実験方法：大腸菌ATCC 8739細胞は、実施例Y（細胞指向実施例）において記載されるように増殖および処理された。細胞の段階的な10倍希釈はPBS中で作製され、ミリポア1225マニフォールド中の吸収パッド（Chemunexカタログ番号200-C3012-02）上に載せられたブラックポリエステルメンブレン（Chemunexカタログ番号200-C2010-01）を通して2連の試料を沪過し、そして実施例Y（細胞指向実施例）において記載されるように染色した。さらに、10～5倍希釈の10μlを3連でTSA（BDカタログ番号236950）上に播き、細胞の力価を得るために37℃で一晩増殖させた。ポリエステルメンブレン上の蛍光シグナルは、CCD画像処理装置（上記の工程6；図3に記載される）を使用して、FITC光学フィルターセット（色度/励起470/40nm、放射522/40nm）を用いてキャプチャーされた。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）が、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理するために使用された。各フィルターから生成したシグナルは、すべての対象物のピクセル強度の合計として定義された（ここで、対象物は、350-65301からのピクセル強度を含むようなこの特定の実施例において定義される）。このシグナルを定義する方法は、いかなる染色細胞をも含まないフィルターの領域からバックグラウンドを除去するが、重複する対象物からの強度を覆い隠したりまたは実際より少なく計数することはない（細胞は小さくかつ全く透明であるので、細胞の層が薄い限りはシグナルは相加的である）。

結果：図28に示されるように、この方法から生成されたシグナルは、少なくとも5桁の大きさにわたって直線的であり、これは、この試験についての広いダイナミックレンジと見なされる。

変法：小さい対象物の数では、正確な定量は、これらのピクセル強度の合計を使用するよりも、個々の対象物を計数することによって達成され得る。なぜなら、対象物は、重複することがないらしいからである。このことは、とりわけ、複数の染色ならびに複数の励起および/または放射の波長が、どの対象物が目に見える細胞を表すかを決定するために使用される場合に、1または0個の細胞にまで下げたときの正確な計数に拡張し得る。さらに、より洗練された対象発見アルゴリズムが、局所的なバックグラウンド強度および照射のバリエーションを考慮に入れるために利用され得る。

非拡大的な広域画像処理を使用した、フィルター上での個々の染色細菌の検出：この図は、CCDカメラを使用する非拡大的な広域画像処理が、メンブレン上に沈着された個々の細菌細胞を検出することを示す（実施例24）。シーバーグリーンIで染色された大腸菌細胞は、ブラックポリカーボネートフィルターを通して沪過された。次いで、このフィルターは、CCD画像処理装置を使用して画像処理した（一番上のパネル）。一番下のパネルは、CCD画像中の発光物体が、確かに、Syber Green染色された大腸菌であることの蛍光顕微鏡的な確認を示す（1000倍）。

（図２８）本発明に基づく試験のダイナミックレンジを示す。この図は、本発明を使用した場合に可能である、大きなダイナミックレンジを示す。大腸菌細胞は、数百万の細胞から数百にまで希釈され、沪過され、および蛍光原性エステラーゼ基質で染色された。CCDに基づく非拡大的な広域画像処理によって生成された蛍光画像は、分析され、そしてそれらのシグナルが細胞計数に対してプロットされた。そのシグナルは、少なくとも5桁の大きさにわたって直線的である。

（図２９）拡大なしで機器不使用の、少数の細菌細胞の検出を示す。この図は、単一の大腸菌細胞を検出する液体捕捉アッセイ法における、二重にコートした（アルカリホスファターゼ/抗大腸菌抗体）粒子の使用（実施例26に記載）を実証する。パネルの3つのカラムの各々において、画像は異なる検出方法を使用して得られた。パネルの一番上の行は、100細胞を含む試料に適用した場合のアッセイを示す。パネルの一番下の行は、試料が細胞を含まない場合の結果を示す。「100細胞」と標識された各々のパネルは、対応する「細胞なし」の対照よりも有意に多いスポットを有する。化学発光シグナルについては、スポットは白色または黒色のバックグラウンドであるのに対して、色素発生シグナルについては、スポットが白色のバックグラウンド上で黒色に現れる。後者のスポットはまた、拡大の使用なしで、裸眼でのメンブレンの検査によって観察されることに注意されたい。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4801

従って、この実施例の結果は、二機能性のビーズを使用する非拡大的な広域画像処理が、複雑な機器を使用しない場合でさえ、高感度の検出にとって強力な手段となり得ることを実証する。

（図３０）クラミジア・トラコマチスおよびナイセリア・ゴノレエについての迅速同種イムノアッセイ法；その1；クラミジア・トラコマチスの存在の検出を示す。この図は、一般的な性感染症の病原体であるクラミジア・トラコマチスおよびナイセリア・ゴノレエについて走査する、実施例31に記載の同種イムノアッセイ法を図示する。この図は、このイムノアッセイ法が試料中のクラミジア・トラコマチスの存在をいかにして検出するかを示す。試験が2つの病原体をいかにして区別するかを理解することは図31に言及される。このアッセイ法の形式は図11において図示されるものに対応する。実験の詳細は、実施例22（図25）におかる細菌およびウイルスを検出するために使用される多重化アッセイ法と同様である。

（図３１）クラミジア・トラコマチスおよびナイセリア・ゴノレエについての迅速同種イムノアッセイ法；その2；多重化検出の原理を示す。この図は、図30の続きで、実施例31に記載の同種イムノアッセイ法を図示し、これは、一般的な性感染症の病原体であるクラミジア・トラコマチスおよびナイセリア・ゴノレエについて走査する。赤色の粒子の検出は、クラミジア・トラコマチス感染を示すのに対して、緑色の粒子の検出は、ナイセリア・ゴノレエ感染を示す。

このアッセイ法の形式は図11において図示されるものに対応する。実験の詳細は、実施例22（図25）において細菌およびウイルスを検出するために使用される多重化アッセイ法と同様である。

（図３２）非拡大的な広域画像処理を使用した、高シグナル複雑性を有する多重化同種イムノアッセイ法を示す。この図は、高度に多重化した同種イムノアッセイ法についての図式を示す。このアッセイ法が2対の分析物特異的蛍光粒子ではなくむしろ、多くの分析物について同時に走査する多くの分析物特異的粒子対を組み込む以外は、このアッセイの原理は図30に図解されたものと同じである。多数の標的のカテゴリーを同定するために必要とされる高度なシグナル複雑性（すなわち、別個の多数のシグナル）を達成するための方法は、詳細な説明の項の工程6に記載される。

（図３３）多数の下気道病原体について並行して走査するイムノアッセイ法を示す。この図は、実施例33に記載されるイムノアッセイ法を図解する。下気道試料（例えば、痰またはBAL）は顕微鏡スライドに固定される。マルチウェルテンプレートをスライドに添付した後、病原体特異的なビオチン化された抗体の異なるファミリーが各ウェルに添加される（例えば、抗S.ニューモニエ抗体または抗レジオネラ抗体が別々のウェルに添加される）。未結合の抗体が洗い流され、そしてストレプトアビジンでコートされた蛍光粒子がビオチン化された抗体に結合した病原体に結合される。蛍光粒子が結合した区域の位置が病原体の同定を示す。なぜなら、このような区域は既知の病原体に対する抗体を含んだウェルに対応するからである。この粒子含有の区域は、CCD検出を使用して画像処理される。

（図３４）培養を伴わない、下気道感染の多重化された同定を示す。この図は、実施例34に記載の試験を図示する。異なる尿道病原体についての捕捉抗体を、ガラススライド上で平行した線に付着させる。スライドは、細菌細胞中の核酸に結合する蛍光染色で処理した尿溶液に浸漬する。細菌病原体が、存在する場合、細菌病原体はスライド上の捕捉抗体の対応する線に付着し、そして非拡大的な広域画像処理を使用して画像処理される。

（図３５）血液由来のウイルス：HIV、HCV、HBV、およびCMVの迅速かつ多重化された同定を示す。この図は、実施例35に記載される試験を図示する。4つの異なるウイルス（HIV、HBV、HCV、およびCMV）に特異的な4つの異なる捕捉抗体を含む4つの別個のスポットが、光学的に透明なマイクロタイターディッシュの底に吸着された。血液（図ではHIVを含む）がウェルに添加され、そしてウイルスを捕捉抗体に結合させる。血液を取り除いた後、4種類のウイルス特異的蛍光粒子の混合物がウェルに添加される。各々の種類の粒子が別個のスペクトル特性（シグナルシグニチャー）を有する蛍光団で染色され、そして異

なるウイルス特異的抗体でコートされる。ウェルの表面上にトラップされるウイルス粒子は、CCDに基づく非拡大的な広域画像処理によって検出および定量される対応する蛍光粒子に結合する。結合粒子の位置およびシグナルシグニチャーの両方が血液中のウイルスを同定する。

（図３６）非拡大的な広域画像処理を使用した、A型インフルエンザウイルスの超高感度ラテラルフロー試験を示す。この図は、蛍光標識粒子で標識され、かつ非拡大的な広域画像処理を使用して分析される、A型インフルエンザウイルスについてのラテラルフロー試験の結果を示す。この図は、（左から右に）0、10^5、10^6、10^7、および10^8ビリオン/mlを含む試料を適用された試験ストリップからの捕捉線および対照線の画像を示す。蛍光シグナルは、A型インフルエンザビリオンの濃度の増加に伴って増加する。示されたデータは、この試験が少なくとも10^5ビリオン/mlまで低い濃度を検出し得ることを示す。従って、この実験により、本発明に基づくラテラルフロー試験の感度が実証される。

（図３７）可視的検出を使用したM.ツベルクローシスについての迅速ラテラルフロー試験を示す。この図は、実施例36に記載の試験を図示する。一番上のパネルは、ラテラルフロー試験の構成の側面図を示す。試験ゾーンは、吸収剤のメンブレンに結合した抗M.ツベルクローシス捕捉抗体の線を含む。陽性対照ゾーンは、メンブレンに結合したM.ツベルクローシス細菌を含む。試料（図ではM.ツベルクローシスを含む）は試料パッドに適用される。キャピラリーフローは、メンブレンに沿って病原体細胞を引っ張り、その結果、これらは試験ゾーン中の捕捉抗体と接触し、かつトラップされる。抗M.ツベルクローシス抗体およびアルカリホスファターゼに結合体化された粒子は、試料パッドに適用される。キャピラリーフローを経由して吸収パッドに向かう移動の過程で、結合体は、試験ゾーン中で捕捉されたM.ツベルクローシス細胞に結合し、そして対照ゾーン中でフィルターに結合したM.ツベルクローシスに結合する。これらの結合した結合体は、アルカリホスファターゼ基質を用いる色素発生性染色後に直接的に可視化される。

（図３８）非拡大的な広域画像処理を使用した、多数の異なる細菌戦因子を検出するための迅速ラテラルフロー試験を示す。この図は、実施例38に記載される試験を図示する。このストラテジーは、以下の例外を除いて、図37の説明文中に記載されたものと同様である。この試験は、細菌、ウイルス、および毒素を含む、多数の異なる細菌戦因子について、試料を走査する（単純化のために、この図は実施例38において記載される試験中の標的、結合体、および捕捉抗体のすべてを示しているわけではないことに注意のこと）。この実施例において、試料は、結合体パッドにおいて結合体と接触し、かつ結合体を移動させる。最終的に、この試験は、アルカリホスファターゼの化学発光性基質およびCCD画像処理を使用して、特異的に結合した結合体粒子を検出する。

（図３９）ゲノム減算を使用した、S.ニューモニエカテゴリー特異的配列の単離を示す。この図は、実施例39に記載のS.ニューモニエ特異的配列の単離を図示する。図39Aは、S.ニューモニエとその最も密接な関連物との間の系統学的な関連性を示す（Kawamuraら、International Journal of Systematic Bacteriology 45: 406-8, 1995）。カテゴリー特異的配列を単離するためのストラテジーは2つの工程に分けられ得る：ゲノム減算段階（図39B）およびスクリーニング段階（図39C）である。最初に、ゲノム減算（Straus、1995、前出）が、系統学的な株（この場合、S.ニューモニエ）からのDNAを「＋」ゲノム差分試料として使用して実行される（図39B）。「－」ゲノム差分試料は、最も密接な関連物である株（肺炎を一般的に引き起こさない株）のいくつかをプールすることによって構築される。得られる減算産物は、病原体のゲノムにハイブリダイズするが最も密接に関連する種のゲノムにはハイブリダイズしないフラグメントである。減算産物をクローニングした後、カテゴリー特異的であるサブセットが単離される（図39C）。これらは、すべてのS.ニューモニエ株にハイブリダイズするが他の群のいかなる株にもハイブリダイズしないDNAフラグメントである。試験されたすべてのS.ニューモニエ株にハイブリダイズするが他の種であるストレプトコッカス属の菌株とはハイブリダイズしないプローブが選択される。詳細については実施例39を参照されたい。

（図４０）核酸プローブを使用した、呼吸器系の病原体についての包括的な試験を示

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4803

す。この図は、実施例39に記載の試験を図示する。病原体特異的プローブの集合は、2つの区域（1つは呼吸器系の試料を含み、そして1つはスポットのアレイを含み、これらの各々は異なるカテゴリーの対照である呼吸器性病原体を含む）を含むスライドにハイブリダイズされる。集合中の各プローブのファミリーは、別個のシグナルシグニチャーで標識される。対照スポットのシグナルシグニチャーと、臨床試料における病原体のシグナルシグニチャーとを比較することで、臨床試料中の病原体を同定する。画像分析ソフトウェアによって見い出された対象物の数および強度は、試料中の病原体の数を定量する。詳細については実施例39を参照されたい。

（図４１）カテゴリー特異的配列の間接的なコンビナトリアル標識を示す。この図は、実施例40における、高いシグナル複雑性を達成するために使用される方法を示す。カテゴリー特異的オリゴヌクレオチドであるカテゴリー結合分子の各ファミリーは、表5に示す図式に類似の図式を使用して特定のシグナルシグニチャーで標識される。従って、図に示されるように、S.ニューモニエプローブは、紫色または青色のいずれかの量子ドットで間接的に標識されるのに対して、S.アウレウスプローブは、黄色または緑色のいずれかの量子ドットで標識される。例えば、紫色の量子ドットで標識されるプローブは、2つの隣接する部分：カテゴリー特異的オリゴヌクレオチドおよび「紫色タグ」を用いて合成される。この紫色タグの配列は、紫色の量子ドットに結合体化された「紫色タグ相補物」にハイブリダイズし得る。

（図４２）CNSストリップ試験を示す。この図は、実施例41に記載の試験を図示する。

（図４３）仮想的な減算によって特定されるゲノム上の差分の配列を増幅するための二成分性PCRプライマーを示す。この図は、クラミジア・トラコマチスにおいて存在するが、クラミジア・ニューモニエにおいては存在しない領域（～200から500bp）を増幅するために、実施例43において使用されるPCRプライマーを示す。二成分性の構造を有するPCRプライマーが設計される。「左側プライマー」は、クラミジア・トラコマチス における挿入/欠失領域の「左側」末端に対応する20bpのプライマーに連結されたXhoLプライマー配列

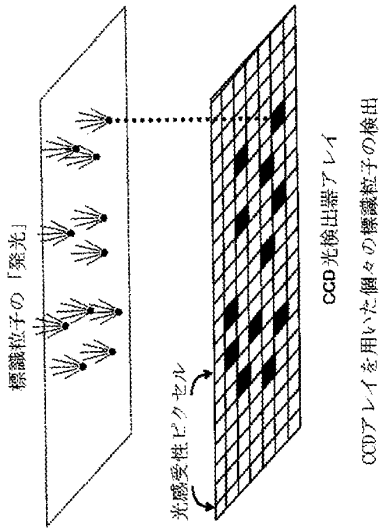
(5'- GGG CCC CCC CTC GAT C-3')

を有する（5'-XhoL-クラミジア・トラコマチス左側プライマー-3'）。「右側プライマー」は、クラミジア・トラコマチス における挿入/欠失領域の「右側」末端に対応する20bpのプライマーに連結されたXhoRプライマー配列

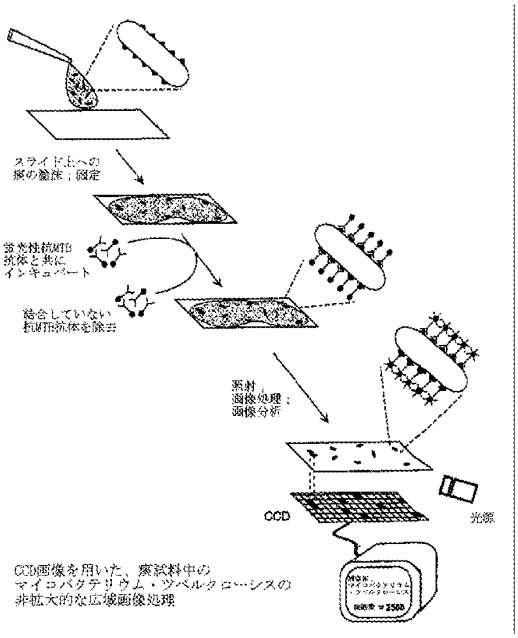
(5'-ATC GAT ACC GTC GAC CTC-3')

を有する（5'-XhoR-クラミジア・トラコマチス右側プライマー-3'）。

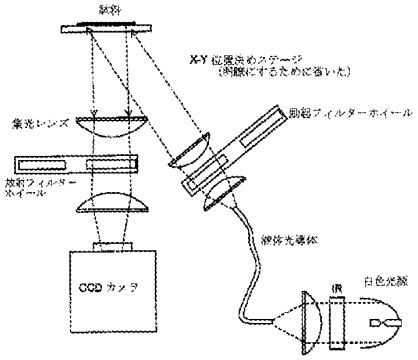
【図1】



【図2】

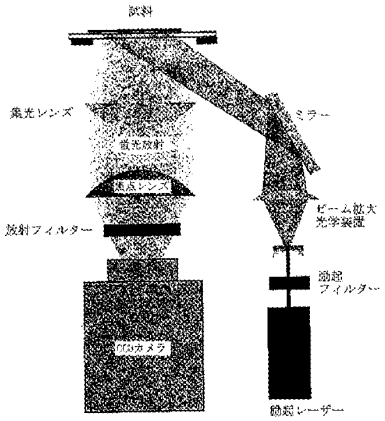


【図3】



広域画像処理のためのCCD画像処理装置

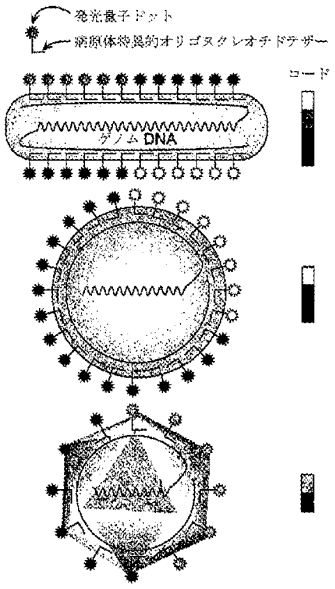
【図4】



非拡大的な広域画像処理のための
CCD画像処理システム

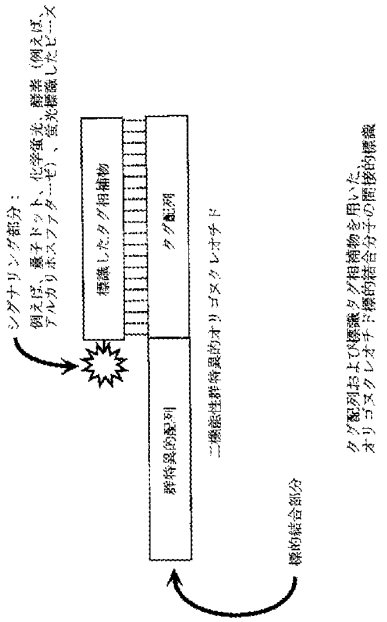
Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4805

【図5】

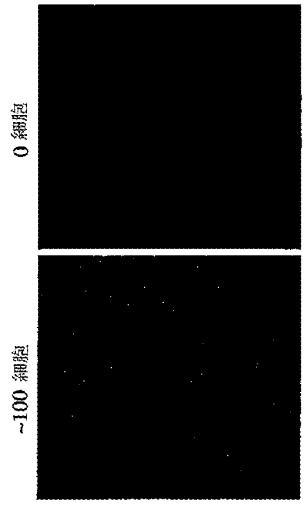


コンビナトリアル標識を用いた、異なる病原体の別個の標識

【図6】

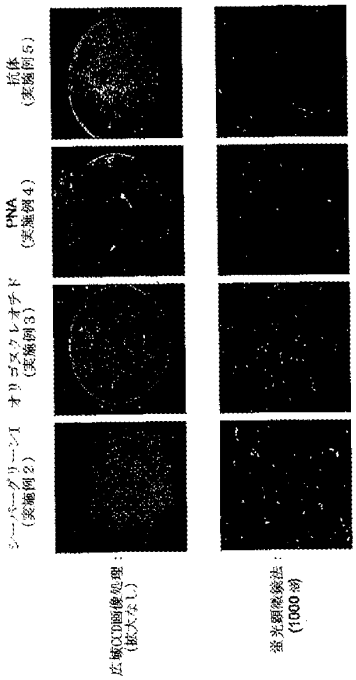


【図7】



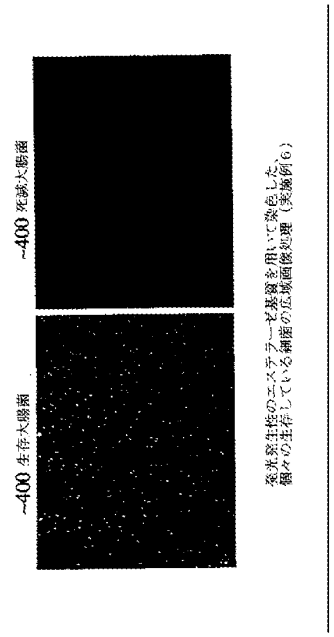
蛍光性DNA結合染色剤で標識した個々の細菌の
広域画像処理（実施例1）

【図8】

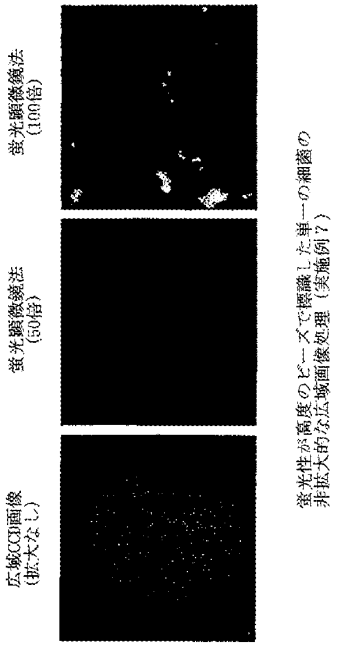


種々のシグナリング部分を用いた、単一の大腸菌細胞の
非拡大的な広域画像処理（実施例2～5）

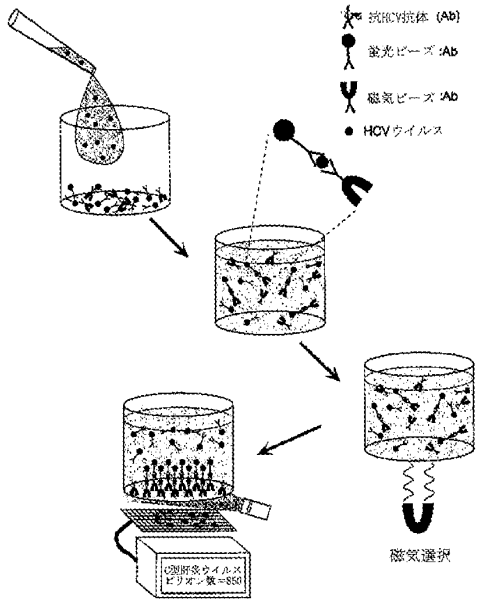
【図9】



【図10】

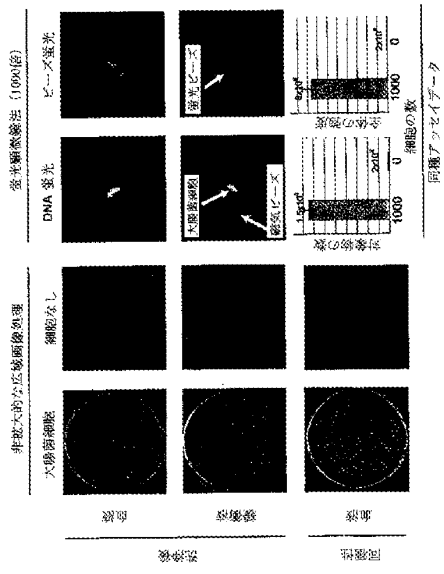


【図11】



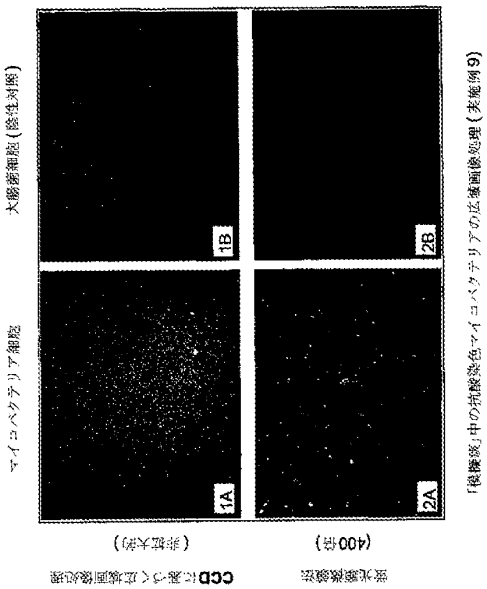
蛍光ビーズ：ウイルス：磁気粒子複合体の液相磁気選択、
引き続いて非拡大的な広域画像処理を用いた、
ウイルス(HCV)についての同種イムノアッセイ法

【図12】

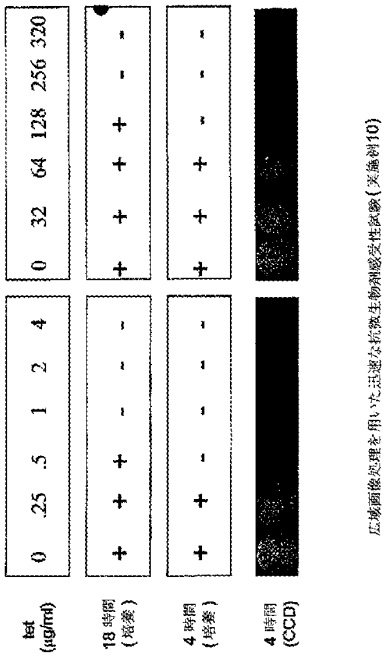


非拡大的な広域画像処理を使用して個々の細菌を
検出する、同種イムノアッセイ法（実施例8）

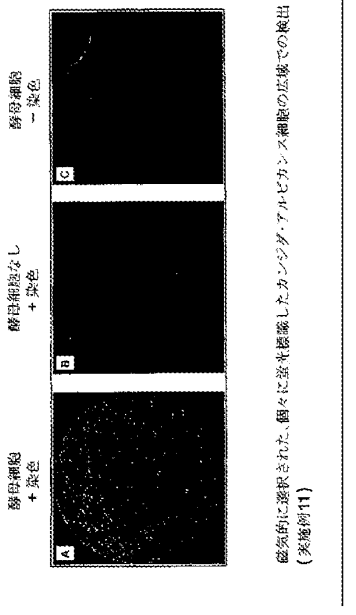
【図13】



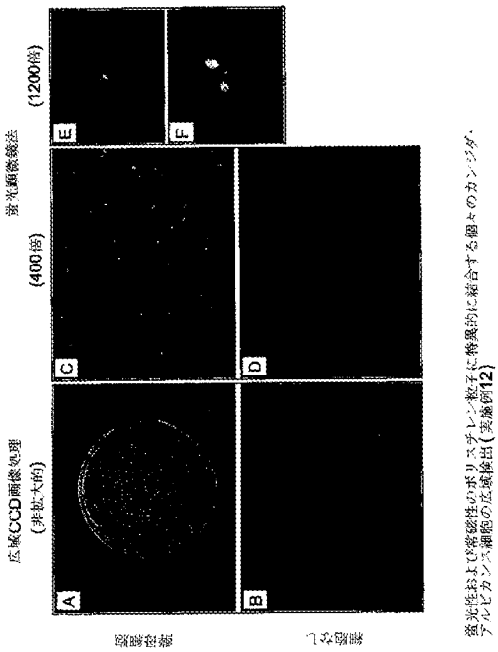
【図14】



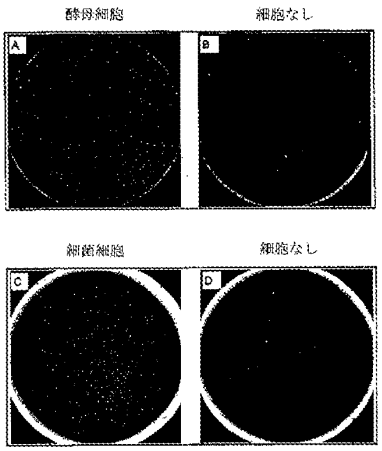
【図15】



【図16】

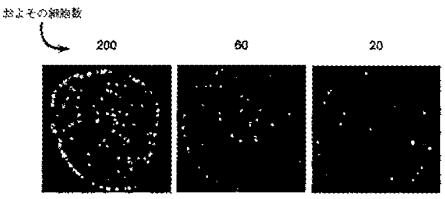


【図17】



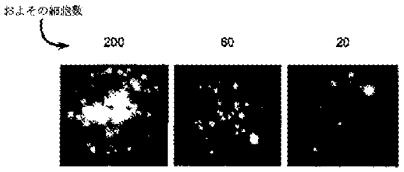
蛍光抗体および磁気粒子に特異的に結合した個々のカンジダ・アルビカンスの広域検出（実施例13）

【図18】



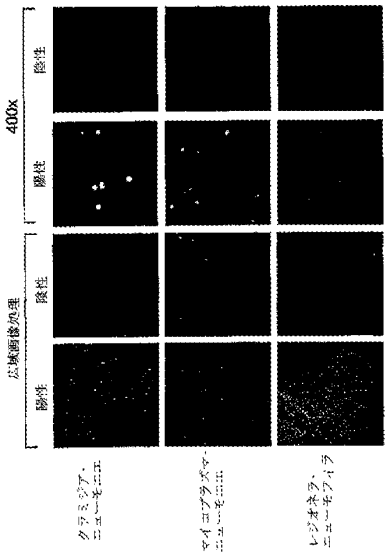
CCDカメラを用いた、単一の化学発光酵母細胞(C.アルビカンス)の非拡大的な広域検出（実施例14）

【図19】



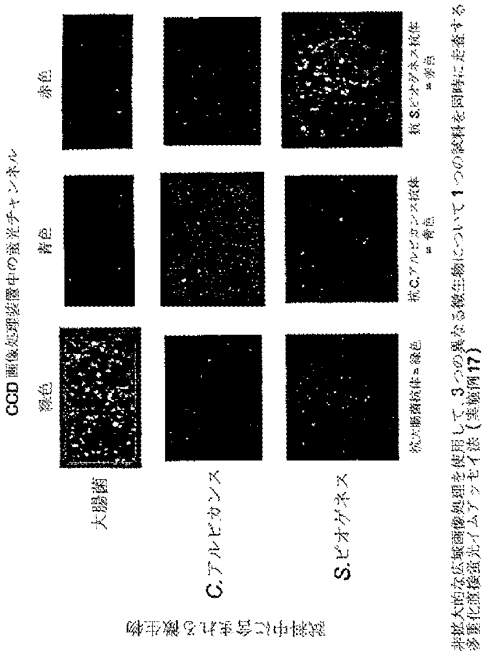
インスタントフィルムの直接的な露出を用いた、単一の化学発光酵母細胞(C.アルビカンス)の非拡大的な広域検出（実施例15）

【図20】



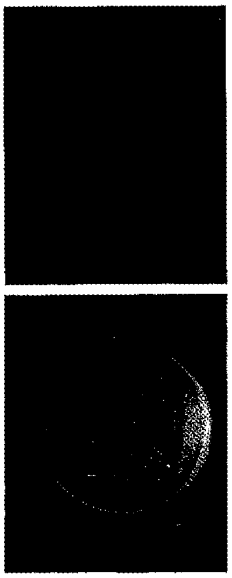
非拡大的な広域画像処理を用いた、下気道感染に関与する生物の検出（実施例16）

【図21】



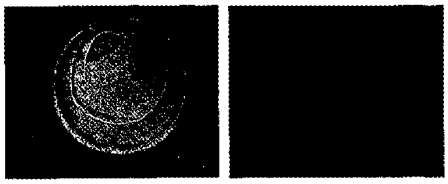
非拡大的な広域画像処理を使用して、3つの異なる微生物について1つの試料を同時に走査する、多重化蛍光免疫アッセイ法（実施例17）

【図22】



固相捕捉および非拡大的な広域画像処理を用いた、ウイルスイムノアッセイ法
（実施例18）

【図23】



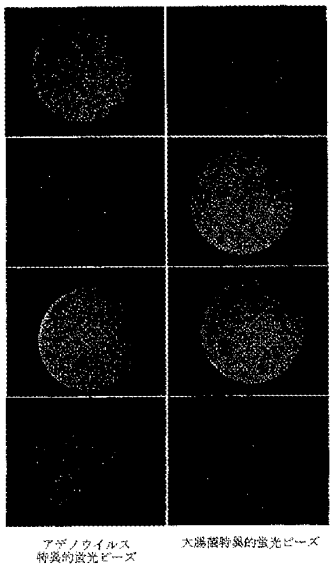
固相捕捉および非拡大的な広域画像処理を用いた、血液中の
ウイルスイムノアッセイ法（実施例19）

【図24】



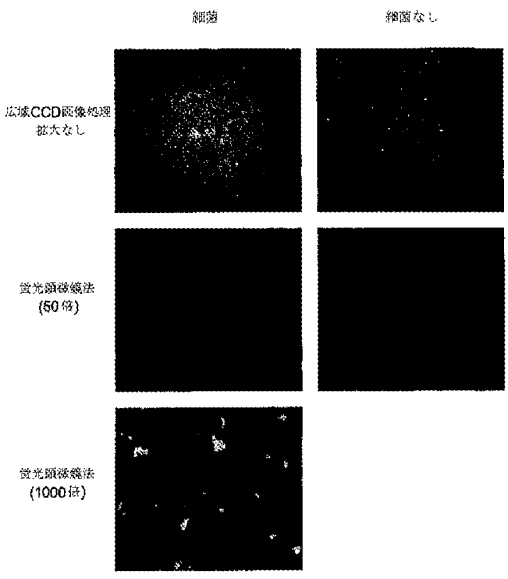
液相サンドイッチを形成する磁気ビーズおよび蛍光ビーズ、
続いて非拡大的な広域画像処理を用いたウイルスイムアッセイ法
（実施例20）

【図25】



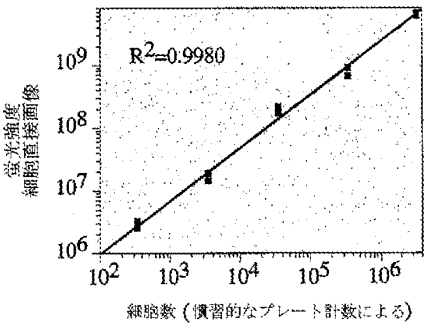
細菌およびウイルスについて同時に走査する
多重化広域画像処理イムノアッセイ法
（実施例22）

【図26】



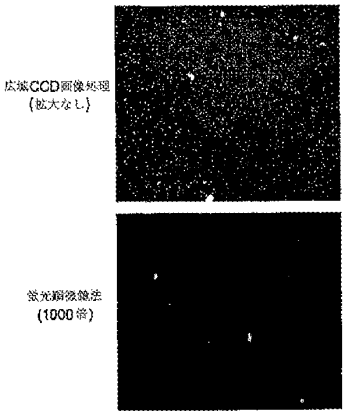
非拡大的な広域画像処理を用いた、単一の細菌を検出する
ためのフィルタースループットアッセイ法（実施例23）

【図27】



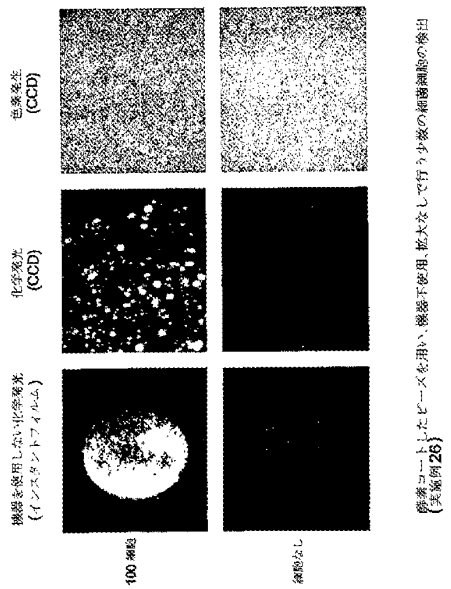
蛍光発生性エステラーゼ基質を用いて染色した細胞の広域画像処理を用いた細菌の定量（実施例24）

【図28】



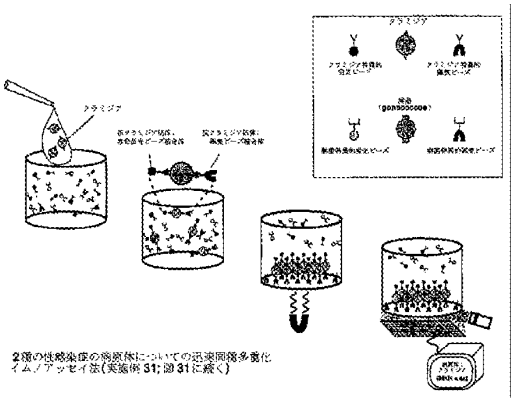
非拡大的な広域画像処理を用いた、フィルター上での個々の染色された細菌の検出（実施例25）

【図29】



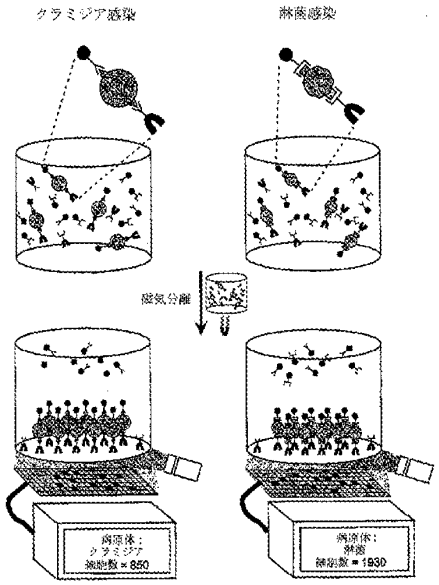
膜表面コートしたビーズを用い、顕微鏡下使用、拡大なしで行う少数の細菌細胞の検出（実施例26）

【図30】



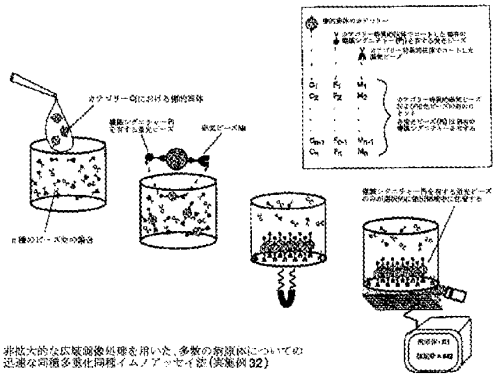
2種の伝染病原の病原体についての迅速同時多重化イムノアッセイ法（実施例31；図31に続く）

【図31】



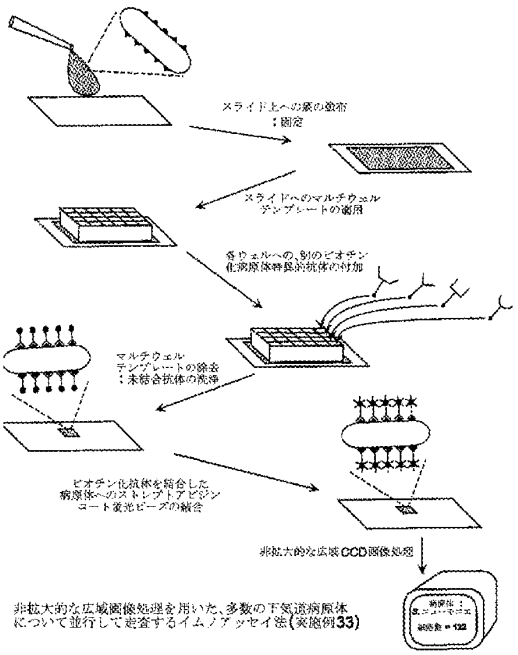
2種の性感染症の病原体についての迅速多重化同様イムノアッセイ法
(実施例31;図30からの続き)

【図32】



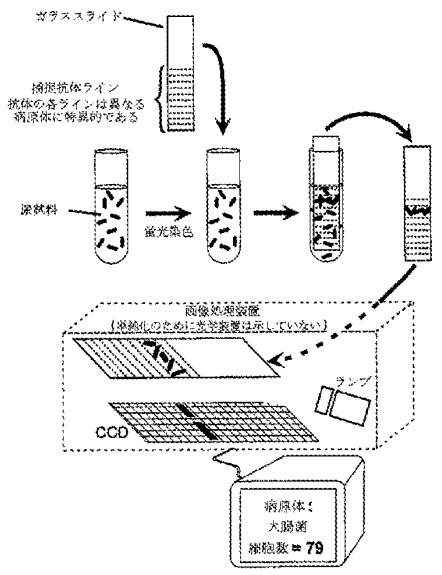
非拡大的な広域画像処理を用いた、多数の病原体についての迅速な定量多重化同様イムノアッセイ法(実施例32)

【図33】



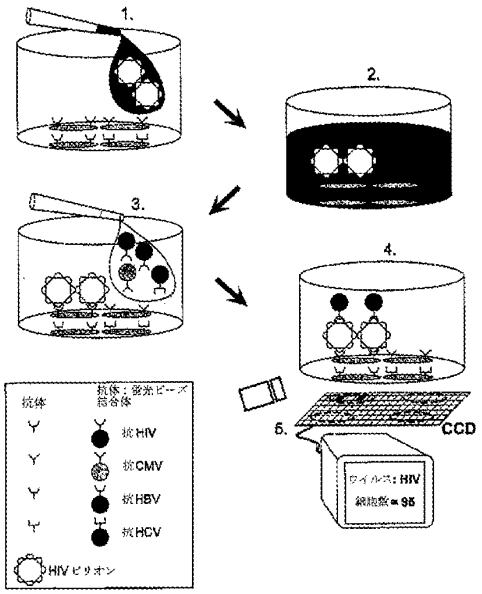
非拡大的な広域画像処理を用いた、多数の下気道病原体について並行して定量するイムノアッセイ法(実施例33)

【図34】



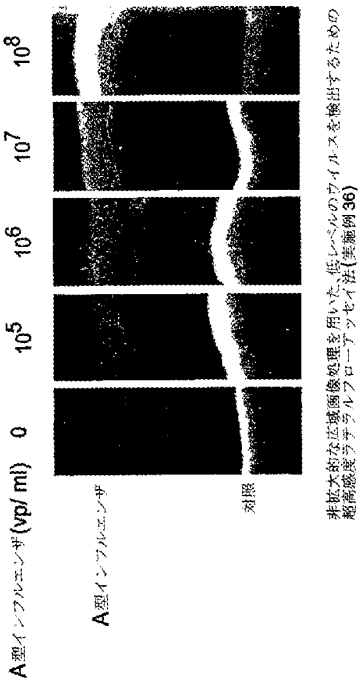
非拡大的な広域画像処理を使用して単一細胞を検出する、下気道感染の多重化イムノアッセイ法(実施例34)

【図35】

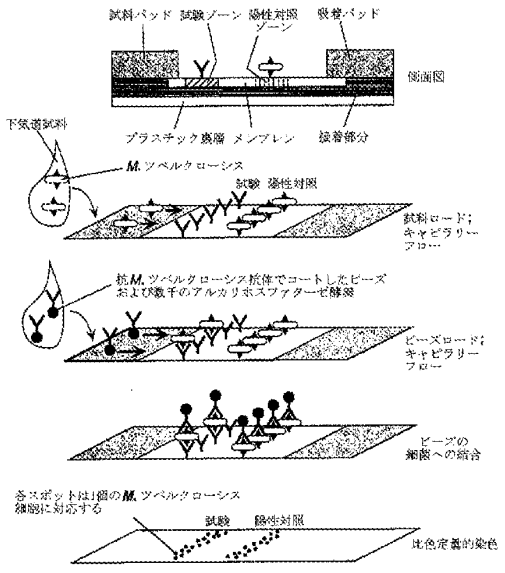


非拡大的な広域画像処理を用いた、血液由来のウイルスの多重化イムノアッセイ法(実施例35)

【図36】

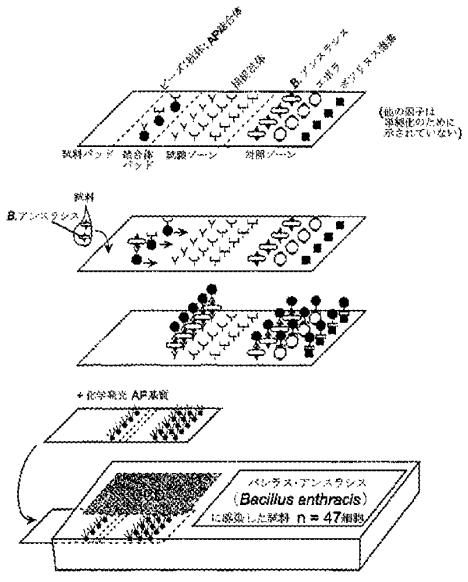


【図37】



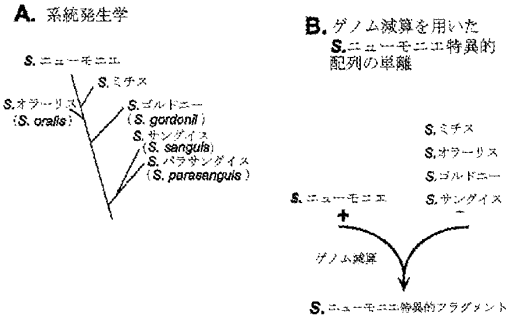
可視的検出を用いたM.ツベルクローシスについての迅速ラテラルフロー試験(実施例37)

【図38】



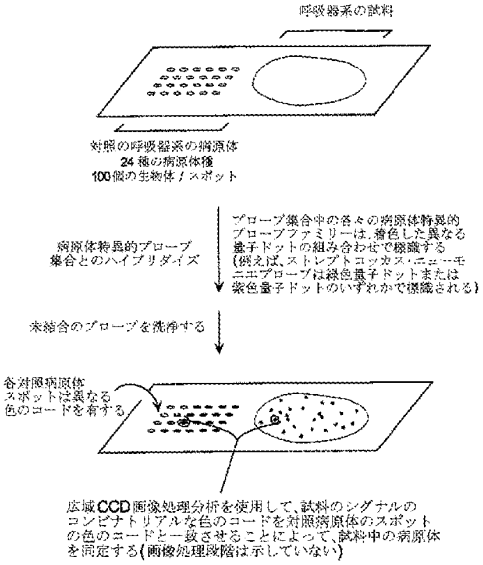
非拡大的な画像処理を用いた、多数の異なる細菌病因因子を検出するための迅速ラテラルフロー試験(実施例38)

【図39】



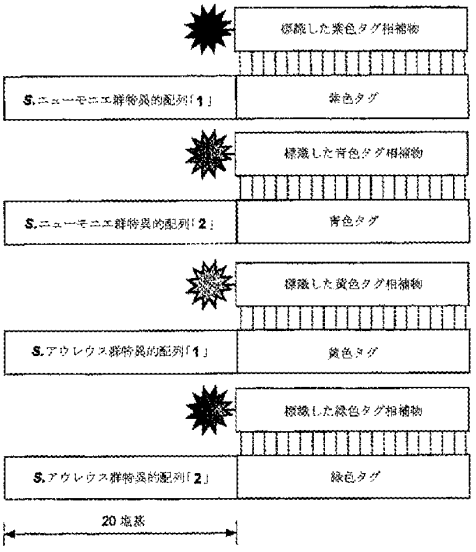
ゲノム減算を用いたS.ニューモニエ特異的配列のファミリーの単離(実施例39)

【図40】



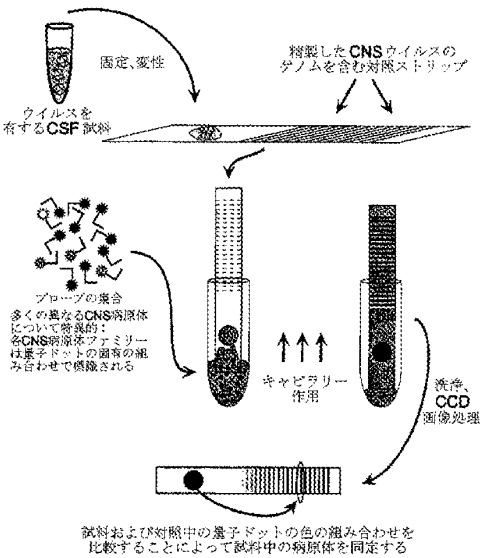
広域画像処理を使用して、同時に24種の異なる病原体について呼吸器系の試料を走査する(実施例39)

【図41】



群特異的配列の隣接的なコンビナトリアル標識(実施例40)

【図42】

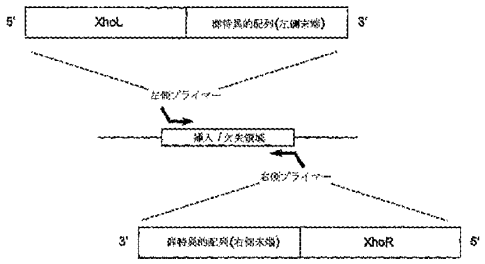


試料および対照中の量子ドットの色の組み合わせを比較することによって試料中の病原体を同定する

逆連ハイブリダイゼーションクロマトグラフィーを用いた、多数のCNSウイルス病原体の同時走査(実施例41)

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4814

【図43】



「仮想的な断片」の塩基をPCR増幅するための二成分性PCRプライマー(実施例43)

【手続補正書】
【提出日】平成16年9月2日(2004.9.2)
【手続補正1】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０４７２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０４７２】
他の実施態様は特許請求の範囲内にある。
【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Genomic Profiling Systems, Inc.

<120> Rapid and Sensitive Detection of Cells and Viruses

<130> CE-A0408

<140> JP　2003-572353
<141> 2002-09-06

<150> US　60/317,658
<151> 2001-09-06

<160> 3

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 1
gggcccccc tcgatc　　16

<210> 2
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 2
atcgataccg tcgacctc　　18

<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 3
gctgcctccc gtaggagt　　18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/28434

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : G01N 31/00
US CL : 435/7.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 435/7.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
NONE

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WEST, CAPLUS, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,891,394 A (DROCOURT et al.) 06 April 1999(06.04.1999), abstract, columns 1-3.	1-12, 16-135
Y	US 6,214,560 B1 (YGUERABIDE et al.) 10 April 2001(10.04.2001), abstract, columns 1-2, column 6, lines 13-22, columns 9-10, column 12 lines 51-62	1-12, 16-136
A	US 4,587,213 A (MALECK, George) 06 March 1986(06.03.1986), document, abstract, columns 1-3.	1-12, 16-136
A	US 5,981,180 A (CHANDLER et al.) 09 November 1999(09.11.1999), columns 1-4.	1-12, 16-136

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.　　☐ See patent family 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 application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 September 2004 (26.09.2004)	06 OCT 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Zachariah Lucas Telephone No. 571.272.1600

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/28434

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

1. ☒ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The claims are incomplete and do not define what subject matter is being claimed.

