレゴール・ドゥ・トゥール 8

(72)発明者 マル, ジャック

フランス国、エフ - 75013 パリ、リュ・
シャルコット 18

Fターム(参考) 4B024 AA19 CA01 HA12

4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA15

4B063 QQ43 QR08 QR42 QR56 QS25

QS34 QS39 QX02

专利名称(译)	生物芯片，准备和使用		
公开(公告)号	JP2003517155A	公开(公告)日	2003-05-20
申请号	JP2001545580	申请日	2000-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家科学研究中心		
申请(专利权)人(译)	中心法国国家，香提网络点击		
[标]发明人	ヴユヤシノヴィッチトドール ドユマシルビー マルジャック		
发明人	ヴユヤシノヴィッチ,トドール ドユマ,シルビー マル,ジャック		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6834 C12Q1/6837 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6837 C12Q1/6834		
FI分类号	G01N33/53.M C12M1/00.A C12Q1/68.A G01N37/00.102 C12N15/00.F		
F-TERM分类号	4B024/AA19 4B024/CA01 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02		
优先权	1999015967 1999-12-17 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

生物芯片，其制造及其用途技术领域本发明涉及生物芯片，其制造及其用途。具体地，本发明涉及一种生物芯片，其包括通过直接将核酸固定到载体上的树枝状臂和/或具有负电荷的臂和/或具有负电荷的载体上。本发明的方法和生物芯片可用于检测或分析基因表达，例如用于寻找目的基因或用于诊断目的。