2. ☐ Claim Nos.: 14 and 15
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

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

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(1)) (July 1998)

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ｇ０１Ｎ　21/78	Ｇ０１Ｎ	21/78　Ｃ	
Ｇ０１Ｎ　33/543	Ｇ０１Ｎ	33/543　５２１	
Ｇ０１Ｎ　33/569	Ｇ０１Ｎ	33/569　Ｂ	
	Ｇ０１Ｎ	33/569　Ｇ	

(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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
ポラロイド
ＰＯＬＡＲＯＩＤ

(72)発明者　ストラウス　ドン
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　ケンブリッジ　バッキンガム　ストリート　１９

Ｆターム(参考) 2G054 AA08 BB08 BB13 CA20 CB02 CB03 CE02 EA01 EA03 FA19
GA04 GB02 GB10
4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ03 QQ04 QQ05 QQ10 QQ15 QQ16 QQ17
QQ18 QQ19 QQ20 QR32 QR35 QR38 QR48 QR56 QS32 QS36
QS39 QX01 QX02

(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2006-511792
(P2006-511792A)
(43)公表日　平成18年4月6日(2006.4.6)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
G01N 30/88	(2006.01)	G01N 30/88	E	2G045
C12M 1/00	(2006.01)	G01N 30/88	J	4B024
C12M 1/40	(2006.01)	C12M 1/00	A	4B029
C12Q 1/68	(2006.01)	C12M 1/40		4B063
B01J 20/281	(2006.01)	C12Q 1/68	A	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 94 頁）　最終頁に続く

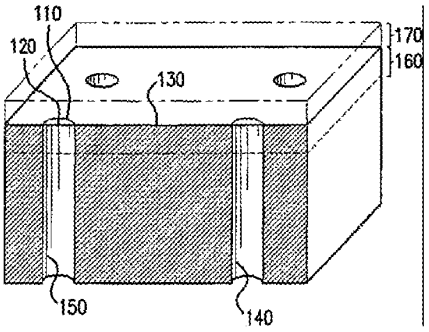
(21)出願番号　特願2004-555704 (P2004-555704)
(86)(22)出願日　平成15年11月20日 (2003.11.20)
(85)翻訳文提出日　平成17年7月25日 (2005.7.25)
(86)国際出願番号　PCT/US2003/037598
(87)国際公開番号　WO2004/048936
(87)国際公開日　平成16年6月10日 (2004.6.10)
(31)優先権主張番号　60/429,093
(32)優先日　平成14年11月26日 (2002.11.26)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/429,259
(32)優先日　平成14年11月26日 (2002.11.26)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　505191906
ユニバーシティ　オブ　ユタ　リサーチ　ファンデーション
アメリカ合衆国，ユタ　８４１０８，ソルト　レイク　シティ，スイート　１１０，アラピーン　ドライブ　６１５
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次

最終頁に続く

(54)【発明の名称】微小孔物質、被分析物の局在化及び定量の方法、並びに被分析物の局在化及び定量用物品

(57)【要約】
液体サンプル中に存在する１以上の被分析物を分離するための方法が本明細書中に記載される。該方法は、微小孔物質を有するフィルターを通して液体を通過させることを含み、ここで該被分析物は、微小孔物質の表面付近に局在化される。さらなるハイブリダイゼーション及び増幅などのさらなるステップは、被分析物が局在された時点で、行われうる。１の方法では、、被分析物が局在された時点で、サンプル中の被分析物の濃度を測定するために、該被分析物が検出され、計数され、そして相関されうる。改変された微小孔物質及び混合物はまた、本明細書中に開示され、本明細書中に記載される方法及び物品のいずれかにおいて使用されうる。混合物は、微小孔物質及びピグメントから構成され、該ピグメントは一度被分析物が局在されると、該被分析物の検出を高める。さらなる態様では、様々なキット及び物品、例えば本明細書中に記載される微小孔物質のいずれかを含むろ過装置などが提供される。



Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4820

【特許請求の範囲】
【請求項1】
微小孔物質及びピグメントを含む複合体であって、該ピグメントが該微小孔物質内に組み込まれている前記複合体。
【請求項2】
前記ピグメントが、前記微小孔物質に共有結合されている、請求項１に記載の複合体。
【請求項3】
前記ピグメントが、リンカーにより前記微小孔物質に結合される、請求項２に記載の複合体。
【請求項4】
前記リンカーが、オルガノシリル基を含む、請求項３に記載の複合体。
【請求項5】
前記ピグメントが、前記微小孔の表面上に存在する水酸基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、アミン基、又はそれらの組合せにより、該微小孔物質に結合される、請求項２に記載の複合体。
【請求項6】
前記ピグメントが、有機色素を含む、請求項２に記載の複合体。
【請求項7】
前記有機色素が、イソチオシアネート、トリアジン、又はエステルを含む、請求項６に記載の複合体。
【請求項8】
前記微小孔物質が、セラミック、金属、炭素、又はガラスを含む、請求項１に記載の複合体。
【請求項9】
前記微小孔物質が、金属酸化物を含む、請求項１に記載の複合体。
【請求項10】
前記金属酸化物が、酸化アルミニウム、酸化ジルコニウム、酸化チタン、ゼオライト、又はそれらの組合せを含む、請求項９に記載の複合体。
【請求項11】
前記微小孔物質が、無機電気化学的に形成された物質又はエッチ物質を含む、請求項１に記載の複合体。
【請求項12】
前記微小孔物質が、約０．０２ミクロン～約０．２ミクロンの直径を有する微小孔を含む、請求項１に記載の複合体。
【請求項13】
前記微小孔物質が酸化アルミニウムを含み、かつ前記ピグメントが有機色素を含み、ここで該有機色素が、オルガノシリル基を含むリンカーにより該微小孔物質に共有結合される、請求項１に記載の複合体。
【請求項14】
前記ピグメントが、前記微小孔物質上に沈積される、請求項１に記載の複合体。
【請求項15】
前記ピグメントが、元素金属、金属酸化物、合金、又はそれらの組合せを含む、請求項１４に記載の複合体。
【請求項16】
前記ピグメントが元素金属を含む場合、該元素金属が遷移金属を含む請求項１５に記載の複合体。
【請求項17】
前記遷移金属が、パラジウム、ニッケル、銀、金、又はそれらの組合せを含む、請求項１６に記載の複合体。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4821

【請求項18】
前記微小孔物質が酸化アルミニウムを含み、そして前記ピグメントが該微小孔物質上に沈積される１以上の元素遷移金属を含む、請求項１に記載際の複合体。
【請求項19】
前記元素遷移金属が、パラジウム、ニッケル、又はそれらの組合せを含む、請求項１８に記載の複合体。
【請求項20】
前記複合体がさらにサスペンション・ポリマーを含み、ここで該サスペンション・ポリマーが該複合体の表面付近に局在化される、請求項１～１９に記載の複合体。
【請求項21】
前記サスペンション・ポリマーが、オリゴヌクレオチド、多糖、タンパク質、又はそれらの組合せを含む、請求項２０に記載の複合体。
【請求項22】
前記サスペンション・ポリマーが、オリゴヌクレオチドを含む場合、該オリゴヌクレオチドが核酸を含む、請求項２０に記載の複合体。
【請求項23】
前記複合体が、ビーズ又は膜を含む、請求項１に記載の複合体。
【請求項24】
ピグメントを微小孔物質に共有結合することを含む、請求項１に記載の複合体の製造方法。
【請求項25】
ピグメントを微小孔物質上に沈積することを含む、請求項１に記載の複合体の製造方法。
【請求項26】
請求項２４に記載の方法により作られる複合体。
【請求項27】
請求項２５に記載の方法により作られる複合体。
【請求項28】
被分析物検出のための、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体の使用。
【請求項29】
前記被分析物が、核酸、タンパク質、寄生虫、真菌、エフェクター分子、リガンド、レセプター、シグナル生成分子、構造分子、イオン、抗原、抗体、組織、細胞、細胞要素、細菌、タンパク質、又はそれらの組み合わせを含む、請求項２８に記載の使用。
【請求項30】
バイオリアクターとしての、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体の使用。
【請求項31】
被分析物の局在化方法であって、該分析物を、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体と接触することを含む、前記方法。
【請求項32】
液体サンプルから被分析物を分離する方法であって、該液体サンプルを、請求項１～２０、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体と接触することを含む、前記方法。
【請求項33】
被分析物の定量方法であって、以下のステップ：
（ａ）該被分析物を含む既知の体積を有する液体サンプルを、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体に通し、ここで該被分析物が、該複合体の表面付近に局在化され、そして
（ｂ）該複合体上の該被分析物を検出するステップ
を含む前記方法。

【請求項34】
ステップ(ａ)の後又は前のいずれかにおいて、前記被分析物のうちの少なくとも幾つかは、検出可能なトレーサーで標識されて、標識された被分析物を作り出す、請求項３３に記載の方法。
【請求項35】
前記検出ステップ(ｂ)が、光学的検出により行われる、請求項３３に記載の方法。
【請求項36】
ステップ(ｂ)の後に、
（ｃ）　前記複合体上の前記標識された被分析物を計数し、そして
（ｄ）　該計数された被分析物を前記液体サンプルの既知の体積と相関して、該液体サンプル中の該被分析物濃度を測定する、請求項３４に記載の方法。
【請求項37】
前記液体サンプルが生体液を含み、ここで該生体液が、全血、血清、血漿、脳脊髄液、尿、唾液、精液、痰、気管支肺胞洗浄液、関節吸引液、又は創傷排膿液を含む、請求項３３～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項38】
前記液体サンプルが、細菌、ウイルス、真菌、胞子、細胞培養、糞便、動物組織又は細胞、野菜組織又は細胞、それらの溶解された成分、又はそれらの組合せを含む、請求項３３～３５のいずれか1項に記載の方法。
【請求項39】
前記液体サンプルが、前記複合体を通す前に、前ろ過されるか、又は不純物を取り除くために処理される、請求項３３～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項40】
前記液体サンプルはさらに、緩衝液、塩、酵素、界面活性剤、カオトロピック剤、又はそれらの組合せをさらに含む、請求項３３～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項41】
前記液体サンプルがさらにＮａＣｌを含む、請求項３３～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項42】
前記被分析物が、タンパク質、寄生虫、真菌、エフェクター分子、リガンド、レセプター、シグナル-生成分子、構造分子、イオン、抗原、抗体、組織、細胞、細胞要素、細菌、タンパク質、又はそれらの組合せを含む、請求項３３～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項43】
前記被分析物が核酸を含む、請求項３３～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項44】
前記核酸が、少なくとも約１５００塩基又は塩基対を有するＲＮＡ又はＤＮＡを含む、請求項４３に記載の方法。
【請求項45】
前記核酸がビリオンを含む、請求項４３に記載の方法。
【請求項46】
前記ビリオンがＨＩＶビリオンを含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項47】
前記核酸が、検出可能なトレーサーで標識され、ここで該検出可能なトレーサーが、蛍光マイクロビーズ、量子ドット、表面プラスモン共鳴粒子、蛍光生成酵素、蛍光色素、又はそれらの組合せを含む群を含む、請求項４３に記載の方法。
【請求項48】
ステップ(ａ)の後に、前記局在された核酸が、特異的に局在された標的核酸を含む、請求項４３に記載の方法。
【請求項49】

前記特異的に局在された標的核酸が、蛍光核酸色素を含むトレーサーで標識される、請求項４８に記載の方法。

【請求項50】

ステップ(ａ)の後に、前記局在された核酸が、非特異的に局在された核酸を含む、請求項４３に記載の方法。

【請求項51】

前記非特異的に局在された核酸が、蛍光トレーサーを含む特異的に結合するプローブで標識された標的核酸を含む、請求項５０に記載の方法。

【請求項52】

前記非特異的に局在された核酸が、特異的に結合するプローブとハイブリダイゼーションされて、表面局在化ハイブリッドを形成する標的核酸を含む、請求項５０に記載の方法。

【請求項53】

前記表面局在化ハイブリッドが、蛍光核酸色素で標識される、請求項５２に記載の方法。

【請求項54】

前記核酸が、核酸に付着される２以上の異なる検出可能なトレーサー分子を含む検出可能なトレーサーで標識される、請求項４３に記載の方法。

【請求項55】

前記検出可能なトレーサー分子が、蛍光トレーサー分子を含む、請求項５４に記載の方法。

【請求項56】

前記標識された核酸が、３超のシグナル対ノイズ比を達成するために、十分な蛍光を有する、請求項５５に記載の方法。

【請求項57】

前記標識された核酸が、約３～約１０のシグナル対ノイズ比を達成するために、十分な蛍光を有する、請求項５５に記載の方法。

【請求項58】

前記標識された被分析物は、０又は１の標識された被分析物が検出領域内で検出されることを許容するための十分小さい検出領域の光学的な検出により計数される、請求項３４に記載の方法。

【請求項59】

前記標識された被分析物が、走査共焦点上面蛍光光度計で光学的に検出される、請求項３４に記載の方法。

【請求項60】

前記標識された被分析物が、ＣＣＤアレイに基く蛍光装置で光学的に検出される、請求項３４に記載の方法。

【請求項61】

ステップ(ａ)の前に、サスペンション・ポリマーを前記液体サンプルに加え、ここで該サスペンション・ポリマーが、前記被分析物と相互作用する、請求項３３～３５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項62】

核酸の増幅方法であって、(ａ)　該核酸を含む既知の体積を有する液体サンプルを、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体に通し、ここで該核酸が、該複合体の表面付近に局在化され、そして(ｂ)　該核酸を増幅することを含む、前記方法。

【請求項63】

核酸の増幅方法であって、(ａ)　既知の体積を有する液体サンプル中の核酸を増幅して、増幅された核酸を作り出し、そして(ｂ)　増幅された核酸を含む該サンプルを、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体に通すことを含み、ここで該増

幅された核酸が該複合体の表面付近に局在化される、前記方法。
【請求項64】
核酸のハイブリダイゼーション方法であって、（ａ）該核酸を含む液体サンプルを、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体に通し、ここで該核酸が該複合体の表面付近に局在化され、そして（ｂ）該核酸を、該核酸に相補的である結合性オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションすることを含む、前記方法。
【請求項65】
核酸のハイブリダイゼーション方法であって、（ａ）液体サンプル中の核酸を、該核酸と相補的である既知の配列を有する結合性オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションして、ハイブリダイゼーションされた核酸を作り出し、そして（ｂ）該ハイブリダイゼーションされた核酸を含む液体サンプルを、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体に通し、ここで該ハイブリダイゼーションされた核酸が、該複合体の表面付近に局在化される、前記方法。
【請求項66】
核酸同定方法であって、（ａ）該核酸を含む液体サンプルを、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体に通し、ここで該核酸が、該複合体の表面付近に局在化され、そして（ｂ）該核酸を、該核酸に相補的である既知の配列を有する結合性オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションすることを含む、前記方法。
【請求項67】
核酸同定方法であって、（ａ）液体サンプル中の核酸を、該核酸と相補的である既知の配列を有する結合性オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションして、ハイブリダイゼーションされた核酸を作り出し、そして（ｂ）ハイブリダイゼーションされた核酸を含む液体サンプルを、請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体に通し、ここで該ハイブリダイゼーションされた核酸が、該複合体の表面付近に局在される、前記方法。
【請求項68】
請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体を含む物品。
【請求項69】
前記物品がろ過装置である、請求項６８に記載の物品。
【請求項70】
前記ろ過装置が、入口と出口を有するウェル本体であって、ここで該ウェル本体が入口壁と出口壁を有するウェル本体、並びに（ｂ）請求項１～２２、２６、２７のいずれか１項に記載の複合体を含むフィルターであって、ここで該フィルターが該ウェル本体の該入口壁に付着されるフィルターを含む、請求項６８に記載の物品。
【請求項71】
前記ウェル本体の前記入口が、キャップを取り付けられる、請求項６９に記載の物品。
【請求項72】
前記ウェル本体の前記出口が、キャップを取り付けられる、請求項６９に記載の物品。
【請求項73】
前記ろ過装置が、２以上のウェル本体を含み、ここで各ウェル本体が、トップ開口部及び底開口部、並びに（ｂ）請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体を含むフィルターを含み、ここで該フィルターは、各ウェル本体の底開口部をカバーする、請求項６９に記載の物品。
【請求項74】
前記ろ過装置がさらに、該ろ過装置の前記フィルターを通して液体を移動させるための装置を含む、請求項７３に記載の物品。
【請求項75】
前記ろ過装置がさらに、吸引装置を含み、ここで該ろ過装置が、シールを形成するように吸引装置内に配置される、請求項７３に記載の物品。
【請求項76】

請求項１～２２、２６、及び２７のいずれか１項に記載の複合体、並びに被分析物を検出するための検出手段を含むキット。

【請求項77】

請求項６８～７５のいずれか１項に記載の物品、並びに被分析物を検出するための検出手段を含む、キット。

【請求項78】

前記被分析物が、標識された被分析物を含む、請求項６８～７５に記載のキット。

【請求項79】

既知の体積を有する液体サンプル中の１以上の被分析物を分離するための方法であって、(a)該液体を、微小孔物質を含むフィルターに通すことを含み、ここで該被分析物が該微小孔物質の表面付近に局在化される、前記方法。

【請求項80】

前記局在化ステップ(a)の前又は後に、前記被分析物が検出可能トレーサーで標識される、請求項７９に記載の方法。

【請求項81】

前記局在化ステップ(a)の後に、(b)　標識された被分析物を光学的に検出し；(c)　該標識された被分析物を計数し、そして(d)　該被分析物を前記液体サンプルの既知の体積と相関して、該液体サンプル中の該被分析物の濃度を測定する、請求項８０に記載の方法。

【請求項82】

前記微小孔物質が、無機電気化学的に形成された膜又はエッチ膜を含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項83】

前記微小孔物質が、０．２ミクロン未満の直径を有する微小孔を含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項84】

前記微小孔物質が、約０．０２ミクロン～約０．２ミクロンの直径を有する微小孔を含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項85】

前記微小孔物質が、金属酸化物を含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項86】

前記金属酸化物が、酸化アルミニウム、酸化ジルコニウム、酸化チタン、ゼオライト、又はそれらの組合せを含む、請求項８５に記載の方法。

【請求項87】

前記サンプルが、生体液を含み、ここで、該生体液が、全血、血清、血漿、脳脊髄液、尿、唾液、精液、痰、気管支肺胞洗浄液、関節吸引液、又は創傷排膿液を含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項88】

前記液体サンプルが、細菌、ウイルス、真菌、胞子、細胞培養、糞便、動物組織又は細胞、野菜組織又は細胞、それらの溶解された成分、又はそれらの組合せを含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項89】

前記液体サンプルが、前ろ過され、又は前記フィルターを通る前に不純物を取り除くために処理される、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項90】

前記液体サンプルが、さらに緩衝液、塩、酵素、界面活性剤、カオトロピック剤、又はそれらの組合せを含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項91】

前記液体サンプルが、さらにＮａＣｌを含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載

の方法。
【請求項92】
前記被分析物が、タンパク質、寄生虫、真菌、エフェクター分子、リガンド、レセプター、シグナル-生成分子、構造分子、イオン、抗原、抗体、組織、細胞、細胞要素、細菌、タンパク質、又はそれらの組合せを含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項93】
前記被分析物が、核酸を含む、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項94】
前記微小孔物質が、前記核酸に相補的である結合性オリゴヌクレオチドを含まない、請求項９３に記載の方法。
【請求項95】
前記核酸が、少なくとも約１５００塩基又は塩基対を有するＲＮＡ又はＤＮＡを含む、請求項９３に記載の方法。
【請求項96】
前記核酸が、ビリオンを含む、請求項９３に記載の方法。
【請求項97】
前記ビリオンが、ＨＩＶビリオンを含む、請求項９６に記載の方法。
【請求項98】
前記核酸が、検出可能なトレーサーで標識され、ここで該検出可能なトレーサーが、蛍光マイクロビーズ、量子ドット、表面プラスモン共鳴粒子、蛍光生成酵素、蛍光色素、又はそれらの組合せを含む少なくとも１の群を有する、請求項９３に記載の方法。
【請求項99】
ステップ(ａ)の後に、前記核酸が、特異的に局在された標的核酸を含む、請求項９３に記載の方法。
【請求項100】
特異的に局在された標的核酸が、蛍光核酸色素を含むトレーサーで標識される、請求項９９に記載の方法。
【請求項101】
ステップ(ａ)の後に、前記核酸が、非特異的に局在された核酸を含む、請求項９３に記載の方法。
【請求項102】
前記非特異的に局在された核酸が、蛍光トレーサーを含む特異的結合性プローブで標識された標的核酸を含む、請求項１０１に記載の方法。
【請求項103】
前記非特異的に局在された核酸が、特異的結合性プローブとハイブリダイゼーションされて、表面局在化ハイブリッドを形成する標的核酸を含む、請求項１０１に記載の方法。
【請求項104】
前記表面局在化ハイブリッドは、蛍光核酸色素で標識される、請求項１０３に記載の方法。
【請求項105】
前記核酸が、検出可能なトレーサーであって、該核酸に付着される２以上の異なる検出可能なトレーサー分子を含む検出可能なトレーサーで標識される、請求項９３に記載の方法。
【請求項106】
前記検出可能なトレーサー分子が、蛍光トレーサー分子を含む、請求項１０５に記載の方法。
【請求項107】
前記標識された被分析物が、３超のシグナル対ノイズ比をを達成するために十分な蛍光を有する、請求項８０又は８１に記載の方法。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4827

【請求項108】
０又は１の標識された核酸が、検出領域内で検出されることを許容するため、十分に小さい検出領域を光学的に検出することにより、前記標識された被分析物が計測される、請求項８０又は８１に記載の方法。
【請求項109】
前記標識された被分析物が、走査共焦点上面蛍光光度計で光学的に検出される、請求項８０又は８１に記載の方法。
【請求項110】
前記標識された被分析物が、ＣＣＤアレイに基く蛍光装置で光学的に検出される、請求項８０又は８１に記載の方法。
【請求項111】
ステップ(ａ)の後、前記被分析物が増幅される、請求項７９に記載の方法。
【請求項112】
ステップ(ａ)の後に、前記被分析物が、前記核酸と相補的な結合性オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションされる、請求項９３に記載の方法。
【請求項113】
ステップ(ａ)の後に、前記核酸が、該核酸を同定するため、該核酸と相補的である既知の配列を有する結合性オリゴヌクレオチドでハイブリダイゼーションされる、請求項９３に記載の方法。
【請求項114】
ステップ(ａ)の前に、サスペンション・ポリマーを前記液体サンプルに加え、ここで該サスペンション・ポリマーが、前記被分析物と相互作用する、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項115】
ステップ(ａ)の前に、前記微小孔物質の表面付近へ、サスペンション・ポリマーを局在化する、請求項７９～１１４に記載の方法。
【請求項116】
前記サスペンション・ポリマーは、オリゴヌクレオチド、多糖、タンパク質、又はそれらの組合せを含む、請求項１１５に記載の方法。
【請求項117】
前記サスペンション・ポリマーがオリゴヌクレオチドを含むとき、該オリゴヌクレオチドが核酸を含む、請求項１１６に記載の方法。
【請求項118】
微小孔物質及びサスペンション・ポリマーを含む改変微小孔物質であって、該サスペンション・ポリマーが、該微小孔物質の表面付近に局在化される、前記物質。
【請求項119】
前記微小孔物質が、無機電気化学的に形成された膜又はエッチ膜を含む、請求項１１８に記載の物質。
【請求項120】
前記微小孔物質が、０．２ミクロン未満の直径を有する微小孔を含む、請求項１１８に記載の物質。
【請求項121】
前記微小孔物質が、約０．０２ミクロン～約０．２ミクロンの直径を有する微小孔を含む、請求項１１８に記載の物質。
【請求項122】
前記微小孔物質が、金属酸化物を含む、請求項１１８に記載の物質。
【請求項123】
前記金属酸化物が、酸化アルミニウム、酸化ジルコニウム、酸化チタン、ゼオライト、又はそれらの組合せを含む、請求項１２２に記載の物質。
【請求項124】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4828

前記サスペンション・ポリマーが、オリゴヌクレオチド、多糖、タンパク質、又はそれらの組合せを含む、請求項１１８に記載の物質。
【請求項125】
前記サスペンション・ポリマーがオリゴヌクレオチドを含むとき、該オリゴヌクレオチドは核酸を含む、請求項１１８に記載の物質。
【請求項126】
入口及び出口を有するウェル本体を含むろ過装置であって、ここで該ウェル対が内部壁及び外部壁、並びに(ｂ)被分析物を局在化できる微小孔物質を含むフィルターを含み、ここで該フィルターが、該ウェル本体の該内部壁に取り付けられる、前記装置。
【請求項127】
前記ウェル本体の前記入口が、キャップを取り付けられる、請求項１１８に記載の物品。
【請求項128】
前記ウェル本体の前記出口が、キャップを取り付けられる、請求項１１８に記載の物品。
【請求項129】
２以上のウェル本体を含むろ過装置であって、ここで各ウェル本体が、トップ開口部と底開口部、並びに(ｂ)　被分析物を局在化できる微小孔物質を含むフィルターを含み、ここで該フィルターは、各ウェル本体の底開口部をカバーする、前記装置。
【請求項130】
前記ろ過装置が、さらに吸引装置を含み、ここでシールが形成されるように該ろ過装置が吸引装置内に配置される、請求項１２８に記載の物品。
【請求項131】
被分析物を局在化することができる微小孔物質を含む膜、並びに標識された核酸を検出するための検出手段を含む、キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【0001】
液体サンプル中に存在する１以上の被分析物を分離するための組成物、方法、装置、及び機械が、本明細書中で記載される。
【0002】
本出願は、２００２年１１月２６日に出願された米国仮出願第60/429,093号及び第60/429,259号の利益を主張する。これらの出願は、その教示の全てを本明細書中に援用される。
【背景技術】
【0003】
背景技術
対象由来のサンプル中に存在する被分析物(analyte)の定量及び同定は、医学分野において重要である。特に、サンプルからの被分析物の定量及び同定は、多数の疾患の診断及び治療の大きな助けとなりうる。
【0004】
例えば、医学診断において、核酸分析は、広く使用される技術である。現在の核酸分析技術は、患者サンプル１ｍｌあたりの標的核酸の数百の分子コピーをルーチンに定量する。従来の研究室装備で検出するための十分に高い核酸濃度を達成するために、十分な量の分子増幅を必要とし、該増幅はポリメラーゼ・チェーン・リアクション(ＰＣＲ)を介することが多い。この分子増幅は、増幅前に核酸の精製を必要とし、これは時間の浪費であり、値段が高く、調整が難しく、そして限られた正確性しか有さない。最終アッセイ結果は、幾つかの多段階の過程をしっかり制御することに左右される。現在、少なくとも一部において、現在の技術に特有の限られた精密度及び正確性のため、ウイルス量アッセイは、核酸濃度の(線形というよりはむしろ)対数値を記録する。
【0005】

上記の増幅技術は、競合又は妨害する混入物を含まない精製された核酸サンプルを必要とする。混入物は、サンプル中に存在しうるし、そして酵素、タンパク質、ヘモグロビン、細菌、粒子などを含むこともある。或いは、混入物は、使用された精製システム由来でありうるし、そして有機溶媒、塩、金属イオンなどを含むこともある。核酸増幅(逆転写、増幅、など)を妨げる混入物を取り除くこと並びに検出(ハイブリダイゼーション、蛍光、など)を妨げる混入物質を取り除くことは、時間がかかる過程を行うことを必要とする。

【0006】

核酸を精製するための技術が存在する。例えば、クロロホルム、フェノール、及び低級アルコールを使用する複数回の有機試薬抽出/精製は、次なる分析のため核酸を単離及び精製するために何年も使用されてきた。更なる精製技術は、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、及びそれらの種々の組合せを使用するクロマトグラフィー技術を含む。

【0007】

シリカに基く核酸精製技術は、現在広く商業的に使用されている。これらのシステムは、カオトロピック剤及び/又は有機溶媒の存在下において、シリカ及びその誘導体上での可逆的結合(沈降)を通して核酸を精製する。典型的に、これらのシステムは、５+Mのグアニジン・チオシアネート(ＧＴＣ)中に核酸を含む患者サンプルを希釈する。この混合液を室温で反応させ、次に等量の無水エチル・アルコールを加え、そしてボルテックスをかける。この混合液を、核酸が即座に結合する表面積の大きいシリカに晒す。シリカを回収し、ＧＴＣ及びエチル・アルコールを含む溶液で数回洗浄し、乾燥し、そして次に結合した核酸を、低塩濃度の水で溶出させる。この技術のいくつかの別方式も存在し、そして使用されるシリカに基いた結合剤に基いて区別される。例えば、一のシステムは、小さいろ過又は厚い結合用シリカ繊維マットを含むスピンカラムを使用する。別のシステムは、グラスビーズ、磁性を帯びたシリカに基くビーズ、シリカを充填されたフィルターなどを使用する。これらのシステムは、かなり低濃度の標的核酸を単離及び精製を可能にするために、担体核酸(共沈剤)を加える。シリカに基く核酸精製技術は、それらの意図された機能を適切に果たす一方、これらの技術は、時間がかかりそして高価である。

【0008】

核酸の精製と同様に、核酸の固定化のための技術も多く存在する。核酸の捕獲を亢進するために、核酸を含む溶液に接触された際に核酸に結合する種々の化学物質で、表面は処理される。例えば、ガラス及び酸化アルミニウムに有機化合物を共有結合することは、知られている。そうした結合は、電荷、疎水性効果などの制御を目的とし未変性の酸化物表面を完全に改変するために、並びに表面に特異的標的分子の捕捉をもたらすことを目的とし、核酸、タンパク質、ポリマーなどの共有結合を可能にするため、シラン化試薬の使用を含むこともある。種々の表面化学物質を伴う石英、ガラス、及びシリコン基質は、光学的分子検出用に核酸を補足するために使用されてきた。これらの技術は、固定化又は捕捉のため、反応性の表面に標的核酸を拡散することを必要とする。低い濃度では、これらの拡散に制御される反応は、完了するために数時間必要とする。これらの技術は、時間がかかり、高価であり、そして迅速な光学的分子検出技術に適さないこともある。

【0009】

従って、サンプルから被分析物を迅速で、高価でなく、そして高効率で単離するための物質、装置、及び方法が所望されている。被分析物がサンプルから取り出された時点で、被分析物の更なる操作(例えば定量及び単離)を妨げうる混入物の全てを取り除くことが所望される。

【発明の開示】

【0010】

要約

液体サンプル中に存在する１以上の被分析物を分離するための組成物、方法、装置、及び機械が、本明細書中で記載される。一の態様では、該方法は、液体を微小孔物質(Micro

porous Material)から構成されるフィルターに通すことを含む。ここで被分析物は、微小孔物質の表面に局在化される。被分析物が微小孔物質上に局在された時点で、処理ステップ、例えばハイブリダイゼーション及び増幅が行われる。一の態様では、被分析物が微小孔物質上に局在された時点で、既知の体積を有するサンプル中の被分析物の濃度を検出するために、該被分析物は検出、計数、及び/又は相関される。

【0011】

別の態様では、複合体物質が開示される。特定の実施態様では、これらの複合体は、本明細書中に記載される方法及び物品の全てにおいて使用されうる。該複合体は、微小孔物質とピグメント(pigment)から構成されており、ここで該ピグメントは、微小孔物質内に組み込まれている。該ピグメントは、微小孔物質の光学的性質を変化させ、これにより、被分析物が複合体の表面付近に局在された時点で、被分析物の検出が高められる。

【0012】

別の態様では、改変された微小孔物質であって、微小孔物質とサスペンション・ポリマー(suspention polymer)から構成される物質が開示される。ここで該サスペンション・ポリマーは、微小孔物質の表面付近に局在される。

【0013】

さらなる態様では、微小孔物質のいずれかを含むか又は本明細書中に記載されるろ過装置などの種々のキット及び物品が提供される。

【0014】

本明細書中に記載される微小孔物質、方法、物品、及び機械の利点は、以下の記載において部分的に説明されるであろうし、又は以下に記載の態様の実行により確認されうる。以下に記載の利点は、添付の特許請求の範囲に特に指摘される要素及び組み合わせを用いて認識され、そして達成されるであろう。前の一般的な記載と以下の詳細な記載の両方とも例示的及び説明的のみであり、そして制限的ではないということは理解されるべきである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

詳細な説明

A.被分析物の分離及び分析のための組成物及び方法。

所定のサンプルから又は所定のサンプルにおいて被分析物を分離又は分析できることが所望される状況が多くある。被分析物は、例えばサンプル中で分析される標的物質のいずれかでありうる。例えば、疾患診断において、病原体又はその一部により産生される特定の被分析物が存在し、そして医師は、この被分析物の有無を使用して、患者が病原体に感染しているかどうかを決定する。この決定の型に影響する特性及びパラメーターが多くあり、例えば検出効力、検出方法がどの程度の感度であるか、病原体により産生される被分析物の量、分析を行うために必要とされるサンプル量、被分析物の安定性、サンプル中に存在するバックグラウンドとなる被分析物の量などである。検出の感度及び被分析物を検出できる簡便性を増大させる方法及び組成物は所望される。

【0016】

典型的に、該方法は、例えばサンプルから被分析物を分離することによりサンプル中で被分析物を操作し、被分析物を局在化し、例えば分離された被分析物の数を計数することにより被分析物を分析し、計数された被分析物の数をサンプル中の被分析物の数に相関し、被分析物を精製し、そして、例えば１以上の別の操作が完了した後に被分析物を収集することを含む。これらのステップ及び他のステップは順々に行われるか、又はこれらのステップの多く又は全ては一緒に行われうる。

【0017】

液体サンプルなどのサンプル中に存在する１以上の被分析物を分離する方法が本明細書中に記載される。典型的に、液体サンプルは、既知の体積であって、被分析物の分析の特定の類型を容易にする体積を有するであろう。「液体サンプルから被分析物を分離する」は、液体サンプルなどのサンプルから被分析物を取り出すことを意味する。サンプルから

分離される被分析物の量及び正確性は変化しうる。一の態様では、被分析物の有無の定性測定は、正確性を欠きかつ非効率的にサンプルから分離された被分析物に基いて行われうる。別の態様では、被分析物は、高まった正確性及び効率で分離される。この態様では、分離された被分析物は、さらなる操作、例えば本明細書中で議論される定量にかけられうる。分離された被分析物の純度は、かなり高純度なものからサンプル由来の不純物を含む被分析物までの範囲で変化しうる。開始サンプルに対する少なくとも２、５、１０、２５、５０、７５、１００、１５０、２５０、５００、７５０、１,０００、５,０００、１０,０００、及び２５,０００倍の精製度が達成されうる。

【0018】

一の態様では、該方法は、液体サンプルなどのサンプルを、フィルターに通すことを含む。典型的には、該フィルターは、微小孔物質を有するか又は微小孔物質から作られる。サンプルがフィルターを通過するとき、被分析物は、フィルターの表面付近に局在化されうる。開示されたフィルター及び微小孔物質は、多くの異なる表面、例えば平面的表面、外部表面、内部表面、湿表面、及びチャネル表面などを有する。被分析物は、しばしば微小孔物質を通り抜ける。微小孔物質は、複数の孔、穴、及び/又はチャネルを有する物質のいずれかである。微小孔物質は、液体が物質中に又は物質を通り流れることを許容する。

【0019】

特定の実施態様では、該物質は局在化され、そしてこの局在化は可逆的であり、そして別の実施態様では局在化は非可逆的である。局在化は、固定化される特徴も含み、このことは、被分析物が規定の領域に、分析、例えば計数又はアッセイされるために十分長く保持されるということを意味する。

【0020】

フィルター及び微小孔物質の特徴は、サンプル中の被分析物の分離及び/又は操作のパラメーターに影響する。特定の実施態様では、微小孔物質は複合体又は改変された微小孔物質であり、そしてこれらの複合体は、本明細書中に記載される。例えば該被分析物を直接観察することにより、又は被分析物に結合する標識のいくつかの類型についてアッセイすることにより、局在された被分析物を検出することが所望される。該検出は、従来からアナログ・シグナル検出技術と名付けられる技術により行われてきた。ここで全ての被分析物は、微小孔表面に局在された被分析物の数を表す「総」シグナルに関与する。加えて、本明細書中に開示される技術は、デジタル検出又は被分析物分子計数と名付けられるものを許容する。以下にさらに詳細に記載されるように、被分析物の分子計数は、被分析分子又は標識から実際に検出できるシグナル及び検出方法により観測されるバックグラウンドのシグナル量を含む多くの異なるパラメーターにより影響される。さらに、検出に必要とされるシグナルの閾値レベルが存在し、そして該閾値レベルは、使用される検出方法毎に異なる。フィルターの平面的表面に局在された特定の被分析物の「計数」を可能にするため、局在される被分析物分子又は標識からの絶対検出可能シグナルは、検出方法においてバックグラウンド・シグナルより高く、そしてシグナル検出についての絶対閾値より高い被分析物から観測されるシグナルが存在するように十分高いことが必要であり、そうでなければ被分析物は、局在されるが、計数されなくなってしまう。本明細書中に記載されるように、本明細書中に記載される微小孔物質は、フィルター内に使用されて、特定の検出方法用のフィルターにより産生されるバックグラウンド・シグナルを低減することができる。アナログ検出では、このバックグラウンド・シグナルの低減は、より少ない絶対数の被分析物を検出することを可能にする。なぜなら、被分析物からのより小さいシグナルであって、バックグラウンドを超えて観測されるシグナルが必要とされるからである。分子計数のようなデジタル検出では、バックグラウンド・シグナルの低下は、個々の分子のよりよい解像を可能にし、かつ分子の検出を大幅に改良する。こうして、開示された方法及び組成物は、被分析物検出におけるより良い感度を可能にし、つまり、サンプル中のより少ない数の被分析物の検出を可能にした。このことは、被分析物の有無を同定するためにより少ないサンプル及び試験物質の使用を可能にし、かつ感度及び正確性がより高い可

能性があるので望ましい。本明細書中に記載されるように、特定の実施態様では、複合体は、バックグラウンド・シグナルを低減するためにピグメントを使用する。

【0021】

被分析物質が微小孔物質、例えば複合体又は改変微小孔物質の表面付近に局在された時点で、さらなる処理ステップが行われうる。被分析物は、例えば増幅、検出、又は単離されうる。例えば、被分析物はまた、計数、相関、精製、又は収集されうる。

【0022】

本明細書中に記載される微小孔物質、方法、物品、及びキットは、慣用の被分析物の分離及び分析方法を超える改良を提供し、そして現行技術より単純化されている。さらに、本明細書中に記載される微小孔物質、方法、物品、及びキットは、分離したステップ、又は物質若しくは方法として個々に、或いは開示された物質及び方法のステップの組合せとして有用である。例えば、多種多様な不純物質から迅速にかつ単純に微小孔物質を通して核酸を単離する能力は、これらの単離された核酸が次に計数されるかどうかにかかわらず有用である。

【0023】

開示された物品並びに組成物及び微小孔物質の類型の様々な部分、並びに様々なステップ及び方法ステップのセットは、以下のより例示的な詳細において説明される。

【0024】

B．被分析物の局在

開示された方法は、サンプル中の被分析物を局在化するために一般的に使用される。使用されうるサンプルであって、被分析物の源となりうるサンプルの多くの異なった類型が存在する。

１．サンプル

液体は、例えば開示されたフィルター又は微小孔物質を通過するように機能するので、サンプルは典型的には液体である。被分析物を含むサンプル液体は、溶液又は懸濁液、例えば分子的に溶解された物質の溶液又は流体力学的に懸濁された物質を含む。被分析物を含むサンプル液体は、生体液、例えば全血、血清、血漿、脳脊髄液、尿、唾液、精液、痰、気管支肺胞洗浄液、関節吸引液(joint aspirate)、又は創傷排膿液(wound drainage)を含む。使用されうる別のサンプル液は、細菌、ウイルス、真菌、胞子、細胞培養、糞便、動物組織又は細胞、野菜組織又は細胞、それらの溶解された成分、又はそれらの組合せを含む。被分析物を含む固体サンプルは、ホモジェナイズされうるか、又はそうでなければサンプルの分析を容易にする溶液中に入れられることが理解されるだろう。

【0025】

別の態様では、被分析物の源は、環境サンプルでありうる。例えば、ポリマー又は他の化学物質などの汚染物質を含む排水でありうる。別の態様では、サンプルは、生物戦争サンプルであって、生物戦争薬剤で汚染された可能性があるサンプルと考えられるものでありうる。例えば、生物戦争サンプルは、飲料水サンプルなどの水サンプルであって、汚染された可能性のあるサンプルでありうる。別の態様では、サンプルは、空気サンプルでありうる。

【0026】

i．　既知体積サンプル

サンプルは、しばしば既知の体積状態において利用されるであろう。既知の体積サンプルとは、サンプルの体積又は量が知られているサンプルである。典型的には、処理の間の幾つかの点でサンプル中に存在する被分析物の濃度を測定することを望む場合、さらにサンプル中に存在する被分析物の量が、サンプルの由来元の生物における被分析物の量に相関させる場合、既知の体積サンプルを使用することは重要である。例えば、対象内にどれだけの量のウイルス粒子が存在するかを知ることが所望される場合、血液サンプルなどのサンプルは、対象から取られうる。開示された方法及び組成物を使用して、この血液サンプルが分析され、そしてサンプル中に存在する被分析物の量が測定されうる。どれだけ多くの被分析物が対象中に存在するかを決定するために、既知の体積のサンプル中にどれだ

け多くの分析物が存在するかを測定し、そして次にこれを、例えば対象の液体の全体積についての知見に基いて、対象中に存在する被分析物の量に当てはめることを必要とする。

【0027】

既知体積のサイズは、例えば、サンプル中の被分析物の量、被分析物の検出感度、又は被分析物について計画された操作の類型に左右されうる。例えば、サンプルが血液サンプルである場合、既知の体積は、遺伝子試験については、４０μｌ未満、３０μｌ未満、２０μｌ未満、１０μｌ未満、又は５μｌ未満でありうる。一方、ウイルス量試験についての血漿又はＣＳＦサンプルは、２００μｌ超、例えば２００μｌ～１０，０００μｌでありうる。別の態様では、被分析物を含むサンプルの量は、０．５μｌ～１，０００μｌ、０．５μｌ～９００μｌ、０．５μｌ～８００μｌ、０．５μｌ～７００μｌ、０．５μｌ～６００μｌ、０．５μｌ～５００μｌ、０．５μｌ～４００μｌ、０．５μｌ～３００μｌ、０．５μｌ～２００μｌ、０．５μｌ～１００μｌ、０．５μｌ～５０μｌ、０．５μｌ～２５μｌ、又は０．５μｌ～１０μｌである。別の態様では、サンプルが環境サンプル、例えば水、空気などである場合、サンプルの体積は、１ミリリットル超、例えば１０ｍｌ～１，０００ｍｌでありうる。

【0028】

２．被分析物

示されたように、開示された組成物及び方法は、情報が所望される被分析物を取り扱うように、典型的に設計される。微小孔物質上への局在化に必要とされる性質を有する被分析物のいずれかは、標的されうるか又は取り扱われうる。

【0029】

多数の被分析物は、本明細書中に記載される微小孔物質のいずれかの表面付近に局在化されうる。例えば、被分析物は、タンパク質、寄生虫、真菌、エフェクター分子、リガンド、レセプター、シグナル-生成分子、構造分子、イオン、抗原、抗体、組織、細胞、細菌、タンパク質、又はそれらの組合せでありうる。さらに、被分析物は、サスペンション・ポリマーに結合された標的分子のいずれかを含む。被分析物のこれらの類型は、局在効率を増加させる。例えば、ＤＮＡ及び抗体から構成されるサスペンション・ポリマーは、抗原を特異的に結合するために使用されうる。例えば、抗原は、１０００ｋＤａ未満の分子量であり、そして微小孔物質上に効率よく局在するためにはおそらく小さすぎる。抗原を、核酸に結合された抗体と最初に相互作用させることにより、例えば、該抗原は、核酸との会合に基いてより効率的に局在化されうる。特定の態様では、標的分子をサスペンション・ポリマーと反応させることにより、実質的に局在化効力が改良されうる。局在効率を増加するためのサスペンション・ポリマーの使用の更なる詳細は、以下に考察されている。

【0030】

被分析物を分類する１の方法は、該被分析物を局在化するために使用される微小孔物質の孔サイズに対する被分析物のサイズによる。例えば、被分析物は、微小孔物質における孔の直径の少なくとも１．５倍、２倍、３倍、４倍、６倍、８倍、１０倍、又は２０倍の輪郭線長(contour length)又は球形直径(globular diameter)を有しうる。特定の実施態様において、目標は、微小孔物質の表面付近に被分析物を局在化し、そして次に局在された分析物を検出することであると理解されている。孔サイズに対して被分析物が大きければ大きいほど、被分析物は、より効率よく局在されるであろう。つまり、微小孔物質を通り抜けることによって局在化位置から逃れる被分析物分子の数が、より少なくなることを意味する。しかしながら、孔のサイズが小さくなると、液体がフィルター又は物質を通過することができるスピードは減少し、そして所望の被分析物と伴に局在される不純物の数も高くなる。被分析物の大きさが測定され、そして使用される物質の適切な孔サイズを決定するために計算が使用され、そしてさらに、実験に基く分析が孔サイズを決定又は最適化するために使用されうるということも理解される。

【0031】

ｉ．　組織

サンプルは、生物の組織のいずれの類型からも取得されうる。例えば、特定の状況では、例えば、組織が血である場合、組織は直接使用されうる。しかしながら、別の状況では、組織は収集され、そして次に例えばホモジェナイザー又は粉砕により、取り扱われうる。

【0032】

４種の基本的な組織型が存在する。これらは、器官、構造、及び生物の別の構成要素の全てを作り出す。裏打ち、被覆、保護、吸収及び分泌する上皮細胞が、生物の中又は表面上に存在する。他の組織及び構成要素を一緒に保持する結合組織が存在する。血液は、結合組織とみなされる。互い通過しそして細胞のサイズを変化させる収縮性繊維を含む筋肉細胞を含む筋肉組織が存在する。最後に、神経組織が存在する。組織の１より多い類型を含む組織サブタイプ又は器官の例は、脂肪、乳房、脳、骨、腸、胃、皮膚、血液、肝臓、腎臓、子宮、前立腺、大腸、尿路、心臓、肺(pulmonary)、肺(lung)、筋肉、靭帯、腱、軟骨、精液、リンパ液などである。

【0033】

ｉｉ．細胞

細胞のいずれの類型は、被分析物として考えられうる。例えば、真核細胞及び原核細胞は、被分析物でありうる。被分析物でありうる真核細胞の例は、例えば哺乳動物細胞、爬虫類細胞、両生類細胞、及び鳥類細胞などの動物細胞、血液細胞、肝細胞、腎臓細胞、皮膚細胞、脳細胞、骨細胞、神経細胞、免疫細胞、リンパ細胞、脳細胞、植物細胞、及び真菌細胞の全ての類型である。別の態様では、被分析物は、細胞の構成要素であることもあり、非限定的に、核、核膜、白色体、小胞体、リボソーム、染色体、細胞膜、ミトコンドリア、核小体、リソソーム、ゴルジ体、ペルオキシソーム、又は葉緑体を含む。

ｉｉｉ．細菌

細菌の類型のいずれかは、被分析物でありうる。細菌の例は、非限定的にアビオトロフィア(Abiotrophia)、アクロモバクター(Achromobacter)、アシダミノコッカス(Acidaminococcus)、アシドボラックス(Acidovorax)、アシネトバクター(Acinetobacter)、アクチノバシラス(Actinobacillus)、アクチノバクルム(Actinobaculum)、アクチノマデュラ(Actinomadura)、アクチノマイシス(Actinomyces)、アエロコッカス(Aerococcus)、アエロモナス(Aeromonas)、アフィピア(Afipia)、アグロバクテリウム(Agrobacterium)、アルカリゲネス(Alcaligenes)、アロイオコッカス(Alloiococcus)、アルテロモナス(Alteromonas)、アミコラタ(Amycolata)、アミコラトプシス(Amycolatopsis)、アナエロボスピリラム(Anaerobospirillum)、アナエロラブダス(Anaerorhabdus)、アラクニア(Arachnia)、アルカノバクテリウム(Arcanobacterium)、アクロバクター(Arcobacter)、アルスロバクター(Arthrobacter)、アトポビウム(Atopobium)、アウレオバクテリウム(Aureobacterium)、バクテロイデス(Bacteroides)、バルネアトリクス(Balneatrix)、バルトネラ(Bartonella)、ベルゲイェラ(Bergeyella)、ビフィドバクテリウム(Bifidobacterium)、ビオフィリア(Bilophila)、ブランハメラ(Branhamella)、ボレリア(Borrelia)、ボルデテラ(Bordetella)、ブラシスピラ(Brachyspira)、ブレビバシラス(Brevibacillus)、ブレビバクテリウム(Brevibacterium)、ブレブンジモナス(Brevundimonas)、ブルセラ(Brucella)、ブルコルデリア(Burkholderia)、ブチアウゼラ(Buttiauxella)、ブチリビブリオ(Butyrivibrio)、カリマトバクテリウム(Calymmatobacterium)、カムピロバクター(Campylobacter)、カプノシトファーガ(Capnocytophaga)、カルジノバクテリウム(Cardiobacterium)、カトネラ(Catonella)、セデセア(Cedecea)、セルロモナス(Cellulomonas)、センチペダ(Centipeda)、クラミジア(Chlamydia)、クラミドフィラ(Chlamydophila)、クロモバクテリウム(Chromobacterium)、シセオバクテリウム(Chyseobacterium)、クリセオモナス(Chryseomonas)、シトロバクター(Citrobacter)、クロステリジウム(Clostridium)、コリンセラ(Collinsella)、コマモナス(Comamonas)、コリネバクテリウム(Corynebacterium)、コキセラ(Coxiella)、クリプトバクテリウム(Cryptobacterium)、デルフチア(Delftia)、デルマバクター(Dermabacter)、デルマトフィラス(Dermatophilus)、デスルフォモナス(Desulfomonas)、デスルフォビブリオ(Desulfovibrio)、ジアリスター(Dialister)、ジケルボバクター(Dichelo

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4835

bacter)、ドロシコッカス(Dolosicoccus)、ドロシグラヌルム(Dolosigranulum)、エドワードシエラ(Edwardsiella)、エゲルセラ(Eggerthella)、エクリキア(Ehrlichia)、エイケネラ(Eikenella)、エムペドバクター(Empedobacter)、エンテロバクター(Enterobacter)、エンテロコッカス(Enterococcus)、エルウィニア(Erwinia)、エリシペロスリクス(Erysipelothrix)、エスケリキア(Escherichia)、ユーバクテリウム(Eubacterium)、ユーインジェラ(Ewingella)、エキシグオバクテリウム(Exiguobacterium)、ファックラミア(Facklamia)、フィリファクター(Filifactor)、フラビモナス(Flavimonas)、フラボバクテリウム(Flavobacterium)、フランシセラ(Francisella)、フソバクテリウム(Fusobacterium)、ガルドネレラ(Gardnerella)、ベメラ(Gemella)、グロビカテラ(Globicatella)、ゴルドナ(Gordona)、ハエモフィラス(Haemophilus)、ハフニア(Hafnia)、ヘリコバクター(Helicobacter)、ヘロコッカス(Helococcus)、ホルデマニア (Holdemania)、イグナビグラヌム(Ignavigranum)、ジョンソネラ(Johnsonella)、キンゲラ(Kingella)、クレブシエラ(Klebsiella)、コクリア(Kocuria)、コセレラ(Koserella)、クルチア(Kurthia)、キトコッカス(Kytococcus)、ラクトバチルス(Lactobacillus)、ラクトコッカス(Lactococcus)、ロートロピア(Lautropia)、レクレルシア(Leclercia)、レジオネラ(Legionella)、レミノレラ(Leminorella)、レプトスピラ(Leptospira)、レプトトリキア(Leptotrichia)、ルコノストック(Leuconostoc)、リステリア(Listeria)、リストネラ(Listonella)、メガスファエラ(Megasphaera)、メチロバクテリウム(Methylobacterium)、ミクロバクテリウム(Microbacterium)、ミクロコッカス(Micrococcus)、ミツオケラ(Mitsuokella)、モビルンカス(Mobiluncus)、モエレレラ(Moellerella)、モラキセラ(Moraxella)、モルガネラ(Morganella)、マイコバクテリウム(Mycobacterium)、マイコプラズマ(Mycoplasma)、ミロイデス(Myroides)、ネイセリア(Neisseria)、ノカルディア(Nocardia)、ノカルディオプシス(Nocardiopsis)、オクロバクトラム(Ochrobactrum)、オエスコビア(Oeskovia)、オリゲラ(Oligella)、オリエンティア(Orientia)、パエニバシラス(Paenibacillus)、ペントエア(Pantoea)、パラクラミジア(Parachlamydia)、パスツレラ(Pasteurella)、ペディオコッカス(Pediococcus)、ペプトコッカス(Peptococcus)、ペプトストレプトコッカス(Peptostreptococcus)、フォトバクテリウム(Photobacterium)、フォトラブダス(Photorhabdus)、プレシモナス(Plesiomonas)、ポルフィリモナス(Porphyrimonas)、プレボテラ(Prevotella)、プロピオニバクテリウム(Propionibacterium)、プロテアス(Proteus)、プロビデンシア(Providencia)、シュードモナス(Pseudomonas)、シュードノカルジア(Pseudonocardia)、シュードラミバクター(Pseudoramibacter)、シクロバクター(Psychrobacter)、ラネラ(Rahnella)、ラルストニア(Ralstonia)、ロドコッカス(Rhodococcus)、リケッチア(Rickettsia)、ロカリマエア(Rochalimaea)、ロセオモナス(Roseomonas)、ローチア(Rothia)、ルミノコッカス(Ruminococcus)、サルモネラ(Salmonella)、セレノモナス(Selenomonas)、セルプリナ(Serpulina)、セラチア(Serratia)、シュウェンネラ(Shewenella)、シゲラ(Shigella)、シムカニア(Simkania)、スラッキア(Slackia)、スフィンゴバクテリウム(Sphingobacterium)、スフィンゴモナス(Sphingomonas)、スピリラム(Spirillum)、スタフィロコッカス(Staphylococcus)、ステノトロフォモナス(Stenotrophomonas)、ストマトコッカス(Stomatococcus)、ストレプトバチルス(Streptobacillus)、ストレプトコッカス(Streptococcus)、ストレプトマイシス(Streptomyces)、スクシニビブロ(Succinivibrio)、ステレラ(Sutterella)、ストネラ(Suttonella)、タツメラ(Tatumella)、ティシエレラ(Tissierella)、トラブルシエラ(Trabulsiella)、トレポネマ(Treponema)、トロフェリマ(Tropheryma)、ツァカムレラ(Tsakamurella)、ツリセラ(Turicella)、ウレアプラズマ(Ureaplasma)、バゴコッカス(Vagococcus)、ベイロネラ(Veillonella)、ビブリオ(Vibrio)、ウィークセラ(Weeksella)、ウォリネラ(Wolinella)、ザントモナス(Xanthomonas)、ゼノラブダス(Xenorhabdus)、イエルシニア(Yersinia)、及びヨケネラ(Yokenella)である。

【0034】

細菌の別の例は、マイコバクテリウム・ツベルクロシス(Mycobacterium tuberculosis)、M.ボビス(M. bovis)、M. チフィムリウム(M. typhimurium)、M. ボビスＢＣＧ株(M. bovis strain BCG)、ＢＣＧ亜種(BCG substrains)、M. アビウム(M. avium)、M. イン

トラセルラレ(M. intracellulare)、M. アフリカヌム(M. africanum)、M. カンサシ(M. kansasii)、M. マリヌム(M. marinum)、M. ウルセランス(M. ulcerans)、M.アビウム・サブスピーシーズ・パラツベルクロロシス(M. avium subspecies paratuberculosis)、スタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)、スタフィロコッカス・エピデルミジス(Staphylococcus epidermidis)、スタフィロコッカス・エキュー(Staphylococcus equi)、ストレプトコッカス・ピオゲネス(Streptococcus pyogenes)、ストレプトコッカス・アガラクチア(Streptococcus agalactiae)、リステリア・モノシトジェネス(Listeria monocytogenes)、リステリア・イヴァノヴィ(Listeria ivanovii)、バシラス・アンスラシス(Bacillus anthracis)、B. サチリス(B. subtilis)、ノカルディア・アステロイデス(Nocardia asteroides)、及び別のノカルディア種、ストレプトコッカス・ビリダン群(Streptococcus viridans)、ペプトコッカス種(Peptococcus)、ペプトストレプトコッカス種)(Peptostreptococcus)、アクチノマイシス・イスラエリ(Actinomyces israelii)及び別のアクチノマイシス種、並びにプロピオニバクテリウム・アクネ(Propionibacterium acnes)、クロストリジウム・テタニ(Clostridium tetani)、クロストリジウム・ボツリヌム(Clostridium botulinum)、別のクロストリジウム種、シュードモナス・アエルギノサ(Pseudomonas aeruginosa)、別のシュードモナス種、カンピロバクター種(Campylobacter)、ビブリオ・コレラ(Vibrio cholerae)、エシェリキア種(Ehrlichia species)、アクチノバシラス・プレウロニューモニア(Actinobacillus pleuropneumoniae)、パスツエラ・ヘモリティカ(Pasteurella haemolytica)、パスツエラ・ムルトシダ(Pasteurella multocida)、別のパスツエラ種、レジオネラ・ニューモフィラ(Legionella pneumophila)、別のレジオネラ種、サルモネラ・チフィ(Salmonella typhi)、別のサルモネラ種、シゲラ種(Shigella species)、ブルセラ・アボルツス(Brucella abortus)、別のブルセラ種、クラミジア・トラコマチス(Chlamydi trachomatis)、クラミジア・シタシ(Chlamydia psittaci)、コキシエラ・バーネッティ(Coxiella burnetti)、エシェリキア・コリ(Escherichia coli)、ネイセリア・メニジチジス(Neiserria meningitidis)、ネイセリア・ゴノレア(Neiserria gonorrhea)、ヘモフィラス・インフルエンザ(Haemophilus influenzae)、ヘモフィルス・デュクレイ(Haemophilus ducreyi)、別のヘモフィルス種、イエルシニア・ペスティス(Yersinia pestis)、イエルシニア・エンテロリチカ(Yersinia enterolitica)、別のイエルシニア種、エシェリキア・コリ(Escherichia coli)、E. ヒラエ(E. hirae)、及び別のエシェリキア種、並びに別のエンテロバクテリア(Enterobacteria)、ブルセラ・アボルツス(Brucella abortus)、及び別のブルセラ種(Brucella species)、バルコルデリア・セパシア(Burkholderia cepacia)、ブコルデリア・シュードマレイ(Burkholderia pseudomallei)、フランシセラ・ツラレンシス(Francisella tularensis)、バクテロイデス・フラジリス(Bacteroides fragilis)、フドバクテリウム・ヌクレアツム(Fudobasterium nucleatum)、プロベテラ種(Provetella species)、及びコウドリア・ルミナチウム(Cowdria ruminantium)、又はそれらの系統又は変種を含む。

【0035】

ｉｖ．ビリオン及びウイルス

ウイルスのいずれかの類型は、被分析物でありうる。ウイルスの例は、非限定的に１型単純ヘルペス・ウイルス(Herpes simplex virus type-1)、２型単純ヘルペス・ウイルス(Herpes simplex virus type-2)、サイトメガロウイルス(Cytomegalovirus)、エプステイン-バー・ウイルス(Epstein-Barr virus)、バリセラ-ゾスター・ウイルス(Varicella-zoster virus)、ヒト・ヘルペスウイルス６(Human herpesvirus 6)、ヒト・ヘルペスウイルス７(Human herpesvirus 7)、ヒト・ヘルペスウイルス８(Human herpesvirus 8)、バリオラ・ウイルス(Variola virus)、ベシクラー・ストマチチス・ウイルス(Vesicular stomatitis virus)、Ａ型肝炎ウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、Ｄ型肝炎ウイルス、Ｅ型肝炎ウイルス、ライノウイルス(Rhinovirus)、コロナウイルス(Coronavirus)、Ａ型インフルエンザ・ウイルス(Influenza virus A)、Ｂ型インフルエンザ・ウイルス(Influenza virus B)、メアスレス・ウイルス(Measles virus)、ポリマーウイルス(Polyomavirus)、ヒト・ポリオーマ・ウイルス(Human Papilomavirus)、呼吸器合胞体ウイルス（

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4837

Respiratory syncytial virus)、アデノウイルス(Adenovirus)、コクサッキー・ウイルス(Coxsackie virus)、デング・ウイルス(Dengue virus)、ムンプス・ウイルス(Mumps virus)、ポリオウイルス(Poliovirus)、ラビエ・ウイルス(Rabies virus)、ラウス・サルコーマ・ウイルス(Rous sarcoma virus)、黄熱病ウイルス(Yellow fever virus)、エボラ・ウイルス(Ebola virus)、マルバーグ・ウイルス(Marburg virus)、ラッサ熱ウイルス(Lassa fever virus)、東部ウマ脳炎ウイルス(Eastern Equine Encephalitis virus)、日本脳炎ウイルス(Japanese Encephalitis virus)、セントルイス脳炎ウイルス(St. Louis Encephalitis virus)、ムライ渓谷熱ウイルス(Murray Valley fever virus)、西ナイル・ウイルス(West Nile virus)、リフト・バレー熱ウイルス(Rift Valley fever virus)、A型ロタウイルス(Rotavirus A)、B型ロタウイルス(Rotavirus B)、C型ロタウイルス(Rotavirus C)、シンドビス・ウイルス(Sindbis virus)、サル免疫不全ウイルス(Simian Immunodeficiency virus)、１型ヒトT細胞白血病ウイルス(Human T- cell Leukemia virus type-1)、ハンタウイルス(Hantavirus)、ルベラ・ウイルス(Rubella virus)、トリ免疫不全ウイルス(Simian Immunodeficiency virus)、１型ヒト免疫不全ウイルス(Human Immunodeficiency virus type-1)、ワクシニア・ウイルス(Vaccina virus)、ＳＡＲＳウイルス(SARS virus)、及び２型ヒト免疫不全ウイルス(Human Immunodeficiency virus type-2)、又はそれらの系統又は変種のいずれかを含む。

【0036】

ｖ．寄生虫

寄生虫のいずれかの類型は、被分析物でありうる。寄生虫の例は、非限定的に、トキソプラスマ・ゴンジー(Toxoplasma gondii)、プラスモジウム・ファルシパルム(Plasmodium falciparum)、プラスモジウム・ビバクス(Plasmodium vivax)、プラスモジウム・マラリア(Plasmodium malariae)、別のプラスモジウム種、トリパノソーマ・ブルセイ(Trypanosoma brucei)、トリパノソーマ・クルジー(Trypanosoma cruzi)、リーシュマニア・メジャー(Leishmania major)、別のリーシュマニア種、シストソーマ・マンソーニ(Schistosoma mansoni)、別のシストソーマ種、エンタモエバ・ヒストリティカ(Entamoeba histolytica)、又はそれらの系統又は変種のいずれかを含む。

【0037】

ｖｉ．タンパク質

タンパク質のいずれかの類型は、被分析物でありうる。例えば、タンパク質は、ペプチド又はタンパク質若しくはペプチドの断片を含みうる。タンパク質は、微小孔物質における孔サイズに依存するいずれかの長さであり、そして１以上のアミノ酸又はそれらのバリアントを含む。タンパク質(１つ又は複数)は、分析前にプロテアーゼ分解などにより断片化されうる。分析されるタンパク質サンプルは、サンプルの複雑度を低減するために分画又は分離されうる。断片化及び分画は、同じアッセイにおいて一緒に使用されうる。そうした断片化及び分画は、タンパク質分析を単純化及び拡張できる。

【0038】

ｖｉｉ．抗体

いずれかの類型の抗体は、被分析物でありうる。本明細書中で使用されるとき、「抗体」という用語は、非限定的に全てのクラスの全免疫グロブリン(つまり、未処理の抗体)、２又は多数の抗原又はエピトープ特異性を有するキメラ抗体及びハイブリッド抗体、並びにハイブリッド断片を含むＦ(ａｂ')２、Ｆ(ａｂ')、Ｆａｂなどの断片を包含する。こうして、抗体の特異的抗原に結合する能力を保持する抗体断片が提供される。例えば、結合活性を維持する抗体断片は含まれる。そうした抗体及び断片は、当該技術分野に周知である技術により作られうる。抗体を産生する方法及び特異性及び活性について抗体をスクリーニングする方法は、Harlow and Lane. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988)を参照のこと。「抗体」という用語は、本明細書中で広い意味で使用され、そしてポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の両方を含む。無傷の免疫グロブリン分子に加えて、これらの免疫グロブリン分子の断片又はポリマー、並びにヒト又はヒト化免疫グロブリン分子又はその断片もまた、「抗体」とい

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4838

う用語の中に含まれる。例えば米国特許第4,704,692号に記載される抗原結合タンパク質(一本鎖抗体)と抗体断片の抱合体も、「抗体」の意味の中に含まれる。該文献の内容は、本明細書中に援用される。

【0039】

ｖｉｉｉ.抗原

抗原のいずれかの類型は、被分析物でありうる。本明細書中に使用される「抗原」は、投与された際、免疫応答を誘発でき、それにより抗原に特異的に結合する抗体の産生及び放出を刺激する物質を含む。抗原は、抗体により特異的に結合されて、抗原/抗体複合体を形成する分子及び/又は成分を含む。抗原の例は、非限定的にペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、ＤＮＡ、ＲＮＡ、多糖、それらの組合せ、それらの断片、又はそれらのミメティクスを含む。

【0040】

ｉｘ．真菌

真菌のいずれかの類型は、被分析物でありうる。真菌の例は、非限定的に、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)、クリプトコッカス・ネオフォーマンス(Cryptococcus neoformans)、ヒストプラマ・カプスラツム(Histoplama capsulatum)、アスペルギルス・フミガツス(Aspergillus fumigatus)、コッシドデス・イミチス(Coccidiodes immitis)、パラコシジオデス・ブラシリエンシス(Paracoccidiodes brasiliensis)、ブラストマイシス・デルミチジス(Blastomyces dermitidis)、ネモシスチス・カルニ(Pneomocystis carnii)、ペニシリウム・マルネッフィ(Penicillium marneffi)、及びアルテルナリア・・アルテルネート(Alternaria alternate)、並びにそれらの変種又はことなる系統を含む。

【0041】

ｘ．エフェクター分子

被分析物は、エフェクター分子でありうる。「エフェクター種」、「エフェクター」、及び「分子エフェクター」とも呼ばれる「エフェクター分子」は、エネルギーを仕事に、仕事をエネルギーに、仕事又はエネルギーを情報に、又は情報を仕事又はエネルギーに変換することができる選択された分子であり、非限定的に、シグナル-生成種、刺激-応答分子、応答-生成分子、酵素、合成酵素、薬剤、触媒抗体、触媒、収縮性タンパク質、輸送タンパク質、制御タンパク質、酸化還元タンパク質、酸化還元酵素、酸化還元メディエーター、シトクロム、電気活性化合物、光反応性化合物、超分子、超分子デバイス、及び形状-記憶構造、又はそれらのバリアント若しくは誘導体のいずれかを含む。

【0042】

ｘｉ．リガンド

いずれの類型のリガンドは、被分析物でありうる。「リガンド」という用語は、親和性に基いた相互作用によりレセプターに特異的に結合できる分子である。リガンドは、非限定的に、レセプターアゴニスト、部分アゴニスト、混合アゴニスト、アンタゴニスト、応答-誘導又は刺激分子、薬、ホルモン、フェロモン、伝達物質、オータコイド、成長因子、サイトカイン、補欠分子族、補酵素、コファクター、基質、前駆物質、ビタミン、トキシン、制御因子、抗原、ハプテン、炭水化物、分子擬態、プリント(print)分子、構造分子、エフェクター分子、選択分子、ビオチン、ジゴキシゲニン、及びコンジナー、交差反応物質、アナログ、コンペティター、又はそれらの分子の誘導体、並びにライブラリーから選ばれた分子であって選ばれた標的に特異的に結合できる分子、及びこれらの分子のいずれかを第二の分子に付着させることにより形成された抱合体、又はそれらの誘導体又はバリアントを含む。

【0043】

ｘｉｉ．レセプター

被分析物は、レセプターでありうる。「レセプター」という用語は、親和性に基く相互作用によりリガンドに特異的に結合できる分子である。「レセプター」は、非限定的に、生物学的、合成の、又は遺伝子組換えにより作られた膜レセプター、ホルモン・レセプター、薬物レセプター、伝達物質レセプター、オータコイド・レセプター、フェロモン・レ

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4839

セプター、刺激応答カップリング又は受容性分子、抗体、抗体断片、遺伝子組換えされた抗体、抗体模倣物又はミメティクス、分子模倣物、分子インプリント、分子認識単位、接着分子、凝集素、レクチン、セレクティング(selecting)、細胞レセプター、アビジン及びストレプトアビジン、及びコンジェナー、アナログ、コンペティター、又はそれらの分子の誘導体、並びに非オリゴヌクレオチド分子であって、例えばコンビナトリアル方法及び/又はライブラリースクリーニングにより、別の選択された分子に特異的に結合するように選ばれる分子、及びこれらの分子のいずれかを第二分子に付着させることにより形成される抱合体を含む。レセプターは、さらに、構造分子、エフェクター分子、及びリガンドを含む選択分子、或いはその誘導体又はバリアントのいずれかを特異的に認識することができる選択分子をさらに含む。

ｘｉｉｉ．シグナル生成分子

被分析物は、シグナル生成分子でありうる。「シグナル生成分子」及び「シグナル生成種」は、検出できるシグナルを生成するか、物質の検出性を高める若しくは調節するか、或いは物質のエネルギー、活性、出力、若しくはシグナルを、定性的、定量的又は検出可能な異なるエネルギー、活性、出力、シグナル、状態、若しくは形態に変換することができる分子である。或いは、シグナル-生成分子は、標的分子と相互作用でき、局在できる被分析物を生成する。シグナル-生成分子は、非限定的に、分子、分子群、抱合体及び複合体であって、検出可能な(及び場合により染色された、改変された、結合された、標識された、又は誘導体化された)タグ、トレーサー、ラジオアイソトープ、ラベル、レポーター、ポリマー、集光複合体、アンテナ構造、天然及び合成の並びにバイオミメティックの光合成分子、反応中心、光化学系、シグナル伝達経路、分子カスケード、巨大分子、微小粒子、ナノ粒子、コロイド、金属、色素、フルオロフォア、蛍光体、及び別の光子吸収体、光子放出体、及び感光性分子を含むもの、例えば、別の分子又は基の光子吸収又は光子放出性質を増強、減弱、転調、又は消光する分子、エネルギー転移ドナー及びアクセプター、酵素、補酵素、コファクター、触媒抗体、合成酵素及び触媒、分子模倣物及びミメティクス、発光、摩擦発光、音発光、電気発光、化学発光、及び生物発光分子、電子伝達ドナー及びアクセプター、酸化及び還元化合物、メディエーター及び別の電気活性分子、代謝性、光活動性、シグナル及びシグナル処理分子であって、生物学的及び生物ミメティックのプロセス及びシステムにおいてエネルギーを捕捉及び伝達するために使用される分子、例えば場合により天然、合成、ミメティック骨格を含み、組織的及びカップリング分子、シャペロン及びアクセサリー生物又バイオミメティック分子、或いは第一の形態のエネルギー又は情報を第二の形態のエネルギー又は情報への変換に関わる分子群を含む。

【0044】

ｘｉｖ．構造分子

被分析物は、構造分子のいずれかでありうる。実施例は、非限定的に、元素、原子、分子、イオン、及び化合物であって、表面、親水・疎水の両性表面(amphibious surfaces)、無機及び有機金属、例えば炭素、シリコン、ガラス、有機及び無機結晶、選択された溶媒、選択された溶質、天然の、バイオミメティックの、及び合成のナノ構造及び微小構造、ファイバー、フィラメント、シルク、分子骨格、ナノチューブ、ナノロッド、フラーレン、バッキーボール、ダイヤモンド様分子、半導体、絶縁体、金属、プラスチック、エラストマー、ポリマー、界面活性剤、潤滑剤、ワックス、オイル、粉末、フィラー、賦形剤、繊維、錠剤化成分、パッケージング物質、紙、工業用プラスチック、環状及び多環分子、デンドロン、デンドリマー、電解質、及び多価電解質、塩、炭化水素、セラミックス、及び生物の、生物適合の、生物ミメティックの、生分解性の、及び刷り込み可能な(Imprintable)モノマー、マルチマー、及びポリマー、例えば脂肪酸、脂質、界面活性剤、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、ポリアミン、ポリ酸、糖、スターチ、セルロース、グリコシル化分子、グリコポリマー、及びそれらの抱合体を含むものを含む。

ｘｖ．イオン

被分析物は、いずれのイオンでありうる。イオンの例は、アルカリ金属イオン、アルカリ土類金属イオン、遷移金属イオン、又はランタノイド金属イオンを含む。一の態様では

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4840

、キレートは、イオンを含むサンプルへと加えられ、局在化の前に、イオン/キレート複合体を形成する。この態様では、イオン、キレート、及び/又はイオン/キレート複合体は、被分析物である。別の態様では、キレートは、イオンと相互作用できる微小孔物質の表面付近に共有結合されうる。

ｘｖｉ．核酸被分析物

一の態様では、被分析物は核酸である。デオキシリボ核酸(ＤＮＡ)、リボ核酸(ＲＮＡ)、及びペプチド核酸(ＰＮＡ)は、重合体であり、特定の条件下で水溶液中に可溶性の多イオン性分子である。ｐＨ、イオン強度、対イオン、電荷中和、水和、有機沈殿、分子組成物などに応じた溶液中における核酸の推定の三次元構造は、当業者に周知である。一の態様では、核酸は、一本鎖又は二本鎖ＤＮＡ又はＲＮＡでありうる。

【0045】

本明細書中に開示される様々な分子であって、核酸に基いた分子が存在し、例えば本明細書中に開示される核酸及び別のタンパク質のいずれか、並びに様々な機能性核酸を含む。開示される核酸は、例えばヌクレオチド、ヌクレオチド・アナログ、又は代替ヌクレオチドから作られる。これら及び別の分子の非制限的な例は、本明細書中で考察される。例えば、ベクターが細胞において発現される場合、発現されたｍＲＮＡは、典型的にＡ、Ｃ、Ｇ、及びＵから作られるということが理解される。

ｘｖｉｉ．核酸及び関連分子

核酸は、塩基部分、糖部分、及びリン酸エステル部分を含む分子である。ヌクレオチドは、ヌクレオシド間の結合を作るリン酸エステル部分及び糖部分を介して結合されうる。ヌクレオチドの塩基部分は、アデニン-９-イル(Ａ)、シトシン-１-イル(Ｃ)、グアニン-９-イル(Ｇ)、ウラシル-１-イル(Ｕ)、及びチミン-１-イル(Ｔ)でありうる。ヌクレオチドの糖部分は、リボース又はデオキシリボースである。ヌクレオチドのリン酸エステル部分は、５価リン酸エステルである。ヌクレオチドの非制限的な例は、３’-ＡＭＰ(３’-アデノシン・一リン酸)又は５’-ＧＭＰ(５’-グアノシン一リン酸)である。

【0046】

ヌクレオチド・アナログは、塩基、糖、又はリン酸エステル部分のいずれかに対する幾つかの類型の改変を含むヌクレオチドである。ヌクレオチドに対する改変は、当該技術分野に周知であり、そして例えば、５-メチルシトシン(５-ｍｅ-Ｃ)、５-ヒドロキシメチル・シトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、及び２-アミノアデニン、並びに糖又はリン酸部分における改変を含む。

【0047】

代替ヌクレオチドは、ヌクレオチドに類似の機能性質を有するが、リン酸エステル部分を含まない分子であり、例えばペプチド核酸(ＰＮＡ)である。代替ヌクレオチドは、ワトソンクリック又はフーグステン型の核酸を認識するが、リン酸エステル部分以外の部分を解して互いに結合される分子である。代替ヌクレオチドは、適切な標的核酸と相互作用するとき、二重ヘリックス型の構造を構成することができる。

【0048】

例えば細胞取り込みを高めるために、別のタイプの分子(抱合体)をヌクレオチド又はヌクレオチドアナログに結合することができる。抱合体は、化学的にヌクレオチド又はヌクレオチド・アナログに結合される。そうした抱合体は、非限定的に、コレステロール部分などの脂質部分を含む(Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989,86, 6553-6556)。

【0049】

ワトソン-クリック相互作用は、ヌクレオチド、ヌクレオチド・アナログ、又は代替ヌクレオチドのワトソン-クリック面との少なくとも１の相互作用である。ヌクレオチド、ヌクレオチド・アナログ、又は代替ヌクレオチドのワトソン-クリック面は、プリンに基いたヌクレオチド、ヌクレオチド・アナログ、又は代替ヌクレオチドのＣ２、Ｎ１、及びＣ６位、並びに、ピリミジンに基いたヌクレオチド、ヌクレオチド・アナログ、又は代替ヌクレオチドのＣ２、Ｎ３、Ｃ４位を含む。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4841

【0050】
フーグステン相互作用は、ヌクレオチド又はヌクレオチド・アナログのフーグステン面であって、二重鎖ＤＮＡのメジャー・グルーブに晒される面上で生じる相互作用である。フーグステン面は、Ｎ７位、及びプリンヌクレオチドのＣ６位における反応性基（NH_2又はＯ）を含む。
【0051】
こうして、核酸は、一般的に塩基と呼ばれるヌクレオチドから作られるポリマーである。核酸分子は、核酸を作り上げる塩基の数により特徴付けることができる。例えば、特定の態様では、核酸被分析物は、少なくとも、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、１４５、１４６、１４７、１４８、１４９、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、２９５、３００、３２０、３４０、３６０、３８０、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００、２０００、２１００、２２００、２３００、２４００、２５００、２６００、２７００、２８００、２９００、３０００、３２００、３４００、３６００、３８００、４０００、４５００、５０００、５５００、６０００、６５００、７０００、７５００、８０００、８５００、９０００、９５００、１００００、１１０００、１２０００、１３０００、１４０００、１５０００、１６０００、１７０００、１８０００、１９０００、２００００、２５０００、５００００、１００００００、２００００００、３００００００、４００００００、５００００００、及び１０００００００塩基又は塩基対の長さである。別の態様では、ＤＮＡ又はＲＮＡは、少なくとも約１５００塩基又は塩基対を有する。
【0052】
核酸の１次構造は直線であり、各塩基又は塩基対は、完全に伸ばされた輪郭線長（contour length）とすると、おおよそ０．３４ｎｍになる。様々な核酸の代表的な輪郭線長を表１に示した。
【0053】
【表1】

表１

核酸	塩基又は塩基対	輪郭線長
オリゴ・プローブ	40	0.013ミクロン
	200	0.068ミクロン
	1,000	0.340ミクロン
HIV RNA	9,000	3.06ミクロン
Ｔ４ファージ・ゲノム	160,000	54.4ミクロン
Ｅ．コリ　ゲノム	420万	1,428ミクロン

【0054】

核酸分子の推定の直径は、約２ｎｍであり、並外れて異方性で高い縦横比の一次構造をもたらす。高次構造(例えば、２次、３次など)は、核酸についてよく知られており、そしてかなり環境に左右される。有機性、イオン性、又はポリマー性の沈殿剤がない水溶液中では、核酸は、コイル型又は弛緩型の三次元立体配置として通常記載されるが、既知の試薬で可逆的に球形又は凝集体へと沈殿される。同様に、コイル型の核酸は、以下の溶液中で、例えば伸張、分子配向などの実質的な３次元変化を受ける。

【0055】

一の態様では、本明細書中で記載される微小孔物質、方法、及び物品は、診断目的用に生物学的液体から核酸を単離することができる。高感度アッセイは、統計的に有意となる十分な核酸を補足するため、２００μｌ以上の患者サンプルを必要とする。市販のウイルス量アッセイは、標的ウイルス核酸に基いた標的又はシグナル増幅技術(例えばＰＣＲ、βＤＮＡなど)を使用する。つまり、これらの技術は、ビリオンを溶解後にサンプル液体中に存在する全ウイルス核酸を定量する。「ビリオン」は、完全な成熟ウイルス粒子である。溶解前のサンプル液体中に存在する未封入ウイルス核酸も、全量の一部として含まれてしまう。未封入ウイルス核酸は、非感染性であると広くみなされているので、それらを全ウイルス量に含めてしまうことにより、計測が不正確になってしまう。

【0056】

未封入核酸の大部分を分析前に取り除くことにより、現存するウイルス量アッセイを改良するために使用されうる方法及び物質が本明細書中に記載される。一の例では、アッセイされるビリオンは、ＨＩＶビリオンである。患者サンプル(例えば血漿、血清、ＣＳＦ、生物戦争抽出液など)は、本明細書中に記載される微小孔物質を通してろ過される。微小孔物質は、可溶性核酸(例えば、ｓｓＤＮＡ、ｄｓＤＮＡ、ｓｓＲＮＡ、ｄｓＲＮＡ)並びに直径が数ミクロンより大きい細胞要素の全てを局在させる。無傷のビリオンは、フィルターを通過し、そして患者サンプルのろ液は、ウイルス核酸を遊離させるために溶解される。次にウイルス核酸を遊離するため溶解した。該溶解された患者サンプルろ液は、ろ過され、次に第二微小孔物質をとおして洗浄され、ビリオン由来の核酸を第二微小孔物質の表面付近へと局在させた。

【0057】

３．フィルター

ろ過は、フィルターの流路寸法に対する分子の大きさに主に基く分離方法と考えられる。ろ過は、微小孔物質の孔の寸法が小さく均一であるためフィルターの入口表面上でろ過が主に起こる表面ろ過、或いは微小孔物質の孔が蛇行経路構造を有し、そして粒子をフィルターの深部にトラップする深部フィルターに一般的に分類される。

【0058】

本明細書中に記載される微小孔物質であって、複合体及び改変された微小孔物質を含む微小孔物質のいずれかは、フィルターとして製造されうる。一の態様では、微小孔物質は、例えばビーズ又は膜などのフィルターへと成形されうる。ビーズは、システムの要求に依存して、直径数ミリメートル～直径１ミクロン未満でありうる。ビーズは、球形であるか、不規則な形であるか、又は要求される形のいずれにも形成されうる。ビーズの大きさは、その用途に応じて変化しうる。ビーズは、均一の多孔物質であるか、又は限定された空隙率を有する中心を覆う微小孔表面を示す。さらに、ビーズは、磁性体、常磁性体でありうるか、又はビーズの分離を手助けする別の性質を有しうる。

【0059】

膜は、限られた厚さを有する２次元構造である。一の態様では、膜フィルターは、１ミクロン未満～１００ミクロン超の厚さを有する。一の態様では、該膜は、１ミクロン～１００ミクロン、１０ミクロン～９０ミクロン、２０ミクロン～８０ミクロン、３０ミクロン～７０ミクロン、又は４０ミクロン～６０ミクロンの厚さを有する。別の態様では、０．２ミクロン・アノポア(Ａｎｏｐｏｒｅ)(商標)無機酸化膜は、典型的に４０～５０ミクロンの厚さであり、一方、０．０２ミクロン・アノポア膜は、厚さ１ミクロン未満のとても薄い０．０２ミクロンの孔の層を有し、該層は、厚さ約４０ミクロンである０．２ミク

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4843

ロンの支持層上に重層している。従って、膜は、被分析物局在表面として、支持物質上に形成されるか又は作られうる。この支持物質は、強度、取り扱いの容易さ、流量の性質、熱的性質などの有用な特性をシステムに付与する。この態様では、支持物質、及びそれゆえ膜は、全体の要求に沿う様々な形、大きさ、及びデザインでありうる。

【0060】

本明細書中に記載される方法において、表面フィルター又は深部フィルターは、被分析物を分離及び局在する前に、サンプルから不純物及び別の破片を前以ってろ過するために使用されうる。試験サンプルのろ過性の改良を手助けするために、当業者に知られる別の技術は、本明細書中に記載される物品のいずれかと組み合わせて使用されうる。これらは、巨大な不純物を取り除くために試験サンプルを前以ってろ過するか、又は酵素の使用、界面活性剤の使用、カオトロピック剤の使用、超音波及び熱処理、タンパク質沈殿などを含むサンプル分解などによる試験サンプルの処理を含む。

４．表面

微小孔物質は、多くの異なる表面を有する。例えば、平面的表面、外部表面、内部表面、及び湿表面がある。微小孔物質から構成されるフィルターの模式図は、図１ａ及び１ｂにおいて図示される。図１ａは、微小孔物質１００を示すフィルターの上面図であり、ここで１１０は、微小孔物質における多数の穴又は孔のうちの一つをあらわす。これらの穴は、均一の間隔又は大きさである必要はないが、多くの実施態様では、均一の間隔又は大きさである。フィルターに付随する多くの異なる表面が存在する。図１ｂは、微小孔物質を有するフィルターの断面図である。例えば、微小孔物質の外部表面１３０により作られる平面、並びに複数の孔及び穴に起因する開口部１１０により定義される平面的表面１２０が存在する。内部表面１４０は、微小孔物質を貫通するチャネル１５０により形成される。

【0061】

５．被分析物の微小孔物質との相互作用

ｉ．局在

被分析物が、本明細書中に記載される微小孔物質のいずれかと接触されるとき、微小孔物質は、被分析物が微小孔物質中に入り込むこと及び微小孔物質を通り抜けることを妨げるか又は阻害する。微小孔物質は、被分析物と相互作用して、微小孔物質を通した被分析物の分子崩壊を実質的に妨げる。一の態様では、表面ろ過は、被分析物を迅速に局在化し、そして濃縮するために使用されうる。表面ろ過の効率は、種々のパラメーター、例えば、被分析物対孔サイズ比、ろ過される液体中の不純物の組成、及び被分析物と表面との相互作用に左右されるであろう。

【0062】

上に記載される態様では、被分析物を含むサンプルが、微小孔物質と接触するときに、被分析物は、微小孔物質上に局在される。本明細書中に使用される「局在される」という用語は、物質の表面付近における被分析物の濃度の増加として定義される。こうして、被分析物の微小孔物質内への流れ込み、及び/又は微小孔物質通過が低減又は抑制される。

【0063】

局在された被分析物は、微小孔物質の表面付近に存在し、そして微小孔物質内にはトラップされない。図１ｂを参照すると、本明細書中で使用される「表面付近」は、(1)微小孔物質の平面的表面の下１０ミクロンの領域、該領域は１６０である、(2)微小孔物質の平面的表面１２０の近接部、又は(3)平面的表面の上２５μｍの領域、該領域は１７０である、として定義される。一の態様では、被分析物の全体又は一部は、微小孔物質の平面的表面の多くとも１０ミクロン下に存在する。一の態様では、被分析物が、平面的表面に近接する場合、該被分析物は、微小孔物質の外部表面と直接接触する。一の態様では、被分析物は、平面的表面の下、孔の深さに対して１０％、孔の深さに対して８％、孔の深さに対して６％、孔の深さに対して４％、孔の深さに対して３％、又は孔の深さに対して２％の位置に存在する。一の態様では、被分析物は、微小孔物質の平面的表面の下、１０μｍ、５μｍ、４μｍ、３μｍ、２μｍ、１μｍ、又は０．５μｍ～平面的表面の上２５μ

ｍ、１０μｍ、９μｍ、８μｍ、７μｍ、６μｍ、５μｍ、４μｍ、３μｍ、２μｍ、１μｍの位置に存在する。ここで、平面的表面の下の端点のいずれもが、平面的表面の上の端点のいずれかと共に使用されうる。

【0064】

一の態様では、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、又は９０％の被分析物は、微小孔物質の表面付近に局在化される。別の態様では、局在化される被分析物の量は、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９.５％、又は１００％である。一の態様では、標的の被分析物は、個々の単離された分子としての微小孔分子の表面付近に濃縮される。この態様は、以下に記載される分子計測に有用である。別の態様では、標的分子は、微小孔物質の表面付近の互いの上面上に層状になりうる。機械的ろ過による被分析物の局在化は、次の処理用の純粋な被分析物の取得方法であって、極めて早く、複雑ではない方法を提供する。

【0065】

さらに、分子計数用に被分析物質を保持するために拡散制御反応を必要とする先行技術とは異なって、本明細書中に記載される微小孔物質は、微小孔表面付近に被分析物を局在させるための弱い表面相互作用を使用する。例えば、被分析物が核酸である場合、可逆性の核酸処理、並びにフィルター表面に急速に核酸を局在させるための強力な表面相互作用、例えばハイブリダイゼーション、共有結合などは、本明細書中に記載される微小孔物質のいずれかを使用した場合に可能になる。任意なものであるが、局在化される核酸に相補的である結合性オリゴヌクレオチドが、該核酸を局在化させるために微小孔上に存在することは必要とされない。別の態様では、極度に感度の高いウイルス量アッセイにおいて見られる極度に低濃度の核酸を検出するために、微小孔物質は、光学的分子計数技術とともに使用されて、分子増幅なしに核酸濃度を直接決定することを可能にする。このことは、高い濃縮の効果、並びに微小孔物質の表面付近に局在された核酸の優れた検出性のため可能になる。

【0066】

上で記載されるように、核酸の分離は、微小孔物質の表面付近における核酸と表面との弱い相互作用により促進される。しかしながら、分子規模(molecular scale)について厳密に考えると、核酸は、ミクロンサイズの規模に変形可能であり、特定の条件下では、実際のフィルターの孔の直径を通り抜けうる。局在化により核酸を選別することは、被分析物が崩壊して微小孔物質内に入ることを妨げるために、被分析物質と微小孔物質との間の相互作用を含む。この点から見て、微小孔物質中に存在する孔の大きさは、いつ微小孔物質を選ぶかを考慮するために変化する大きさである。孔は、被分析物を効率的に除外するために十分小さくあるべきであるが、サンプル液体中に残存する不純物の早い通過を可能にするために十分大きくあるべきである。該技術の模式的描写は、図２に図示される。

【0067】

図２a及び２ｂに示されるように、被分析物２００は、溶液流２４０からの機械的なろ過により、複数の微小孔２２０とフラット２３０を有する微小孔物質２１０の表面付近に局在された。被分析物２００の長さは、微小孔２２０の寸法に比べて大きく、そして図２aに図示されるように幾つかのか開口部に物理的にまたがう。

【0068】

図２ｂに示されるように、表面相互作用は、局在化被分析物２００とフラット２３０の露出した表面との間におこる。ポリマーと表面との間の相互作用は、広く試験され、そして実質的に０の相互作用から完全な共有結合による固定化まで変化する。機械システムに純粋に類似することによって、図２ｂの溶液２４０がフィルターを通して流れる場合、被分析物２００は、被分析物２００とフラット２３０との間に生じる剪断力２６０に支えられる分子張力２５０により微小孔２２０にわたって支えられる。このことは、既知の分子変形能力に関連して実際のろ過に所望される比較的大きい孔直径の結果である。大きな被分析物が多くの孔にまたがっていることを考慮にいれても、剪断力２６０は、被分析物２

００が崩壊して微小孔２２０を通過することを防ぐために必要とされる。

【0069】

シリカ又は別の多孔支持体の孔の中に吸着/沈降することに頼る周知の被分析物の精製方法論とは異なって、被分析物が核酸である場合、核酸局在に必要とされる弱い相互作用が、穏和な条件下における可溶性、コイル形態の核酸において達成される。一の態様では、可逆性核酸処理についての弱い表面相互作用が考慮される。別の態様では、ハイブリダイゼーション、共有結合などの強力な表面相互作用は、迅速な核酸局在化のために使用されうる。

【0070】

ｉｉ．固定化

「局在化」という用語はまた、微小孔物質の表面付近に被分析物質を固定化することを含む。本明細書中で使用される「固定化」という用語は、計数されるのに十分長い時間微小孔物質の表面付近の特異的領域に被分析物を制止することとして定義される。一の態様では、被分析物は、特異的検出期間の間、１μm^3の領域に固定化される。「局在化」という用語はまた、被分析物を微小孔物質の表面付近に濃縮することも含む。本明細書中に使用される「被分析物の濃縮」は、濃縮された被分析物の純度に関わらず、決められた領域で、微小孔物質の表面付近に被分析物を集積することとして定義される。被分析物が、微小孔物質の表面付近に局在される場合、被分析物は、可逆的に又は非可逆的に微小孔物質に結合されうる。被分析物が「可逆的に」結合される場合、被分析物の大部分が、微小孔から取り外されうる。逆に、被分析物が「不可逆的に」結合される場合、被分析物の大部分を微小孔物質から取り外すことができない。

【0071】

６．局在化条件

一の態様では、被分析物の局在化を手助けするために、様々な無機塩は、場合によりサンプル溶液中に使用されうる。例えば、ＮａＣｌなどの塩又はグアニジニウム・イソチオシアネート、グアニジニウム・ヒドロクロリドなどを含むカオトロピック塩は、望まれるとき、サンプル溶液中にも使用されうる。一の態様では、使用される塩の濃度は、２Ｍ未満、例えば１．８Ｍ、１．６Ｍ、１．４Ｍ、１．２Ｍ、１．０Ｍ、０．８Ｍ、０．６Ｍ、０．４Ｍ、０．２Ｍ、０．１Ｍ、０．０５Ｍでありうる。ここで、濃度のいずれかは、別の濃度とともに範囲を形成しうる(例えば０．１Ｍ～１．８Ｍ)。

【0072】

別の態様では、緩衝液は、局在化を促進するため、被分析物を含むサンプルへと加えられうる。一の態様では、トリス、カーボネート／バイカーボネートなどは使用されうる。別の態様では、リン酸緩衝液は、微小孔物質上への被分析物の保持を無効にするために使用され、そうして、被分析物は、所望されるなら次の分析のため微小孔物質から容易に取り除かれうる。リン酸イオンは、酸化アルミニウム・クロマトグラフィーの充填剤に結合することが知られており、並びに微小孔物質上の同じ弱い結合部位と競合できる。一の態様では、緩衝液は、サンプルのｐＨを制御する為に使用されうる。一の態様では、約４より低いｐＨ値は、緩衝イオンとは無関係の核酸局在の高い効率をもたらす。別の態様では、９～１０より高いｐＨ値は、アミン改変された微小孔表面でさえ局在効率の低下を示す。一の態様では、サンプルｐＨは、タンパク質沈降を最小化するために、サンプルのｐＨは、６～８の範囲に維持される。このｐＨ範囲では、核酸を効率よく局在化するための微小孔物質の能力は、表面の改変、塩濃度、及び緩衝塩などのイオン添加物により左右される。別の態様では、酵素又は界面活性剤は、サンプル中に存在しうる。別の態様では、後でより十分に記載されるように、様々な緩衝液、塩、タンパク質、界面活性剤などの局在化についての効果は、微小孔表面と被分析物との間の相互作用の性質に左右される。例えば、０．２ミクロンの公称の孔サイズを有する平面的、改変されていない無機金属酸化物の微小孔、例えばアノポア０．２ミクロン膜フィルター表面上への核酸の局在化は、塩濃度を伴うことにより局在効率の増加を示す。本明細書中に記載されるように、この塩効果は、この塩がカオトロピック塩であるかに左右されない。さらにこの塩効果は、低濃度の

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4846

塩のみが効果的な局在化を作り出すために必要とされていることを示し、該濃度は、一般的に１モル濃度未満、通常１００ミリモル濃度未満である。アミン改変アノポア０．２ミクロン膜フィルターは、塩濃度とは独立である効率的な局在を示す。

【0073】

微小孔表面をコートする物質、例えば、タンパク質、界面活性剤などは、被分析物－表面相互作用の改変によって局在化に影響しうる。例えば、タンパク質及び界面活性剤は、未改変０．２ミクロンアノポア膜フィルターについて一般的に低い局在効率であるが、アミン改変フィルターにおいてほとんど効果を有さない。以前に記載されるように、特定のイオン例えば、リン酸、ホウ酸、重炭酸などは、おそらく微小孔表面上の弱い結合部位について被分析物と競合することによって、未改変の平面的０．２ミクロンアノポア膜フィルター上における核酸の局在化に影響しうる。一の態様では、アミン改変された０．２ミクロンのアノポア膜フィルターは、イオン効果のかなりの低下を示した。

【0074】

７．微小孔物質

本明細書中で使用される「微小孔物質」という用語は、複数の孔、穴、及び／又はチャネルを有する物質のいずれかである。この微小孔物質は、液体が、物質を通過して流れるか又は物質内に流れることを可能にする。微小孔物質は、１ミクロン未満の寸法を有する小さく均一であり、高密度である穴又は孔を一般的に有する。微小孔物質は、局在された被分析物を分析するために使用される特定の検出技術に応じて、場合により可視光、紫外線、又は赤外線に対し透過型でありうる。微小孔物質は、該物質を通した早い水の流れを可能にするため親水性でありうる。微小孔物質は、望まれる場合、場合により不透明(opaque)でありうる。微小孔物質は、簡単な取り扱いのため良好な機械的強度、低い非特異性結合、及び被分析物と比較的反応しない性質を有する。本明細書中で使用される「微小孔物質」という用語は、以下に記載される複合体及び改変微小孔物質のいずれかを含む。

【0075】

一の態様では、微小孔物質は、約０．０２ミクロン～約０．２ミクロンの範囲の大きさの直径を有しうる。無傷の細菌、細胞、粒子などのかなり大きい被分析物では、大きい孔サイズが意図される。以前に議論されたように、孔の大きさが大きいほど、幾つかの例で一般的に見られる不純物で栓される傾向が少なくなる。１０ミクロンまでの孔のサイズは、特定のサンプルの分析について意図されうる。別の態様では、孔の直径は、約０．０２ミクロン～約０．１８ミクロン、約０．０２ミクロン～約０．１６ミクロン、約０．０２ミクロン～約０．１４ミクロン、約０．０２ミクロン～約０．１２ミクロン、約０．０２ミクロン～約０．１ミクロン、約０．０４ミクロン～約０．２ミクロン、約０．０６ミクロン～約０．２ミクロン、約０．０８ミクロン～約０．２ミクロン、又は約０．１ミクロン～約０．２ミクロンでありうる。

【0076】

微小孔物質は、高濃度の小さく、均一な穴又は孔を有するか、又はそうした材料へと変換されうる物質のいずれかから構成されうる。そうした物品の例は、非限定的に、無機物質、ポリマーなどを含む。一の態様では、微小孔物質は、セラミック、金属、炭素、ガラス、金属酸化物、又はそれらの組合せである。別の態様では、微小孔物質は、トラック・エッチ(track etch)物質、電気化学的に形成された無機物質などを含む。「電気化学的に形成された無機物質」という用語は、金属を金属酸化物へと電気的に変換することにより形成される物質として本明細書中に定義される。「トラック・エッチ物質」という用語は、物質内に穴を作りだすために、ポリマー膜上に電離放射線を使用することにより形成される物質として定義される。そうした物質は、市販されている。米国特許第5,716,526号に開示される微小孔物質のいずれもが使用されうる。該文献は、その全てを援用される。さらなる態様では、微小孔物質が金属酸化物である場合、該金属酸化物は、酸化アルミニウム、酸化ジルコニウム、酸化チタン、ゼオライト、又はそれらの組合せを含む。ゼオライトの例は、非限定的に、米国特許第4,304,675号;第4,437,429号;第4,793,833号;及び第6,284,232号に記載される。これらの文献は、その全てを本明細書中に援用される。一の

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4847

態様では、微小孔物質が、金属酸化物である場合、金属酸化物は、１以上の金属塩を様々な量で含みうる。例えば、リン酸アルミニウム、塩化アルミニウム、又は硫酸アルミニウムなどのアルミニウム塩は、微小孔物質の一部でありうる。

【0077】

一の態様では、微小孔物質は、電気鋳造された無機金属酸化物であり、例えば米国特許第6,225,131号において記載される。該文献の開示は、本明細書中に援用される。そうしたセラミック膜は、Whatman, Incから販売され、そしてアノポア(商標)及びアノディスク(Anodisc)(商標)という商標名で流通している。アノポア膜は、各孔がおおよそ直径０．２ミクロン×長さ５０ミクロンを有する蜂の巣上の構造を有する。アノポア膜は、少量のリン酸アルミニウム(５～１０％)を伴う酸化アルミニウムから主に構成される。この態様では、これらの微小孔物質は、以下の望ましい特徴を有する：可視光スペクトルにおいて実質的に非蛍光であり；かなり均一な孔構造であり；高密度の孔及び高い液流速であり；比較的硬く；平面的であり；及び濡れたとき場合により透明であり；高い融点であり及びプラスチックに容易に熱溶接でき；比較的生物学的に不活性であり、そして非特異的結合が少なく、又はタンパク質、核酸などの変性効果が少ない。

【0078】

別の態様では、微小孔物質は、被分析物の表面局在化を高めるために化学的に改変されうる。例えば、核酸は負に荷電された分子であり、微小孔物質は、正の荷電を有するように様々な化学物質で処理されて、その結果、核酸は、イオン性の引力を介して微小孔物質の表面付近に留まる。そうした、弱い引力は、核酸が微小孔物質を通り抜けることを妨げる点で役に立つ。一の態様では、微小孔物質は、弱い正の表面荷電を与えるために、非限定的に、アミノプロピルトリメトキシシラン(ＡＰＳ)、エチレンジアミノプロピルトリメトキシシラン(ＥＤＡＰＳ)、又は別のアミノシラン試薬を含むシラン化試薬で前処理されうる。別の態様では、被分析物局在を高めることを目的としわずかな表面荷電を与えるために、微小孔物質は、非限定的にポリリジンを含むポリマー物質で前処理されうる。従って、微小孔物質は、被分析物の保持を変化するため、ジオールなどの中性試薬で改変されうる。該ジオールの例は、酸加水分解されたグリシドキシプロピルトリメトキシシラン(ＧＯＰＳ)である。

【0079】

本明細書中に記載される微小孔物質のいずれかは、当業者に周知の技術により改変されうる。一の態様では、ＥＤＡＰＳ改変された微小孔物質は、約５％のＥＤＡＰＳを分子研究品質(molecular grade)の水に室温で溶解することにより調製されうる。水溶液は、約５分間室温でインキュベーションされて、トリメトキシ基を加水分解させた。この溶液は、およそ１ｃｍ²あたり１ミリリットルの流速で、約５分間かけて微小孔物質をとおしてろ過され、活性化微小孔物質は、約４０℃で吸引オーブン中で脱水された。乾燥微小孔物質は、次に、等量の１／ＴＥ緩衝溶液(１０ｍＭ・トリス－ＨＣｌ(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩基)、１ｍＭ・ＥＤＴＡ(エチレンジアミン四酢酸)緩衝液など、ｐＨ７～８)を数回ろ過することにより洗浄されて、表面のｐＨを調節した。該微小孔物質を、等量の分子研究用品質の水で数回ろ過し、そして次に再び脱水した。乾燥フィルターは、室温で乾燥状態で保存された。別の態様では、ジオール改変膜フィルターは、ＥＤＡＰＳの代わりにＧＯＰＳを使用し、そして吸着されたエポキシドをジオールに変換する周知の酸加水分解ステップを含むことにより同様に作られうる。

【0080】

８．組成物

市販される微小孔物質のいくつか、例えばアノポア無機酸化物膜は、低い自己蛍光を有した。しかしながら、幾つかの用途では、少量の自己蛍光でさえ有害である。例えば、蛍光顕微鏡は、生物学的及び形態学的分析において広く使われる強力な分析ツールである。弱い蛍光標本は、並外れて低い自己蛍光を伴う表面、例えば処理融合シリカ、ガラス、またはクリスタリン・シリコン上で調製されなければならない。直接ろ過表面上の小粒子(例えば、細胞、ビリオン、核酸、など)の蛍光分析は、典型的にろ過膜自己蛍光により制

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4848

限される。無機酸化微小孔物質は、ポリマー製の膜よりずっと低い自己蛍光を示すが、該自己蛍光は、弱い蛍光粒子の分析には高すぎることもある。

【0081】

上記されるように、アノポア膜は、各孔がおよそ直径０．２ミクロン×長さ５０ミクロンの蜂の巣状の構造を有する。微小孔物質の内部領域は、外部表面領域よりずっと大きい。実際、アノポア膜の内部湿領域は、投影表面領域より、典型的に５００倍大きい。いくつかの場合、この巨大内部表面領域は、外部表面上に存在する粒子の光学分析に有害である。例えば、生物学的細胞は、蛍光標識された特異的タンパク質の結合反応により頻繁に分析される。理論的には、微小孔物質の表面付近に未知細胞を局在化し、続いて局在された細胞を蛍光標識されたタンパク質に晒すシステムが開発されうる。結合していないタンパク質を微小孔物質から洗い流した後に、局在化細胞と標識タンパクとの間の特異的結合反応は、局在された細胞の蛍光の増加により検出される。残念ながら、全ての表面は、非特異結合(ＮＳＢ)と知られるものを示す。すなわち、少量の標識タンパク質は、細胞上の特異的レセプターがない微小孔物質に結合する。多くの光学検出器は、特異的に標識された表面局在化細胞から生じる特異的シグナルと、透明微小孔物質の内部における巨大内部膜表面領域に非特異的に結合される蛍光タンパク質から生じるシグナルを区別することができない。上記微小孔物質は、効果的にサンプル粒子を、分析のためその表面に濃縮及び局在化できるが、微小孔物質の巨大内部表面領域へのＮＳＢは、有用な感度を頻繁に制限する。

【0082】

これらの問題を解決するため、微小孔物質の光学的性質(例えば自己蛍光、内部光学散乱、及び蛍光ＮＳＢの検出)を変化するために改変された微小孔物質から構成される組成物が本明細書中に記載される。一の態様では、微小孔物質は、物質自身由来(自己蛍光)又は内部に結合されたトレーサー又は汚染物質由来(ＮＳＢ)の物質内部から生じる検出可能な蛍光及び散乱を低減するために、微小孔物質を光学的に不透明にするように改変される。

【0083】

ｉ．ピグメントを含む複合体

本明細書中で使用される「複合体」という用語は、２以上の物質から構成される製品である。材料の選別に依存し、材料は、複合体を作り出すために互いに反応することもあるし、又は反応しないこともある。一の態様では、複合体は、微小孔物質及びピグメントから構成される。本明細書中で使用される「ピグメント」という用語は、微小孔物質の光学的性質を改変する化合物のいずれかである。ピグメントは、微小孔物質中に取り込まれる。本明細書中に使用される「微小孔物質中に取り込まれる」という用語は、ピグメントを微小孔物質に付着する方法のいずれかとして定義される。ピグメントの微小孔物質への付着は、共有結合、イオン性相互作用を介してなされ、微小孔物質の孔によるピグメントのトラップ、又はピグメントを微小孔物質の表面付近及び/又は微小孔物質の内部表面に沈積することによる。ピグメントは、微小孔物質の湿表面のいずれか上に取り込まれうる。本明細書中に記載される複合体のいずれかは、本明細書中に記載される物品、方法、又はキットのいずれかに使用されうる。

【0084】

複合体は、ピグメントを微小孔物質中に取り込むことにより形成される。一の態様では、ピグメントは、微小孔物質に共有結合される。「微小孔物質に共有結合される」というフレーズは、本明細書中で、リンカーが存在しない状態で、ピグメントと微小孔物質との間での直接的な化学結合を形成すると定義される。例えば、微小孔物質の表面上の成分は、共有結合を形成するためにピグメント上に存在する成分と反応しうる。例えば、微小孔物質の表面上の成分は、ピグメント上に存在する成分と反応して、共有結合を形成しうる。ピグメントは、微小孔物質のいずれの湿表面(つまり、内部及び外部表面)に共有結合されうる。ピグメントと反応しうる微小孔物質に結合される成分の例は、非限定的に水酸基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、アミン基、又はそれらの組合せを含む。

【0085】
或いは、「共有結合」という用語はまた、リンカーを使用して、微小孔物質の表面にピグメントを付けることを含む。例えば、リンカーは、微小孔物質の表面上の成分と結合を形成することができる成分、並びにピグメントと共有結合を形成することができる成分を有する化合物のいずれかでありうる。リンカー上の成分は、選ばれる微小孔物質及びピグメントに依存して同じであるか又は異なりうる。一の態様では、リンカーは、オルガノシリル基である。シラン化は、以前に記載され、そして物質の表面を改変するよく知られた化学方法であり、そして様々な有機分子を結合するための反応性表面を作成するためにさらに使用されうる。例えば、アミン末端の反応性シラン化試薬、例えばアミノプロピル・トリメトキシシラン(ＡＰＳ)及びエチレンジアミノプロピル・トリメトキシシラン(ＥＤＡＰＳ)は、タンパク質リンカーと共有反応できる表面を作るために使用されうる。さらに、エポキシ末端の反応性シラン化試薬、例えば、グリシドキシプロピル・トリメトキシシラン(ＧＯＰＳ)は、色素、タンパク質、又は他の試薬中の求核試薬と直接反応できる表面を作るために使用されうる。一の態様では、微小孔物質は、様々な有用な表面の官能性、例えば、カルボキシレート、スルフヒドリル、ヒドロキシ、芳香族、疎水性などを与える他のシラン化試薬で、当業者により改変されうる。シラン化合物のいずれかは、米国特許第5,959,014号に開示されるシラン化合物のいずれかは、この態様で使用されうる。該文献は、その全てを援用される。
【0086】
一の態様では、有機色素の形態におけるピグメントは、微小孔物質の湿表面に共有結合される。本明細書中で使用される「有機色素」という用語は、化合物が微小孔物質中に取り込まれる場合、微小孔物質の光学性質を改変できる有機化合物のいずれかとして定義される。シラン改変された微小孔物質への色素の付着は、直接的であり、そして選ばれる特異的付着化学に依存する。例えば、アミノ改変された微小孔物質(例えば、ＡＰＳ又はＥＤＡＰＳ)は、非限定的にイソチオシアネート、トリアジン、及び活性エステルを含む既知のアミノ反応性色素の幾つかの化学ファミリーと反応できる。米国特許第6,630,018号;第6,623, 908号;第5,985,514号;及び第5,294,870号に開示される有機色素のいずれかは、本明細書中に開示される複合体を作るために使用さうる。これらの文献は、その全てを援用される。
【0087】
別の態様では、有機色素は、微小孔物質との共有結合を形成することなく微小孔物質を染めることができる。例えば、有機色素は、微小孔物質の孔の中に取り込まれうる。さらに、有機色素は、例えばポリリジンなどの表面に結合されたポリマーに付着されうる。
【0088】
選ばれる有機色素は、最終的に所望される膜の性質によって決まる。例えば、トリアジニル色素は、布地、紙など用の繊維と反応する永続的色素、並びに分析用標識として広く使用される。それらは、蛍光及び非蛍光色素の両方として利用できる。ジクロロトリアジニルアミノフルオレセイン(ＤＴＡＦ)は、強力な蛍光黄色物質を作り出すために、改変された微小孔物質と反応しうる。低い蛍光トリアジニル色素、例えばリアクティブ・ブルー４(Reactive Blue４)、又は有機色素のプロシオンＭＸ(Procion MX)シリーズからの選択したものは、低減された自己蛍光、ＮＳＢ蛍光、及び微小孔物質散乱を与えるために使用されうる。
【0089】
一の態様では、複合体は、酸化アルミニウムから構成される微小孔物質を含み、そしてピグメントは、有機色素であり、ここで該有機色素は、オルガノシリル基により酸化アルミニウムへと共有結合される。別の態様では、微小孔物質はアノポアである。
【0090】
別の態様では、ピグメントは、微小孔物質上に沈積される。「微小孔物質上に沈積される」という用語は、微小孔物質の湿表面のいずれかの上にピグメントを沈積する方法のいずれかとして本明細書中に定義される。一の態様では、得られた沈殿物又は沈積物は、イ

オン性化合物、非イオン性化合物、元素化合物またはそれらの組合せから構成されうる。一の態様では、ピグメントは、遷移金属、金属酸化物、合金、又はそれらの組合せなどの元素化合物である。遷移金属の例は、パラジウム、ニッケル、銀、金、又はそれらの組合せを含む。別の態様では、カーボン・ブラック含有物は、微小孔物質の孔内に沈積されうる。

【0091】

一の態様では、ピグメントは、無電解メタライゼーション加工により、微小孔物質上に沈積されうる。無電解メタライゼーション加工は、高縦横比のナノメートル規模の孔型構造中に金属合金を沈積することについて、当業者に知られている。不導体無電解質メタライゼーション加工は、開始のための表面触媒を必要とする。一の態様では、パラジウム金属は、幾つかの形態において使用され、コロイド懸濁液、イオン性液体、及び金属イオンであって、微小孔物質の表面上で化学的に還元されて金属製のナノスケール・クラスターを形成するものを含む。これらのパラジウム・ナノ粒子は、無電解メタライゼーションの成長部位を形成しうる。

【0092】

ろ過効率に影響を与えることなく、微小孔物質の光学性質を変化させることは望ましい。多くのメタライゼーション加工は、最初に黒色沈積物(パラジウム・ブラック、ブラック・ニッケル、シルバーなど)を形成した。これは、第一メタライゼーション沈積物のかなり粗い(ナノ規模の)不連続の性質のためであり、酸化などを含みうる表面反応を伴って表面上に離れた「島」を形成する。無電解メタライゼーションの当業者は、微小孔物質の孔内の黒色色素沈積物の形成を最大限にするために、反応条件、試薬などを選ぶことができる。これらの沈積物は、非蛍光性であることが分かっており、そして膜流速に最小限の効果しか有しない。

【0093】

一の態様では、複合体は、酸化アルミニウムと１以上の遷移金属元素から構成されるピグメントを含み、ここで該ピグメントは、微小孔物質上に沈積されている。一の態様では、微小孔物質は、アノポアである。別の態様では、遷移金属元素は、他の元素、例えばリン、ホウ素又はそれらの組合せを伴うパラジウム、ニッケル、又はそれらの組合せである。

【0094】

さらに、特定のナノスケールの金属粒子が、プラスモン共鳴として知られる作用を受けることが広く知られている。一の態様では、この作用は、一般的に１０～２００ナノメートルの寸法の範囲のサイズにおける金及び銀粒子で生じた。正確に表面上に間隔を空けて配置された場合、そうした粒子の集合は、プラスモン共鳴表面として記載されるものを形成しうる。これらの表面は、固有の光学性質、例えば高められた吸収、蛍光、エネルギー移転などを示しうる。例えば、特定の分子のラマン散乱は、プラスモン共鳴と合わせて、桁違いに高められうる。さらに、ある体積中に正確に間隔を空けて配置される場合、プラスモン共鳴粒子の集合は、固有の光学性質を有するプラスモン共鳴体積として記載されうるものを形成しうる。プラスモン共鳴体積が孔であるなら、分子相互作用は、巨大内部のプラスモン共鳴表面内で生じ、反応比をかなり亢進する。例えば、本明細書中に開示されるように、ナノスケールの金属沈積物は、微小孔物質の孔内で形成されうる。制御された条件下で、これらの沈積物は、プラスモン共鳴表面の形成に一致するサイズ範囲及び表面密度で金又は銀から形成されうる。微小孔物質が、適切な寸法及び間隔で選ばれる場合、プラスモン共鳴は、隣接する孔の間で生じ、そしてプラスモン共鳴体積をもたらす。

【0095】

C．局在された被分析物の操作

被分析物が微小孔物質上に局在化されると、当業者に周知の技術を使用してさらに処理されうる。以下の技術は、例示であり、そして行われる異なる類型の技術に制限することを意図されない。

【0096】

１．増幅

一の態様では、被分析物が核酸である場合、局在された核酸は、非限定的にポリメラーゼ・チェーン反応、核酸配列に基いた増幅、イソサーマル方法論、リガーゼ・チェーン反応、及びストランド置換増幅を含む増幅技術を使用して分析された。米国特許第4,683,195号；第4,683,202号；第4,965,188号；第5,130,238号；第5,354,668号；第5,427,930号；及び第5,455,166号において開示される増幅技術のいずれかは、本明細書中に記載される方法のいずれかにおいて使用されうる。これらの文献は、その全てを本明細書中に援用される。使用される増幅技術に依存して、核酸の特定の領域又は核酸全体は、増幅されうる。一の態様では、被分析物が、微小孔物質の表面付近に不可逆的に局在化される場合、増幅は、微小孔物質の表面付近で起こる。別の態様では、被分析物が可逆的に微小孔物質の表面付近に局在化される場合、増幅は、微小孔物質の表面付近でおこるか及び/又は被分析物が微小孔物質の表面付近にもはや存在しない溶液中で起こる。

【0097】

一の態様では、核酸は、

（ａ）増幅された核酸を作り出すために既知の体積を有する液体サンプル中で核酸を増幅し、そして

（ｂ）増幅された核酸を含むサンプルを、本明細書中に記載される微小孔物質のいずれかに通すこと

により増幅される。ここで該増幅された核酸は、複合体の表面付近に局在される。

【0098】

別の態様では、核酸は、

（ａ）　既知の体積を有し、核酸を含む液体サンプルを、本明細書中に記載されるいずれかの微小孔物質に通し、ここで該核酸は、複合体の表面付近に局在され、そして

（ｂ）　該核酸を増幅すること

により増幅される。

【0099】

２．ハイブリダイゼーションと同定

以下は、本明細書中に開示されるハイブリダイゼーション/同定方法において使用されうる化合物の異なる類型について論じる。

ｉ．配列

本明細書中に開示されるハイブリダイゼーション/同定方法で使用されうる様々な配列が存在し、これらの全ては、核酸又によりコードされるか、又は核酸である。これらの遺伝子のヒトアナログ、並びに別のアナログ、及びこれらの遺伝子のアレル、及びスプライスバリアント及び別のバリアントの類型は、ジェンバンク(Genbank)を含む様々なタンパク質及び遺伝子データーベースにおいて利用できる。この出願の出願時にジェンバンクで利用できる配列は、その全て並びにその中に含まれる個々のサブシーケンスを本明細書中に援用される。ジェンバンクには、http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgiでアクセスできる。当業者は、配列の相異及び違いの決定の仕方、及び特定の配列を別の関連配列と関連付ける組成物及び方法の調節の仕方を理解する。プライマー及び/又はプローブは、本明細書中に開示されそして当該技術分野に周知である情報を与えられた既知配列のいずれかについて設計されうる。

【0100】

ある実施態様では、この産物は、少なくとも、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５

０、４７５、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１２５０、１５００、１７５０、２０００、２２５０、２５００、２７５０、３０００、３５００、又は４０００のヌクレオチド長である。

【0101】

別の実施態様では、産物は、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１２５０、１５００、１７５０、２０００、２２５０、２５００、２７５０、３０００、３５００、又は４０００ヌクレオチド長に等しいか又はそれ未満である。

【0102】

ａ．機能性核酸

機能性核酸とは、例えば、標的分子を結合し又は特異的反応を触媒するなどの特別な機能を有する核酸分子である。機能性核酸分子は、以下のカテゴリーに分類されうる。このことは制限することを意味しない。例えば、機能性核酸は、アンチセンス分子、アプタマー、リボザイム、トリプレックス形成分子、及び外部のガイド配列を含む。機能性核酸分子は、標的分子により所有される特異的活性のアフェクター、阻害因子、調節因子、及び刺激因子として作用しうるか、又は該機能性核酸分子は、いずれの別の分子とは独立した新規の活性を有する。

【0103】

機能性核酸分子は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ポリペプチド、又は糖鎖などの巨大分子のいずれかと相互作用しうる。こうして、機能性核酸は、開示された核酸のいずれかのｍＲＮＡと相互作用しうる。機能性核酸は、標的分子と機能性核酸分子との間の配列ホモロジーに基いた別の核酸と相互作用するように設計される。別の状況では、機能性核酸分子と標的分子との間の特異的な認識は、機能性核酸分子と標的分子との間の配列ホモロジーに基かないが、むしろ特異的認識が起こることを可能にする三次構造に基く。

【0104】

ｉｉ．抗体

ａ．抗体全般

「抗体」という用語は、広い意味で本明細書中で使用されており、そしてポリクローナル及びモノクローナル抗体の両方を含む。未処理の免疫グロブリン分子に加えて、これらの免疫グロブリン分子の断片若しくはポリマー、及びヒト又はヒト化バージョンの免疫グロブリン分子若しくはそれらの断片は、「抗体」という用語の中に含まれる。抗体は、本明細書中に開示されるｉｎ ｖｉｔｒｏアッセイを使用して、又はそれらのｉｎ ｖｉｖｏ治療及び/又は予防活性が該試験の後に既知の臨床試験方法に従って試験される類似の方法によりそれらの所望の活性について試験されうる。

【0105】

本明細書中で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な集団の抗体から得られた抗体のことを指す。つまり、該集団内の個々の抗体は、抗体分子の小サブセットにおいて存在しうる自然に生じうる突然変異を除いて、同一である。本明細書中のモノクローナル抗体は、特異的に「キメラ」抗体を含む。

キメラ抗体において、重鎖及び/又は系さの一部は、特定の種由来又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体における対応配列と同一であるか又は相同であり、一方、鎖(1つ又は複数)の残りは、別の種由来又は別の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体、並びにそうした抗体の断片における対応する配列に同一であるか又は相同である(

米国特許第4,816,567号、及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)を参照のこと)。

【0106】

開示されたモノクローナル抗体は、モノクローナル抗体を作り出すいずれかの方法を使用して作られうる。例えば、開示されるモノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature, 256: 495 (1975)に記載される方法などのハイブリドーマ法を使用して調製されうる。ハイブリドーマ法において、マウス又は別の適切な宿主動物は、免疫化剤に特異的に結合する抗体を作る又は作り出すことができるリンパ球を導くために典型的に免疫化剤で免疫化された。或いは、リンパ球は、in vitroにおいて、例えば、本明細書中に記載されるＨＩＶ　Ｅｎｖ-ＣＤ４-コ-レセプター複合体を使用して免疫化されうる。

【0107】

モノクローナル抗体はまた、組換えＤＮＡ方法、例えば米国特許第4,816,567号(Cabilly et al.)に記載の方法より作られうる。開示されるモノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチド・プローブを使用することによる)慣用の方法を使用して、容易に単離及び配列決定されうる。抗体又は活性抗体断片のライブラリーはまた、ファージ・ディスプレー技術(例えば、Burton et al.,に対する米国特許第5,804,440号及びBarbas et al.,に対する米国特許第6,096,441号)を使用して、作成及び選別されうる。

【0108】

in vitro方法はまた、一価抗体を調製するために適している。抗体断片、特にＦａｂ断片を作り出す抗体の切断は、当該技術分野に周知であるルーチン技術を使用して達成されうる。例えば、切断は、パパインを使用しておこなわれうる。パパイン切断の例は、１９９４年１２月２２日に発行されたWO94/29348及び米国特許第4,342,566号において記載される。抗体のパパイン切断は、典型的にＦａｂ断片と呼ばれる２個の同一抗原結合性の断片を産生し、ここで各々は、一の抗原結合性部位、及び残渣Ｆｃ断片を伴う。ペプシン処理は、２の抗原混同部位を有する断片を作り出し、そして抗原を架橋することができる。

【0109】

抗体又は抗体断片の活性が、非改変型の抗体又は抗体断片に比較して有意に変化しないか又は損なわれないならば、断片は、他の配列に繋がれていようといまいと、挿入、欠失、置換、又は特定領域若しくは特異的アミノ酸残基の選ばれた改変を含みうる。これらの改変は、例えばジスルフィド結合をできるアミノ酸を取り除くか又は加えるため、生物-寿命を増加するため、その分泌特性を変換するためなどの幾つかの更なる性質を与える。幾つかの場合、抗体又は抗体断片は、その同起源の抗原への特異的な結合などの生物活性性質を有さなければならない。抗体又は抗体断片の機能又は活性領域は、タンパク質の特異的領域を突然変異させ、次に発現されたポリペプチドを発現及び試験することにより同定されうる。そうした方法は、当業者に明らかであり、そして抗体又は抗体断片をコードする核酸を部位特異的突然変異生成することを含む(Zoller, M. J. Curr. Opin. Biotechraol. 3: 348-354,1992).

【0110】

本明細書中に使用されるとき、「抗体」又は「抗体(複数)」は、ヒト抗体及び/又はヒト化抗体を指しうる。多くの非ヒト抗体(例えば、マウス、ラット、又はウサギ由来)は、ヒトにおいて天然抗原性を有し、そして、それゆえヒトに投与されるとき、不所望の免疫応答を生じうる。それゆえ、該方法におけるヒト又はヒト化抗体の使用は、ヒトに投与された抗体が不所望の免疫応答を引き起こす機会を減らすために役に立つ。

【0111】

ｂ．ヒト抗体

開示されたヒト抗体は、いずれかの技術を使用して調製されうる。ヒト・モノクローナル抗体の産生技術の例は、Cole et al. (Monoclonal Antibodies and Cancer T7zerapy, Alan R. Liss, p. 77,1985) 及びBoerner et al. (J. Imfsautaol., 147 (1) : 86-95,1991)により記載される。ヒト抗体(及びそれらの断片)は、ファージ・ディスプレイ・ライ

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4854

ブラリーを使用して産生されうる(Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227: 381,1991 ; Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581, 1991)。

【0112】

開示されたヒト抗体は、トランスジェニック動物からも取得されうる。例えば、免疫化に応答して、ヒト抗体のレパートリーの全てを産生できるトランスジェニック、ミュータント・マウスは、記載されてきた(例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551-255 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7: 33 (1993)を参照のこと)。キメラ及び生殖細胞系列の突然変異マウスにおける抗体の重鎖結合領域(J(H))遺伝子のホモ欠失により、内在性の抗体産生が完全に阻害され、そしてヒト生殖細胞系列の抗体遺伝子のアレイをそうした生殖細胞系列突然変異マウスへとうまく移すことにより、抗原に晒された際、ヒト抗体の産生がもたらされる。所望される活性を有する抗体は、本明細書中に記載されるようにＥｎｖ－ＣＤ４－コーレセプターを使用することにより選択される。

【0113】

ｃ．ヒト化抗体

抗体ヒト化技術は、抗体分子の１以上のポリペプチドをコードするＤＮＡ配列を操作する組換えＤＮＡ技術の使用を一般的に含む。従って、非ヒト抗体(又はそれらの断片)のヒト化形態は、キメラ抗体又は抗体鎖(又はそれらの断片、例えばＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ'、又は抗体の他の抗原結合部位)であって、ヒト(レシピエント)抗体のフレームワーク中に組み込まれた非ヒト(ドナー)抗体由来の抗原結合部位の一部を含むものである。

【0114】

ヒト化抗体を作るために、レシピエント(ヒト)抗体の１以上の相補決定領域(ＣＤＲｓ)由来の残基を、ドナー(非ヒト)抗体分子であって、所望の抗原結合性質(例えば、標的抗原に対する特異性及び親和性の特定のレベル)を有すると知られている分子の１以上のＣＤＲｓ由来の残基により置換される。幾つかの例では、ヒト抗体のＦｖフレームワーク(ＦＲ)残基は、対応する非ヒト残基により置換される。ヒト化抗体は、レシピエント抗体において又は組み込まれたＣＤＲ、或いはフレームワーク配列においても見られない残基も含みうる。一般的に、ヒト化抗体は、非ヒトの源から該ヒト化抗体に導入される１以上のアミノ酸残基を有する。慣用的に、ヒト化抗体は、典型的に、幾つかのＣＤＲ残基及びおそらく幾つかのＦＲ領域が、げっ歯類抗体のアナログ部位由来の残基により置換されるヒト抗体である。ヒト化抗体は、抗体定常領域の少なくとも一部、典型的には、ヒト抗体の一部を含む(Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986), Reichmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988), and Presta, Curr. Opin. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992))。

【0115】

非ヒト抗体のヒト化方法は、当該技術分野に周知である。例えば、ヒト化抗体は、Winterとその同僚の方法(Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986), Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988), Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988))に従って、げっ歯類のＣＤＲｓ又はＣＤＲ配列を対応するヒト抗体配列に置換することにより作成されうる。ヒト化抗体の産生のために使用されうる方法はまた、米国特許第4,816,567(Cabilly et al.)、米国特許第5,565,332号(Hoogenboom et al.)、米国特許第5,721,367号(Kay et al.)、米国特許第5,837,243号(Deo et al.)、米国特許第5,939,598号(Kucherlapati et al.)、米国特許第6,130,364号(Jakobovits et al.)、及び米国特許第6,180,377号(Morgan et al.)において記載される。

【0116】

一の態様では、被分析物が核酸である場合、局在された核酸は、ハイブリ第ｚ－ションされ、そして同定されうる。例えば、未知又は部分的に未知な配列を伴う核酸を含むサンプルが、微小孔物質又は複合体の表面付近に局在され、そして該核酸に相補的である結合性オリゴヌクレオチドと接触されるなら、ハイブリダイゼーションが起こる。結合性オリゴヌクレオチドは、天然オリゴヌクレオチドのいずれか、又は改変オリゴヌクレオチド、

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4855

例えばＰＮＡでありうる。ハイブリダイゼーション・パターンに基いて、局在された核酸から、配列情報をもたらすことは可能である。こうして、核酸配列のいくつか又は全ては、同定されうる。これらのハイブリダイゼーション技術は、Fodor et al. (1992), Science 251,767-773及びSouthern et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22,1368-1373において開示される。これらの文献は、その全てを援用される。

【0117】

一の態様では、核酸は、

（ａ）液体サンプル中の核酸を、既知の配列を有する結合性オリゴヌクレオチドであって、該核酸に相補的であるオリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションさせて、ハイブリダイゼーションされた核酸を産生し、

（ｂ）ハイブリダイゼーションされた核酸を含む液体サンプルを、本明細書中に記載される微小孔物質のいずれかに通し、ここで該ハイブリダイゼーションされた核酸が、該複合体の表面付近に局在される

ことにより、ハイブリダイゼーションされ及び/又は同定される。別の態様では、核酸は、

（ａ）核酸を含む液体サンプルを、本明細書中に記載される微小孔物質のいずれかに通し、ここで該核酸は該複合体の表面付近に局在化され、そして

（ｂ）該核酸を、該核酸と相補的である結合性オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションさせることにより、

ハイブリダイゼーションされる。

【0118】

３．バイオリアクター

一の態様では、本明細書中に記載される微小孔物質であって、複合体及び改変微小孔物質を含むもののいずれかは、バイオリアクターとして使用されうる。この態様では、該バイオリアクターは、小さい発酵器、生物化学フロー分析器、又はバイオセンサーの一部として使用されうる。一の態様では、生物活性薬剤は、複合体に直接又は上記リンカーにより共有結合されうる。例えば、酵素は、上記シラン化をとおして複合体に結合され、酵素/支持体システムを作り出す。別の態様では、反応割合を改良するため、サスペンション・ポリマーの方法により、生物活性薬剤は複合体へと結合されうる。一の態様では、反応物質の溶液が、酵素/支持体システムと接触される場合、酵素/支持体システムは、触媒として振る舞い、そして新たな化合物を作り出しうる。別の態様では、酵素/支持体システムは、バイオセンサーとして振舞い、そしてサンプル中に存在する特定の被分析物と相互作用しうる。

【0119】

４．定量

一の態様では、局在された被分析物は、液体サンプル中に存在する被分析物の量を定量するために使用されうる。「被分析物の定量」というフレーズは、被分析物が、微小孔物質の表面付近に局在化されるとすぐに、サンプルの既知の量に存在する被分析物の量を計算することとして定義される。一の態様では、被分析物は、被分析物粒子を検出及び計数することにより、そして被分析物粒子の数を、サンプルの既知の体積に基く対応する濃度に相関することにより、定量される。

【0120】

本明細書中に記載される被分析物の定量方法は、被分析物の迅速な分析を可能にする。一の態様では、被分析物の分析は、３０分未満で行われうる。別の態様では、被分析物の分析は、標的分子の高感度の増幅(amplification)又は増幅(multiplication)(例えば、ポリメラーゼ・チェーン反応(ＰＣＲ))を必要とせず、それは改良された精度(precision)及び正確性(accuracy)を提供する。多数の別の利点が、以下に記載される。

【0121】

ｉ．被分析物の標識

一の態様では、使用される検出技術に左右されて、被分析物は、検出される前に標識さ

れうる。本明細書中で使用される「標識された被分析物」という用語は、検出可能なトレーサーと相互作用した被分析物として定義される。被分析物と検出可能なトレーサーとの間の相互作用は、化学的又は物理的相互作用、例えば非限定的に共有結合、イオン性相互作用、又はルイス酸-ルイス塩基相互作用を含みうる。本明細書中に示される「検出可能なトレーサー」は、

（１）　上記被分析物と相互作用できる少なくとも１の基、及び

（２）　当該技術分野に周知である技術を使用して検出できる少なくとも１の基

を有する化合物のいずれかとして定義される。一の態様では、被分析物は、局在化の前に標識されうる。別の態様では、該被分析物は、局在された後に標識されうる。

【0122】

被分析物が核酸である場合、特定のハイブリダイゼーションを介した結合及び標識を可能にする核酸の改変技術は、当該技術分野に周知である。例えば、標的核酸は、表面に特異的又は非特異的に局在されうる。「特異的に局在された標的核酸」というフレーズは、サンプル中に存在する標的核酸であって、例えば特異的標的核酸を捕捉及び局在化するだけの特異的結合反応により微小孔物質の表面付近に特異的に局在される核酸として本明細書中に定義される。特異的に局在化されない標的核酸のいずれもが、本明細書中で「非特異的に局在された標的核酸」と呼ばれる。標的核酸のみが局在されるところにおいて、精製目的で特異的に局在された標的核酸を標識することは、市販の分子標識、例えば蛍光核酸色素を使用することにより達成されうる。一の態様では、特異的に局在された標的核酸の局在は、局在された特異的結合剤、例えば、相補的結合性オリゴヌクレオチドなどを使用することにより達成され、特異的に微小孔物質の表面付近に標的核酸を特異的に捕捉及び局在化する。この態様では、微小孔物質の表面付近に局在化される全ての核酸は、標的分子であり、そして標識されうるか及び計数されうる。

【0123】

別の態様では、非特異的局在された標的核酸局在化は、患者サンプル中に含まれる多くの核酸を、微小孔物質の表面付近に局在化することを含む。この態様では、標的及び別の核酸が表面に共局在する場合、非特異的に局在された標的核酸を標識することは、検出可能なマーカーで標識された特異的結合性プローブなどの検出可能のトレーサーを使用することにより、或いは、局在された標的核酸と特異的結合性プローブとの間の表面局在化ハイブリッドを形成し、続いて例えば蛍光核酸色素で標識することにより、達成されうる。この態様では、標的分子は、かなり高濃度の不所望核酸の存在下で、特異的に標識され、そして計数されうる。

【0124】

一の態様では、局在されたビリオン-由来核酸は、非特異的核酸色素で蛍光染色されうる。或いは、核酸色素は、局在化ステップの前に、溶解された患者サンプルのろ液に加えられうる。局在された蛍光核酸は、次に本明細書中に記載される技術を使用して計数されうる。このアプローチは、場合によって潜在的に感染性を有する粒子を同定するための改良された技術を提供する。

【0125】

一の態様では、検出可能なトレーサーは、２以上の異なる検出可能なトレーサー分子である。検出可能なトレーサー上に存在する検出できる基の例は、非限定的に、蛍光マイクロビーズ、量子ドット、表面プラスモン共鳴粒子、蛍光発生酵素、蛍光色素、又はそれらの組合せを含む。一の態様では、検出可能なトレーサーは、標識された又は標識されていないオリゴヌクレオチド・プローブである。別の態様では、以下の検出可能なトレーサーは、核酸を標識するために使用されうる。

【0126】

ａ．蛍光トレーサー

蛍光核酸染色は、標的核酸分子を標識するために使用されうる。蛍光核酸色素は、相互作用、マイナー・グルーブ結合などを介して選択的に核酸を染色する。これらの色素の最も有用なものは、核酸に結合されると強い蛍光の増大を示す。そうした色素の非限定的な

例は、エチジウム・ブロマイド、プロピジウム・アイオダイド、サイバーグリーンＩ、トト-３(Ｔｏｔｏ-３)、サイトックス・オレンジ(Ｓｙｔｏｘ・Ｏｒａｎｇｅ)などを含む。これらの色素の幾つかは、高い量子収量(約５０％超)及び核酸の特定の類型に結合した際、１０００を超える蛍光増強を有する。核酸に結合した際の蛍光増強は、蛍光トレーサーのシグナル-対-ノイズ制限を最小化し、そして色素非特異的結合は、実質的に非蛍光である。さらに、標的核酸あたりの色素充填度は高く、しばしば４塩基対あたり１の蛍光色素分子に達する。蛍光核酸色素の制限は、標的表面上の全ての核酸を染色することを含むが、二重鎖ＤＮＡ、ＲＮＡなどについての選択性を有する事が多い。

【0127】

さらに、連続的蛍光染色アプローチが使用されうる。そうしたアプローチは、標的核酸が相補的なオリゴヌクレオチドを有する微小孔物質の表面付近に特異的に局在するが、表面上の全ての核酸が生物学的アッセイに必要とされる純度のレベルの標的核酸にならないような場合に、特に有用である。この場合、標的及び非標的核酸は、共局在される。連続的染色アプローチにおいて、全ての局在された核酸のうち、かなり高い親和性で二重鎖断片を好んで染色する第一核酸色素Ａが加えられた。次に遊離している色素Ａは、このシステムから取り除かれ、そして相補的なオリゴヌクレオチド・プローブ(非標識)が加えられ、そして標的核酸に結合する。次に第二の核酸色素Ｂは加えられ、そして新たに作られたオリゴプローブ-標的核酸のハイブリッド領域に結合した。これにより、真の標的核酸が色素Ｂで標識されることをもたらす一方、色素Ａが全ての非特異的核酸色素結合部位をブロックする。

【0128】

ＤＮＡ、ＲＮＡ、及びＰＮＡ(ペプチド核酸)オリゴヌクレオチドに基いたプローブは、特異的ハイブリダイゼーションを介した局在化の前又は後において、使用されて標的核酸を標識する。「表面に局在されたハイブリッド」というフレーズは、微小孔物質の表面付近に局在された核酸が、既知の配列を有する基質(例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡ)と接触され、その結果、該基質が、局在された核酸と相互作用する場合に形成された産物として定義される。或いは、「表面に局在されたハイブリッド」というフレーズは、本明細書中で、核酸が既知の配列を有する基質(例えばＤＮＡ又はＲＮＡ)と接触され、その結果該基質が、核酸と相互作用して、ハイブリッドを作り出し、そして次に該ハイブリッドを局在化する場合において形成された産物として定義される。多くのそうしたシステムは当業者に周知である。これらのハイブリダイゼーション・プローブは、トレーサーを光学的に検出可能にするための物質で直接標識することにより検出可能なトレーサーを形成するために使用されうる。プローブの例は、非限定的に、色素、ビーズ、タンパク質及びタンパク質凝集体、量子ドット、ナノ結晶などを含む。さらに、核酸は、さらなるステップの後にそれらを光学的に検出可能にする物質で標識されうる。例えば、ビオチン化プローブは、分子診断において広く使用される。ハイブリダイゼーションの後、結合されたビオチン化プローブは、ビオチンに対する特異的結合剤、例えばアビジン、ストレプトアビジン、ニュートラビジン(neutravidin)などを含む光学検出可能な物質と反応される。ハイブリダイゼーション・プローブは、後に記載される更なるステップの後に光学シグナルを作り出すことができる酵素でさらに直接又は間接的に標識されうる。

【0129】

一の態様では、ウイルス量アッセイは、標識されうる。ＨＩＶは、長さ約９０００塩基の長さの一本鎖リボ核酸(ＲＮＡ)を含む。完全ＨＩＶ・ＲＮＡ分子に対して作成される３６０塩基離れた２５塩基長のオリゴヌクレオチド・プローブが存在する。ＨＩＶ・ＲＮＡ並びに別の標的核酸に特異的に結合する異なるオリゴヌクレオチドプローブを合成する能力は、当業者に周知である。同様に、色素、蛍光ビーズ、蛍光発生酵素などの取り込み又は付着を介したこれらの特異的オリゴ・プローブ蛍光を作る能力もまた、よく知られている。

【0130】

検出可能なトレーサーを産生するため、オリゴヌクレオチド・プローブに付着させる蛍

光標識の選択は、主に検出器のパラメーターによって決定される。実施例１４は、低パワースキャン検出システム、例えば、走査共焦点上面蛍光光度計(scanning confocal epifluorometer)を用いて、標的核酸あたり２５又は１００の多蛍光分子(例えば，フルオレセイン、ローダミン、Ｃｙ５、など)を検出することに基いた本検出データーの計算を説明する。一の態様では、そうした標識分子を産生する方法は、以下のとおりである。局在された標的核酸をプローブ溶液とインキュベーションして、ハイブリダイゼーションを起こさせた。多孔性膜への局在化の場合、ハイブリダイゼーションの間、膜を通して流れるプローブ溶液は、反応時間を短くすることができる。ハイブリダイゼーションしていないプローブ溶液は、ハイブリダイゼーションの厳密度、ＮＳＢなどを制御する条件下で、光学的検出表面から洗い流される。

【0131】

蛍光ビーズに基いたトレーサープロセスは、図３に模式的に図示される。最初に、蛍光マイクロビーズ３００などの蛍光粒子は、マイクロビーズ上に局在化される特異的結合性オリゴヌクレオチド・プローブでコートされる。蛍光マイクロビーズ３００は、膜フィルター３１０の表面上で保持されるような大きさである。標的核酸が、膜フィルター３１０の表面付近に局在された後に、蛍光マイクロビーズは、膜フィルター３１０の表面上に導入され、そしてろ過される。結合性オリゴヌクレオチドで被膜される蛍光マイクロビーズは、局在された標的核酸と直接接触されるよう配置され、そしてハイブリダイゼーションは、拡散により妨げられることなく即座に生じる。適切なインキュベーション時間の後、結合していないマイクロビーズ３２０を、ハイブリダイゼーションの厳密度及び結合特異性を制御する条件下で洗い流した。非特異的に結合するトレーサー・ビーズに対して区別するために、複数のビーズを、各標的核酸に付着すべきである。

【0132】

ｂ．酵素トレーサー

別の実施態様では、酵素技術は、被分析物を高ＳＮＲで標識するために、検出可能なトレーサーとして使用されうる。「サスペンドされた(suspended)」反応物質の増大された活性の原理が使用されうる。例えば、抗体及び別のタンパク質、並びに別の分子は、表面に保持されるとき活性を失うということが知られている。微小孔物質に局在される巨大分子の「足場(scaffolding)」に被分析物を保持することは、表面での不活性化を最小限にすることによって、並びに活性微小孔物質を通した流れを許容することにより物質移動を改良することによって、活性をかなり改良しうる。

【0133】

蛍光沈殿アッセイは、当該技術分野において記載されており、そして可溶性の非蛍光基質を、酵素活性がある点に局在される蛍光沈殿へと変換する酵素トレーサーを使用する。沈殿アッセイにおいて使用される酵素トレーサーの例は、非限定的に、酵素標識蛍光(ＥＬＦ)において使用されるアルカリ・ホスファターゼを含む。該酵素標識蛍光は、Molecular Probes, Incから市販されている。この場合、局在された標的核酸は、適切な酵素で標識されたオリゴヌクレオチド・プローブにハイブリダイゼーションし、該酵素は次に局在された蛍光微小沈殿物であって、標的核酸に一対一対応して計数されうる沈殿物を作り出す。

【0134】

図４は、本明細書中で使用されるＥＬＦ反応を示す。標的核酸４００は、微小孔物質４０１の表面付近に局在され、そして物理的に幾つかの開口部４０２にまたがっている。ビオチン化ハイブリダイゼーション・プローブ４０３は、標的核酸４００に特異的にハイブリダイゼーションされた。図は、縮尺比に従っていないことを注意のこと。典型的な２５塩基の核酸プローブは、たった約８ナノメートルであり、公称の孔直径約１８０ナノメートルと比較される。アルカリホスファターゼ・ストレプトアビジン抱合体４０４は、ビオチン化プローブ４０３に結合された。結合していないプローブ及び結合していない抱合体は、システムから洗い流された。非蛍光・可溶性ＥＬＦ基質４０５は加えられ、そして抱合体４０４は、フィルター４０１上及び４０１内に蛍光沈殿物４０６を作る。この場合、

ハイブリダイゼーションされたプローブ４０３に結合された抱合体４０４は、典型的に、表面の孔上に渡って「サスペンドされている」。これにより典型的に、最小限の表面変性及び他方向性の基質の優れた分散のため、高い酵素活性がもたらされた。膜表面上に存在する非特異的に結合された結合体４０７は、結合体の表面変性のため並びに比較的阻害され基質の表面への拡散のため、典型的にずっと低い活性である。さらに、ＥＬＦ蛍光沈殿物４０６は、微小孔物質の表面付近で作られる。これは、ナノ結晶沈殿を増大し、ナノ結晶を表面付近に局在し、そしてある程度典型的な孔直径にまでナノ結晶の成長を制御する。これらの全ては、検出性を改良する点に貢献する。以前に論じられる様に、複数のトレーサー結合は、ＳＮＲを改良するために、付加的に使用されうる。

【0135】

図５は、本明細書中に記載される方法を使用した典型的なＥＬＦ反応のタイミングのグラフを示す。水平軸は時間であり、そして垂直軸は脱リン酸化基質を沈殿するＥＬＦの局所濃度であり、これはＥＬＦアルコールとしても知られている。点線の水平方向の線、沈殿形成での標識された濃度５１０は、ナノ結晶沈殿が始まる有効濃度を表す。二つの斜の線が存在する。急勾配の線は、標識された特異的シグナル５１１であり、一方なだらかな勾配の線は、標識された非特異シグナル５１２である。これらの二つの線は、局所的なＥＬＦアルコール濃度であって、時間に対して、高い(急勾配)及び低い(緩やかな勾配)酵素活性の位置の付近を表す。低酵素活性の位置は、前述されるように非特異的な結合の結合体である一方、高い酵素活性の位置は特異的に結合された酵素であり、阻害されない単一分子の酵素活性又は小さい領域(１ミクロン^2)に結合する複数のプローブ及び酵素が原因である。この系では、ＥＬＦアルコールの局所的濃度が、線５１０により指し示される濃度を超えるまで、蛍光ナノ結晶は、形成できない。開始沈殿時間５１３と名付けられる反応中の幾つかの時間点では、比較的高い酵素活性の位置が、ナノ結晶形成を引き起こすために十分なＥＬＦアルコールを作り出した。その後、低酵素活性の領域でさえ、ナノ結晶を最終的に作り出しうる。従って、特異的対非特異的結合プローブについての高ＳＮＲが、反応過程における比較的早い時期に存在する。

【0136】

図６は、実施例２２に記載されるように核酸計数についての蛍光スポットカウント対時間のグラフである。簡潔にいうと、ラムダファージＤＮＡは、２０の相補的ビオチン化プローブと前もってハイブリダイゼーションされ、本明細書中に記載される改変されたニッケル-ホウ素アノボアに局在され、そして実施例において記載されるＥＬＦで現像される。ご覧のように、ラムダ・ポジティブ対ラムダ・ネガティブサンプルの明白な差は、反応過程における特に早い時期において検出された。

【0137】

同様に、チラミド(tyramide)に基いたアッセイは、酵素活性のポイント付近にタンパク質を共有結合させる反応性蛍光中間体を酵素学的に作り出し、そして標的核酸に１対１対応で計数されうる局在された微小蛍光ゾーンを産生するために構成されうる。

【0138】

ｃ.反応比を増大するための改変された微小孔物質

別の態様では、サスペンドされた反応物質の増大された反応割合は、有利に使用されうる。一の態様では、サスペンション・ポリマーは、本明細書中に記載のいずれの複合体を含む微小孔物質の表面付近に局在されて、改変された微小孔物質を作り出す。１の態様では、改変された微小孔物質は、微小孔物質をサスペンション・ポリマーを含む溶液と反応することにより産生されうる。ここで、該溶液は、微小孔物質を通り抜け、そしてサスペンション・ポリマーは、微小孔物質の表面付近に局在化される。別の態様では、サスペンション・ポリマーは、サンプルを微小孔物質へと接触する前に、被分析物を含むサンプル中へと加えられる。この実施態様では、該サスペンション・ポリマーは、微小孔物質の表面付近へと局在化される前に、被分析物と相互作用した。サスペンション・ポリマーは、共有結合又はいずれかの物理的又はイオン性相互作用を介して、被分析物と相互作用できる。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4860

【0139】
これの一の態様は、図7a～７ｃにおいて図示される。微小孔７１０を含む微小孔物質７００は、図7aにおいて示される。図７ｂは、微小孔表面７００の表面付近に局在化し、微小孔７１０に渡ってまたがるサスペンション・ポリマー７２０を示す。サスペンション・ポリマー７２０は、微小孔物質７００に付着されて、本明細書中に示されるように微小孔７１０を介した分子崩壊を妨げるために十分である。一の態様では、サスペンション・ポリマーは、例えば共有結合、トラッピング、又は物理的又はイオン性相互作用により微小孔物質に局在されうる。図７ｃは、微小孔表面７００の断面図を示し、微小孔７１０上に「サスペンドされた」サスペンション・ポリマー７２０を示す。サスペンドされている被分析物７３０は、微小孔７１０上でサスペンション・ポリマー７２０に付着されることが示され、そしてサスペンドされていない被分析物７４０は、微小孔７１０上ではなく、一般的に７５０として示される微小孔物質の固体表面支持体上でサスペンション・ポリマー７２０に付着されることがしめされる。開示されるように、サスペンドされた被分析物７３０は、７４０で示されるようにサスペンション・ポリマー上であるが微小孔上でサスペンドされない非サスペンド型の被分析物、又は７６０に示されるように非特異的に結合されるか又は慣用的に(表面に対して直接)局在化される被分析物と比べて、立体障害、拡散、変性などに基いた亢進された反応割合を有する。

【0140】
サスペンション・ポリマーは、微小孔物質上の微小孔にまたがることができる巨大分子のいずれかでありうる。一の態様では、サスペンション・ポリマーは、オリゴヌクレオチド、多糖、又はタンパク質である。一の態様では、サスペンション・ポリマーは、ＤＮＡ及びそのアナログ、並びにＲＮＡなどの核酸である。別の態様では、サスペンション・ポリマーは、セルロース及びスターチなどの多糖である。反応物質は、タンパク質又は別の分子、例えば非限定的に酵素及び抗体、生物分子、又は触媒でありうる。被分析物は、例えば共有結合を介して、リンカー又はビオチン-アビジンなどの結合反応を介して、直接サスペンション・ポリマーに付着されうる。被分析物は、微小孔物質に付着される前又は後にサスペンション・ポリマーに付着されうる。例えば、抗体は、当該技術分野に一般的に周知である方法により溶液中のＤＮＡに付着され、次に付着された抗体を含む該ＤＮＡは、微小孔表面に局在される。付着された抗体の一部は、微小孔上にサスペンドし、そして高められた反応性を有する。ＤＮＡが、表面上に可逆的に局在されたなら、本明細書中に開示される方法により取り除かれることもあり、それにより付着された抗体をさらに取り除く。別の態様では、ＤＮＡを含む抗体は、溶液中で関心の被分析物又はトレーサーと反応されて、特異的結合に作用する。ここで、該ＤＮＡを含む付着抗体及び特異的に結合された被分析物又はトレーサーは、本明細書中に開示されるトレーサーの検出を増進するために、次に微小孔表面に局在される。この場合、サスペンション・ポリマーを微小孔物質に局在化することにより、反応物質、例えば抗体、被分析物、及びトレーサーを溶液から濃縮することが容易であることは、サスペンドされた被分析物の相対活性を亢進することに関わらず、この方法のもう一つの利点である。

【0141】
d.　プラスモン共鳴アッセンブリ
プラスモン共鳴粒子(ＰＲＰ)は、特異な光学的性質を示す金属製のサブミクロンである。特に、金及び銀のＰＲＰは、格別高くかつ波長選択性の光散乱能力を有することが知られている。１個の６０ナノメートルの金粒子は、５００,０００個のフルオレセイン分子の蛍光発光と同等の光子を散乱する。銀のＰＲＰは、金の約８倍の効果を有すると知られているが、化学的に安定でない。ＰＲＰは、診断における使用を提案されてきており、そしてＰＲＰ及び関連技術を商業化するために数社が形成されてきた。

【0142】
球状のＰＲＰ光学性質は、周知である：
１．　かなり小さいＰＲＰでは(金について４０ｎｍ以下)、散乱断面は６倍になるまで粒子半径に比例し、一方、ピーク散乱波長は一定である。この形態では、金は主に５２０

ｎｍで散乱し、一方銀は３８０ｎｍで散乱する。

２．ＰＲＰが大きくなるにつれて(金について４０ｎｍ超)、散乱断面は増大し続け、一方、ピーク散乱波長はより長い波長へとシフトする。例えば、以下の散乱光の色が見られる：

金ＲＰＰ直径	散乱光の色
４０ｎｍ	緑色
７８ｎｍ	黄色
１１８ｎｍ	橙色
１４０ｎｍ	赤色

３．透明誘電散乱粒子(ガラス、プラスチック・ビーズなど)とは異なり、ＰＲＰは、媒体屈折率適合に関する散乱パラメーターの低減を示さない。実際、液浸培地屈折率を固有粒子屈折率に適合することにより、ＰＲＰからの散乱は培地屈折率の増加を伴って増加し、並びにピーク散乱波長における明白な赤方偏移をうける一方、慣用粒子からの散乱は実質的に取り除かれる。

【0143】

非球形(例えば棒状などの)ＰＲＰの性質は、ほとんど明らかにされていない。棒状ＰＲＰについての公表されているデーターは、実質的に２の軸方向の散乱パラメーターを示し、ここで散乱波長は、照明光へのＰＲＰ配向に左右される。例えば、４０ｎｍ未満の直径を有するＰＲＰ棒は、５２０ｎｍの散乱ピーク及びその長さに関連するかなり強力で長い波長ピークを示す。

【0144】

球状ＰＲＰのアッセンブリの性質は、密集したＰＲＰとの間の共鳴相互作用を示す。つまり、密集した球状ＰＲＰの直線状のアレイ・アッセンブリは、同等の棒に類似した長波長散乱性質を示す。二つの密集粒子のアッセンブリは、ＰＲＰ直径に基いた基本的散乱波長(例えば４０ｎｍ未満の金では、５２０ｎｍ)、並びに相互共鳴プラスモン状態の間の共鳴相互作用に関連された長波長を示す。３個のＰＲＰの直線状のアッセンブリは、基本波長並びに３個の球状ＰＲＰアッセンブリの長さに関連した固有の長波長を示す。ＦＲＥＴと同様に、ＰＲＰのこの共鳴アッセンブリは、かなり短い距離の作用であり、そして近接結合事象の分析を得るために有用でありうる。

【0145】

本明細書中に記載される方法において、被分析物が核酸であるとき、プラスモン共鳴アッセンブリ(ＰＲＡ)の検出は、核酸構造分析を可能にしうる。前に記載されるように、検出可能なトレーサー、例えば多数のプローブ結合は、非特異結合事象から特異的結合事象を区別するために使用されうる。上記多数のプローブ技術が、真の標的分子から(ＮＳＢ)を区別することを首尾よく可能にする一方、核酸配列の情報は、いくらか確実性がない。一塩基多型(ＳＮＰ)を伴う標的分子が想定される。さらに、ＳＮＰを含む２５０の塩基領域に特異的に結合する１０個のプローブが合成されることが想定される(１０個のプローブは、各々２５塩基の長さであることが想定される)。各プローブは、蛍光レポーター手段(マイクロビーズ、量子ドット、高蛍光タグ、連続的標識用のビオチンなど)を含む。ＳＮＰを実際にコードするプローブは、非ＳＮＰ標的分子上の結合に比較したとき、計測できる及び予測できる結合偏差(融解温度など)を示す。理論的に、高い厳密度の条件下においてプローブ-標的分子の融解又は結合の間における変則的な蛍光強度の変化によりＳＮＰを同定することができる。慣用的に、核酸計数(ＮＡＣ)検出器は、デジタル分子検出と一致する比較的低いシグナル対ノイズ比で稼動し、そして上の例で記載される蛍光強度の１０分の１の偏差を信頼性を有して検出することができない。少数のプローブ(例えば１０よりはむしろ３)は、ＳＮＰ検出について蛍光強度の差を大きい物にするが、ＮＳＢのため擬陽性を潜在的に増大させてしまう。

【0146】

複数のプローブ結合が、特異的かつ明らかに低いシグナル対ノイズ比で検出されるなら、利点がある。例えば、蛍光共鳴エネルギー転移(ＦＲＥＴ)は、広く使用される。ここで

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4862

、小さい領域内の複数の結合は、固有の波長放出により検出される。類似のシステムであるが、ＮＡＣ検出(高感度、固有多プローブ痕跡(unique multiprobe signature)など)に対する影響を受けやすい性質は、分子増幅をすることなくＳＮＰ同定を可能にしうる。

【0147】

ＰＲＡ検出は、光学散乱パラメーターに独自に基いた多数(２，３，４など)のＰＲＰｓのアッセンブリを区別することができる。例えば５-プローブ・システムは、ＳＮＰ検出に使用されうる。一の態様では、該プローブは、センター(＃３)プローブの下のＳＮＰ位置と近接するように設計されうる。この場合では、ＳＮＰがない場合、予測された融解を行なう５ＰＲＰのアッセンブリ、及び問題のＳＮＰを含む核酸についての２ＰＲＰの２個のアッセンブリへと融解する５ＰＲＰのアッセンブリは、予期される。融解の間における＃３プローブの欠失は、主要分散波長の遠赤外(１×５～４０ｎｍ金ＰＲＰアッセンブリ)から黄色(２×２～４０ｎｍ金ＰＲＰアッセンブリ)への偏移をもたらす。別のスキームは可能であり、球状のＰＲＰ直径、材質、及びＰＲＰアッセンブリ・パラメーターに左右される。さらに、かなり小さい金粒子で開始する溶液中でＰＲＰを「成長」するために、銀の増強が使用されうるということがよく知られている。一の態様では、これらの小さい金粒子(直径２ｎｍ未満)は、アノポア膜上のＮＳＢを少なくすると証明されうる。小さな金核に基く銀によるＰＲＡの増強は、より多くの棒状構造及び固有の検出をもたらす。

【0148】

ｉｉ．検出

標的被分析物が局在された時点で、被分析物は次に、検出システムにより検出されうる。一の態様では、局在された被分析物は標識される。検出技術に左右されて、被分析物は、局在の前又は後に標識されうる。一の態様では、当該技術分野に周知であるように、アナログタイプ検出スキームが使用されうる。ここで、標識された被分析物の各々は、検出のため十分な強度を必要とする総量のシグナルに寄与する。別の態様では、デジタル分子計数(ＭＣ)又はデジタル核酸計数(ＮＡＣ)検出システムは、蛍光の有無について、アッセイ標的表面上の分子サイズ領域を調べるために使用されうる。

【0149】

局在された被分析物のデジタル検出は、高感度検出器、例えば高感度、高空間分解能蛍光検出器であって、微小孔物質の表面の小領域(例えば、約１～１０ミクロン^{2}の領域)を、標識された被分析物由来の蛍光シグナルの有無について調べる検出器を用いて達成されうる。実質的に０又は１の標識被分析物のみが、調査領域内に存在するようにするため、調査領域は十分小さく、かつ局在された被分析物表面濃度は十分低い。検出されたシグナルが、規定の又は動的に計算された閾値であって、標識された標的被分析物とバックグラウンド・シグナル由来の蛍光の相対規模により測定される閾値を超えるときに、被分析物は計数されたとみなされる。

【0150】

別の態様では、被分析物の検出は、非限定的に蛍光、リン光、化学発光、生物発光、ラマン分光法、光学的散乱分散、プラスモン共鳴粒子(ＰＲＰ)分析などを含む別の技術、並びに一般的に当業者に知られる別の技術を用いて達成されうる。

【0151】

デジタル核酸検出の場合、以下の核酸検出の要件の幾つか又は全ては、使用される検出システムの類型に依存されて合わされるべきである。

１．約１～１０ミクロン^{2}の面積の調査領域からの蛍光を明確に単離する。

２．使用される蛍光標識システムに一致させて、調査領域から蛍光発光を高効率及び高感度で計測する。

３．一秒あたり約５，０００～５００，０００の別個の調査領域を計測する。

４．計測の間、焦点を標的表面上に維持する。

５．バックグラウンド差分について強度-位置の関係を維持(画像形成)する。

【0152】

本明細書中で使用されうる適切な検出装置の例は、非限定的に、高速走査共焦点上面蛍

光光度計．高感度蛍光共焦点顕微鏡、電荷結合素子(ＣＣＤ)アレイ、例えばＣＣＤアレイに基いた蛍光顕微鏡、画像増幅カメラなどを含む。高速走査共焦点上面蛍光光度計は、各核酸上のわずかな蛍光標識を検出することができる。前に議論されたいくつかの標識スキーム(例えば蛍光マイクロビーズ、核酸色素、酵素、量子ドットなど)は、十分に大きいシグナルを作り出し、そして洗練されていない装備で検出可能であった。

【0153】

超高感度光学検出においての近年の進歩は、単一の蛍光分子を同定する能力をもたらし、それにより表面に局在される単一分子の数値計数が可能になる。一の態様では、微小孔物質の表面付近に局在される標識された被分析物は、光学検出により検出されうる。光学検出は一般的に、約２００ｎｍ～約２０，０００ｎｍの範囲の波長における電磁気的放射を使用する検出方法を含む。一の態様では、例えば超高感度ウイルス量アッセイにおいて見られる超低濃度の核酸検出について、本明細書中に記載された方法のいずれかにおいて、分子増幅を行わない核酸濃度の直接的決定用に、光学検出は使用されうる。

【0154】

一の態様では、上で記載される連続的蛍光染色法は、局在された核酸を標識するために使用され、そして２個の色素(Ａ及びＢ)は同じであり、光学表面は２回計測され、一回は、最初の染色の後であり、そしてもう一回は、相補性特異的結合性オリゴヌクレオチド・プローブ添加の後にであった。一の態様では、この場合に使用される検出器は、画像検出器例えば、共焦点顕微鏡、ＣＣＤカメラなどである。これらそれぞれの計測から得られた画像は、単純に引き算されて、真の標的核酸計数を与える。これは、最初の染色の間、真の標的核酸が、部分的に染色される場合であってもいえることである。

【0155】

このタイプの技術の例は、ピコグリーン色素を使用するＨＩＶウイルス量核酸検出アッセイである。この色素は、二重鎖ＤＮＡ又はＤＮＡ-ＲＮＡハイブリッドを選択的に染色することが知られている。一本鎖ＨＩＶ・ＲＮＡを含む患者サンプル中の核酸は、アノポア膜などの微小孔物質の表面付近に局在化される。ピコグリーン溶液を加え、そしてＨＩＶ・ＲＮＡの自己ハイブリダイゼーション領域(ヘアピンなど)を含む全ての局在された二重鎖核酸を蛍光染色した。膜フィルターは、蛍光的に画像化されて、バックグラウンドの画像計測を与えた。ＨＩＶ・ＲＮＡに相補的なオリゴヌクレオチド・プローブを加え、そして一本鎖ＨＩＶ・ＲＮＡに特異的にハイブリダイゼーションすることを可能にした。ピコグリーン溶液を再び加え(又は単純に第一回目の染色及びハイブリダイゼーションステップで取り除かない)、そして膜フィルターを再び画像化した。前に撮ったバックグラウンドの画像を、二回目の画像から引き算して、差分画像を作り出した。差分画像は、相補的オリゴヌクレオチドプローブと特異的にハイブリダイゼーションされたＨＩＶ・ＲＮＡ領域を表す。標的ＨＩＶ・ＲＮＡは、次に差分画像上の蛍光スポット又はピクセルとして検出される。

【0156】

上記の例において、色素Ａ及びＢがスペクトル的に独立した物であるなら、色素Ｂの計測のみが必要とされる。色素Ａは非蛍光であり、その結果色素Ａは、蛍光色素Ｂの非標的核酸結合部位を単純にブロックする。この場合、蛍光イメージは、引き算される必要がないので、非画像検出器は、核酸検出に使用されうる。

【0157】

ａ．走査共焦点上面蛍光光度計

分子計数において使用するための適切なスキャン検出システムの１の態様は、図８に模式的に示される。該検出システムは、一般的に８００と名付けられており、光線デリバリー及びコレクション・モジュール８０４と光路で繋がっているレーザー光源８０２を含み、該コレクション・モジュール８０４は、計測されるサンプルにレーザー光を向けるため及び蛍光を収集するための様々な光学要素含みうる。図８において示されるように、デリバリー及びコレクションモジュール８０４の光学要素は、コリメータレンズ８０６を含み、蛍光ビーム・スプリッタ８０８、偏向ビーム・スプリッタ８１０、４分の１波長板８１

２、ダイナミック・フォーカス対物レンズ８１３、及び焦点検出器８１４を含む。該焦点検出器８１４は、焦点レンズ８１５、円柱レンズ８１６、及び４分割フォトダイオード検出器８１７を含む。これらの光学要素と光源８０２からのレーザー・ビームとの相互作用は、以下にさらに詳細に記載される。デリバリー及びコレクション・モジュール８０４は、検出器モジュール８１８と光路で繋がっており、該検出器モジュール８１８は、干渉フィルター８２０、第一焦点レンズ８２２、空間フィルター８２４、第二焦点レンズ８２６、及び光子計数アバランシェ・フォトダイオード(ＡＰＤ)８２８を含む。

【0158】

検出システム８００を作動する間、レーザービーム８３０、例えば直線偏向連続波(ｃｗ)レーザービームは、事前に選択された直径、例えば最大直径６ｍｍにまで拡大されそして平行にされた。該レーザー・ビームは、蛍光ビーム・スプリッタ８０８、偏向ビーム・スプリッタ８１０、４分の１波長板８１２を横切り、そしてダイナミック・フィーカス対物レンズ８１３により、サンプルコンテナ８３２の内部表面上に焦点を合わせられる。蛍光ビームスプリッター８０８は、レーザービーム８３０を伝達し、そして光の全ての異なるの波長を反射する。蛍光ビーム・スプリッタ８０８は、約１５度の入射角などの角度で配置されて、偏向の影響を最小限にし、そしてシグナル対ノイズ比を改善する。偏向ビーム・スプリッタ８１０は、４分の１波長板８１２と繋がっており、従来の光アイソレーターを形成する。直線偏向レーザー光は、偏向ビーム・スプリッタ８１０を横切り、そして４分の１波長プレート８１２により環偏向へと変換される。該光の正反射は、環偏向の方向を逆(右方を左方環偏向に)にする。該逆方偏向は、四分の一波長板８１２を介して元に戻される際に、直線偏向へと変換される。該戻された光は、元のレーザービームに対し直角の直線偏向であり、そして偏向ビームスプリッタ８１０を介して９０度反射されて、検出器８１４に焦点を合わせる。

【0159】

ダイナミック・フォーカス対物レンズ８１３は、レーザービーム及び蛍光検出器の焦点を、スキャンの間標的表面上に維持する。スキャンは、コンテナ又は検出器をコンテナの中心線に沿って動かす間、サンプルコンテナ８３２(例えば、使い捨てポリスチレン培養チューブ、無機光学膜フィルター)を回転することにより達成される。代わりのスキャン・スキームは、スキャンミラー(図示せず)を、４分の１波長板８１２と対物レンズ８１３との間に使用して、直角方向においてスキャンする。対物レンズの開口数(ＮＡ)は、約０．６に制限されて、自動焦点システムが作動するための十分な焦点深度を許容し、並びに対物レンズ８１３とサンプルコンテナ８３２との間の使い勝手の良い作業距離を許容する。

【0160】

対物レンズ８１３をリニアモーター(音声コイル)内に配置し、そしてスキャンの間サンプルコンテナ８３２の内部表面上に焦点を維持するように、焦点システムを閉ループ制御の下で、サンプルコンテナ８３２の方向へ又はから離れる方向へ平行移動した。光学設計の当業者によく知られているように、光の反射は、異なる屈折率を有する二つの透明な物質の間の境界面で生じる。例えば、ガラスから水に対する境界面からの反射は約０．５％であり、一方、ガラスから空気に対する境界面からの反射は、約４％である。検出システム８００は、乾燥表面(境界面)上か、又は固体と液体との間で形成される境界面上に動的に焦点を合わせるように設定されうる。従って、コンテナ-液体境界面からの弱い反射レーザー光(約０．５％)が、焦点検出器の８１４の円筒状レンズ８１６を通過し、そしてフォトダイオード検出器８１７へと照射される。対物レンズ８１３が、コンテナ-液体境界面に焦点をあてるとき、円形状のスポットが焦点検出器８１４上に作られるように該光学系はなっている。理想的な焦点位置からの差分は、環状スポットの伸張(elongation)をもたらす。該伸張は、フォトダイオード検出器８１７により計測され、そして対物レンズ８１３の焦点制御についてのフィードバック・ループにおけるエラーシグナルとして使用される。

【0161】

サンプルコンテナ８３２の内部表面からの蛍光は、レーザー励起のリターンパスに沿って通り、蛍光ビーム・スプリッター８０８により反射される。この位置では、最も正反射された励起光は、偏向ビームスプリッタ８１０により蛍光シグナルから取り除かれる。蛍光偏向に左右されて、幾つかの蛍光シグナルも失われうる。代わりの配置では、蛍光ビームスプリッター８０８は、４分の１波長板８１２と対物レンズ８１３との間に配置されうる。この代わりの配置において、蛍光シグナルは最も強くなるが、さらなる反射励起光を有するだろう。図８において示されるように、蛍光ビームスプリッタ８０８から反射された蛍光ビーム８４０は、干渉フィルター８２０を通過する。該フィルターは、かなり高効率であり、多孔性の干渉フィルターでありうる。蛍光ビーム８４０は、レンズ８２２により空間(spatial)フィルター上へと焦点を合わせられる。空間フィルター８２４は、コンテナ-液体表面の像平面に位置し、そして他の領域由来の光を排除することにより、空間分解能及びシグナル-対-ノイズ比を改良する。空間フィルター８２４を通過する光は、レンズ８２６により、光子計数アバランシェ・フォトダイオード８２８の小領域上に焦点を合わせられる。活性のあるフォトダイオード領域及び大画面表示に依存して、該空間フィルター・システムは、蛍光を小領域のフォトダイオード上に直接焦点を合わせることにより単純化されうる。当業者に周知であるように、画像は、シグナル強度対スキャン位置を追跡することにより構築されうる。そうした画像は、コンピューターのモニターなどの出力ディスプレー上に可視的に表示されうるか、又はさらにコンピューターにより分析されて、検出された核酸を数え上げる。検出システム８００は、多くの異なる構成、例えば、フィルター膜、フローセル、多穴プレートなどを伴って使用するように設計されうる。

【0162】

ｂ．暗視野蛍光光度計に基くカメラ

本明細書中に記載される分子計数法において使用されうる別の適切な検出システムは、模式的に図９において示される。該検出システムは、一般的に９００と名付けられ、微小孔物質上に局在される核酸を検出するために特に適している。該検出システム９００は、励起フィルター９５０を含む光源９０２を含み、これは、検出器モジュール９０４、例えば電荷結合素子(ＣＣＤ)カメラと光路で繋がっている。該検出器モジュール９０４は、標識された核酸蛍光を単離するため、１以上の干渉フィルター９０６を含む。検出器モジュール９０４はフラット・フィールド(flat field)対物レンズ９０８、例えば約０．１～約０．３のＮＡを有して、約５ミクロン～約１５ミクロンの焦点深度をもたらすレンズを有しうる。この大きな焦点深度は、サンプルフィルター膜の位置の自由度を許容する。或いは、高ＮＡの対物レンズは、さらなるシグナルを集めるために使用されうるが、焦点深度を小さくしてしまう。検出器モジュールはまた、検出レンズ９１０、及びＣＣＤアレイ９１２、例えば数秒間～数分間の照射用の冷却型高量子効率裏面入射型ＣＣＤ検出器を含む。別のレンズ及び光ファイバー照射(fiber optic illumination)を介したものを含む別の光学デザインもまた、代わりの態様において使用されうる。

【0163】

検出システム９００の作動の間、照射ビーム９２０は、局在された核酸を有する微小孔物質９３０の表面に向けられる。照射ビーム９００は、蛍光標識された被分析物が蛍光を発することを引き起こす。局在された被分析物は、多くの蛍光マイクロビーズで標識されたとしても、かなり小さい対象である。各々標識された被分析物は、蛍光ビーム９４０から典型的にＣＣＤアレイ９１２上の単一の明ピクセルを発する。検出システム９００は、１０００×１０００ＣＣＤアレイで、直径３ｍｍの標的表面について設計されるとすると、各ピクセルは、膜フィルター上の約３／３ミクロンの領域を表す。検出器システム９００は、前部で記載された図８の走査共焦点システムとは異なって、分析上まとまった照射部及び検出部になるよう設計されうる。これにより、ピクセル・シグナル強度とピクセルあたりの蛍光核酸濃度との相関が許容されるべきである。従って、密集した被分析物(同じピクセル内)は、ピクセル強度における段階関数により分解されて、検出器が計数するダイナミックレンジを改良する。ＣＣＤアレイにより作られる画像は、コンピューターモニターなどの出力ディスプレー上に視覚的に表示さうるし、又は検出された被分析物を計

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4866

数するために、コンピューターによりさらに分析される。

【0164】

ｃ．暗視野分光計によるスキャン

一の態様では、プラスモン共鳴アッセンブリ(ＭＣ-ＰＲＡ)検出に基く分子計数に適した検出器を、図１０に示し、そして一般的に１０００と名付ける。これは、暗視野、共焦点スキャン分光法として最適に特徴付けられる。分子計数用に前部で記載された蛍光に基くシステムとは異なって、この検出器は、十分な光のレベルで作動し、そして高い感度の検出を必要としない。

【0165】

照射は、白色光源由来であるべきであり、そして直接の反射が検出器により検出されないように配置されるべきである。これは、微小孔物質を、高強度の小型のアーク灯を検出対象の全集束角より大きい角度で微小孔物質を照らすための適切な光学系と伴に使用することによって典型的に達成される。これは、慣用の暗視野顕微鏡照射装置又は暗視野金属顕微鏡本体と関連のハードウェアを用いて行われうる。小型アーク灯１００１は、広範な(多波長の)光であって、コンデンサーレンズ１００２により平行化された光を放出する。この光は目隠し円盤(obscuration disc)１００３に衝突し、輪状の放射ビーム１００４を形成する。照射光の輪状のビームは、検出された光が通り抜けるための中央穴を含む鏡１００５により反射される。輪状の照射光は、微小孔物質１０１０上に局在された適切な標識１００９を含む核酸に照射されるために、対物レンズ１００７の最大光集束角より大きい角度で、輪状のレフレクター(１００６)により反射される。このようにして、例えば微小孔物質由来の第一表面反射から鏡面反射された照射光は、集束光学系に入ることができない。光学シグナルは、対物レンズ１００７により集束され、比較的第一表面反射がなく、そして鏡１００５の穴を通過し、そしてレンズ１０１２により共焦点ピンホール１０１３上の結像される。共焦点ピンホール１０１３は、偽(sprious)散乱光などを低減する点で役に立つ。ピンホールを通過した光は、凹面光子１０１４に向けられ、ここで光は個々の波長１０１５へと分散され、そしてフォトダイオード・アレイ１０１６により検出される。このアレイは、ＰＲＡ標識された核酸からの散乱シグナル中に存在する複数の波長を同時に検出する。前部に論じたように、これらの散乱波長の強度は、局在された核酸の標識パラメーターを測定するために使用されうる。この例では、スキャンは、１０１７により表される静止検出器の下で膜アッセンブリを動かすことにより、或いは膜アッセンブリを静止させている間に検出器アッセンブリを動かすことにより達成されうる。

【0166】

ＰＲＡからの散乱光は、微小孔物質の表面付近のかなり小さい領域内から生じる。外部散乱が検出器に達することを制限するために、高開口数の対物レンズ及び共焦点ジオメトリーを使用することは有利である。

【0167】

ＭＣ-ＰＲＡ検出器は、複数の波長を同時に検出するべきである。図１０は、これの一の実施態様を図示する。該検出は、共焦点を通過した散乱光を直線アレイ光検出器上に分散するために、光学格子を使用することによって達成される。光レベルは十分高いので、高価な光子計数及び冷却型ＣＣＤシステムではなくて、慣用のフォトダイオード検出器の使用を可能にする。

【0168】

ｄ.融解曲線分析

被分析物が核酸である場合、融解曲線分析(ＭＣＡ)は、核酸ハイブリダイゼーションの可逆的な性質に基いた技術である。二本鎖の核酸、並びに広範な二次構造(自己ハイブリダイゼーション)を有する一本鎖の核酸は、温度及び溶媒組成のよく規定された条件下で単純な一本鎖構造へと戻される。この過程は、融解と呼ばれている。多くの核酸染色は、二本鎖核酸断片に結合されたとき蛍光の大幅な増大を示し、そしてこれらの二本鎖断片が融解すると、蛍光を失う。融解曲線は、一般的に、蛍光染色された核酸の蛍光対温度のプロットである。曲線の形は、融解核酸の構造についての情報を含み、そして、低い分解能

ではあるが、核酸同定の特異的指標として使用されうる。この技術は、リアルタイムＰＣＲ分析及び分子生物学において広く使用される。

【0169】

一の態様では、ＭＣＡは、少ない異なる核酸の混合体において、標的核酸を区別するために使用されうる。一の態様では、膜フィルター温度又は核酸融解を引き起こす別の因子を制御及び変化させるために改変されたＭＣ検出システムを伴って、核酸局在化及び標識を上で記載されるように行った。これは、微小孔物質を流れる液体の温度を制御することにより、全体の使い捨ての溶媒組成物などの温度を制御することにより、達成されうる。核酸計数融解曲線分析(ＮＡＣ-ＭＣＡ)は、幾つかの微小孔物質の温度でＮＡＣ計測することにより、そして標的核酸の既知の性質に蛍光変化対温度を相関することにより行われる。

【0170】

例えば、標的核酸は、８０℃の融点を有しうる。検出装置は、約７５℃～約８５℃まで０.５℃単位で、ＮＡＣ計測を行うためにセットされた。標的核酸は、融解温度に達すると、特異的蛍光の減少を引き起こす。非標的核酸は、多くが異なる温度で融解するようである。検出装置は、前以って規定された範囲で溶解する核酸を計数するためだけに設定される。限られた数の混じりこんだ非標的核酸を含む適用では、この付加された特異性は、相補的プローブ、染色などの開発における面倒な事態を削ることができる。大規模な二次構造を有する一本鎖ＲＮＡ(例えばＨＩＶ、ＨＣＶ、エンテロウイルスなど)は、予測された固有の温度で融解する染色二次構造でＮＡＣ-ＭＣＡにより分析されうる。さらに、複数の相補核酸に結合するプローブは、特異的標的核酸、例えばＨＩＶ用に設計され、これらは全て一定の温度で融解する。この場合、複数のプローブにハイブリダイゼーションし、そして適切な核酸色素で染色された局在化ＨＩＶは、特異的プローブ設計に固有の決められた温度で融解する。

【0171】

特定の状況では、局在された核酸の形態学は、ＳＮＲ検出を改良するために使用されうる。前部で論じたように、核酸は、並外れた高い縦横比を有する分子である。多くの標的核酸は、明確に同定できる形態で局在化される。図１１は、ニッケル・ホウ素アノポア膜に局在化され、サイバー・ゴールド色素で染色し、そして実施例１２に従って図９において示される検出器を用いて、画像化されたヒト・ゲノムＤＮＡを示す。棒状のＤＮＡが明らかに見られる。この場合、ＤＮＡのピクセルの明るさは、周りのバックグラウンドのピクセルよりは明るいが、ＤＮＡは、先ず形により同定される。イメージ分析技術は、特定の形を同定を助けるため、重なり領域を補正するため、画質を改良するためなどに利用でき、そして計数の正確さを改善する。特定の核酸及び染色技術は、光学的に同定できる構造であって、小型の検出領域内に容易に適合しない構造もたらし、実質的な画像の重なりが存在し、そしてそうでなければ個々の核酸を同定するための画像分析技術を必要とする。これらの技術は、広く使用され、そして当業者に周知である。

iii、計数

比較的純粋な被分析物を微小孔物質の表面付近に固定化することであって、本明細書中に記載される技術により達成される固定化は、被分析物の計数に関して重要な変量である。「計数」という用語は、本明細書中で、微小孔物質の特定の領域で、微小孔物質の表面付近に局在された個々の被分析粒子の数を測定することとして定義される。比較的大きく、多標識された被分析物についてでさえ、単一分子の計数は、特別な検出能力を必要とする。結果として、単一分子計数は、競合又は相互作用物質がないかなり精製された非分析物を固定化することを必要とする。以下の原理は、本明細書中で記載される技術により達成される表面固定化が、どれだけ分子計数を高めるかを示す。

【0172】

光学系では、装置の光収集能力は、焦点の深度に比例するということが数学的に示される。つまり、１ミクロンの深度領域に局在された蛍光粒子を調べるために最適化された装置内で検出されるシグナルは、１００ミクロンの深度領域に局在された同じ蛍光粒子を調

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4868

べる装置であって同等に最適化された装置内で検出されるシグナルよりも１００倍大きくなるだろう。焦点装置の１ミクロンの深度は、１００ミクロンの深度領域を段階的に調べるために使用されうるが、１００倍の時間がかかる。

【0173】

光学分子計数は、光学的に調べるために並外れて小さい体積を単離することを必要とする。被分析物を計数するための最も直接的なアプローチは、標的分子の有無についてかなり小さい検出体積について調べることである。検出体積が大きくなれば、分子の解像度が失われ、検出体積中の非特異的源由来のバックグラウンドシグナルが大きくなり、そして標的分子の存在からもたらされる特異的シグナルは低くなり、それにより標的分子が検出体積に存在する場合を見分ける実用面での能力を低下させる。

【0174】

小さい検出体積は、分子解像度の増加及び光学シグナル対ノイズ比の改善をもたらし、そうした体積は又、アッセイ時間に影響する。検出体積(例えば、必要とされる解像度及びシグナル対ノイズ比の計数に基く)について考えると、必要とされる計数時間は、調べなければならない総体積に比例する。例えば、２００マイクロリットル(μｌ)の患者のサンプルは、１０の標的核酸分子のみを含みうる。１０立方ミクロンの検出体積を想定すると、２００μｌの体積は、１０の標的分子を計数するため２００億回調べなくてはならない。１０の標的分子が、直径５ミリメートルの表面に局在されるなら、該表面は、おおよそ１００万回調べなければならなない。本明細書中に開示されるように、標的分子をフィルター表面上に局在化することは、検出に基いた２００００倍効果的な濃度改良を表し、アッセイ時間の同等の節約になる。

【0175】

分子配置は、光学的計数の間知らされるべきである。サンプル中の検出体積を数百万回～数億回調べることは、完了するために数分かかりうる。自由に拡散する分子は、高速走査検出器により複数回計数されうるか、又は接続された電荷結合素子(ＣＣＤ)アレイ検出器で全く計数されない。こうして、標的分子の配置は、微小孔物質の表面付近に固定化されることにより最も容易に制御される。核酸計数の場合、微小孔物質は、非蛍光であり、そしてハイブリダイゼーション及び/又は蛍光染色が起こる条件下で標的核酸を固定化できることが望ましい。

【0176】

許容される被分析物計数アッセイでは、以下の条件が考慮されるべきである：

１．　シグナル-対-ノイズ比(ＳＮＲ)：標的被分析物は、許容されるエラー割合に一致する装置のシグナル-対-ノイズ比を達成するために十分蛍光を有するべきである。核酸の場合、３より大きい、又は約３～約５０、約３～約４０、約３～約３０、約３～約２０、又は約３～約１０のＳＮＲが、明確な、低エラー割合の核酸計数に所望されるということが計算により示される。

２．　アッセイ特異性：非標的被分析物は、許容されるアッセイ特異性の要件に合致して非蛍光性であるべきである。

３．　ダイナミックレンジ：標的被分析物は、微小孔物質の表面付近に、解像でき、蛍光実体を分離できるものとして、局在されるべきである。つまり、各々の標的被分析物は、他の全てから個別に計測できるべきである。こうして、検出器が調べる各ピクセル又は検出領域は、１又は0の蛍光標的被分析物を含むべきであり、又はシグナル処理技術は、計数間違いを防ぐため、個々の分子の境界線を同定するために使用されうる。

【0177】

標的被分析物が、調べられた体積中に存在するときに検出されたシグナルと、標的被分析物が存在しない際に検出されるシグナルとの比は、シグナル-対-ノイズ比(ＳＮＲ)として定義される。検出されたシグナルは、特定の波長での強度、或いは強度、複数の波長、相、タイミングなどを含むパラメーターの複合体に単純に基きうる。必要とされるＳＮＲは、器具設計とアッセイ要件との関数である。以下の実施例１４は、共焦点上面蛍光光度計のスキャンに基く核酸計数の計算を表し、必要とされるＳＮＲの見積もり、設計された

検出領域、必要とされるスキャン時間、及びハードウェア条件を含む。

【0178】

被分析物が核酸である場合、核酸計数アッセイにおいて高いＳＮＲを達成するための限定因子は、非特異的なトレーサーの結合である。核酸染色であろうがオリゴに基く蛍光プローブであろうが、トレーサーは、標的核酸に結合しない微小孔物質の表面付近に存在するようである。非特異的トレーサーは、調べられたときに蛍光を発するが、該蛍光は、標的核酸として誤って計測してはいけない。

【0179】

例えば、局在された標的核酸が、オリゴヌクレオチドに基く蛍光プローブで標識されるとき、各々の局在された標的核酸が、検出領域において一の蛍光プローブのみとハイブリダイゼーションし、並びに相対の蛍光特性(量子収量、波長など)が特異的結合プローブと非特異的結合プローブとで同じであるなら、標的核酸は、ランダムに位置された非特異結合プローブから区別をすることができない。これは、蛍光ビーズ標識、量子ドット、表面プラスモン共鳴粒子、多標識などを含むプローブ上の蛍光標識の程度に関わらず、いえることである。この場合では、真のＳＮＲが１０であることは、１の検出領域において標的核酸に特異的に結合する最低限１０のプローブを必要とする。但し、該プローブ非特異的結合(ＮＳＢ)は、単離された物として残り、個々の分子は、互いに集合されないという場合を想定する。

【0180】

上記の状況は、共通の蛍光タグで各々標識された複数のプローブを使用する検出領域の蛍光の単純強度計測に基く。各プローブが、明確に分離された蛍光タグで標識されて、分離され、同定できる検出可能なトレーサーを形成するなら、低プローブ数での高効率のＳＮＲは可能でありうる。例えば、計数アッセイに必要とされるＳＮＲは、許容される頻度の非特異事象の計数間違いに基く。単純化された場合において、これは、非特異的事象が所望の特異的事象と同一である(装置検出器により検出されるように)という確率を決定することと同様である。共通のタグ(例えば１の蛍光波長の強度計測)システムは、５個のプローブで行われる。非特異的事象が、５個が合わさったプローブと同じ強度である確率は低い。別々に同定されるタグを有する５個のプローブ(例えば、波長及び強度)に基くシステムでは、非特異的事象が同じ強度であり、そして正しい割合で必要とされる波長の全てを含むという確率はさらに低い。従って、低減されたプローブ数で高効率なＳＮＲを維持するために、より複雑な検出スキームが使用されうる。

【0181】

高効率のＳＮＲは、非特異結合が、それらが標的核酸に特異的に結合されたときと同じ光学応答を誘発しない技術を使用することにより、低いプローブ数で達成されうる。これらは、核酸に結合されたときに実質的な量子収量の増加を引き起こす核酸染色の使用に類似している。酵素は、表面と接触されるとき、かなりの活性を頻繁に失うことが知られている。本明細書中に開示されるように、特異的に結合されたプローブであって、酵素タグで標識されるプローブは、非特異的に結合されるプローブのように直接表面に接触するというよりはむしろ、局在された核酸の微小孔表面に渡ってにサスペンドされると考えられる。従って、酵素標識されたプローブは、少ないプローブ数で高効率のＳＮＲを表しうる。

【0182】

ｉｖ．被分析物濃度の相関

本明細書中で使用される「相関」という用語は、微小孔物質上で計数される被分析粒子の数に基き、そして既知の関係、例えば微小孔物質、標識効率、検出効率、視野、などについて訂正されたサンプルの既知体積中に存在する被分析物の濃度を定量することとして定義される。

【0183】

一の態様では、定性的核酸計数又は検出は、有利に行われうる。この態様では、元のサンプル濃度に対する検出されたシグナルの最終相関は、全然重要ではない。例えば、正確

な濃度よりはむしろ病原体の有無の同定は、診断において十分である事が多い。実施例は、非限定的に生物戦争薬剤の同定、咽頭スワブにおけるＳｔｒｅｐＡ細菌の同定、Ｓ.アレウス(Ｓ.Ａｒｅｕｓ)カルチャーにおける薬剤体制を規定するＭｅｃＡ遺伝子の同定などを含む。本明細書中に記載される微小孔物質、方法、及び物品は、迅速で、使用が簡単で、分子増幅ステップ(ＰＣＲなど)を省き、単純なハードウェアだけを必要とし、処理することなく、例えば得られた最終の結果を最初の濃度に相関することなく複数のサンプル類型の使用能力を介して定性的な分析を提供する。

【0184】

別の態様では、計数された核酸を、最初のサンプル核酸濃度と相関する能力は、定量的な分析に重要である。実際、固定化された核酸を計数する方法は、何年も存在してきた。

例えば、単純に比較的高濃度のサンプルをきれいな石英表面と接触することにより、核酸が石英表面に固定されうることは、当該技術分野に周知であった。核酸の幾つかは、石英に「くっつき」、そして原子間力顕微鏡(ＡＦＭ)、走査電子顕微鏡(ＳＥＭ)などにより計測されうる。一の態様では、本発明に記載される微小孔物質、方法、及び物品は、核酸が微小孔物質へ局在化される簡便さ及び速さにより、広範なサンプル類型及び微小孔物質への局在を許容する精製度により、並びに計数された核酸を最初の核酸サンプル濃度へと相関する能力により、当該技術分野に周知である技術の現状を改良する。

【0185】

本明細書中に記載される微小孔物質は、機械的なろ過に類似の方法を介して、被分析物の局在を許容する。該局在ステップは、特定の被分析物、例えば特定のサイズの核酸について実質的に定量的であり、計数又はＰＣＲなどの更なる処理ステップなどの検出により同定されるため、全ての標的核酸の１００％近くは物質の表面付近に局在する。このかなり高い局在効率は、かなり低い濃度の物質であって、サンプル１ミリリットルあたり、数コピーのみを有する物質の分析を可能にする。

【0186】

局在化の再現性はまた、相関に影響する。例えば、１００％の標的核酸が常に捕捉されそして分析に利用できる場合より確かに低い感度ではあるが、微小孔物質が常に２％の核酸を補足するなら、核酸計数と開始サンプル濃度との間の相関は確立されうる。本明細書中に記載される微小孔物質、方法、及び物品は、並外れて効率的かつ再現性のある局在を許容する。

【0187】

装置、ハードウェア、及び処理パラメーターは、うまくいく相関を予想されるべきである。例えば、環状ビリオンについての定量アッセイが所望されるならば、以下のパラメーターは、最終検出核酸カウントを、最初のウイルス濃度へと相関するために知られているべきである。

１．ビリオン溶解効率
２．捕捉膜を通す開始サンプル体積
３．核酸の捕捉効率
４．核酸の標識効率
５．標識核酸の検出効率
６．検出器により調べられる膜の割合
７．システムの線形性対検出されたシグナル

【0188】

現存している被分析物計数方法とは違って、上で記載されたパラメーターの効率と再現性を介してされる、最終被分析物カウントと最初のサンプル体積との相関はかなり改良された。図１２ａ～１２ｈは、ＹＯＹＯ１標識されたウシ胸腺ＤＮＡの処理された反転画像であって、実施例１３に従って光学的に検出された画像を示す。ろ過された試験サンプル中における相対ＤＮＡ濃度は、図１２ａの１～図１２ｈの１２８まで増加された。図１２ａ～１２ｈに見られるように、個々の核酸は、高感度診断アッセイに関心のある範囲内で容易に計数されうる。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4871

【0189】
図１３は、未相関核酸カウント対核酸濃度のグラフであり、計数されたＹＯＹＯ１で標識されたウシ胸腺ＤＮＡであって、１００μｌの開始サンプル体積からアノポア膜表面へ局在されたものの曲線を示す。処理された画像に対応する該曲線カウント値は、図１２ａ-１２ｈに示される。図１３のグラフは、本明細書中に記載される技術を使用する未相関ＮＡＣアッセイ較正曲線の例である。
【0190】
図１４は、図１３由来の核酸濃度に関して訂正された核酸カウント(つまり、画像由来の訂正されたサンプル濃度対真の相関サンプル濃度)を示し、そして検出器及び固定化効率について訂正されたグラフである。
【0191】
Ｄ.物品及びキット
微小孔物質のいずれかは、ろ過装置の一部でありうる。本明細書中で名付けられる「ろ過装置」という用語は、本明細書中で記載される微小孔物質の少なくとも１を含む装置のいずれかとして定義される。
【0192】
一の態様では、ろ過装置は、図１５ａに記載される。ろ過アッセンブリ１５３０は、被分析物を含む試験サンプル１５３３を保持するためのウェル１５３２を含む。１のウェルのみが図１５ａにおいて示される一方、フィルター・プレート１５３４の一部である複数のウェルが使用され、該プレートは、多ウェルの形式、例えば９６又は３８４ウェルのフィルター・プレートを有することもあるということは理解されるべきである。ウェル１５３２の底開口部１５３８は、被分析物の局在化のため微小孔物質１５４０で覆われている。一の態様では、０.２ミクロンのアノポア膜フィルターは、ウェル１５３２の底部に熱融合されうる。底開口部１５３８は、約5～１０ｐｓｉの差を与えて、試験サンプル１５３３を分析フィルター１５４０を介してろ過することを手助けする吸引源(図示せず)へと繋がっている。さらに、分析フィルター１５４０は、被分析物の光学分子検出用に構成される。例えば、分析フィルター１５４０は、ウェル１５３２の底部分に取り外し可能な状態で付着されて、光学検出システムにおける使用のため、フィルター１５４０を取り出すことを可能にした。さらに、フィルター・アッセンブリ１５３０は、適切な検出器と繋がれて、取り外すことなく分析フィルター１５４０上で光学分子検出を可能にするように設計されることもある。
【0193】
別の態様では、図１５ｂは、別の実施態様に従った前ろ過を伴い、フィルターアッセンブリ１５３０を使用するフィルターシステムの模式的記載である。図１５ｂにおいて図示されるように、フィルターアッセンブリ１５３０は、シリンジ型のフィルター(図示)又はフィルタープレート(固定又は取り外し可能、示さず)などの前ろ過装置１５３５と接続されて使用されうる。前ろ過装置１５３５は、液体中の被分析物を含む粒子が、第一フィルターを通過することを許容する一方、プレフィルター１５３６中の微小孔より大きい汚染物又は不純物を保持するために構成されるプレフィルター１５３６を含む。一の態様では、被分析物が核酸であるとき、該核酸は、ビリオン、細菌、胞子などを含みうる。プレフィルター１５３６は、膜フィルターなどの表面フィルターでありうるか、又はプレフィルター１５３６は、デプス型フィルター(depth filter)でありうる。
【0194】
使用の間、試験サンプル１５３３は、プレフィルター１５３６を通してウェル１５３２へとろ過される。更なる試薬、例えばビリオン溶解試薬、色素、緩衝液などは、ウェル１５３２中のろ過された試験サンプルに加えられうる。ろ過された試験サンプルは、インキュベーションされ、そして次に分析フィルター１５４０を介してろ過されて、核酸捕捉及び局在化をもたらされた。
【0195】
一の態様では、フィルターアッセンブリ１５３０は、例えばＨＩＶ、Ｃ型肝炎、又は別

の感染性疾患についての試験などの迅速ウイルス量アッセイである。この態様では、感染性のビリオン粒子のみが計数されるべきである。つまり、多くのウイルス様粒子は、核酸を含まず、そして感染性がない。同様に、遊離して循環しているウイルス核酸(封入されていない)もまた感染性がない。図１５ｂにおいて示されるろ過システムを使用する際に、無傷の未溶解ビリオンは、プレフィルター１５３６を通過し、一方巨大な不純物及び遊離の核酸が保持される。ウェル１５３２中のろ液ビリオンは、分析フィルター１５４０上に捕捉するため核酸を放出するように処理され、一方タンパク質、ウイルスカプセルの破片、別の小さい不純物などは、フィルター１５４０を通過する。分析フィルター１５４０上に捕捉される唯一の核酸は、無傷のビリオン中に含まれていた核酸である。こうして、感染性のあるビリオンのみが計数される。

【0196】

例えば、ＨＩＶウイルス量分析は、統計的に意味ある十分な核酸を捕捉するため、約２００μｌの患者サンプルを必要とする高感度アッセイの一部として、フィルターアッセンブリ１５３０を用いて行われることもある。そうしたサンプルを獲得するため、２００μｌのヒト血漿サンプルは、図１５ｂに示されるように、大きな不純物及び遊離の核酸を取り除くために、プレフィルター１５３６を使用して前ろ過される。無傷のＨＩＶビリオンは、直径約０．１ミクロンであることが知られており、０．２ミクロンのプレフィルターを通過する。前ろ過されたサンプルは、次にウェル１５３２中で処理されて、ビリオンを溶解し、ウイルスＲＮＡを放出し、そして該ウイルスＲＮＡは、開示された方法に従って次に分析フィルター１５４０上に捕捉される。或いは、前ろ過されたサンプルは、滅菌されたきれいな容器中にいれられ、そして次に溶解試薬などを伴って、正確にウェル１５３２中にピペットで移された。フィルター１５４０の表面上に局在されたウイルスＲＮＡはつぎに、光学的分子計数又は慣用のＰＣＲ型分析などの分析にかけられる。

【0197】

一の態様では、ろ過装置は内部と外部を有するウェル本体から構成される。ここで該ウェル本体は、内部壁と外部壁を有し、そして(ｂ)複合体及び本明細書中に記載される改変型微小孔物質を含む微小孔物質のいずれかから構成されるフィルター、ここで該フィルターは、ウェル本体の内部壁に付着される。一の態様では、フィルターは接着剤を伴ってウェル本体の内部表面に取り付けられる。別の態様では、該フィルターはフィルター・ホルダーの使用によりウェル本体の内部表面に取り付けられる。一の態様では、ウェル本体は、化学的に不活性である物質、及びウェル本体の外形又は構造を変えることなく、熱にかけられる物質のいずれかから構成される。一の態様では、ウェル本体はポリプロピレンなどのプラスチックから構成される。

【0198】

被分析物を含むサンプルが、フィルターと連絡されたウェル本体の内部を通過すると、被分析物は、微小孔物質の表面付近に局在され、そして残りの溶液は、フィルターを通過し、そして出口から排出され、局在された被分析物は、さらに操作されうる。一の態様では、ウェル本体の入口及び出口は、キャップ又はシールをつけることができる。例えば、入口及び/又は出口は、ねじ式のキャップを取り付けられるため、ねじ山をつけられうる。あるいは、入口及び/又は出口は、キャップが入口又は出口上にスナップ式で取り付けられるエッジ又は外形を含みうる。一の態様では、キャップ又はシールは、ウェル本体を構成する物質のいずれかでありうる。

【0199】

上で記載されるろ過装置の幾つかの態様は、図１６に図示される。一の態様では、図１６ａは、一般的に１６５０と名付けられるフィルターアッセンブリであって、市販のサーマルサイクラー１６７０内に適合するように設計されたフィルターアッセンブリを図示する。該ろ過装置は、ウェル本体１６５１、フィルター・ホルダー１６５２、及び出口キャップ１６５３から構成される。分析フィルター１６５４は、熱融合又は別の手段によりフィルターホルダー１６５２に取り付けられて、操作の間サンプル１６５５が分析フィルター１６５４を介してろ過されることを保証する。アッセンブリの間、取り付けられた分

析フィルター１６５４を含むフィルターホルダーは、ウェル本体１６５１内に配置され、そして一般的に１６５６として示される先端の表面の間の機械的な相互作用により保護される。或いは、これらの表面は、接着接合され、又はそうでなければ、漏れがない様式で貼られる。取り付けられた分析フィルター１６５４上に過度の圧力を与えないために、ウェル本体１６５１とフィルターホルダー１６５２との間の隙間１６５７が許容されるが、サンプルの汚染及び持ち越しを妨げるために最小限にされなければならない。使用される間、図１６ｂに示されるように、サンプル１６５５は、フィルターアッセンブリ１６５０と内に配置され、そして出口キャップ１６５３は、取り付けられていない。穏やかな吸引１６６６、圧力、又は遠心力が使用されて、分析フィルター１６５４を通したサンプル１６５５の液流に作用する。ろ液１６５８は、フィルターアッセンブリ１６５０から流れて、出口１６６０から排出(図示せず)され、一方核酸１６５９は、さらなる処理のため、分析フィルター１６５４上に保持される。

【0200】

局在された被分析物１６５９及び分析フィルター１６５４は、洗浄され、又はそうでなければ、ＮＳＢ、持ち越しなどの効果を最小限にするためにこの点で処理される。比較的乾燥したフィルター・アッセンブリ１６５０であって、分析フィルター１６５４上に被分析物１６５９を含むアッセンブリの出口１６６０は、出口キャップ１６５３で蓋をされて(図１６ａ)、さらなる処理の間におけるアッセンブリからの液流を妨げる。出口１６６０に対する液体シールは、出口１６６０上に存在する１６６１として一般的に示される先端表面と、出口キャップ１６５３との間の機械的な相互作用により影響される。当業者に知られている出口１６６０をシールする別の方法は、例えばバルブ、プラグなどについても考慮される。

【0201】

図１６ｃは、さらなる処理用に構成されたフィルターアッセンブリ１６５０を示す。例えば、反応試薬１６６２、例えばＰＣＲマスター・ミックス又は核酸標識用のハイブリダイゼーション試薬は加えられ、そして分析フィルター１６５４上で核酸１６５９と接触される。キャップ１６６３は、フィルターアッセンブリ１６５０のトップ開口部１６６４をシールするために加えられる。或いは、トップ開口部１６６４は、当業者に知られているフィルムでシールされうる。この構成では、該アッセンブリは、慣用のＰＣＲ、ＲＴ-ＰＣＲ、ハイブリダイゼーションなどに必要とされる熱サイクル又は別の処理、分析処理にかけられうる。さらに、この実施態様は、分子計数などの別の検出スキームに有用でありうる。この場合、ウェル本体１６５１は、特定の検出器光学設計を収容するためには短いかもしれない。しかしながら、全ての場合において、処理の間、開口部に可逆的にキャップをつけることにより、液体を膜と接触させて保持する能力は、重要である。

【0202】

別のフィルターアッセンブリは、図１７ａ及び１７ｂに示される。このフィルター・アッセンブリは、一般的に１７７０と名付けられ、図１６において示されたフィルター・アッセンブリについて記載されるウェル型の形よりはむしろ、サーマルサイクル用に熱を伝える平らな表面で操作されるように設計される。一の態様では、微小孔物質は、酸化アルミニウムから構成される。該酸化アルミニウムは、多くのＰＣＲサーマルサイクルにおいて見られるプラスチックのウェルの壁に比べて、優れた熱伝導性質を有する。従って、分析膜を通して熱を伝えるように設計されたフィルターアッセンブリ及びサーマルサイクラーを提供することにより、熱サイクル時間の改良が認められうる。

【0203】

別の態様では、２以上のウェル本体を含むろ過装置、ここで各ウェル本体は上部開口部と底部開口部を有し、そして(ｂ)本明細書中に記載される微小孔物質のいずれかであって、複合体及び改変された微小孔物質を含むものから構成されるフィルターであって、ここで該フィルターが各ウェル本体の底開口部を覆うフィルターから構成される。図１７は、該実施態様の特定の態様を図示する。ウェル本体は、上記物質のいずれかから構成されうる。

【0204】
図１７ａは、サンプル製造の間、吸引ろ過装置１７７１に取り付けられたフィルターアッセンブリ１７７０を示す。或いは、ろ過装置のフィルターを通した液体の移動を向上させるいずれかの装置がこの実施態様において使用されうる。そうした装置の例は、非限定的に、圧力、遠心、又は流体ポンプによるろ過を含む。フィルターアッセンブリ１７７０は、３個のウェルのアッセンブリとして示されているが、一般的にどんな数のウェルをも含みうる。例えば、現在使用される多ウェルプレートは、９６又は３８４の分離されたウェルを含むことが多い。フィルターアッセンブリ１７７０は、以前に記載されるようにろ過の間、被分析物がフィルターに局在化することを可能にするように、熱シーリング又は別の手段により取り付けられた分析膜１７７２を含む。分析される溶液、この場合、全血液ライセート１７７３は、フィルターアッセンブリ１７７０のウェル中に含まれる。吸引ろ過の間．吸引シールは、吸引シーリング表面１７７５で作られる。フィルター・アッセンブリ１７７０は、対応した支持プレート１７７４であって、吸引下で該アッセンブリが変形してシーリング表面１７７５上でより均一な吸引シールをもたらすプレートと伴に示される。一の態様では、吸引により、全血液ライセート１７７３が、分析フィルター１７７２をとおしてろ過される。この態様では、全血液ライセート１７７３内に存在する核酸は微小孔物質１７７２上に局在される一方で、全血液ろ液１７７６は分析フィルター１７７２を通過し、そして最終的に廃棄部(図示せず)に達する。前の例において記載されるように、分析膜１７７２は、さらなる処理の前に洗浄されうる。
【0205】
図１７ｂは、ＲＴ-ＰＣＲ処理の間のフィルターアセンブリ１７７０を示す。この態様では、処理の前に、使い捨てウェルは、漏れ、汚染、及び蒸発を防ぐためにシールされうる。分析フィルター１７７２は、接着剤(粘着性フイルム)により、又は熱シールにより、薄い(１ｍｉｌ)プラスチックのシートを、膜又は膜シール１７８０と示される膜周辺のハウジングにシールされうる。この膜は、シール/ろ過膜の重ね合わせを通して熱が早く伝導することを可能にするように薄くあるべきである。一の態様では、熱伝達分析により、アノポアフィルターの熱抵抗性は、典型的なシールフィルムに比較して無視できるものであるということが示される。それにも関わらず、慣用のプラスチック・シーリング物質(ポリプロピレンフィルムなど)を使用する場合でさえ、この熱抵抗性は、光サイクルＲＴ-ＰＣＲ装置(Ｒｏｃｈｅ)において使用されるガラス製のキャピラリーより少なく、サーマルサイクラーに基くプラスチック製のウェルより数倍も少ない。ろ過膜シーリングに先立って、ぶら下がって残っているろ液の滴又は液体を取り除くために、任意の吸い取りステップは行われうる。該ステップは、使い捨てブロッティング物質を用いてうまく達成されうる。ここで、該ろ過アッセンブリ１７７０は、吸引ろ過装置１７７１から取り外され、素早く使い捨てブロッティング表面(例えばブロッティング紙)に対してブロットし、次に膜を接着剤又は熱シール膜でシールされた。
【0206】
この態様で、使い捨てウェルのトップ開口部は、シールされうる。さらにシーリングは、反応の光学検出を許容するように達成されるべきである。トップシールプレート１７８６は、図１７ｂにおいて、分離された成形片であって、全体として光学分析用の薄い光学窓１７８２を含む片として示される。透明な窓について灰色で示されているが、トップシールプレートは、全体窓を有する透明低蛍光物質から構成されうる。示されるように、トップシールプレート１７８６は、ウェル内で、ＰＣＲ反応液１７８８の液体レベルのすぐ上で、フィルターアッセンブリ１７７０とのシール１７８３を形成する。熱サイクルの間、ＰＣＲ反応液１７８８溶液温度は、同一でなくては成らず(定温)、液体蒸発は、定常の反応条件を維持するために最小限にされなければならず、そして正確な光学計測を可能にするため、凝集は、光学窓１７８２上に制御されるべきである。従って、ＰＣＲ反応液１７８８の液体表面及びシールプレート１７８６の光学窓との間の距離は、使用のしやすさ、物質の構成、並びに所望される熱及び凝集を最小限にするための光学窓の物質移動条件に合わせて最小限にすべきである。

【0207】
図１７ｂを参照すると、熱サイクルは、温度検出フィードバック・ループにおいて操作される熱電モジュール１７８５から、膜シール１７８０/分析フィルター１７７２を介した直接的な熱伝導により達成される。つまり、熱モジュール１７８５(ＴＥＭ、ペルティエ加熱/冷却)は、膜シール１７８０と直接接触しており、介在性の循環空気又は水浴、アルミニウムブロックヒーター中への緩いかみ合いに関連する断熱性の隙間を伴わない。規格が対応したマルチウェルプレート・デザインを使用することにより、熱接触は改良される。ここで、フィルターアッセンブリ１７７０の規格が対応した支持プレート１７７４は、十分な変形能力を有しており、底膜シール１７８０が、熱電過熱/冷却モジュール１７８５の表面へと適合することを可能にする。このようにして、従来のサーマルサイクル装置と比べてより良い正確性及び速さを備えて優れた伝熱能力が予期される。
【0208】
図１７ｂの実施態様は、図１８及び図１９において示される。これらの実施態様では、ろ過装置は、
（ａ）　第一表面及び第二表面を有するプレートであって、ここで該プレートは、少なくとも１の穴を有し、該穴は、プレートの第一表面と第二表面で一定の幅を有する、前記プレート、及び
（ｂ）　第一表面と第二表面を有する微小孔物質であって、ここで該微小孔物質の該第一表面は、プレートの第二表面に隣接しており、該微小孔物質がプレートにおける各穴を覆う、前記微小孔物質
を含む。本明細書中で使用される「隣接」という用語は、プレート及び本明細書中で記載される微小孔物質のいずれかであって、互いに物理的に接触しているものとして定義される。「隣接」という用語はまた、別の物質により分離されているプレートと微小孔物質のことも指す。例えば、プレフィルターは、プレートと微小孔物質との間に配置されうる。
【0209】
図１８では、プレート１８００は、剛性、低蛍光、製造の容易さ、及び熱伝導性を有する物質のいずれかから構成される。一の態様では、プレートは、陽極酸化アルミ又はプラスチックから構成される。図１８ａでは、１２個の反応ウェル１８０１は、プレート１８００を介して形成され；しかしながら、穴のいずれの数がプレート中に存在し、１の穴のみを含む場合もある。一の態様では、アノポア膜１８０２は、プレート１８００の底表面に結合され、それにより反応ウェル１８０１の底を形成する。膜は、液体接着剤、例えばエポキシ系、アクリル系など又は粘着テープで接着されうる。微小孔物質は、プレート内の各穴を覆う。図１８ｂを参照すると、該ウェルは、光学的検出、シーリング、液体の取り扱いなどを手助けするために、大きいトップ部分と小さい底部分１８０５を有する。一の態様では、大きいトップ部分１８０４は、不純物を取り除くことができるプレフィルターを受けることができる。サンプルを含む被分析物は、微小孔物質を通してろ過及び洗浄され、それにより、さらなる方法及び検出用に被分析物を局在化する。一の態様では、図１９ａを参照すると、被分析物が核酸である場合、局在された被分析物を含む微小孔物質１９０２の乾燥底表面であって、局在された被分析物質を含むものは、熱溶接ポリプロピレン熱シーリング・フィルム１９１０により、乾燥膜上に直接シールされうる。反応液体１９１３、例えばＰＣＲマスター・ミックスは次に、ウェル１９０１中に加えられうる。反応液１９１３を含むウェル１９０１のトップは、透明な粘着テープ１９１１(図１９ｂ)または透明なスナップ方式のトップ１９１２(図１９ａ)により密閉されうる。このアッセンブリは、例えば図１７において記載されように処理されうる。
【0210】
別の態様では、核酸被分析物の濃縮及び局在化に使用される微小孔物質は、図２０におけるカスケード・フィルターアッセンブリ２０８０の一部でありうる。フィルター・アセエンブリ２０８０は、被分析物を含むサンプルを受け取る取り外し可能なハウジング２０８２を含む。ハウジング２０８２の第一部分２０８３は、試験サンプルを前ろ過するため

の０．２ミクロンアノポア膜フィルターなどの第一フィルター２０８４を含むように構成さる。ハウジング２０８２の第二部分２０８５は、被分析物の局在化のための第二フィルター２０８６、例えば０．２ミクロンアノポア膜フィルターを含むように構成される。フィルター２０８４及び２０８６は、ハウジング２０８２内において一列のフィルター型の配置に配列され、その結果フィルター２０８４がフィルター２０８６に隣接し、そして先行する。サンプルの入口チューブ２０８７は、第一部分２０８３における第一チャンバー２０８８と流路で繋がっており、そして排出チューブ２０８９は、ハウジング２０８２の第二部分２０８５中で、第二チャンバー２０９０と流路で繋がっている。

【0211】

一の態様では、フィルター・アセンブリ２０８０を使用する間、血清サンプルなどの前処理された患者サンプルは、チューブ２０８７を通してチャンバー２０８８へ及びフィルター２０８４上へと配置されされる。サンプルは、フィルター２０８４、そして次にフィルター２０８６を通して流れるので、核酸は、フィルター２０８６の表面に局在化される。図２０において示されるように、補足された核酸を含むフィルター２０８６は、さらなる処理及び/又は以下に記載される光学核酸計数のため、ハウジング２０８２から物理的に取り出される。

【0212】

さらなる実施態様において、被分析物の濃縮及び局在に使用される膜フィルターは、図２１に図示されるように、フローセル・フィルター・アッセンブリ２１００の一部でありうる。フローセルフィルターアッセンブリ２１００は、サンプル又は被分析物を含む別のサンプルを受け取るためのハウジング２１０２を含む。ハウジング２１０２は、分析フィルター２１０４を保持するように形作られる。一の態様では、被分析物フィルター２１０４は、核酸局在用の０．２ミクロンのアノポア膜フィルターである。フィルター２１０４は、任意の孔フィルター支持体２１０５上に静止する。フィルター２１０４が十分に小さい直径を有するなら、孔フィルター支持体２１０５は除かれうる。入口チューブ・ポート２１０６は、フィルター２１０４に隣接する第一チャンバー２１０７と流路で繋がっており、そして出口チューブ・ポート２１０８は、ハウジング２１０２においてフィルター支持体２１０５に隣接している第二チャンバー２１０９と流路で繋がっている。光学窓２１１０は、ハウジング２１０２の表面上に位置して、検出器への及び検出器からの光２１１２がフィルター２１０４の表面に伝わることを可能にする。光２１１２は、蛍光光度計(図示せず)などの検出器に動作可能なように接続される。

【0213】

フローセル・フィルター・アッセンブリ２１００を使用する間、サンプルは、チューブポート２１０６を通してチャンバー２１０７及びフィルター２１０４上へと注入される。サンプルが、フィルター２１０４を介して流れるので、被分析物は、フィルター２１０４上に局在化される。一の態様では、被分析物が核酸であるとき、サンプル中の核酸は、サンプルをフローセルフィルターアッセンブリ２１００に注入する前に標識された。しかしながら、核酸は、フィルター２１０４の表面への局在化の後に標識されうる。この態様では、フィルター２１０４上の核酸は、蛍光光度計を使用することにより、光学窓２１１０を通して、フローセルフィルターアッセンブリ２１００中で、サンプル液流とフィルター膜処理と同時に計測されうる。これは、場合により、より良いバクグラウンドシグナルを排除することにより、核酸の検出性を改善する。サンプルの前ろ過は、必要とされるなら、サンプルをフローセルフィルターアセンブリ２１００に注入する前に行われる。ポート２１０６と２１０８は、キャップされるか、又は局在された核酸のさらなる処理、例えばハイブリダイゼーション、ＰＣＲ反応などが起こることを可能にするように閉められうる。

【0214】

図２２は、一般化されたウェル型の形態の改変であって、被分析物の局在化の直前に特定の前ろ過を与える改変を示す。幾つかの場合において、周囲のごみ、カビ、細菌などは、分析される被分析物サンプルを含むウェル中に入り込み、そして被分析物計数について

のエラーシグナルを作り出しうる：この効果を最小化するフィルターのアッセンブリは、一般的に２２００と名付けられた。フィルター・アッセンブリ２２００は、開口部２２０３を有する第一チャンバーを規定するハウジングを有し、該開口部はチャンバー２２０１中に被分析物サンプル２２０２の配置を可能にする。チャンバー２２０１の底は、約０．２ミクロンよりより大きい粒子を保持しかつ被分析物が通り抜けるように選ばれるプレフィルター２２０４を含む。プレフィルター２２０４の下に、前ろ過された被分析物サンプルを、分析フィルター２２０７へと運ぶ液体通路２２０５が存在する。該分析フィルター２２０７は、第二チャンバー２２０９の一の末端でハウジング中に配置される。通路２２０５の一の表面の少なくとも一部は、光学窓２２０６により規定され、該光学窓２２０６は、通路２２０５と流路で繋がった分析フィルター２２０７の表面を検出することを可能にする。

【0215】

フィルター・アッセンブリ２２００の使用の間、サンプル２２０２がフィルター２２０７を通して流れて、チャンバー２２０９に位置する液体廃液２２０８を形成するので、サンプル２２０２中に含まれた被分析物は、分析フィルター２２０７上に局在化される。曲がったポート２２１０は、吸引源に接続されて、液流を補助及び制御することもあるし、又はチャンバー２２０１は、当業者に周知であるように少し加圧されることもある。示されるように、廃液２２０８はチャンバー２２０９中に含まれうるか、又はチャンバー２２０９から取り出されて、中央廃液コンテナ(図示せず)に移される。フィルターアッセンブリ２２００は、チャンバー２２０１におけるサンプル処理(例えば、ビリオン溶解液など)まえに、固有の核酸、粒子、及び別の不純物を取り除くために本明細書中に記載されるさらなる前ろ過を伴って使用されうる。フィルター２２０４は、フィルター２２０７上への核酸固定化の直前に、妨害する恐れのある粒子を単純に取り除く。

【0216】

図２３ａ及び２３ｂは、かなり低減された拡散距離を有する被分析物計数用のフローセル装置を図示し、該装置は、固体表面(フィルターではない)局在化を用いて使用されうる。低濃度の被分析物は、固体表面へと拡散するためにかなりの時間を必要とする。図２３ａは、平面図を示し、そして図２３ｂは、固体表面局在化フローセル装置２３００の側面図を示した。フローセル装置２３００は、フローセル装置２３００は、サンプル２３０２を含む被分析物をハウジングの第一部分により定義される入口チャンバー２３０７へと導入するための入口チューブ２３０１を有する。チャンバー２３０７の一の壁の少なくとも一部は、チャンバー２３０７とハウジングの第二部分により定義される局在化通路２３０４との間に存在するフロー分配構造２３０３により形成される。図２３ｂを参照すると、局在化通路２３０４を定義するハウジングの第二部分の少なくとも１の主要表面は、光学窓２３０５から構成される。さらに、少なくとも１のこれら主要表面の内部は、局在化表面２３０６としてサンプルから被分析物を局在化するために処理された。局在化表面２３０６は、光学窓２３０５上、表面反対光学窓２３０５上、又はその両方の上に存在しうる。

【0217】

分配構造２３０３は、局在化通路２３０４において下流への均一な流れを引き起こすために十分な圧力低下を与える孔物質から一般的に構成される。特定の状況下で、流れ分配構造２３０３は、局在化通路２３０４への狭い開口部として構成されうる。局在化通路２３０４は、一般的に約１～約１０ｍｍの幅と長さ、及び厚さ約１０～約５０ミクロンの寸法を有する平面構造である。つまり、被分析物を含むサンプル２３０２は、約１～約１０ｍｍの幅，約１０～約５０ミクロンの高さ、及び約１～約１０ｍｍの長さの通路を流れる。

【0218】

フローセル装置２３００の作動の間、被分析物を含むサンプルは、装置内に流れこみ、ここで該サンプルは、局在化通路２３０４へと均一に導入される。サンプルが、この通路をとおしてゆっくり流れるとき、被分析物は、通路の高さにより与えられるかなり小さい

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4878

拡散距離(約１０～５０ミクロン)のため、比較的早く局在化表面２３０６上に局在化される。残りの液体は、局在化通路２３０４から廃液として出る。局在された被分析物は、次に表面２３０６上で光学的に検出される。該フローセル装置２３００は、重力、圧力、又は吸引流量制御で設定され、そして使い捨て装置の不可欠な要素でありうる。さらに、フローセル装置２３００は、長期間光学検出器から間接的にサンプルを処理するように設計されうる。そうしたサンプルは、局在化が完了したの後に即座に光学的に分析される。

【0219】

上で記載される物品及びろ過装置のいずれかは、キットに含まれうる。該キットはまた、局在された被分析物を検出するために上で記載された検出手段のいずれかを含む。一の態様では、光学的検出器は、標識核酸を検出するために使用される。

【0220】

E.一般用語

本発命の組成物、物品、装置、及び/又は方法が開示又は記載される前では、特記ない限り、それらは特定の合成方法又は特定の組換えバイオテクノロジーの方法に制限されず、又は特記がない限り特定の試薬に制限されず、そのようなものとして当然変わりうるということを理解されるべきである。また、本明細書中で使用される専門用語は、特定の実施態様を記述する目的のみであり、制限することを意図されていないということも理解されるべきである。

【0221】

明細書及び添付の特許請求の範囲に使用されるとき、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、文脈が明らかにそうでないということを示さないかぎりは、複数の対象を含む。こうして、例えば、「a pharmaceutical carrier」という記載は、２以上のそうした担体などを含む。

【0222】

範囲は本明細書中で、「約」ある数値～「約」別の数値として表される。こうした範囲が表されるとき、別の実施態様は、該ある数値～該別の数値を含む。同様に、数値が近似として表されるとき、前述の「約」の使用によって、特定の数値が、別の実施態様を形成するということが理解されるだろう。範囲の各々の末端は、別の末端に関して、及び別の末端と独立して有効であることがさらに理解されるであろう。本明細書中に開示される多くの数値が存在し、そして各々の数値は、その数値そのものに加えて「約」該数値として本明細書中に開示される。例えば、数値「１０」が開示されるならば、「約１０」もまた開示される。ある数値が開示されるとき、「該数値以下」、「該数値以上」、及び該数値間の範囲もまた、当業者により適切に理解されるように開示される。例えば、数値「１０」が開示されるなら、「１０以下」並びに「１０以上」も開示される。本出願をとおして、データーは多数の異なる形式で提供され、そしてこのデーターは末端と開始点及びデーター点のいずれかの組合せの範囲を表すことが理解される。例えば、特定のデーター点「１０」及び特定のデーター点１５が開示されるならば、１０及び１５超、以上、未満、以下並びに１０及び１５そのものは、１０～１５と同様に開示されたと考えられる。

【0223】

この明細書及び添付の特許請求の範囲において、以下の意味を有すると定義される多数の用語について参照が成される。「任意」又は「場合により」は、その後に記載される事象又は状況が起こることもあるし起こらないこともあるということを意味し、そして該記載は、前記事象又は状況が起こる場合とそれが起こらない場合を含むということを意味する。

【0224】

本出願をとおして、様々な文献が参照される。これらの文献の開示全ては、それが属する技術の状態をより十分に記載するために、本出願中に援用される。開示された参考文献は、個々に及び特異的に、該文献中に含まれる構成要素であって、該文献の文章中に論じられる構成要素について本明細書中に援用される。

【実施例】

【0225】
実施例
以下の実施例は、当業者に、本明細書中に開示及び特許請求される化合物、組成物、及び方法が、どうやって作られ、そして評価されるかについての完全な開示及び記載を与えるために記載され、そして純粋に例示的であることを意図し、そして発明者が、発明であるとみなす範囲を制限することを意図しない。エフェクターは、数(例えば、量、温度など)に関する正確性を保証するために作られたが、幾つかの間違い及び偏差は、説明されるべきである。他に記載がない限り、割合は、重量による割合であり、温度は、℃で表されるか室温であり、そして圧力は、大気圧又はその付近である。反応条件、例えば、濃度要素、所望の溶媒、溶媒混合液、温度、圧力、及び他の反応試薬、並びに記載の方法から得た産物の純度及び収率を最適化するために使用されうるの多数の変動及び組合せが存在する。正当かつルーチンな実験のみが、そうした処理条件を最適するために必要とされる。

【0226】
Ａ．材料
迅速なウイルス量アッセイにおいて、試験される核酸は、約８０００塩基又は塩基対を有するＲＮＡ又はＤＮＡでありうる。このサイズ範囲における核酸(ＤＮＡ及びＲＮＡ)ラダーは、局在化用に試験された。他に特記がない限り、ＥｃｏＲＩで切断されたラムダ・ファージＤＮＡであって、３,５３０、４,８７８、５,６４３、５,８０４、　７,４２１、及び２１,２２６塩基対のＤＮＡを、モデル核酸として使用した。５０～１０,０００塩基又は塩基対の断片を有する別のＤＮＡ及びＲＮＡラダーとの比較は、ＲＮＡとＤＮＡ局在における類似性を示した。ろ過された核酸ラダー上のゲル電気泳動は、約１５００塩基又は塩基対より大きい分子の高い保持効率を示した。精製されたウシ胸腺ＤＮＡであって１３,０００平均塩基対長を有するものは、様々な条件下でろ過され、そして結果は以下の実施例において記された。ろ過は、０.２ミクロンのアノポア膜フィルターを含むように改変されたミリポア・マルチウェル・フィルター・プレートを含むフィルター・アッセンブリであって、図１５ａにおいて示される直径約５ミリメートルの改変又は未改変の０.２ミクロン・アノポア膜フィルター表面を伴うウェル・アッセンブリと類似であるアッセンブリを用いて行われる。

【0227】
１．実施例１
図２４ａ及び２４ｂは、プレーン未改変、ジオール(酸加水分解されたグリシドオキシプロピルトリメトキシシラン)改変、及びアミン(アミノプロピルトリメトキシシラン)改変０.２ミクロンアノポア膜についてのＮａＣｌ濃度に対する核酸保持率のグラフである。図２４ａは、０～１０００ｍＭ・ＮａＣｌ範囲を示し、一方図２４ｂは、図２４ａから拡大された０～１００ｍＭの範囲を示す。これらの結果は、１ｍＭ・トリス緩衝液、ｐＨ８.０において得られた。グラフから明らかであるように、１００ｍＭの塩が、プレーンの及びジオール改変膜上で実質的に完全に核酸を保持することに必要とされ、アミン改変膜については、実質的に塩の効果がない。

【0228】
２．実施例２
図２５ａ及び２５ｂは、プレーンの未改変アノポア膜についての塩濃度に対する核酸保持率のグラフである。図２５ａは、０～４５００ｍＭの塩濃度の範囲であり、一方図２３ｂは、図２５ａから拡大された０～１００ｍＭの範囲を示す。これらの結果は、上記のＤＮＡ切断部位を使用して、１ｍＭ・トリス緩衝液、ｐＨ８.０中で得られた。図２５ａ及び２５ｂのグラフ中に記されるように、ＮａＣｌ(カオトロピック塩ではない)は、プレーンの０.２ミクロン・アノポア膜上への核酸保持を促進する点で、グアニジン・チオシアネートと同じくらい効果的であり、そしてグアニジン・ヒドロクロリドよりずっと効果的である。

【0229】

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4880

３．実施例３

図２６は、プレーン未改変、ジオール改変、及びアミン(ＡＰＳ)改変の０．２ミクロン・アノポア膜についてのｐＨに対する核酸保持率のグラフである。結果は、１Ｍ・ＮａＣｌ、５０ｍＭリン酸緩衝液、及び前に記載されるように切断されたＤＮＡで得られた。図２６のグラフにおいて示されるように、核酸保持率は、ｐＨ４において一貫して高くそして表面改変とは無関係であったが、重大な表面改変効果は、ｐＨ６～８で示され、プレーン膜は、５％以下の核酸保持率へと下がり、そしてジオール改変膜は、６５％の保持率まで下がった。高ｐＨ(１０)では、核酸保持率は、プレーン及びジオール改変膜について実質的に０まで下がったが、アミン改変膜についてはまだ５０％を超えていた。

【0230】

４．実施例４

図２７～２９のグラフは、１ｍＭトリス緩衝液ｐＨ８．０中で、ＮａＣｌを変量として、プレーン未改変、アミン(ＡＰＳ)改変、及びジオール改変のアノポア膜上での核酸保持率の性質を示した。これらのグラフはそれぞれ、３つの場合：

全膜保持率(プロットは図２４ａと同一である)；

膜を通した洗浄液　－　核酸を含む特定の緩衝液が膜を通してろ過された後に、等量の同一の緩衝液であって核酸を含まないものが、膜を通してろ過され、そして分析される。

膜の表面からの洗浄液　－　膜を洗浄したのち(上記膜を通した洗浄ののち)、等量の同一の緩衝液であって核酸を含まない緩衝液は、膜上のウェル中に配置される。この緩衝液は、約１０回膜上で吸引と注入が行われて、表面から局在された核酸を洗浄する。この表面洗浄液を、吸光度により分析し、そして溶出された核酸を計測した。

についての核酸保持率(％)対ＮａＣｌ濃度をプロットする。

【0231】

プレーン及びジオール改変されたアノポア膜(図２７及び２９各々)は、洗浄画分からの検知可能物を示した。ここでは、核酸がフィルターを通して流れたとき、核酸は保持されているよりはどうやら遅らされているようだ。この膜通過洗浄の後では、核酸は、ほとんどフィルター表面から洗浄されない。アミン改変アノポア膜(ＡＰＳ、図２８)は、異なったふるまいを示した。洗浄をとおして、改変された膜から核酸はほとんど取り除かれず、一方幾つかの場合、６０％近くの開始核酸は、膜の表面から洗い出すことができる。

【0232】

５．実施例５

図３０のグラフは、プレーン未改変及びアミン(エチレンジアミノプロピルトリメトキシシラン、ＥＤＡＰＳ)改変膜に関して、リン酸緩衝液濃度の核酸保持又は溶出についての効果を示す。リン酸二ナトリウムを、グラフ上に挙げた濃度で、１ＭのＮａＣｌに加え、ｐＨを８．０に調節した。リン酸イオンは、酸化アルミニウム・クロマトグラフィー・パッキングに結合することが知られ、そして核酸と同様のアノポア膜上の弱い結合部位と競合しうる。図３０のグラフにおいて示されるように、ＥＤＡＰＳ改変アノポア膜により局在化される核酸は、リン酸濃度に対する反応性について、プレーン膜の反応性とは程遠い。

【0233】

別の緩衝液はまた、未改変のアノポア膜上に局在された核酸を低下できない。表２は、表に挙げられた緩衝液を含む１０００ｍＭ・ＮａＣｌ中におけるＤＮＡの保持率を示す。

【0234】

【表2】

表２

緩衝液	核酸局在割合（％）
１mMトリス	98.3%
50mMトリスホウ酸塩	17.8%
50mMリン酸塩	-2.6%
50mM重炭酸塩	4.6%
50mMホウ酸塩	5.7%

【0235】

６．実施例６

表面の性質は、弱い相互作用を妨げる化学種の吸着により影響されることが多い。そうした化学種は、膜被膜物質として使用され、そして本明細書中に記載される幾つかの用途において存在する血漿要素及び界面活性剤を含む。表５は、ウイルス量アッセイにおいてみつかる条件下での、ＤＮＡの局在化割合を示す。該条件は、１ｍｇ/ｍｌプロテイナーゼＫ酵素、２％トウィーン２０界面活性剤、記された添加塩、及び６５％ＥＤＴＡヒト血漿の有無を含む。

【0236】

【表3】

表３

膜	塩	血漿％	核酸局在
アミンEDAPS	なし	65％	99％
アミンEDAPS	なし	0％	99％
アミンEDAPS	200mM NaCl	65％	96％
アミンEDAPS	200mM NaCl	0％	98％
アミンEDAPS	200mM GTC	65％	100％
アミンEDAPS	200mM GTC	0％	96％
未改変	なし	65％	42％
未改変	なし	0％	28％
未改変	200mM NaCl	65％	56％
未改変	200mM NaCl	0％	97％
未改変	200mM GTC	65％	13％
未改変	200mM GTC	0％	96％

【0237】
表３に示されるように、ＥＤＡＰＳ改変された膜による核酸局在化は、様々な塩及び血漿条件下で一貫して高いが、一方未改変膜は、様々な条件下での一貫しない核酸局在化を有した。
【0238】
７．実施例７
高感度のウイルス量アッセイでは、かなり少量の核酸が定量される。以下の表４は、貯蔵された臨床サンプル対ビリオン溶解液／血漿消化反応条件から得られたＨＩＶ・ＲＮＡの局在化割合を示す。全てのサンプルは、１３５μｌの患者サンプル(ＥＤＴＡ血漿)、２ｍｇ/ｍｌプロテイナーゼＫ、２％トウィーン、および４００ｍＭのグアニジン・チオシアネートを含んだ。該サンプルを３０分間、表４に記載の条件下でオインキュベーションした。
【0239】

【表4】

表４

インキュベーション	膜	RNA濃度	局在割合（％）
室温	なし	321kコピー／ml	-------
室温	プレーン	274kコピー／ml	14.6%
室温	EDAPS	5.7kコピー／ml	98.2%
55℃	なし	542kコピー／ml	-------
55℃	プレーン	427kコピー／ml	21.2%
55℃	EDAPS	4.1kコピー／ml	99.2%
室温超音波処理	なし	481kコピー／ml	-------
室温超音波処理	プレーン	388kコピー／ml	19.3%
室温超音波処理	EDAPS	5.8kコピー／ml	98.8%

【0240】
表４に示されるように、ＥＤＡＰＳ改変された膜によるＲＮＡ局在は、種々のインキュベーション条件下で一貫して高い。一方、プレーン未改変膜は、種々のインキュベーション条件下でずっと低いＲＮＡ局在割合を有した。
【0241】
８．実施例８
ヒト血漿ろ過上での試験サンプル切断の効果は、成分を含む３００μｌの全インキュベーション混合液を使用することにより、及び以下の表５に載せられる条件にかけることにより調査された。使用されるフィルター・アッセンブリは、改変ミリポア９６ウェル・フィルタープレートの底に熱融合された直径約５ｍｍの未改変０．２ミクロンアノポア・膜フィルターを含んだ。これは、例えば、図１５ａの実施態様に示される。
【0242】

【表5】

表５

サンプル[1]	プロテイナーゼＫ酵素[2]	界面活性剤[3]	カオトロピック塩	インキュベーション温度[4]	インキュベーション時間	ろ過時間[5]
1(200μl血漿)	なし	なし	なし	RT	なし	詰まった
2(上に同じ)	2.3mg/ml	なし	なし	55℃	20分	詰まった
3(上に同じ)	2.3mg/ml	なし	0.5M GITC	55℃	20分	詰まった
4(上に同じ)	2.3mg/ml	0.5%トライトン	0.5M GITC	55℃	20分	15秒
5(上に同じ)	2.3mg/ml	0.5%トライトン	なし	55℃	20分	18秒
6(上に同じ)	2.3mg/ml	2.0%トウィーン	なし	55℃	20分	15秒
7(上に同じ)	1.7mg/ml	1% SDS	なし	55℃	30分	15秒
8(上に同じ)	1.0mg/ml	2%トウィーン	なし	RT	30分	14秒
9(上に同じ)	なし	2%トウィーン	なし	RT	30分	4+分

１　－　サンプル－　新鮮又は冷凍ＥＤＴＡヒト血漿
２　－　プロテイナーゼＫ酵素－　濃縮液体(２３ｍｇ/ｍｌ),Sigma-Aldrich Co.
３　－　界面活性剤－　分子研究用品質　トライトンX-１００、トウィーン２０、又はＳＤＳ(ドデシル硫酸ナトリウム)
４　－　インキュベーション条件－　ＲＴ(室温)２５℃ベンチトップ；５５℃水浴
５　－　ろ過時間－　局在化膜フィルターを通して２５０μｌのインキュベーション後の液体をろ過するための秒数。

【0243】
表５に記載されるように、界面活性剤を使用した場合、サンプルの切断により、２００μｌの血漿サンプルが使い勝手のよいマルチウェル形式において０.２ミクロン膜を通して数秒でろ過されることが可能になる。

【0244】
９．実施例９
図３１は、脳脊髄液(ＣＳＦ)、ヒト血清、及び全血についてのサンプル切断/ろ過試験の棒グラフである。全ろ過体積は、左の軸に示され、一方、約3.５ミリメートルの直径の未改変０.２ミクロン・アノポア膜を通して全体積をろ過するのにかかる時間が、右の軸に記載される。様々な体積及び切断条件が示され、水(コントロール)、無傷(未切断)ＣＳＦ、及び切断ＣＳＦ、血清、血漿、及び全血液を含む。切断条件は、以下：

ＣＳＦ、血清、血漿
３１ｍＭ　トリスＨＣｌ、１０ｍＭ　ＥＤＴＡ
８００ｍＭ　グアニジン・イソチオシアネート
０.５％　トライトンX-１００
５.２％　トウィーン２０
０.９ＡＵ　プロテイナーゼ

全血
１８ｍＭ　トリスＨＣｌ、６ｍＭ　ＥＤＴＡ
５００ｍＭ　グアニジン・イソチオシアネート
０.３％　トライトンX-１００
３.０％　トウィーン２０

２．０ｍｇ/ｍｌ　プロテイナーゼＫ

を含んで示される全切断体積において３７℃で１５分であった。

【0245】

示されるように、種々の生物学的サンプルの実用的な体積は、アノポアフィルターの小さい領域を通して、無理のない時間でろ過できる。

【0246】

１０．実施例１０

ＰＣＲ増幅を含む全血からのゲノム核酸の抽出及び精製は、以下の方法を使用して行われる。最初に、１０μｌのＥＤＴＡ抗凝集ヒト全血を、１８０μｌの分子研究用品質の水であって、１０％ドデシル硫酸ナトリウム溶液を１０μｌ含む水に最終濃度０．５％になるように溶解した。混合液を軽く混合し、次に室温で約１５分間インキュベーションした。サンプル全体を、未処理の完全０．２ミクロン・アノポア膜を備えるマルチウェル・フィルター・プレート(前記改変ミリポアフィルター・プレート)中に配置した。混合液を約３０秒かけて乾燥するまで吸引ろ過し、次に約１００μｌの蒸留水で洗浄し、それを再び乾燥するまで膜を通して吸引ろ過した。洗浄された膜は、実質的に白色であり、かなり少量の結合されたヘモグロビンが見えた。その後、ヒトβグロビンタンパク質の遺伝子コード中に含まれる核酸配列を増幅するためのプライマーを含む２０μｌのＰＣＲマスター・ミックスをフィルター上に分注し、そして最初のＳＤＳで溶解された血液サンプルから捕捉された局在化ゲノムＤＮＡのいずれかを簡単に再溶解させた。再溶解は、繰り返し２０μｌのマスターミックスを膜上で注入及び吸入することにより助けられた。マスター・ミックスを吸引しそしてＰＣＲキャピラリー・チューブへと移し、そしてリアルタイムＰＣＲ(Roche Lightcycler)により、ヒトβグロビンタンパク質の遺伝子コード内に含まれる核酸配列について分析した。陽性の結果を得た。

【0247】

種々に同定されたサンプル由来の１０μｌの全血を、５００ｍＭグアニジン・イソチオシアネート、０．５％トライトン-X１００、２０ｍＭトリス-ＨＣｌ、ｐＨ６．５、１０ｍＭＥＤＴＡ及び０．２５ｍｇ/ｍｌプロテイナーゼＫ(＞５００Ｕ/ｍｇ)を含む２００μｌの全体積中に、１５分間室温(～２５℃)で溶解した。ライセートを次に未改変アノポア膜(ｄ＝～３．８ｍｍ)を介して、吸引によりろ過し、次に１００μｌの２００ｍＭ・ＮａＣｌで洗浄した。フィルターを次に乾燥し、そして裏側を１～３μｌのＤＹＭＡＸ　ＯＰ-２１可動性プラスチック結合のビーズであって、適用後ＵＶで５秒間硬化させたビーズ(１～３μｌ)で不動体化した。全血サンプル由来の表面に局在されたＤＮＡを含む膜は、５０μｌの慣用のＰＣＲチューブ中のＰＣＲマスターミックスに加えられた。該ミックスは、１×ＰＣＲ緩衝液(Roche)、４ｍＭ・$MgCl_2$(Roche)、２ｍＭｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、及び４ｍＭｄＵＴＰ(Perkin Elmer)、５００μｇ/ｍｌ・ＢＳＡ(Idaho, Technology)、各０．５μＭのＰＣＯ３及びＰＣＯ４プライマー、１Ｕ Heat Labile Uracil N-Glycosylase(Roche)及び３Ｕ FastStart Taq Polymerase(Roche)を含む。慣用のサーマル・サイクラーにおいて行われるＰＣＲ熱サイクルは、以下：５０℃×５分(ＵＮＧ)、９５℃×５分(ｔａｑ活性化)、{９５℃×３秒、５５℃×４５秒、７２℃×６０秒}を４０サイクル、続いて最終伸張７２℃×５分であった。各５０μｌＰＣＲ反応のうちの１０μｌを２％アガロース、ＴＢＥゲル上にロードし、そして電気泳動した。β-グロビン(～１１０ｂｐ)又はプライマー・ダイマー(～３５ｂｐ)を表すバンドは、ゲルをエチジウム・ブロマイドにおいて染色した後に可視化し、そしてＵＶ光の下で観測した。ヒトゲノムＤＮＡの存在を示す陽性の結果が得られた。図３２は、電気泳動ゲルの写真であり、全血液サンプル中に含まれる局在化ゲノムＤＮＡ上に存在するβグロビン標的領域をＰＣＲ増幅することにより作られたアンプリコンを示す。示されるように、ＰＣＲ増幅は、全ての場合において起こる。

【0248】

１１．実施例１１

遺伝子分析用に、全血液サンプルをリアルタイムＰＣＲ(ＲＴ-ＰＣＲ)中で使用する能力

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4886

は、研究の作業の流れを単純化し、そしてコストを削減し、そして別の利益を与える。実施例１０の全血ＰＣＲ増幅は、前記図１８及び１９において示される単純化された使い捨て形式を使用し、図１７ｂの系に類似する系において分析を行うことにより作られたアンプリコンをリアルタイム検出することを含むように拡大された。１０μｌの全血は溶解され、次に図１８において一般的に示されるように、及び実施例１０に記載されるように、ろ過されそして未改変のアノポア・フィルターを介して洗浄された。アノポアの乾燥された底表面は、全血サンプルから由来される局在されたゲノムＤＮＡを含み、熱溶接ポリプロピレン、熱シーリングフィルム１９１０により、図１９に示されるように直接乾燥膜上にシールされた。以前に記載されたとおりであるが、１：６０００希釈のサイバーグリーンＩ色素(molecular Probes)を含んだむ組成の５０μｌのＰＣＲマスター・ミックスを次にウェル１９０１中に加えた。ウェル１９０１のトップは、ＰＣＲ反応液１９１３を含み、次に透明の粘着テープ１９１１又は透明のキャップ１９１２によりシールした。このアッセンブリを、図１７ｂにおいて図示されるようにアノポアーシーリングフィルム表面を直接通して熱を伝えるように設計されたリアルタイムＰＣＲ装置で熱サイクルした。ウェル内の蛍光の変化は、ウルトラ・ブライト(ultra blight)青色発光ダイオード、フォトダイオード検出器、及び適切な干渉フィルター、エレクトロニクス、及びソフトウェアから構成される単純化された蛍光光度計により、サーマルサイクルされる間モニターされた。蛍光データーをライトサイクラー(Roche)ソフトウェアにより評価した。サーマルサイクルをPerkin Elmer４８０装置であって、特注フラットサーマルサイクル領域を遠隔操作することを許容するように改変された装置を使用することにより達成した。サーマルサイクル・プロファイルは、実施例１０(９９℃／２０秒、５０℃×３秒、７５℃／６０秒)と同じであった。融解分析は、温度を１時間かけて６５℃～９９℃まで上昇させることにより行われた。

【0249】

実施例１１用のリアルタイム増幅曲線は、図３３に示され、一方融点曲線は図３４において示される。類似の結果は、図３４におけるライトサイクラーで見られた。図は、単純化されたリアルタイムの形式で、分解された全血からの膜局在されたＤＮＡから、特異的ＰＣＲ増幅及びβグロビン遺伝子の同定の明快な証拠を示した。

【0250】

１２．実施例１２

ヒトゲノムＤＮＡは、蛍光染色により直接的に可視化されうる。１００万細胞/ｍｌ超に濃縮され精製されたヒト白血球細胞１０μｌを、０．５％ドデシル硫酸ナトリウムを含む１９０μｌのＴＥ緩衝液に加え、そして２０分間、５６℃でインキュベーションして、血球細胞を溶解し、ＤＮＡを放出させた。ＴＥ緩衝液中に１～１０，０００希釈のサイバーゴールドから構成される溶液中で、１～４００，０００の細胞溶液１０μｌで開始することに基いて、この溶液を終濃度まで希釈した。希釈ＤＮＡ溶液を、サイバーゴールド溶液中で数分インキュベーションし、次に５０μｌを実施例２２に従ったニッケル-ホウ素改変アノポア膜を通してろ過した。局在されたヒトゲノムＤＮＡを含む膜を簡単にＴＥ緩衝液で洗浄し、次に図９及びさらに実施例１３において示されるのと類似の装置に基いて可視化された。実施例に従った、典型的なヒトゲノムＤＮＡのイメージは、図１１に示される。

【0251】

１３．実施例１３

核酸を光学的に分析した。精製された約１３，０００塩基対のウシ胸腺ＤＮＡは、１００ｎＭのＹＯＹＯ１核酸色素を含むろ過された１０ｍＭトリス-ＨＣｌ、１ｍＭ・ＥＤＴＡ中に１～１２８の相対濃度で段階希釈された。室温でのインキュベーションの５分後、１００μｌの標識核酸サンプルを、黒色ポリプロピレン・ホルダー上に熱融合された活性フィルター直径約３ｍｍの０．２ミクロンの未改変アノポア膜を通してろ過した。４８８ｎｍでの単線で作動する２０ミリワットの空冷アルゴンレーザー、並びに１０２４×１０５８ピクセルの裏面入射型ＣＣＤカメラであって、－１０に冷却され、０．３ＮＡ、１０×

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4887

平面顕微鏡対物レンズを備えるカメラを使用し、図９に示される機器構成の蛍光顕微鏡で、フィルターを画像化した。ＤＮＡを約５秒の照射で簡単に可視化した。画像をシグナル処理して、縁部を際立たせ、明らかに核酸ではない不具合を取り除き、バックグラウンドの蛍光について訂正し、次に残っている処理されたＤＮＡスポットを計数した。処理された画像を図１２において示し、得られた単純希釈曲線を図１３において示し、装置に対し訂正された希釈曲線及びシステム・パラメーターを図１４において示した。

【0252】

１４、実施例１４

例えば図８に記載される共焦点スキャン検出システムについての種々の検出パラメーターを評価するために、理論モデリングを行った。理論モデリングのため、以下の仮定を行った。

１、１ｍｌサンプル中に含まれる核酸を１ｃｍ^{2}の領域に結合する。

２．１ｃｍ^{2}あたり１の計数間違いによる誤診率は許容される。

３．核酸を２５又は１００色素分子/核酸で染色する。

４．各蛍光色素分子は、検出ゾーンに存在するとき、５００００光子/秒の検出されたシグナルを生ずる。これは、１００ｋＷ/ｃｍ^{2}の照射密度で達成される。

５．ノイズは、器具によるノイズ、ラマン散乱、プラスチックの蛍光などのバックグランド源由来である。さらに、核酸染色由来の表面非特異結合(ＮＳＢ)は、均一に分散され、単離された(密集していない)色素分子であって、スキャンエリアあたり複数の色素が存在する可能性がかなり低い色素分子をもたらす。密集された蛍光シグナルを与える表面に結合された非特異的核酸などの不慮の染色は、考慮されなかった。

【0253】

理論モデリングは、以下の検出条件に基いた。蛍光標識された核酸は、光学表面へと結合される。共焦点走査上面蛍光光度計は、結合された核酸に強く照射し、核酸の蛍光を引き起こす。核酸から発光された蛍光光子は、捕捉され、そして計数される。さらに、上面蛍光光度計は、散乱光、器具ノイズ、ＮＳＢなどからのバックグラウンド計数率を検出する。蛍光核酸からの特異的シグナルは、スキャンスピードとスポットサイズにより定義される間隔において生じる光子のスモール・バースト(small burst)として存在する。典型的な例として、０．５～１０μ秒におこる３～２０個の光子のバーストが計算された。バックグラウンド又はノイズシグナルは、ポアソン分布に従い、そして特異的核酸シグナルから区別できないバーストにおいて生じる限界確率を有する。

【0254】

必要とされる検出パラメーター(ＳＮＲ、スキャンスピード、スポットサイズなど)を、１ｃｍ^{2}スキャンの間生じる最大統計ノイズ・バースト計数に等しい蛍光核酸シグナルをセットすることにより測定した。これによりバックグラウンド・ノイズからの1/ｃｍ^{2}の統計的擬陽性数がもたらされた。つまり、規定のスキャンスピード及びスキャン・スポット・サイズは、照射スポットが固定化された蛍光核酸上を通過するためにかかる時間である光子バースト時間(例えば、約０．５～約１０μ秒)をもたらす。光子バースト時間あたりの、検出器により計数される光子数は、核酸とバックグラウンドとの間で区別される。バックグラウンドノイズは、統計変動のためスモール・バーストを含む。必須最小核酸シグナル(光子/バースト時間)は、全スキャン時間の間に統計的に生じうる最大ノイズシグナル(光子/バースト時間)に等しくなるようセットされる。従って、装置は、各時間毎に１個の核酸を計数し、この示されたバースト割合(例えば、２μ秒あたり５個の光子)は超過である。統計的に、ノイズは、１ｃｍ^{2}スキャンあたりの１のそうした出現、又は１ｍｌサンプルあたりの１の擬陽性を計上すべきである。

【0255】

以下の等式及び数学的関係は、実施例中で行われた理論モデリングにおいて使用された。

１．ポアソンランダム変数方程式：

$$P_{(I)} = e^{-G} G^I / I!$$

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4888

［式中、Ｉは、規定の間隔における光子数であり；
Ｐは、規定の間隔においてＩ個の光子が生じる確率であり；そして
Ｇは、規定の間隔において光子が生じる平均確率である］

２．一般的な関係：

Ｔ＝秒/１ｃｍ^{2}スキャン
Ｄ＝スポット寸法、ミクロンである。
光子バースト時間(μ秒)＝Ｔ(Ｄ^2)１×１０^8

［式中、１×１０^{8}は、ｃｍ^{2}あたりのミクロン^{2}の数である］

スキャンスピード(ｃｍ/秒)＝１×１０^4/ＴＤ
核酸シグナル(光子数/光子バースト時間)＝ＦＲＴＤ^2/１×１０^8

［式中、Ｆは、蛍光色素分子の数/核酸であり；そして
Ｒは、検出された光子計数率/色素分子(50,000光子/秒/想定分子)である］

バックグラウンド・シグナル(光子計数/光子バースト時間)＝ＢＴＤ^4/１×１０^8

［式中、Ｂは、平均バックグラウンド・シグナル(光子計数/秒/ミクロン^2)である］

ＮＳＢシグナル(光子計数/光子バースト時間)＝ＺＴＲＤ^4/１×１０^8

［式中、Ｚは、光学表面に非特異的に結合される蛍光色素分子/ミクロン^{2}である］

フォトン・バースト・時間に基いて発現されるシグナルに関して、それらは、ポアソン・ランダム変数方程式において以下のように有用である：

Ｉ＝核酸シグナル；

これは、１擬陽性/ｃｍ^{2}につき最小核酸シグナル(光子/バースト時間)である。

Ｇ＝バックグラウンド・シグナル＋ＮＳＢシグナル；

これは、全ての非核酸源についての平均光子計数／バースト時間である。

Ｐ＜Ｄ^2／１×１０^8

この条件は、完全な１ｃｍ^{2}スキャンにおける、１未満の擬陽性の統計的発生を示す。これらの関係に関して、様々な条件下の計数パフォーマンスの曲線は、以下の実施例において記載されるように作られた。

【0256】

１５．実施例１５

図３５は、以下の５個の検出条件についてのスキャン時間対スポット寸法のグラフである。

１．１００色素分子／核酸、１０ｋｈｚ／ミクロン^{2}ノイズ、０色素分子／ミクロン^{2}ＮＳＢ；

２．１００色素分子／核酸、４０ｋｈｚ／ミクロン^{2}ノイズ、０色素分子／ミクロン^{2}ＮＳＢ；

３．１００色素分子／核酸、４０ｋｈｚ／ミクロン^{2}ノイズ、１色素分子／ミクロン^{2}ＮＳＢ；

４．２５色素分子／核酸、１０ｋｈｚ／ミクロン^{2}ノイズ、０色素分子／ミクロン^{2}ＮＳＢ；及び

５．２５色素分子／核酸、４０ｋｈｚ／ミクロン^{2}ノイズ、１色素分子／ミクロン^{2}ＮＳＢ

【0257】

図３５のグラフにおいて示されるように、スキャン時間限界を２００秒に設定することにより、最もノイズの高い２５色素分子／核酸の場合以外の発現は、２ミクロンスポットで可能である。２ミクロンより大きいスポット寸法に関する場合についてのデーターは存在しない。なぜなら、曲線が、スポット寸法が２と３ミクロンの間で、ＳＮＲアプローチ２として、急激に上向きになるからである。

【0258】

１６．実施例１６

図３６～３９は、スキャン時間対シグナル／ノイズのグラフであり、ここで：

シグナル対ノイズ比(ＳＮＲ)＝核酸シグナル／バックグラウンド・シグナル＋ＮＳＢシ

グナル

図３６のグラフは、種々のスポット寸法で、２～５００のＳＮＲの間で、１００色素分子／核酸の条件に作られた。図３７のグラフは、種々のスポット寸法で、２～１００ＳＮＲの拡大されたスケールの１００色素分子／核酸の条件について作られる。図３８のグラフは、種々のスポット寸法、２～５００ＳＮＲでの２５色素分子／核酸の条件について作られた。図３９の該グラフは、２～１００ＳＮＲの拡大されたスケールを伴う種々のスポット直径で、２５色素分子／核酸の条件について作られた。

【0259】

図３６～３９のグラフの各々の左末端でのＳＮＲの実際の数値は、２．５、３．０、４．０、５．０、及び１０．０である。図３６～３９のグラフにより、ＳＮＲが約１０未満で、スキャン時間が劇的に増加することが明らかにされた。２．５未満のＳＮＲについてのスキャン時間は、ＳＮＲ比が２．５未満になり、スキャン時間が増大されることを観測するため以外では計算されない。

【0260】

理論モデリングに基いて、最も早いスキャンは、ＳＮＲの問題点が著しくなるまで、最も大きいスポットで達成される。図３７を再び参照して、２ミクロンのスポット寸法で、２５色素分子／核酸、４０ｋＨｚ／ミクロン^{2}ノイズ、１色素分子／ミクロン^{2}ＮＳＢは、３．４７２のＳＮＲを有した。１００色素分子／核酸、５０ｋＨｚ／ミクロン^{2}ノイズ、及び１色素分子／ミクロン^{2}ＮＳＢの場合について４ミクロンのスポット寸法でみられる同じＳＮＲである。両方の曲線は比較的なだらかである。これらの曲線の完全なプロットは、スキャン時間の急激な増加を示し、ＳＮＲが１に近づくにつれて無限に近くなる。有用な最小ＳＮＲは、おおよそ３であるようだ。

【0261】

ＮＳＢが単離された色素分子として存在する限り、ＮＳＢは全体のバックグラウンドに加えられ、そしてＳＮＲ予測は正当である。色素分子が、スキャンに使用されるスポットサイズと大きさが類似する領域中に濃縮されるメカニズム、例えば表面に結合された非特異的核酸を染色することは、非特異核酸を特異的核酸として計数するという過ちをもたらす。

【0262】

１７．実施例１７

図４０は、未改変０．２ミクロンの孔サイズのアノポア膜フィルター上に局在化され、そしてＹＯＹＯ１色素で染色された４８，５０２塩基対長のラムダ・ファージＤＮＡの高倍率反転顕微鏡写真であり、実施例３に記載の技術に従って画像化された。図４０は、ＤＮＡ分子の形が容易に明らかにされる膜フィルターの表面上のＤＮＡを明らかに示す。図４０における明るい細長い形は、十分に伸張された局在化ＤＮＡに一致し、暗い球形は、崩壊された分子構造に一致する。さらに、中間体構造は、容易に現われ、ここで直線状の尻尾は、暗いスポットとくっついて見られて、特定の分子伸張を表す。

【0263】

１８．実施例１８

サンプルのウイルス量は、核酸計数により測定される。計数された核酸からの、開始サンプルウイルス量濃度を相関させる多数の例は、以下の値：

１．ビリオン溶解効率	９９％
２．サンプル体積	２００μｌ
３．核酸捕捉効率	８５％
４．核酸標識効率	９５％
５．核酸検出効率	９９％
６．検出された膜割合(％)	２５％
７．システム線形性	９５％

に基きうる。

アッセイの間、膜分析の画像は、１，０００の検出された別個の標識された核酸を示しう

る。パラメーター７で開始し、そして後ろから薦めると、１０００の検出された別個の核酸は、システムの線形性のため、１，０５３(１０００／０．９５)個の実際の核酸に一致する。つまり、検出器は、確かな濃度で全ての核酸を正確には計数できない。全体の膜ろ過の２５％のみが画像化されるので、１０５３個の核酸は、サンプル由来の全てのフィルター上の核酸４２１２個(１０５３／０．２５)を表す。さらに、核酸のある割合のみが、別の理由から検出されうるので、及びある割合の核酸のみが標識されて検出を可能にする。従って、４２１２個の核酸は、フィルター上の存在する４４７８個(４２１２／０．９９×０．９５)の核酸が、フィルター上に存在した。フィルター上の４，４７８個の核酸は、実際フィルターを通して流れた核酸５２６９個(４，４７８／０．８５)個の核酸を実際あらわす。なぜなら、８５％のそうした核酸のみが、フィルター上に実際保持されるからである。フィルターをとおして流れた５２６９個の核酸は２００μｌの開始サンプル由来であり、つまり１０５３８(５２６９／０．２ｍｌ)個の核酸／ｍｌ(サンプル)の濃度由来である。最終的に、溶解条件は、標的ビリオンから標的核酸を９５％の効率で産生することが知られている。従って計算された１０５３８個の核酸／ｍｌは、１０６４４(１０５３８／０．９９)個の患者サンプルの１ｍｌにおける実際のビリオンを表す。

【0264】

１９．実施例１９

０．２ミクロンの４７ミリメートルの直径のアノポア膜を以下のように色素で改変した：３ｍｌのＥＤＡＰＳ(エチレンジアミノプロピル・トリメトキシシラン)を２７ｍｌの高純度の水へと混合して溶解した。該溶液を２５ｍｍの直径のアノトップ・フィルター(Whatman，０．２ミクロン)を通してろ過して、全ての不純物、ゲル化された試薬、沈殿などを取り除いた。乾燥アノポア膜を、次にろ過溶液中で完全に浸した。浸された膜を含む溶液を、軽く超音波処理し、次に吸引オーブン中に起き、そして空気を吸引して膜が湿るのに役に立つ。５分の全浸潤時間の後、湿った膜を、丁寧に溶液から移して、そして１００ｍｌの高純度水中にゆっくり混合して２回浸潤することにより洗浄して、未結合のシラン試薬を取り除いた。膜を同様に１００ｍｌの５×TE緩衝液中で同様に洗浄して、表面に結合されたアミノ基を中和し、次に再び１００ｍｌの高純度水中で洗浄した。

【0265】

湿った膜を吸引下の温めた(１００℃)オーブン中で約３時間、脱水した。乾燥ＥＤＡＰＳ膜を次に新たに調製され、そしてろ過されたアミノ反応性の色素(プロシオンＭＸ(Procion MX、リアクティブ・ブルー４(Reactive Blue4)、ＤＴＡＦなど)の溶液であって、約０．５ｇの色素を５０ｍｌの高純度水中に含んだ溶液中に浸潤した。気泡を超音波処理及び吸引により取り除いた。膜を室温で約４時間色素溶液中にとどめた。暗く染色された膜を素早く高純度水で洗浄し、次に乾燥された。染色された乾燥膜は、親水性であり、そして簡単に水をろ過する。

【0266】

２０．実施例２０

０．２ミクロンの直径４７ｍｍのアノポア膜を、以下のように、カーボンブラック光学的なピグメントを取り込むことにより改変した：約０．２ｇのカーボンブラック(Raven ５０００ Ultra ２，Columbian Chemicals，Inc.)は、界面活性剤であるトウィーン２０を約２％含む高純度水１ｍｌ中へと機械的に分散された。得られた黒色ピグメント分実機を、膜表面に適用して、数分間沈殿させ、次に水で膜から洗浄された。得られた黒色膜は、光学的に不透明であり、そしていくらか疎水性であるが、水をろ過することができる。

【0267】

２１．実施例２１

アノポア膜を以下のように無電解金属沈殿物により光学的に改変した：無電解沈殿に適した金属合金は、当該技術分野に周知であり、そしてニッケル、リン、ホウ素、金、パラジウム、銀などを含んだ。メタライゼーションは、光学改変が行われ、一方液体ろ過性質が保たれることを可能にするように制御されなければならない。アノポア膜上のメタライゼーション方法は、一般的に２個の方法である：

活性化－アノポアは、一般的にメタライゼーション溶液と非反応性である。従って、膜は、メタライゼーションの前にパラジウムを取り込むことにより活性化される。これは以下のように達成された。

【0268】

塩化パラジウムを、撹拌及び穏やかに熱することにより、終濃度５ｍｇ/ｍｌでジメチルスルホキシド(ＤＭＳＯ)中に溶解した。０.５ｍｌの塩化パラジウム/ＤＭＳＯ溶液を、４９.５ｍｌのアセトン中に溶解した(１％溶液)。乾燥アノポア膜を、１～２分間塩化パラジウム/ＤＭＳＯ/アセトン溶液に十分浸潤し、次に取り出した。ぶら下がった水滴を膜表面から取り除き、次に膜を完全に風乾させた。アセトン/ＤＭＳＯを素早く取り除き、そして塩化パラジウムを沈殿させるために、アセトンで湿った膜をジエチルエーテル中に浸すことが、行われうる。さらに、水は、希釈剤としてアセトンの代わりになりうる。この場合、アセトンは、ジエチルエーテルの代わりに使用されて、素早く膜を脱水し、そして塩化パラジウムを沈殿する。粒子の均一な分散として膜内に存在する塩化パラジウムは、電気的メタライゼーションの前に既知の還元剤、例えば水素化ホウ素ナトリウム、ジメチルアミノボラン、次亜リン酸ナトリウムなどで反応することにより、金属パラジウムへと化学的に還元されなければならない。多くの場合では、これは、最後のメタライゼーション反応中で行われる。ここで、パラジウム塩は、大量の金属の沈積の前に、メタライゼーション・バス還元試薬により、触媒性金属へと還元される。

【0269】

メタライゼーション　－　無電解メタライゼーション用に多くの剤形が存在する。例えば、無電解金属合金であって、リン又はホウ素を合金試薬として含む合金が広く知られている。両方ともが、最初に光学的に黒色の沈積(「黒色ニッケル」)を形成し、そして、本明細書中に使用される実施態様中で有用である。

【0270】

黒色ニッケル/リンピグメント沈積物は、塩化パラジウム活性化アノポア膜を、３０ｇ/ｌの塩化ニッケル、１０ｇ/ｌの次亜リン酸ナトリウム、５０ｇ/ｌの塩化アンモニウムを含む、ｐＨ８～１０、浴温度９０℃の溶液中に浸すことにより形成される。浸す際、アノポア膜は、ゆっくり茶色になり次に黒色になる。約５分のうちに、膜は、３.０超の光学的吸光度を有する完全な黒色になる。これらの黒色ニッケル/リン膜は、かすかに未改変アノポアよりも親水性が少ないが、ろ過のための高い水の流速を保持する。

【0271】

黒色ニッケル/ホウ素ピグメント沈積物は、塩化パラジウム活性化アノポア膜を、２５ｇ/ｌ硫酸ニッケル、１５ｇ/ｌの酢酸ナトリウム、４ｇ/ｌのジメチルアミノボランを含むｐＨ５.９、室温の溶液中に浸すことにより形成された。この反応は、ニッケル/リンシステムに記載されるように実質的に先行した。両方の場合において、膜は最初に黒色になるが、最終的には(１０+分)金属及び非多孔質になる。なぜなら、ニッケル合金が、孔及び該表面に沈積しつづけるからである。図４２は、黒色ニッケル/ホウ素沈積物を含むように、実施例２１に従って改変されたアノポア膜の内部の電子顕微鏡画像である。見られるように、金属の沈積は、格別に小さく、単離された粒子であり、そして材料的に膜の流れの性質に影響するようには見えない。

【0272】

図４１は、３種の有機色素改変されたアノポア膜、並びに実施例１９及び２１に従って膜上に沈積されたニッケル-リンを有するアノポア膜(沈積されたピグメント膜)についての波長に対する光学的吸光度を示す。

【0273】

図４２は、実施例２１において記載された方法により製造された改変アノポア膜の内部の電子顕微鏡写真である。明るいスポットは、実施例２１に従って沈積されたニッケル-ホウ素合金のピグメント包含物である。表６は、プレーンアノポア膜、３の有機色素で改変された膜、及び沈積されたピグメント膜についての膜自己蛍光結果を示す。データーを図１４に示される特注設計の暗視野上面蛍光光度計で取得した。有機色素膜は、実施例１

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4892

９に従って、プロシオンＭＸ・ジェットブラック、リアクティブ・ブルー４、又はプロシオンＭＸレッドで改変され、そして沈積ピグメント膜は、黒色ニッケル/リンを取り込むことにより、実施例２１に従って改変された。０．２ミクロンの直径を有する黄色蛍光ポリスチレンビーズ(Molecular Probes, Inc)を、膜に対して画像化し、そして真のビーズ蛍光を測定した。バックグラウンドのシグナルも計測した。このデーターは、非蛍光有機色素又は沈積されたピグメントを有するアノポア膜の自己蛍光が実質的に低減することを示す。

【0274】

【表6】

表６

膜改変	0.2ミクロンビーズ黄色蛍光	訂正された膜シグナル	ビーズ／膜シグナル比
未改変膜	660,000	81,250	8.123
黒色ピグメント膜	320,000	500	640
有機黒色膜	270,000	20,500	13.17
有機青色膜	290,000	10,500	27.62
有機赤色膜	280,000	18,000	15.55

【0275】

表７は、プレーン並びに前に記載された黒色ピグメント(ニッケル/リン)アノポアについてのＮＳＢの検出性の低下の結果を示す。２の実施例が示される。１列目は、蛍光タンパク質ＮＳＢの検出性低下のデーターを示す。蛍光タンパク質溶液は、以下：

１００ｎＭ　　R-フィコエリトリン(Molecular Probes, Inc)

１×ＴＥ緩衝液(１０ｍＭトリス、１ｍＭ・ＥＤＴＡ、ｐＨ８．０)

１％ＢＳＡ

を含んで調製された。

【0276】

４０μｌの上記R-フィコエリトリン溶液を、直径０．１５０インチの流量範囲の改変及び未改変０．２ミクロンアノポア膜を通してろ過し、次に４０μｌの１％ＢＳＡ-１／ＴＥ緩衝液で洗浄し、次に２００μｌのプレーン１×ＴＥ緩衝液で洗浄した。蛍光計測を、５０ｎｍの帯域通過により５９５ｎｍの中心波長に変換された照射フィルターを伴う図９の装置上で行なった。

【0277】

２列目は、蛍光ビーズのＮＳＢの検出低下についてのデーターを示す。これは、蛍光R-フィコエリトリン溶液を０．０２ミクロンの黄色蛍光マイクロビーズ溶液(Molecular Probes, Inc,１％の固体ストック溶液の７４８倍希釈、１％ＢＳＡ１×ＴＥ緩衝液中の１０ｎＭ等量のビーズ濃度)に置き換えれば、方法及び試薬の点で１列目と同じである。蛍光計測を図９の装置上で行った。両方の例は、非特異的結合物質から検出された蛍光の低下を示した。

【0278】

【表7】

表７

NSB種	未改変0.2 ミクロンアノポア	黒色ピグメント改変0.2 ミクロンアノポア	NSB検出比 未改変／改変
タンパク質	6,400	48	133
0.02ミクロン・ビーズ	255,000	858	297

*蛍光データーは膜の自己蛍光について訂正される。

【0279】
ピグメント改変された膜は、ＮＳＢ低減、分子捕捉、共有結合などの有用な表面特性を与えるために、プレーン膜について前に記載されたようにシラン化反応によってさらに改変されうる。

【0280】
２２．実施例２２

酵素結合蛍光(ＥＬＦ)による核酸検出及び定量は、以下のように行われうる。

２０の相補的にビオチン化されたオリゴヌクレオチドプローブは、ラムダファージＤＮＡに対して特注されて合成された。これらのプローブは、各々１０プローブを有する２つの群として標的ＤＮＡに特異的に結合された。各群におけるプローブは、約２００の塩基対の典型的な間隔で結合するように設計された。これは、ラムダＤＮＡターゲット上の高いプローブ結合密度の２の領域をもたらした。ラムダＤＮＡが完全に直鎖であるなら、各領域における１０のプローブが、約０.６ミクロンの長さに含まれるということを計算が示した。この２つの領域が、約２５０００塩基対、又は完全な直鎖の場合７～８ミクロンにより分離された。

ラムダＤＮＡを、以下に記すように上記プローブに前以ってハイブリダイズさせた：

１μｌの精製ラムダファージＤＮＡ(５００μｇ/ｍｌ)を、４ｍＭ・$MgCl_2$及び２０ｎＭの各２０の上記プローブを含む４９９μｌのＰＣＲファーストスタート緩衝液(Ｒｏｃｈｅ)中に加えた。この混合液を９５℃で１０分間熱し、冷却して５６度で５分間おき、冷却して３７℃で２分間置き、次に室温まで冷却した。未反応性のプローブを、キアゲンＰＣＲクローン・アップキットで製品説明書に従い取り除いた。２０個のハイブリダイゼーションされたビオチン化プローブを含む最終ラムダＤＮＡを、ＴＥ緩衝液中で１μｇ/ｍｌに希釈し、そして-２０℃で冷凍した。

【0281】
標識されたラムダＤＮＡを以下のように可視化した。

【0282】
ニッケル・ホウ素改変されたアノポア膜を、実施例２１に従って製造し、そして図１８ａに示されるように、１２個の個々のウェルを伴うアッセンブリへと構成した。このアッセンブリを、アノポア膜に対してしっかりシーリングすることにより、吸引ろ過を可能にする単純吸引ハウジング中に配置した。２０μｌの１：２００希釈のＴＥ緩衝液中の上記前以ってハイブリダイゼーションされたラムダＤＮＡを、幾つかのウェル中にろ過し、一方２０μｌのプレーンＴＥ緩衝液を異なるウェル中にろ過した。１０μｌのＴＢＴ緩衝液(１０ｍＭ・トリス、１００ｍＭ・ＮａＣｌ、１％ＢＳＡ、０.１％トゥィーン-２０、ｐＨ７.８)を全てのウェルを通してろ過し、次に、１０μｌのさらなるＴＢＴ緩衝液を加え、そして全てのウェルで５分間インキュベーションして、改変アノポア膜上に結合する非特異タンパク質の効果を抑制した。ＴＢＴインキュベーション溶液をろ過し、次にフィルターアッセンブリを、吸引ハウジングから取り出し、次にアノポア膜をカバーするパラ

フィルムを再設置した。該パラフィルムは、アノポア・フィルターを密閉して、次のステップの間液体の流れを妨げた。ＴＢＴ緩衝液中の１：５０希釈の１０μｌストレプトアビジン-アルカリ・ホスファターゼ(ＳＡＰ、molecular Probesのin situハイブリダイゼーション用ＥＬＦキット)を各ウェル中に加え、そして室温で１５分間インキュベーションした。ウェルを吸入して乾燥させ、１０μｌのTBT緩衝液を各ウェルへと加え、次に再び吸入して乾燥させ、次に１０μｌの洗浄緩衝液(Molecular Probes ＥＬＦキット)を加え、再び乾燥するまで吸入した。フィルター・アッセンブリを吸引ハウジングから取り出し、そしてパラフィルムを取り除いた。アッセンブリを次に吸引ハウジング中に再設置した。１００μｌの洗浄緩衝液を、各ウェルをとおして乾燥するまでろ過した。モルキュラー・プローブ・キットに付属の説明書に従って調整された１０μｌのＥＬＦ基質を、各ウェルに加え、そして規定の時間インキュベーションした。簡潔に説明すると、ＥＬＦ基質は、ろ過された現像緩衝液中の基質試薬の１：１０希釈液であった。２の更なる試薬ろ過ののちに加えられ、各々は１：１０００希釈であった。これらの各試薬及び緩衝液は、Molecular Probesが独自に開発した物であり、そしてＥＬＦキット中に含まれる。

【0283】

規定の時間のＥＬＦ現像インキュベーションの後に、各ウェルは、１０μｌの洗浄緩衝液で洗われ、そして吸引され、続いて１０μｌの蒸留水で洗浄され、吸引された。ウェルを、名目上３６５ｎｍで照射することを可能にする適切なフィルターを備える水銀励起源小型アーク灯、並びに５２７ｎｍにセットされた検出フィルターで、図９において示される検出器上で可視化した。

【0284】

この例の結果を、図６に示し、これは明らかに、局在されたＤＮＡを含むウェルとＤＮＡを含まないウェルとの間における現像されたＥＬＦシグナルの違いを示した。さらに、ＥＬＦインキュベーションの時間効果は、前に記載されたように明らかに目に見えた。

【0285】

本出願を通して、様々な文献が参照される。これらの参考文献の開示は、その全体を、より完全に本明細書中に記載される化合物、組成物、及び方法を記載するために、本出願中に援用される。

【0286】

様々な改変及び変化は、本明細書中に記載される微小孔物質、方法、及び物品に行われうる。本明細書中に記載される微小孔物質、方法、及び物品の別の態様は、本明細書及び本明細書中に開示される微小孔物質、方法、及び物品の慣用技術を考慮に入れることから明らかであるだろう。明細書及び実施例は、例示として考えられるということが意図される。

【0287】

本出願に含まれそして本出願の一部を構成する添付の図面は、以下に記載される幾つかの態様を記載する。これらの図面は、本明細書中に記載される微小孔物質、物品、及び方法の典型的な実施態様のみを記載するのみであり、そしてそれゆえその範囲を制限するものと考えるべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0288】

【図1】図１ａは、微小孔物質の上面図である。図１ｂは、微小孔物質の断面図を示す。

【図2】図２ａ及び２ｂは、微小孔物質の表面付近における被分析物の局在を示す。

【図3】図３は、局在化した被分析物に対する蛍光に基くビーズ・トレーサー過程を示す。

【図4】図４は、局在化被分析物の検出のための酵素結合蛍光の使用を示す。

【図5】図５は、本明細書中に記載される技術を使用する典型的なＥＬＦ過程のタイミングのグラフを示す。

【図6】図６は、蛍光スポット・カウント対核酸計数時間を表すグラフである。

【図7】図７ａ-７ｃは、改変された微小孔物質及び反応割合を高めるためのそれらの使用

を図示する。
【図8】図８は、局在された被分析物の検出用装置を図示する。
【図9】図９は、局在された被分析物の別の検出用装置を図示する。
【図10】図１０は、局在された被分析物の別の検出用装置を図示する。
【図11】図１１は、ニッケル/ホウ素アノポア(Anopore)表面上に局在し、そしてサイバー・ゴールド色素で染色されたヒト・ゲノムＤＮＡを示す。
【図12】図１２ａ-１２ｈは、ＹＯＹＯ-１標識されたコウシ胸腺ＤＮＡであって、光学的に検出されたＤＮＡの処理された反転画像を図示する。
【図13】図１３は、未校正の核酸カウント(ＮＡＣ)アッセイの較正曲線のグラフを示す。
【図14】図１４は、核酸濃度に関して校正後の核酸カウントを示すグラフである。
【図15】図１５は、被分析物の局在化のためのろ過装置を図示する。
【図16a】図１６は、被分析物の局在化のための別のろ過装置を図示する。
【図16b-c】図１６は、被分析物の局在化のための別のろ過装置を図示する。
【図17】図１７は、被分析物の局在化のための別のろ過装置を図示する。
【図18】図１８は、被分析物の局在化のための別のろ過装置を図示する。
【図19】図１９は、被分析物の局在化のための別のろ過装置を図示する。
【図20】図２０は、被分析物の局在化のための別のろ過装置を図示する。
【図21】図２１は、被分析物の局在化のための別のろ過装置を図示する。
【図22】図２２は、被分析物の局在化のための別のろ過装置を図示する。
【図23】図２３は、被分析物の局在化のための別のろ過装置を図示する。
【図24a】図２４ａ及び図２４ｂは、未変性、ジオール(酸加水分解されたグリシドオキシプロピルトリメトキシシラン)改変、及びアミン(アミノプロピルトリメトキシシラン)改変０、２ミクロン・アノポア膜についての核酸保持割合 対 ＮａＣｌ濃度のグラフである。
【図24b】図２４ａ及び図２４ｂは、未改変、ジオール(酸加水分解されたグリシドオキシプロピルトリメトキシシラン)改変、及びアミン(アミノプロピルトリメトキシシラン)改変０．２ミクロン・アノポア膜についての核酸保持割合 対 ＮａＣｌ濃度のグラフである。
【図25a】図２５ａ及び２５ｂは、未改変、アノポア膜についての核酸保持割合 対 塩濃度(カオトロピック及びＮａＣｌ)のグラフである。
【図25b】図２５ａ及び２５ｂは、未改変、アノポア膜についての核酸保持割合 対 塩濃度(カオトロピック及びＮａＣｌ)のグラフである。
【図26】図２６は、未改変、ジオール改変、アミン(ＡＰＳ)改変の０．２ミクロンアノポア膜についての核酸保持割合-対-ｐＨのグラフである。
【図27】図２７は、１ｍＭ・トリス緩衝液ｐＨ８．０でＮａＣｌが変化する際の未改変アノポア膜上の核酸保持性質を示すグラフである。
【図28】図２８は、１ｍＭ・トリス緩衝液ｐＨ８．０でＮａＣｌが変化する際のアミン(ＡＰＳ)改変アノポア膜上の核酸保持性質を示すグラフである。
【図29】図２９は、１ｍＭ・トリス緩衝液ｐＨ８．０でＮａＣｌが変化する際のジオール改変アノポア膜上の核酸保持性質を示すグラフである。
【図30】図３０は、未改変及びアミンについて、核酸保持又は溶出に関するリン酸緩衝濃度の効果を示すグラフである。
【図31】図３１は、脳脊髄液(ＣＳＦ)、ヒト血清、及び全血についてのサンプル消化/ろ過試験の棒グラフである。
【図32】図３２は、全血サンプル中に含まれる局在化ゲノムＤＮＡ上に存在するβグロビン標的領域のＰＣＲ増幅により作られた単位複製配列を示す電気泳動ゲルの写真である。
【図33】図３３は、溶解された血からの核酸を、βグロビンＰＣＲ増幅/検出についてのリアルタイム増幅曲線である。
【図34】図３４は、溶解された血液から得た核酸のβグロビン単位複製配列の融解曲線を示す。

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4896

【図35】図３５は、５の検出条件についてのスキャン時間-対-スポット寸法のグラフである。
【図36】図３６は、様々なスポット規模での１００個の色素分子/核酸の条件と２～５００シグナル-対-ノイズ比（ＳＮＲ）についてのグラフである。
【図37】図３７は、様々なスポット規模での１００個の色素分子/核酸の条件と２～１００ＳＮＲについてのグラフである。
【図38】図３８は、様々なスポット規模での２５個の色素分子/核酸の条件と２～５００ＳＮＲについてのグラフである。
【図39】図３９は、様々なスポット規模での１００個の色素分子/核酸の条件と２～１００ＳＮＲについてのグラフである。
【図40】図４０は、未改変の孔サイズ０．２ミクロンのアノポア膜フィルター上に局在し、そしてＹＯＹＯ-１色素で染色された４８，５０２塩基対のラムダ・ファージＤＮＡの高拡大反転画像である。
【図41】図４１は、可視光吸収-対-３種の有機色素に改変されたアノポア膜及びニッケル-リンが付着した膜(付着ピグメント膜)についての波長を示す。
【図42】図４２は、ニッケル-ホウ素で改変されたアノポア膜の内部の電子顕微鏡写真である。

【表7】

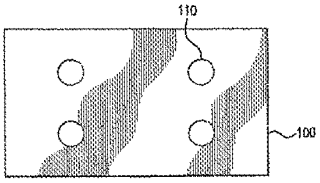


FIG.1a

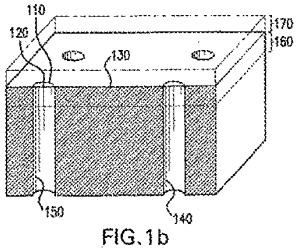


FIG.1b

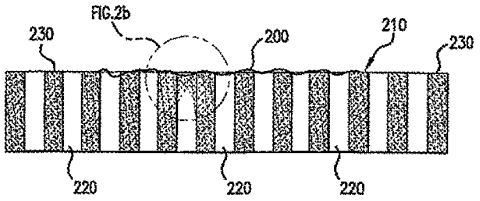


FIG.2a

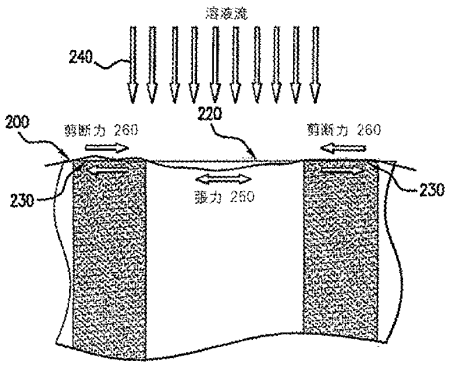


FIG.2b

【図3】

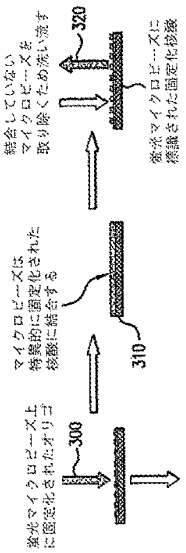


FIG.3

【図4】

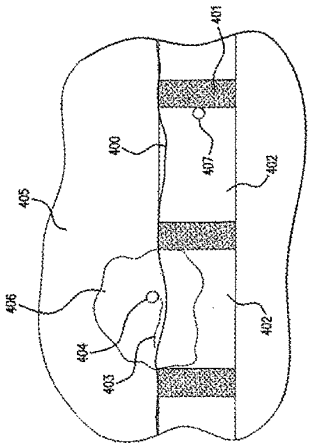


FIG.4

【図5】

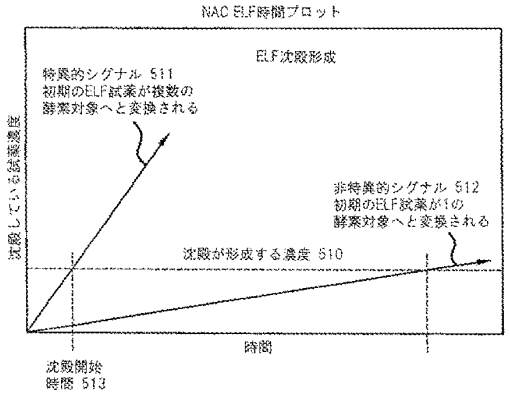


FIG.5

【図6】

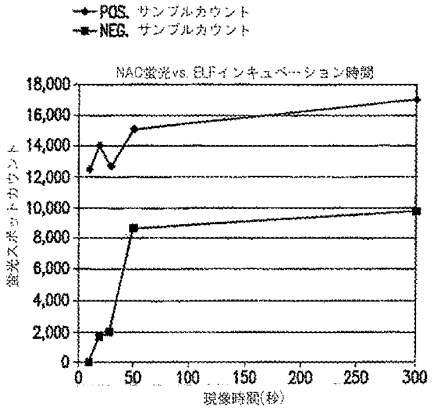


FIG.6

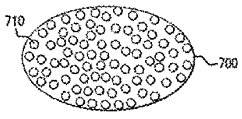


FIG.7a

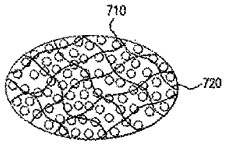


FIG.7b

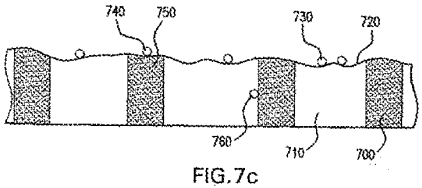


FIG.7c

【図8】

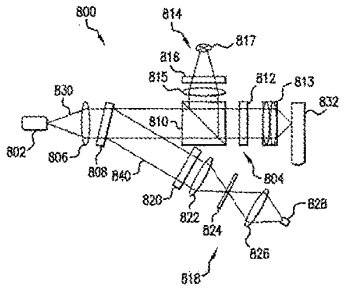


FIG.8

【図9】

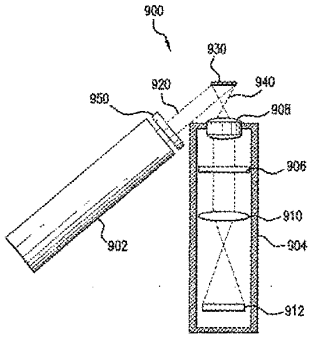


FIG.9

【図10】

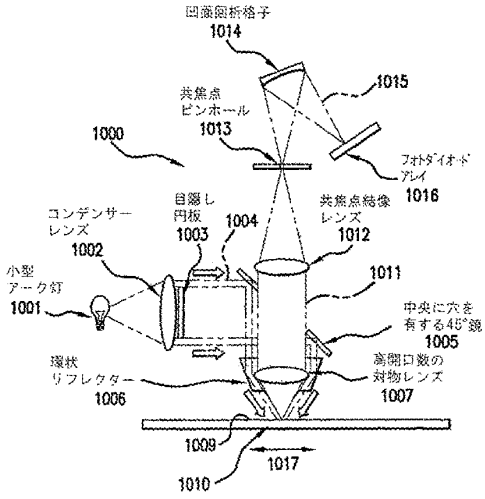


FIG.10

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4899

【図11】

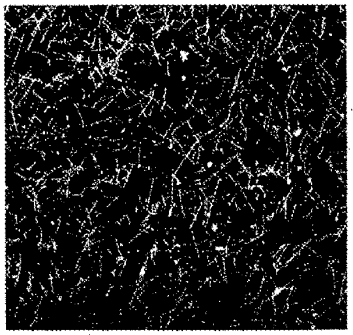
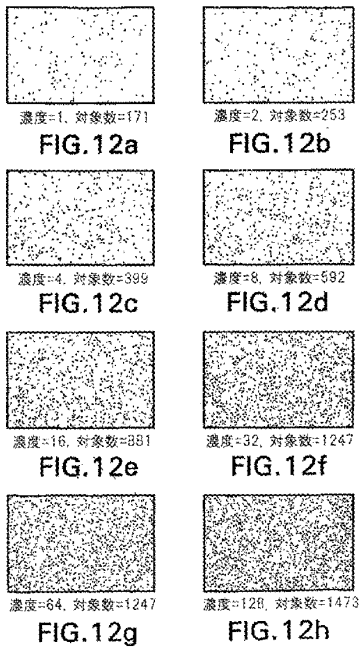


FIG.11

【図12】



【図13】

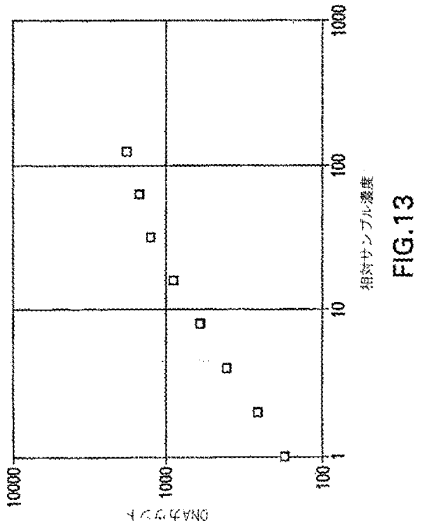


FIG.13

【図14】

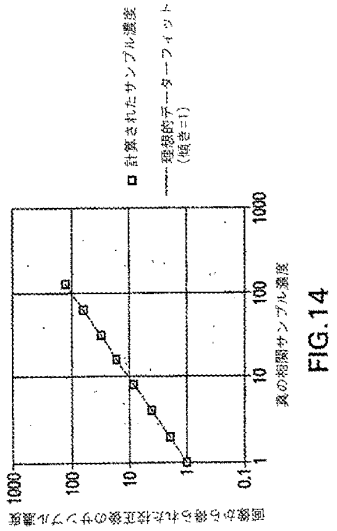


FIG.14

【図15】【図15】

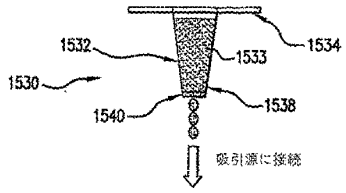


FIG.15a

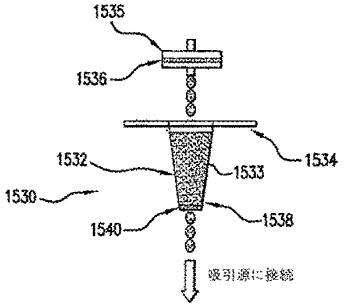


FIG.15b

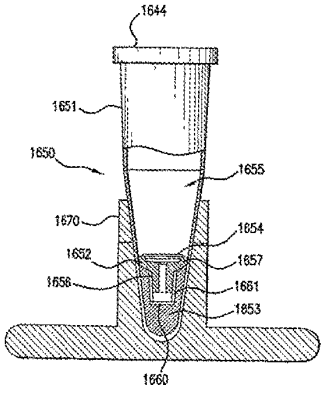


FIG.16a

【図16b-c】

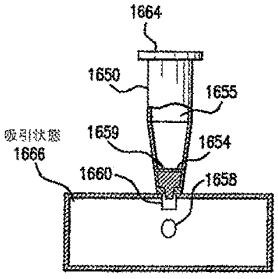


FIG.16b

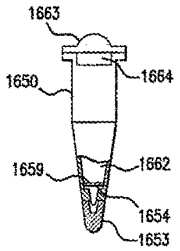


FIG.16c

【図17】

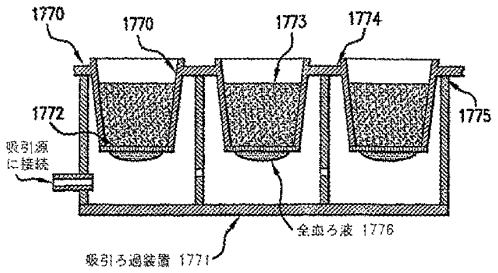


FIG.17a

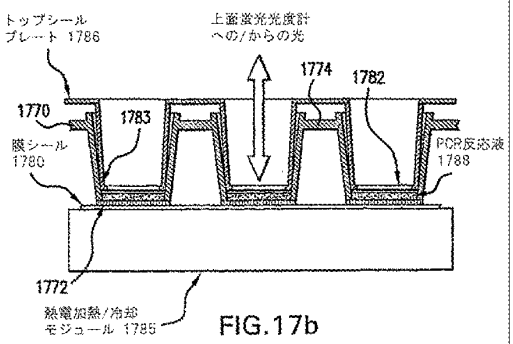


FIG.17b

【図18】

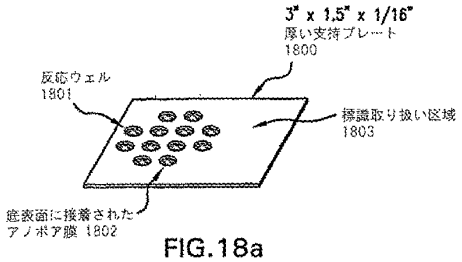


FIG.18a

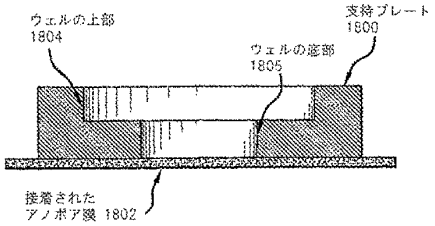


FIG.18b

【図19】

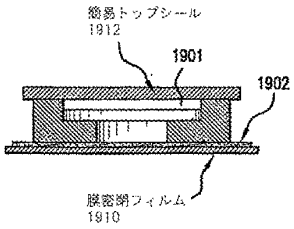


FIG.19a

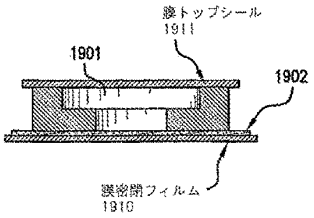


FIG.19b

【図20】

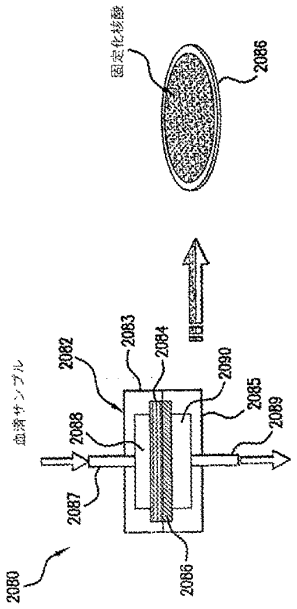


FIG.20

【図21】

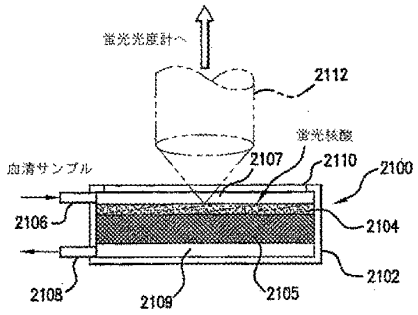


FIG.21

【図22】

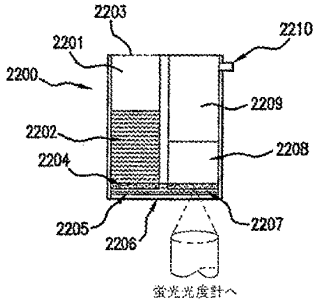


FIG.22

【図23】

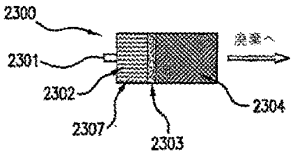


FIG.23a

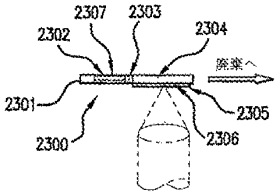


FIG.23b

【図24a】

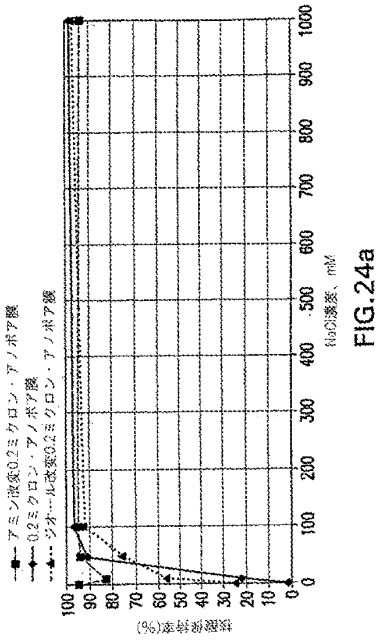


FIG.24a

【図24b】

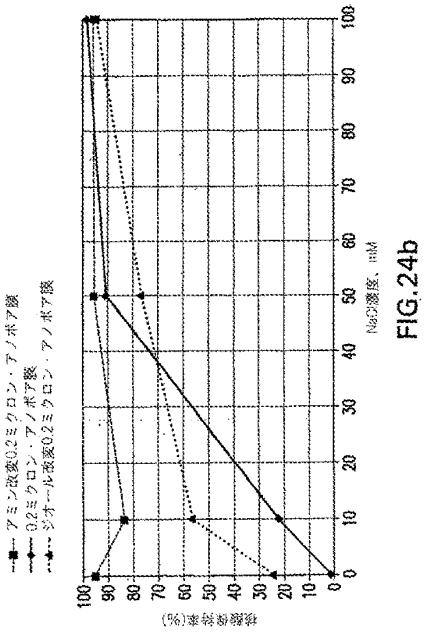


FIG.24b

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4903

【図25a】

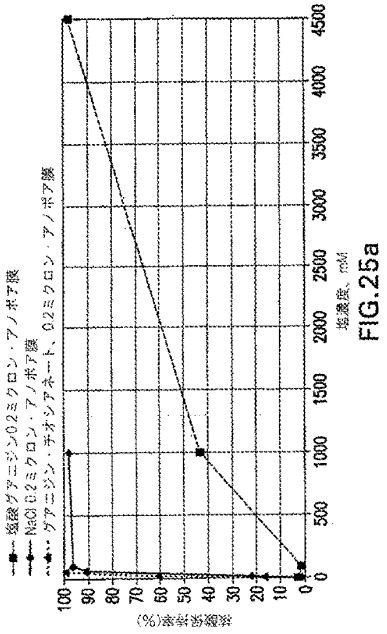


FIG.25a

【図25b】

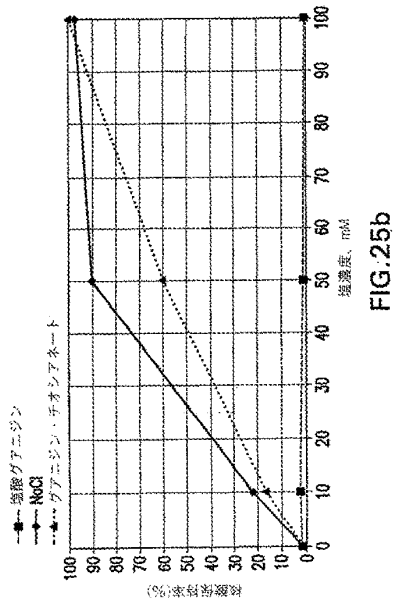


FIG.25b

【図26】

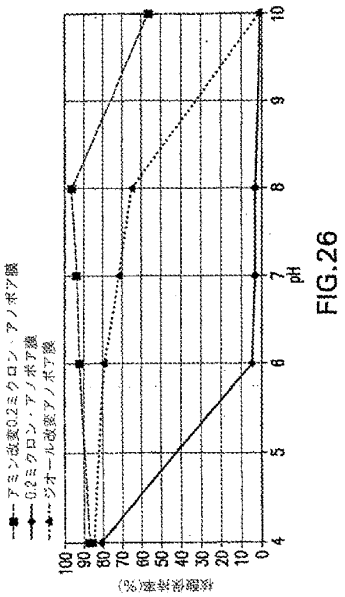


FIG.26

【図27】

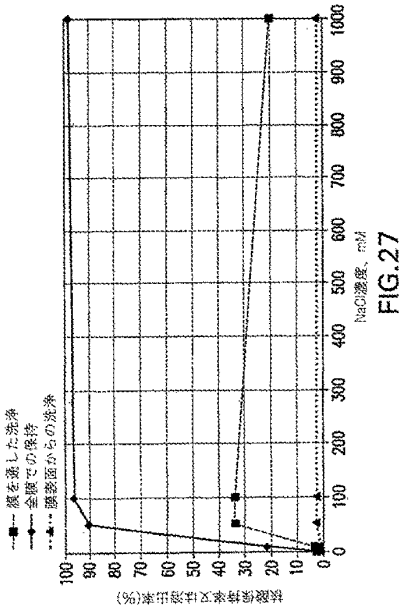


FIG.27

【図28】

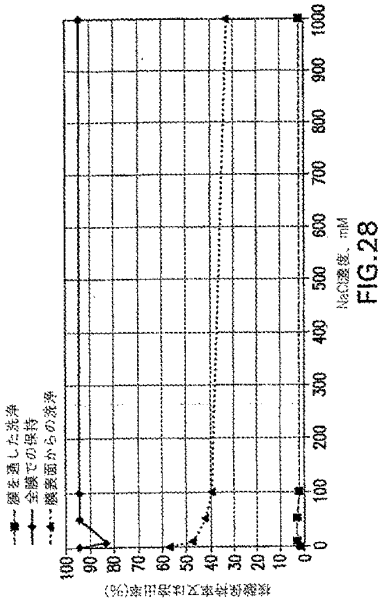


FIG.28

【図29】

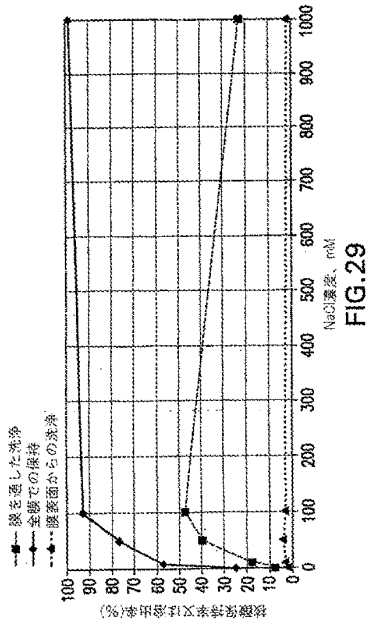


FIG.29

【図30】

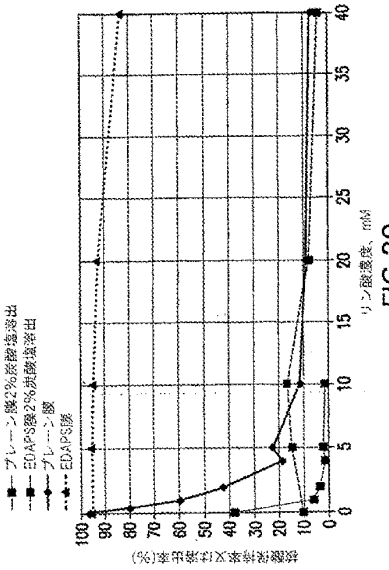


FIG.30

【図31】

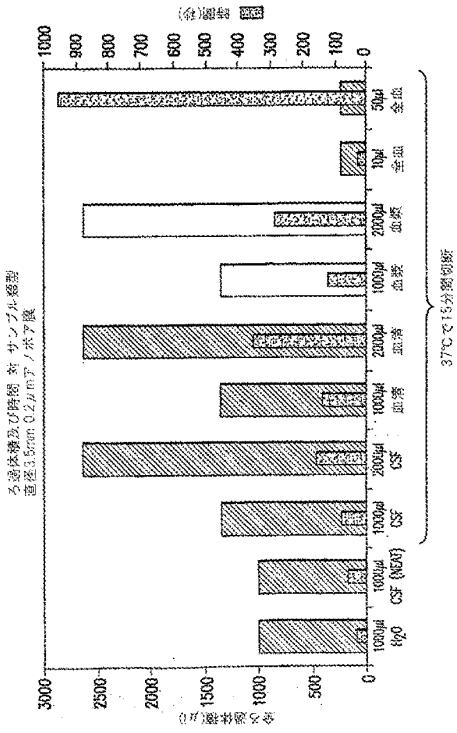


FIG.31

【図32】

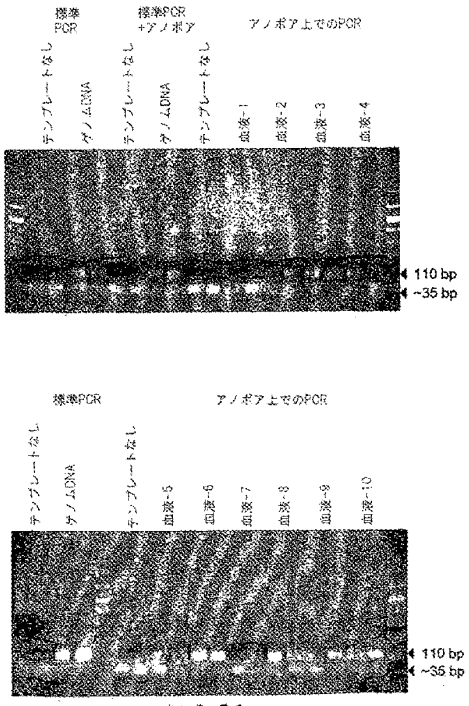


FIG.32

【図33】

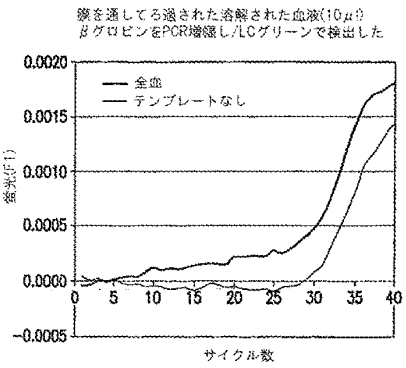


FIG.33

【図34】

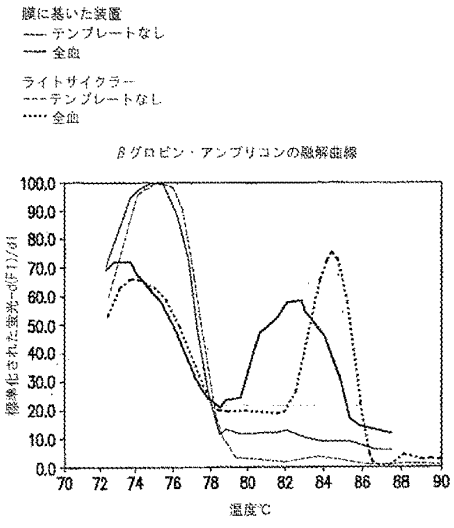


FIG.34

【図35】

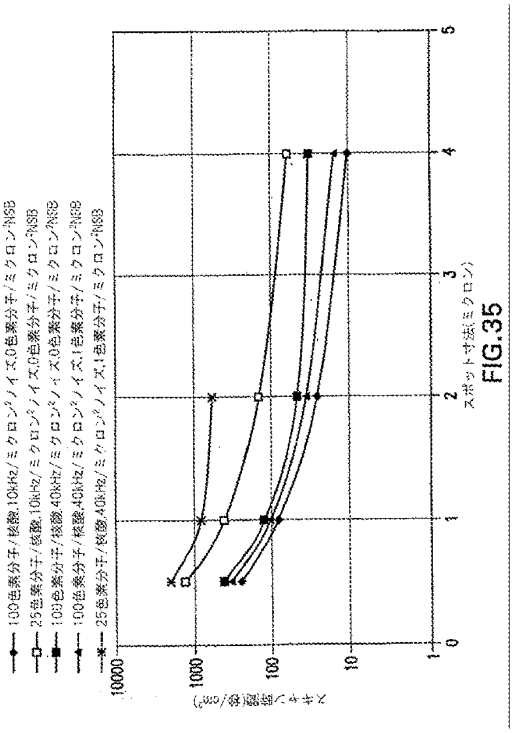


FIG.35

【図36】

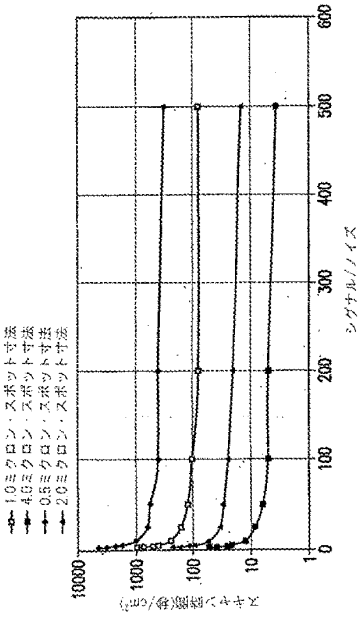


FIG.36

【図37】

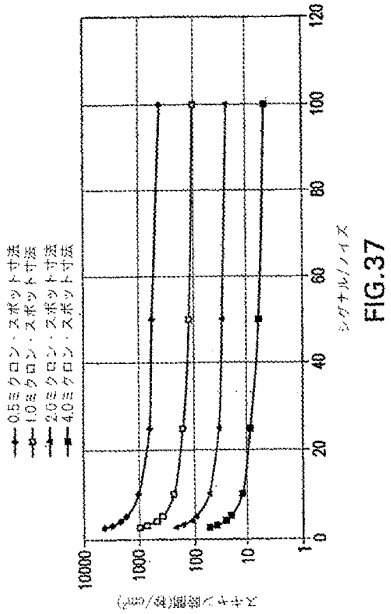


FIG.37

【図38】

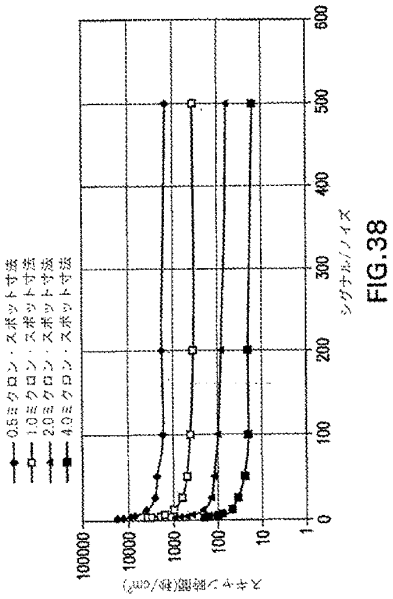


FIG.38

【図39】

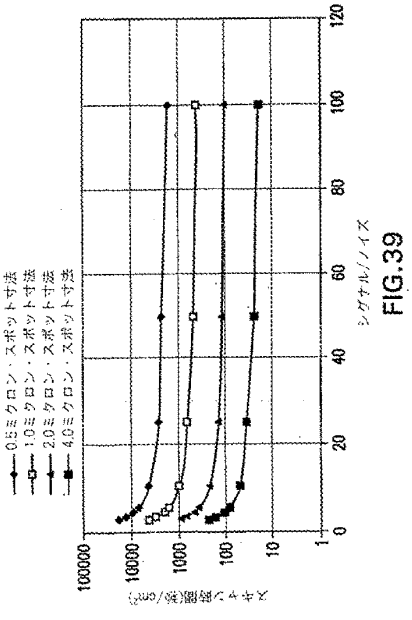


FIG.39

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4907

【図40】

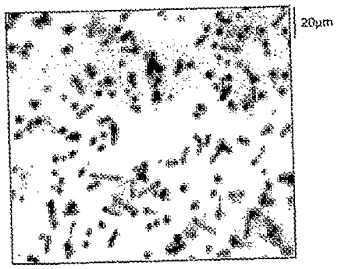


FIG.40

【図41】

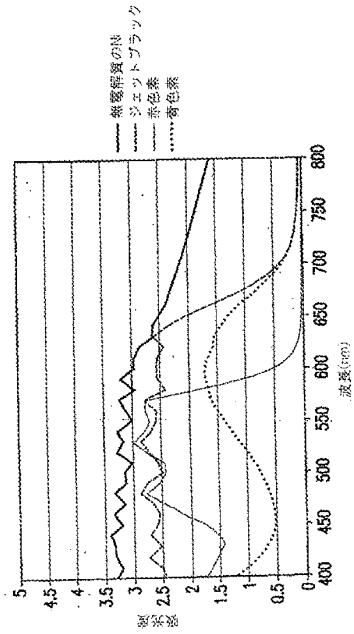


FIG.41

【図42】

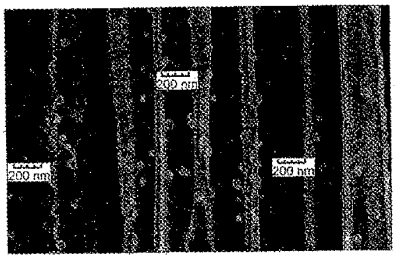


FIG.42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/37598

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : C12Q 1/68; G01N 27/26; C12M 1/00; H01B 1/00
US CL : 436/6; 204/400, 403.1, 409; 252/500
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 436/6; 204/400, 403.1, 409; 252/179, 184; 502/158, 401

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 3,632,417 (Brason) 4 Jan. 1972 (04.01.1972), column 2, line 73 to column 3, line 1.	1, 12, 14, 23, 25, 27
X	US 6,649,083 B1 (Pinnavaia et al) 18 Nov. 2003 (18.11.2003), column 16, lines 8-33	2-11, 13, 24, 26
Y	US 4,110,079 (Schaeffer et al) 29 Aug. 1978 (29.08.1978), abstract	15-22, 28-131
Y	US 5,643,721 (Spring et al) 1 Jul. 1997 (01.07.1997), abstract	15-22, 28-131
Y	US 4,042,335 (Clement) 16 Aug. 1977 (16.08.1977), column 10, line 66 to column 11, line 40	1-131
Y	US 5,213,964 (Jones) 25 May 1993 (25.05.0993), column 7, line 67 to column 8, line 42.	1-131
Y	US 5,807,756 (Bauman et al) 15 Sep. 1998 (15.09.1998), column 2, lines 7-15; column 14, line 58 to column 15, line 10.	1-131
Y	US 6,428,748 B1 (Wallach) 6 Aug. 2002 (06.08.2002), column 1, lines 48-65.	1-131

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.　☐ See patent family 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 application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 August 2005 (20.08.2005)	20 SEP 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer Victor S. Chang Telephone No. 571-272-1418

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/37598

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

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

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

3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

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

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

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/37598

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

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

Group I, claims 1, 12, 14, 23, 25, 27, drawn to a composite comprising a microporous material and a pigment.

Group II, claims 2-7, 24, 26, drawn to a composite comprising a microporous material and a covalently attached pigment.

Group III, 8-11, 13, claims drawn to a composite comprising a microporous material and a pigment, the microporous material comprises an inorganic material.

Group IV, claims 15-17, drawn to a composite comprising a microporous material and a pigment, the pigment comprises an elemental metal, a metal oxide, a metal alloy, or a combination thereof.

Group V, claims 18 and 19, drawn to a composite comprising a microporous material and a pigment, the microporous material comprises aluminum oxide, the pigment comprises an elemental transition metal.

Group VI, claims 20-22, 118-125, 127, 128, 130, drawn to a modified microporous material.

Group VII, claims 28, 29, drawn to a use of a composite in detection of an analyte.

Group VIII, claim 30, drawn to a use of a composite as a bioreactor.

Group IX, claim 31, drawn to a method of localizing an analyte.

Group X, claim 32, drawn to a method of separating an analyte.

Group XI, claim 33-61, drawn to a method for quantifying an analyte.

Group XII, claims 62 and 63, drawn to a method for amplifying a nucleic acid.

Group XIII, claims 64 and 65, drawn to a method for hybridizing a nucleic acid.

Group XIV, claims 66 and 67, drawn to a method for identifying a nucleic acid.

Group XV, claims 68-78, 126, 129, drawn to a filtration device.

Group XVI, claims 79-117, drawn to a method for separating analytes.

Group XVII, claim 131, drawn to a kit comprising a membrane comprising a microporous membrane.

Additionally, this application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

In order for more than one species to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. The species are as follows:

Species A: a ceramic, a metal, carbon, or glass.
Species B: a metal oxide.
Species C: a pigment comprises an elemental transition metal.
Species D: a pigment comprises a metal oxide.
Species E: a pigment comprises a metal alloy.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/37598

Species F: a suspension polymer comprises a nucleic acid.
Species G: a suspension polymer comprises a polysaccharide.
Species H: a suspension polymer comprises a protein.

The claims are deemed to correspond to the species listed above in the following manner:

Claims 8-10 (inorganic microporous materials): Species A and B.
Claims 15-17 (pigments): Species C-E.
Claims 20-22, 118-125, 127, 128, 130 (modified microporous materials): Species F-H

The following claim(s) are generic: 1-7, 11-14, 18, 19, 23-117, 126, 129 and 131.

The inventions listed as Groups I-XVII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: It is noted that Group I is extremely broad and in excess of disclosure, for example, it is well known that numerous microporous polymer foam contains pigments for aesthetic purpose, whereas the instant invention is directed to inorganic microporous materials only. Note also as evidence of the state of the art Brasen (US 3632417) which teaches that "Any of the well-known pigments, extender pigments, and dyes can be added to the novel finish composition used to form the novel microporous sheet material of this invention to give the desired color to the product." (column 2, line 73 to column 3, line 1). For Groups II and III, Pinnavaia et al. (US 6649083) teaches a microporous inorganic oxide composition containing organic silane linking pore surfaces to a dye composition (column 16, lines 8-33). For groups VI-XVII, Schaeffer et al. (US 4110079) teaches an analytical element for use in the clinical assay of an analyte contained in a biological liquid sample which is applied from an external source to a substantially planar sample receiving suface of the element. The analytical element comprises a porous layer bearing the aforementioned sample receiving surface, at least one dry reagent material for use in the assay, and one or more associated rupturable pod-like member(s) containing a liquid reagent for the assay, such liquid reagent, upon rupture of the pod-like member(s), being released into the element (Abstract); and Spring et al. (US 5643721) teaches an invention which provides an immobilization medium which can immobilize bioreagents to support materials and which dries to a water resistant layer or film. The immobilization medium comprises (i) a liquid or fluid binding reagent and (ii) complexes of a bioreagent immobilized to a solid phase which are evenly dispersed within the binding reagent. The suspension can further include supplemental ingredients evenly dispersed throughout the medium which can provide the medium with electrochemical properties, enhance the stability of the immobilized bioreagent and/or improve the medium's capability of drying to a substantially water resistant or insoluble layer. The immobilization medium provided by the instant invention is in the form of a homogeneous liquid suspension Abstract). As such, each of afore mentioned groups appears to be known art, and does not make a contribution over the prior art. The unity of invention is lacking and restriction is appropriate.

Additionally, the species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: clearly each species has patentably distinct composition.

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

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4912

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ｇ０１Ｎ	30/74	(2006.01)	Ｇ０１Ｎ	30/48	Ｃ	
Ｇ０１Ｎ	33/48	(2006.01)	Ｇ０１Ｎ	30/48	Ｇ	
Ｇ０１Ｎ	33/53	(2006.01)	Ｇ０１Ｎ	30/74	Ｆ	
Ｇ０１Ｎ	33/566	(2006.01)	Ｇ０１Ｎ	33/48	Ｅ	
Ｃ１２Ｎ	15/09	(2006.01)	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｍ	
			Ｇ０１Ｎ	33/566		
			Ｃ１２Ｎ	15/00	Ｆ	

(81)指定国　AP(BW,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,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人　100108903
弁理士　中村　和広
(74)代理人　100082898
弁理士　西山　雅也
(72)発明者　スミス，ロジャー　イー．
アメリカ合衆国，ユタ　８４７３８，アイビンス，ノース　３２５　ウエスト　６１０

Ｆターム(参考) 2G045 BB06 BB51 CA25 CA26 CB01 CB03 CB04 CB07 CB08 CB14
CB21 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37 FA11 FB02 FB07 FB12
4B024 AA11 CA01 CA09 HA12
4B029 AA07 BB01 BB15 BB20 CC03 FA01 FA09 FA11 FA12 FA15
4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR32 QR55 QR82 QS34 QX02

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4913

PCT WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 4 :		(11) International Publication Number:	WO 88/ 05533
G01N 21/00	A1	(43) International Publication Date:	28 July 1988 (28.07.88)

(21) International Application Number: PCT/US88/00041

(22) International Filing Date: 12 January 1988 (12.01.88)

(31) Priority Application Number: 004,339

(32) Priority Date: 16 January 1987 (16.01.87)

(33) Priority Country: US

(71) Applicant: KELSIUS, INC. [US/US]; 6330 Chelton Drive, Oakland, CA 94611 (US).

(72) Inventors: KLAINER, Stanley, M. ; 20 Belinda Court, San Ramon, CA 94583 (US). WALT, David, R. ; 12 Milk Street, Lexington, MA 02173 (US). GOTTLIEB, Amos, J. ; 1650 Haight Street, San Francisco, CA 94113 (US).

(74) Agents: REED, Dianne, E. et al.; Ciotti & Murashige, Irell & Manella, 545 Middlefield Road, Suite 200, Menlo Park, CA 94025 (US).

(81) Designated States: AT (European patent), BE (European patent), CH (European patent), DE (European patent), FR (European patent), GB (European patent), IT (European patent), JP, LU (European patent), NL (European patent), SE (European patent).

Published
With international search report.
Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.

(54) Title: AMPLIFICATION OF SIGNALS FROM OPTICAL FIBERS

(57) Abstract

A fiber optic sensing device for measuring a chemical or physiological parameter of a body fluid or tissue. To one end of the fiber is attached a polymer including a plurality of photoactive moieties selected from the group consisting of chromophores and lumophores, the photoactive moieties spaced apart so as to minimize chemical or physical interaction therebetween while optimizing the density of photoactive moieties. In one embodiment, a polymer chain is covalently bound to photoactive moieties through functional groups such as esters, amides, or the like. In a second embodiment, a polymer chain is inherently fluorescent and is formed from at least one monomeric unit. These devices are particularly useful as pH and oxygen sensors.

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	**FR**	France	**ML**	Mali
AU	Australia	**GA**	Gabon	**MR**	Mauritania
BB	Barbados	**GB**	United Kingdom	**MW**	Malawi
BE	Belgium	**HU**	Hungary	**NL**	Netherlands
BG	Bulgaria	**IT**	Italy	**NO**	Norway
BJ	Benin	**JP**	Japan	**RO**	Romania
BR	Brazil	**KP**	Democratic People's Republic of Korea	**SD**	Sudan
CF	Central African Republic			**SE**	Sweden
CG	Congo	**KR**	Republic of Korea	**SN**	Senegal
CH	Switzerland	**LI**	Liechtenstein	**SU**	Soviet Union
CM	Cameroon	**LK**	Sri Lanka	**TD**	Chad
DE	Germany, Federal Republic of	**LU**	Luxembourg	**TG**	Togo
DK	Denmark	**MC**	Monaco	**US**	United States of America
FI	Finland	**MG**	Madagascar		

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4915

AMPLIFICATION OF SIGNALS FROM OPTICAL FIBERS

Description

Technical Field

This invention relates generally to the use of optical fibers for measuring various chemical and biochemical parameters in fluid or body tissue.

Background

The use of optical fibers for such analytic purposes is known and described, for example, in Hirschfeld, U.S. Patent No. 4,577,109, entitled "Remote Multi-Position Information Gathering System and Method." Such techniques are also described by F.P. Milanovich, T.B. Hirschfeld, F.T. Wang, S.M. Klainer, and D. Walt in "Novel Optical Fiber Techniques for Medical Application," published in the Proceedings of the SPIE 28th Annual International Technical Symposium on Optics and Electrooptics, Volume 494.

Briefly summarizing the method of the prior art, a sensor consisting typically of a fluorescent dye is attached to the distal end of an optical fiber, preferably of diameter suitable for in vivo application. Light of a suitable wavelength, from an appropriate source, is used to illuminate the distal end of the optical fiber, visible light, for example, having a wavelength typically between about 400 and 800 nm. The light is propagated along the fiber to its distal end.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4916

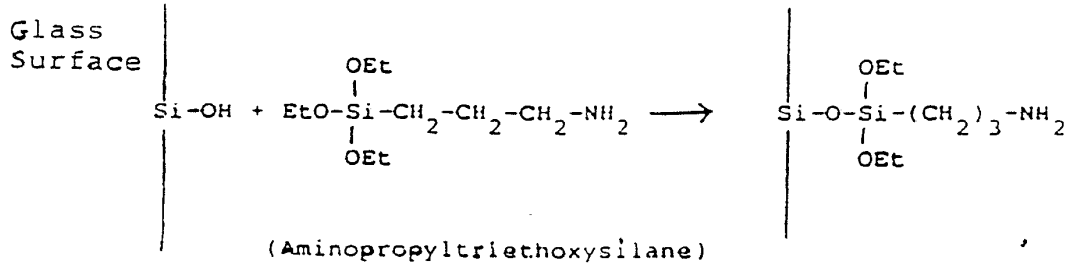
A fraction of the light is reflected at the fiberliquid interface and returns along the fiber. A second fraction of the light is absorbed by the fluorescent dye, and light is then emitted therefrom in a band centered usually but not always at a longer wavelength. The intensity of this band is dependent upon the interaction of the dye with the property or substance measured in the body fluid or tissue. This fluorescent light is also propagated along the return path of the fiber and measured using suitable optical equipment. The ratio of the wavelengths is determined and the parameter of interest measured.

Fluorescent molecules have been attached to the distal end of an optical fiber or to a separate piece of glass, e.g., a glass bead, by a technique which is used in the immobilization of enzymes. See Methods of Enzymology, vol. XLIV, Ed. Klaus Mosbach, Academic Press, pp. 134-148 (1976). A fundamental problem encountered with such a technique has been the failure to provide sufficient amounts of indicator at the distal end of the fiber. The prior art describes two primary approaches to the problem. In the first of these, a porous substrate is used so that more surface area is available to which indicator moieties may bind, while in the second, as described, for example, in U.S. Patent No. 4,269,516 to Lubbers et al., indicator is provided in solution form, which solution is separated from the external environment by a membrane.

In the former procedure, a glass surface, for example the distal end of an optical fiber (or a glass bead which is subsequently attached to the fiber), is treated so that it is porous. It is then reacted with a suitable agent such as 3-aminopropyltriethoxy silane, and a series of reactions is carried out culminating in

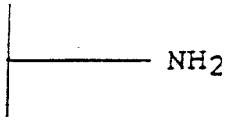
Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4917

the covalent attachment of a biologically and/or chemically active molecule, e.g., a fluorescent species, to the surface of the glass. These reactions may be represented as follows:

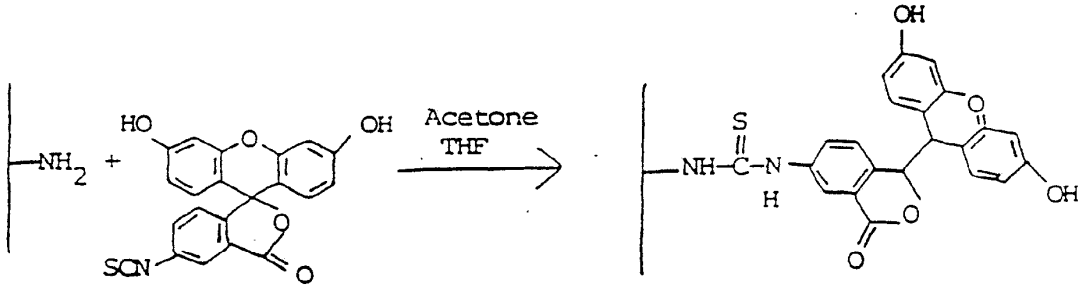


(Aminopropyltriethoxysilane)

Now representing the silanized glass (referred to also hereinafter as aminoalkyl glass or fiber) as



the next step is realized by reacting a fluorophore such as fluorescein isothiocyanate dissolved in an aprotic solvent with the aminoalkyl fiber



and performing the remaining conventional washing and purification steps.

A dye immobilized on glass in this manner is pHsensitive in the physiological range and is relatively stable. However, to achieve a satisfactory degree of response, it has been necessary to employ porous glass, that is, a special alkali borosilicate glass which has been heat treated to separate the glass into two phases. Typically, the phase which is rich in boric acid and alkali is leached out with acid to leave a porous, high-

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4918

silica structure. The porous structure is then silanized and treated with the desired fluorescent species. The resulting treated glass is then attached to the distal end of an optical fiber. Porous glass provides more surface area available for silanizing and thus many more fluorescent molecules can be attached.

However, this technique is difficult to carry out. The most practical way to accomplish the intended result is to provide a bead of porous glass, silanize it, react it with the fluorescent species, and then attach the glass bead to the distal end of an optical fiber. This attachment is difficult to effect because of the small size of the beads and the ease with which the pores in the glass are occluded.

The technique of using a solution behind a membrane also suffers from serious drawbacks. Most importantly, the phenomena of concentration quenching comes into play, which severely limits the amount of dye that can be in close proximity to the end of the fiber. Where fluorescent dyes are present in concentrations higher than about 10^{-3}M, for example, concentration quenching occurs and results in a substantial loss of accuracy. Several processes are believed to be responsible for concentration quenching: (1) the increased probability of self-absorption at higher densities or concentrations of fluorophores; (2) formation of dimers or higher aggregates which are normally less fluorescent than the monomer; and (3) reaction of excited molecules with ground state molecules to form excimers, which again have emission spectra quite different from the monomer spectrum. See, e.g., Guilbault, Practical Fluorescence, New York: Marcel Dekker, Inc., 1973. Similar problems arise in the case of absorbing dyes, where exciton interaction --

that is, interaction of dipoles on neighboring groups or molecules -is a factor at higher densities. See Birks, Photophysics of Aromatic Molecules, London: Wiley & Sons, 1970.

Disclosure of the Invention

Accordingly, it is an object of the present invention to overcome the aforementioned disadvantages of the prior art.

It is another object of the invention to provide a fiber optic sensing device, comprising an optical fiber to one end of which is attached a polymer including a plurality of photoactive moieties spaced apart from each other at a preselected distance.

It is still another object of the invention to provide such a device wherein the preselected distance is sufficient to minimize chemical or physical interaction between the photoactive moieties while optimizing the density thereof.

It is yet another object of the invention to provide such a device wherein the photoactive moieties are covalently attached to the polymer through functional groups, such as through ethers, amides, or the like.

It is a further object of the invention to provide such a device wherein the polymer is inherently fluorescent and includes at least one monomer unit which is itself photoactive.

It is still a further object of the invention to provide such a device wherein the inherently fluorescent polymer is quenchable by oxygen.

It is another object of the invention to provide a method of making fiber optic sensing devices, comprising attaching a plurality of monomeric units,

sequentially or as a preformed polymer, to an optical fiber tip, wherein at least a fraction of the monomeric units include photoactive moieties.

Additional objects, advantages and novel features of the invention will be set forth in part in the description which follows, and in part will become apparent to those skilled in the art on examination of the following, or may be learned by practice of the invention.

In one aspect of the invention, a fiber optic sensing device is provided, comprising a fiber to one end of which is attached a polymer including a plurality of photoactive moieties. The photoactive moieties, which may be chromophores or lumophores are positioned along the polymer in such a way as to optimize the distance between the moieties. That is, chemical or physical interaction (e.g., concentration quenching, exciton interaction, steric interference) is minimized while the density of photoactive moieties is optimized. The high density of photoactive moieties achieved with the present invention provides an apparatus of substantially increased sensitivity.

The photoactive moieties may be attached as side groups, i.e. pendant to the main polymer chain. In such a case, each photoactive moiety is attached through one bond to the polymer backbone. In an alternative embodiment of the invention, in which the polymers are designated "inherently fluorescent," each photoactive moiety is in the backbone of the polymer, i.e. is bound to the remainder of the polymer through two or more bonds.

In another aspect of the invention, a method of forming a fiber optic device is provided. The method involves either sequential attachment of labeled monomer

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4921

units to a fiber optic tip, or, alternatively, attachment (covalent or otherwise) of a preformed polymer to a fiber optic tip; the preformed polymer may be labeled with photoactive moieties before attachment or after.

Potential uses of the device include, inter alia, use as a pH sensor, an oxygen sensor, an electrolyte sensor and a blood gas sensor.

Modes for Carrying Out the Invention

As used herein, "photoactive" moieties are molecular species which undergo a detectable change in electronic configuration in response to interaction with light. In the present invention, the detectable change corresponds to one or more chemical or physiological parameters.

"Chromophores" are atoms or groups of atoms that serve as units in light absorption. For example, a chromophore includes the electronic substructure of a dye that absorbs light and thereby causes the material to be colored. A change in the environment of a chromophore can change the amount of light absorbed at a particular wavelength or the amount of light absorbed over a range of wavelengths. Examples of chromophores useful herein include cresol red and phenol red. Suitable chromophores also include lumophores such as pyrenes, perylenes and their derivatives, and other paracyclic aromatic compounds.

"Lumophores" are atoms or groups of atoms that serve as units in light emission. All compounds which are capable of undergoing fluorescence or phosphorescence include a lumophore.

"Chemical or physical interaction" between the photoactive moieties of a polymer, as used herein,

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4922

includes any interaction which (1) changes the electronic absorption spectrum obtained; (2) changes the electronic emission spectrum obtained; (3) changes the quantum yield of emission; (4) interferes with the accurate measurement of particular chemical or physiological parameters in a sample or (5) destabilizes the polymer structure.

A "substantially nonporous" material is a material having a porosity less than about 5% (vol./vol.).

"Inherently fluorescent" polymers, as used herein, are polymers formed from one or more photoactive monomer units, so that photoactive moieties are actually present within the polymer backbone so that each is bound to the remainder of the polymer chain through two or more bonds. This is in contrast to polymers in which the photoactive moieties are pendant to the polymer chain, where each is bound through only one bond to the remainder of the polymeric structure.

The optical fiber of the present invention is typically between about 50 μ and about 600 μ in diameter. In a preferred embodiment, the sensing device is useful for in vivo applications, for example to measure pH or oxygen concentration, in which case the diameter should be between about 50 μ and about 250 μ.

The fiber may be comprised of virtually any material so long as it is an optical conductor at the wavelengths of interest. For example, the fiber may be an organic material such as polymethylmethacrylate, polystyrene, polymethylphenyl siloxane or deuterated methyl methacrylate, or it may be an inorganic material such as glass. As noted earlier, successful use of substantially nonporous materials in this application --

that is, to give a highly sensitive device -represents a significant improvement in the art.

The polymer which is attached to the fiber tip can be any stable polymer which can be derivatized so as to contain photoactive moieties. In addition, the polymer must be optically transparent both to exciting light, i.e. light directed through the fiber into the polymer, and to light emitted from the photoactive moieties attached thereto. Examples of polymers suitable for use herein include polyacrylamides, polylysines, polymethacrylates, polyurethanes, polyethers, and polysiloxanes such as polydimethyl and polymethylphenyl siloxane. The polymer chain is preferably less than about 200 monomer units in length, to ensure that substantially all photoactive moieties are maintained fairly close to the fiber tip.

The polymer may be attached to the fiber in a number of ways. In a preferred embodiment, the polymer is attached to the fiber covalently, typically through an aminoalkyl or other linking group (see Example 4). Suitable linking groups for glass and other fibers may be prepared from the following: diaminoalkanes, diaminoaryl compounds, diisothiocyanate-substituted aryl compounds, alkyldialdehydes, arylalkyl dialdehydes, arylalkyldiamines, alkyl dicarboxylic acid derivatives, arylalkyl decarboxylic acid derivatives, aryl dicarboxylic acid derivatives, alkyl diols, aryl diols, arylalkyl diols, and the like. Alternatively, the polymer may be attached to the polymer by adsorption or electrostatic interaction. In the latter case, the polymer is attached to the fiber by forming a salt of the polymer and a linking group on the fiber.

Unless the polymer is of the "inherently fluorescent" type, it must be provided with areas of

reactivity so that photoactive moieties can bind to the polymer backbone. The photoactive moieties may bind directly to the polymer backbone or may bind to the polymer through functional groups such as ethers, amines, amides including acrylamides, esters, alkyl moieties having from about two to about twenty-two carbon atoms, arylalkyl, etc.

Suitable photoactive moieties for use herein include chromophores, lumophores and combinations thereof. Chromophores include, for example, cresol red and phenol red. Lumophores include both fluorophores and phosphors. Examples of suitable fluorophores for use herein are fluorescein, perylene, pyrene and their derivatives. An examples of a suitable phosphor is rose bengal.

The reactive areas on the polymer are distributed along the polymer chain such that the photoactive moieties are spaced apart by at least about 4 angstroms, that is, the distance between photoactive moieties is determined by the relative frequency of the species in the polymer backbone. This frequency can be achieved during preparation of the polymer by diluting the photoactive moiety, i.e. by introducing a nonphotoactive comonomer during polymerization. Alternatively, with a preformed polymer having reactive functional groups to which photoactive moieties will bind, the frequency of these moieties can be controlled by dilution during the reaction attaching the pendant moieties or by using a nonphotoactive moiety which can compete for binding to the functional groups on the polymer chain.

In some cases, depending on the environment and on the photoactive moieties selected, i.e. where there is a potential for interaction at a greater

distance, spacing of at least about 14 angstroms is preferred. The distance factor is key to the present invention, as the distance between photoactive moieties is carefully preselected so as to minimize chemical or physical interaction therebetween, while optimizing the density thereof close to the fiber tip. The inventors herein have demonstrated that, generally, the amount of light recaptured by the fiber from the photoactive moieties is strongly dependent on the density of these groups. The strength of the signal ultimately generated is also dependent on the distance of the active moieties from the end of the fiber to these groups. Thus, and as accomplished by the present invention, it is advantageous to have a very high density of photoactive moieties at the fiber tip, as close to the end of the fiber as possible.

Generally, the fiber tip will be provided with a plurality of polymer chains all similarly bonded to the fiber. The spacing of photoactive moieties is then controlled not only along a single polymer chain but also between polymer chains. This is accomplished by controlling the number of polymer chains attached to a given area of the fiber tip, for example, by minimizing the number of attachment sites on the substrate or by reacting some of the sites with nonphotoactive polymer chains.

A primary use of the above-described sensing device, a preferred embodiment herein, is as a pH sensor. The fiber tip is placed into contact with a fluid or tissue, light is directed along the fiber toward the fiber-sample interface so that photoactive species are caused to fluoresce, and the ratio of fluorescence to reflected light is determined. This ratio changes with pH in a predictable fashion; thus, pH

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4926

may be determined by interpolating along a curve prepared from known pH/ratio points.

In an alternative embodiment of the invention, a fiber optic sensing device is provided which comprises a fiber tip to one end of which is attached an inherently fluorescent polymer. The polymer has as part of its molecular structure a chromophore, lumophore or the like, i.e. it is actually formed from one or more photoactive monomer units.

Such a device provides a number of advantages: first, as with the embodiment described earlier, a very high optical density may be achieved without interfering effects such as concentration quenching. This allows for a very thin, yet highly absorbing, polymer layer. The thinness of the polymer layer causes an increase in the amount of emitted light which enters the fiber and allows, also, for a mechanically sturdy configuration. A second advantage is that with inherently fluorescent polymers, as with the polymers having pendant photoactive moieties, there is no separate dye which can migrate out of the polymer matrix. This promotes long-term stability of the device and allows the material to be used in contexts where dye toxicity could otherwise be a problem.

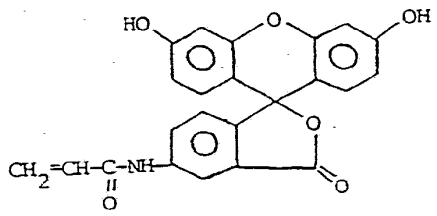
The inherently fluorescent polymers are prepared by reaction of a photoactive moiety with a reactive monomeric species under polymerization conditions. The photoactive moieties may be introduced within a straight-chain polymer or as cross-linking functionalities in a cross-linked polymer (see Examples 16 and 17). Suitable photoactive moieties are as described earlier, and particularly suitable photoactive moieties for use in the inherently fluorescent polymer application are derivatives of pyrene. Preferred

polymers include polycarbonamides, polyurethanes, polyamides, polyimides, polyesters, and polysiloxanes such as polymethylsiloxanes, polymethylphenylsiloxanes and the like.

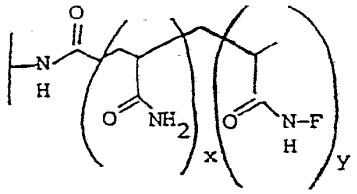
A preferred use of the fiber optic sensing device which incorporates an inherently fluorescent polymer at the optical fiber tip is as an oxygen sensor. In such an application, the photoactive moieties incorporated in the polymer are fluorescent species which are quenchable by oxygen. The device is constructed so that fluorescence emission varies with (typically is inversely related to) the oxygen concentration of its environment, which may be gaseous or aqueous (e.g., blood).

The present invention also encompasses a method of attaching labeled polymeric species -- inherently fluorescent or otherwise -to a fiber optic tip. In one embodiment, the method involves sequential addition of monomer or oligomer species to a linking group present on the fiber. At least a fraction of these species is photoactive. In another embodiment, the method involves attachment of a preformed polymer to the fiber tip, which polymer may be labeled with photoactive moieties prior to attachment or after. The attachment of the preformed polymer may be covalent, or it may be effected by adsorption or electrostatic binding.

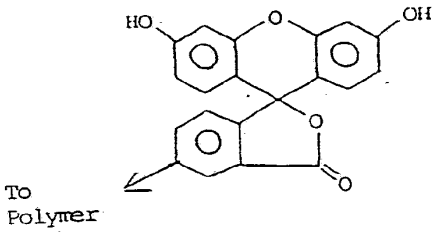
In developing the device of the present invention, the inventors herein discovered a new and useful fluorescent compound attachable in a simple, one-step reaction to a polymer chain. This compound is a fluorophore having an acryloyl substituent on an aromatic ring, and in one embodiment is given by the following structure



It will be apparent to those skilled in the art that the compound may be further substituted on the aromatic rings, e.g., with halogen substituents or lower alkyl or alkoxy groups. Such a fluorescent acrylamide is then polymerizable (with or without nonfluorescent acrylamide monomers) in the presence of a catalyst such as 2,2'-azobisisobutyronitrile to form fluorescent polymers having the structure



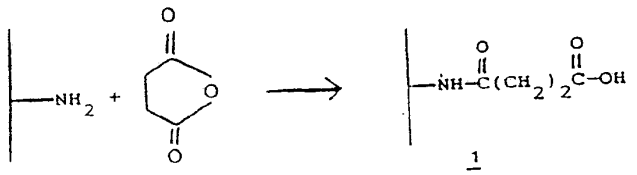
In the above structure, x and y represent the number of nonfluorescent and fluorescent monomer units in the polymeric structure, respectively, and are selected so as to provide the requisite spacing between photoactive moieties. Typically, x and y each range from about 1 to about 200, and the sum of x and y is also, typically, less than about 200. F represents the major portion of the molecule given by



It is to be understood that while the invention has been described in conjunction with specific embodiments thereof, that the foregoing description as well as the examples which follow are intended to illustrate and not limit the scope of the invention, which is defined by the appended claims. Other aspects, advantages and modifications within the scope of the invention will be apparent to those skilled in the art to which the invention pertains.

Example 1

Preparation of Acid Glass



1

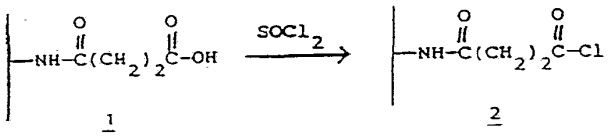
In 1 and generally hereinafter, the group -NH- is derived from the primary amino group of the aminoalkyl glass.

The acid glass 1 was prepared as follows: Succinic anhydride (Aldrich, 3.0g) was dissolved in anhydrous tetrahydrofuran (THF) (100 ml). Silanized glass, i.e. aminoalkyl glass (Pierce Chemical, 1 g), was added and the solution was refluxed for four hours. The glass was then washed with 30 ml of acetone and dried in vacuo at 25°C for thirty minutes.

Example 2

Preparation of Acid Chloride Glass

The acid glass of Example 1 was treated with $SOCl_2$ as follows: A 10% solution of thionyl chloride (Aldrich) in dry chloroform was prepared. 0.5 g of acid glass was added to 20 ml of the thionyl chloride solution and refluxed for four hours. The glass was then rinsed with chloroform and dried under vacuum for thirty minutes.

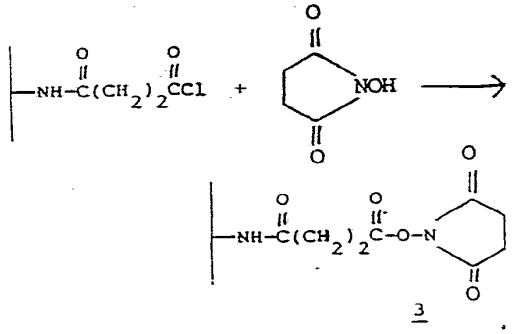


1 2

Example 3

Preparation of N-Hydroxy Succinic (NHS) Glass

The acid chloride glass of Example 2 was reacted with N-hydroxysuccinimide as follows:



3

The reaction was carried out as follows: 3.8 g of N-hydroxysuccinimide (Aldrich) and 4.45 ml of triethylamine (Aldrich) were added to 50 ml of anhydrous stirred chloroform. This solution was then cooled to 0°C. Acid chloride glass was added and the suspension was stirred for an additional forty minutes. The temperature of the suspension was maintained at 0°C during this stirring period. The glass was filtered,

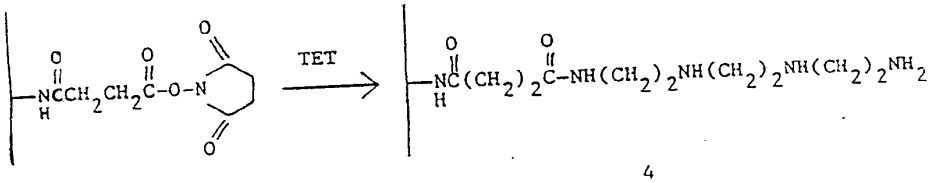
and the beads were washed with chloroform and dried in vacuo at 25°C for thirty minutes.

The purpose of treating the acid chloride glass with N-hydroxy succinimide was to protect the treated glass from hydrolysis in subsequent treatment.

Example 4

Treatment of NHS Glass with Triethylenetetramine (TET)

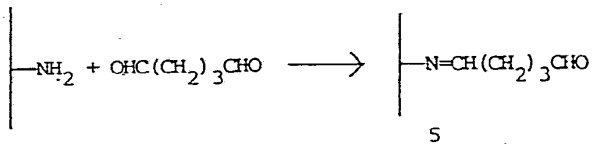
The NHS glass from Example 3 is added with stirring to a mixture of 50 ml of anhydrous chloroform and 8 ml of triethylenetetramine (Aldrich). The glass mixture is stirred for one hour, and the beads are then filtered, washed with chloroform and dried in vacuo at 25°C for thirty minutes. The reaction may be represented as



4

The treated, aminoalkyl glass 4 has numerous nitrogen functionalities to which fluorescent groups may be attached.

Example 5

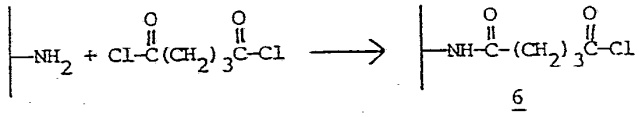


5

Glutaraldehyde glass (represented by structure 5) was prepared as follows. A solution of 25% glutaraldehyde was diluted to 2.5% in 0.1 M Na_3PO_4, pH 7, to 50 ml. The aminoalkyl glass prepared in the preceding Example was immersed for one hour and then rinsed with deionized water.

Example 6

Glutaryl Chloride (glut-Cl) Glass



6

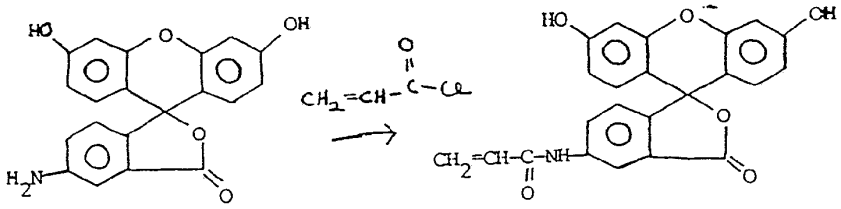
2.5 ml of glutaryl dichloride [source?] was diluted to 10 ml in anhydrous THF. Aminoalkyl glass (400 mg) as prepared in Example 4 was immersed for one hour in this solution and then rinsed with dry acetone.

Example 7

Attachment of a Fluorescent Polymer to Aminoalkyl Glass

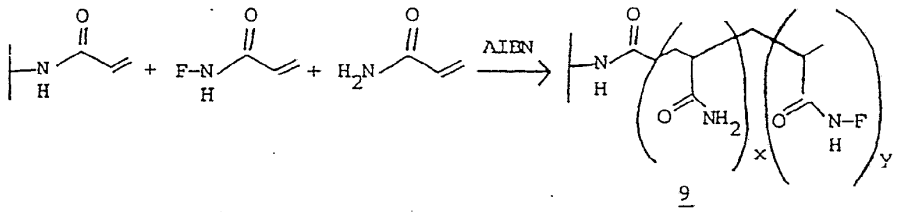
(a) Preparation of N-substituted acrylamide derivative of fluorescein: Two hundred mg of fluorescein amine 7 (Aldrich) were dissolved in a mixture of 1.0 ml anhydrous dimethyl formamide and 25 ml anhydrous chloroform, followed by addition of 0.56 ml of

acryloyl chloride (Aldrich). The reaction mixture was stirred and maintained at a temperature of 25°C. After sixty minutes, the pH of the reaction mixture was found to be about 3, indicating formation of HCl and thus reaction of the fluorescein amine with the acryloyl chloride. The solvent was stripped off in vacuo leaving an amber oil. The product was presumed to have the formula 8.



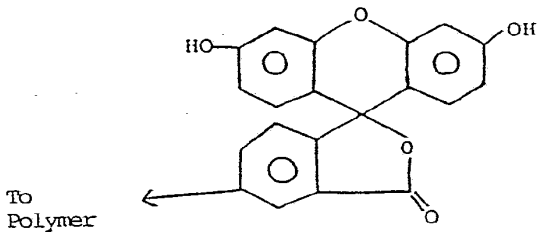
7 8

(b) Copolymerization of Acrylamide and 8 with Aminoalkyl Glass: 400 ml of 8 were dissolved in 30 ml tetrahydrofuran together with 1 g acrylamide and 10 mg of 2,2'-azobisisobutryo nitrile (AIBN) (Polysciences) as catalyst. Aminoalkyl glass in the form of a fiber tip (prepared as in Example 4) was activated in 1 ml acryloyl chloride for one hour, immersed in the acrylamide solution, and heated at 50°C for twenty hours. A copolymer of 8 and acrylamide linked to the aminoalkyl glass resulted in the structure given by 9, wherein x and y indicate the numbers of the respective monomer units.



9

The monomer units in all likelihood occur in some more or less random order. The pendant group F is derived from 8; i.e., it is the group 8a.



8a

(c) Testing of Fiber Tip 9: The fiber tip 9 was tested as a pH sensor by immersion first in a buffer solution at pH 6.8 and then in a second buffer solution at pH 7.8. The ratio of the intensity of light resulting from fluorescence to that of the reflected light was found to be 0.81 at the lower pH and 1.1 at the higher pH.

(d) Comparison with a Porous Glass Bead to which FITC is Directly Attached: A porous glass bead (OD = 177 μ, average pore size = 500), was glued to the end of an optical fiber and activated by treatment with aminopropyl triethoxy silane (Petrarch) 10 wt.% aqueous solution, pH 3.45, treatment time sixty minutes). Due to the porous nature of the glass, many aminoalkyl groups were presumed attached. The fiber was then rinsed in distilled water and air dried at 90°C.

Ten mg fluorescein isothiocyanate (FITC) (Molecular Probes) was dissolved in 5 ml acetone and the tip of the fiber described above was immersed in the solution for sixty minutes at room temperature. The fiber was rinsed with acetone, and tested as in Example 7(c) above. The ratio of the intensity of light

resulting from fluorescence to that of the reflected light was found to be 0.54 at pH 6.8 and 1.29 at pH 7.8.

In example 7(c) the glass to which the fluorescent species was attached was nonporous. It was treated to append aminoalkyl groups but eliminated the tedious step of attachment of a porous bead.

The polymeric technique thus achieves a result which is similar to that achieved with porous glass, the porous glass route, however, being less desirable due to attachment problems.

Example 8

Glass Fiber Treated with FITC

By way of further comparison, aminoalkyl glass fiber as in Example 7(b) was treated as follows: The fiber was soaked first in a solution containing 5 mg of FITC in 100 ml of acetone for one hour and then in deionized water for one hour. No observable fluorescent pH effect could be measured using the procedure of Example 7(c).

Example 9

Glass Fiber Treated with High Molecular Weight Polylysine and FITC

A glutaraldehyde-treated aminopropyl glass fiber (prepared as in Example 5) was placed in a solution of 4 mg of 540,000 D average molecular weight (M_w) polylysine in 4 ml of deionized water and allowed to soak for one hour at 23°C. The fiber was then allowed to stand in a deionized water wash for one hour after which time it was treated with a solution of 5 mg FITC/100 ml acetone for one hour. Its pH-dependent fluorescence was measured. At pH 6.8 the ratio of

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4936

fluorescence to reflected light was 0.11, and at pH 7.4 it was 0.21.

Example 10

Glass Fiber Treated with Low Molecular Weight Polylysine and FITC

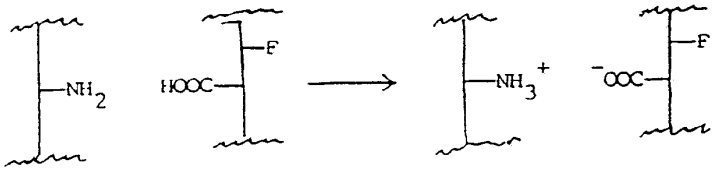
A glutaraldehyde-treated aminopropyl glass fiber (prepared as in Example 5) was placed in a solution of 4 mg of 4,000 D average molecular weight (M_w) polylysine (Polysciences) in deionized water and allowed to soak for one hour at 23°C. The fiber was then placed in a deionized water wash for one hour and immediately treated with a solution of 5 mg FITC/100 ml acetone for one hour. The fiber was then rewashed in deionized water for one hour and its pH-dependent fluorescence measured. The ratio of fluorescent to reflected light at pH 6.8 was 0.35 and at pH 7.4 was 0.52.

From the results of Examples 9 and 10, it may be concluded that the polylysine was attached covalently to the aminopropyl glass and that FITC molecules were attached covalently as pendant groups to the polylysine chains.

Example 11

Electrostatically Bound Fluorescent Polymer

A fluorescent polymer is prepared having pendant fluorescent groups and pendant carboxyl groups. The polymer is caused to react with activated glass (i.e., the aminoalkyl glass of Example 4) having basic groups, resulting in the following:



C D E

where C represents one of a multiplicity of activated groups on glass, D represents a repeating unit in the polymer described above (wherein F represents a pendant fluorescent group) and E represents the resulting salt. This may be accomplished by reacting aminopropyl glass C with a fluorescently labeled polymer D. The resulting ionic salt bridges are then stabilized by drying the product in vacuo.

Example 12

Adsorption of a Fluorescent Polymer on an Aminoalkyl Glass Surface

A polymer having pendant fluorescent groups is prepared, e.g., a copolymer of acrylamide and the acryloyl derivative 8 of fluorescein prepared as described in Example 7(b) but in the absence of aminopropyl glass.

An aminopropyl glass fiber tip is immersed in a 0.01 molar aqueous solution of this copolymer for two days. The fiber is then rinsed with chloroform for three days to remove the nonadsorbed polymer and is dried in vacuo at 25°C for one hour.

Example 13

Immunoassay Embodiment

In the enzyme-linked immunoassay (ELISA) technique, an enzyme is immobilized on the surface of a

test tube or cuvette. See, for example, Chang, Biochemical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins, Vol. 2, Plenum Press, 1977, Chapters 30-33. This technique is improved by the amplification technique of the present invention as follows.

An acetaminophen-specific antibody is treated with a one hundredfold molecular excess of acryloyl chloride, and taken into solution with deionized water to which a twofold quantity of acrylamide has been added together with a suitable amount of AIBN. An aminopropyl glass optical fiber is treated with an excess of acryloyl chloride, washed, added to the acrylated antibody/AIBN solution and warmed at a sufficient temperature to promote graft polymerization of the antibody derivative to the silica surface without denaturing the protein.

Next, an acetaminophen-alkaline phosphatase conjugate is incubated with the immobilized antibody, filtered, washed, and the unknown quantity of acetaminophen-analyte added. The residual bound enzyme activity is then measured and the quantity of acetaminophen calculated.

In the examples above, fluorescent species such as compound 8 and FITC are used and the ratio of fluorescent light to reflected light is measured. As noted, active species other than fluorescent species may be used. For example, phenol red, cresol red and neutral red may be used. These dyes change color with pH. These dyes have functional groups which are capable of reacting with functional groups of monomers and polymers and can be incorporated in polymer molecules formed in situ or in preformed polymers. The following example will serve for purposes of illustration.

Example 14

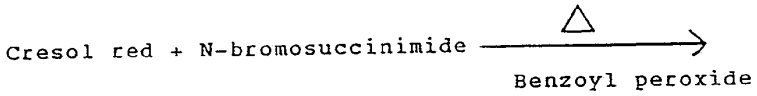
Incorporation of Cresol Red in a Polymer Chain

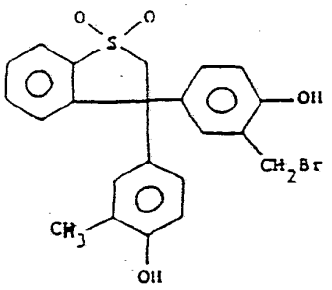
Cresol red (0.038 g) is dissolved in 30 ml of chloroform. N-Bromosuccinimide (0.017 g) is added along with benzoyl peroxide (0.005 g). The solution is refluxed for one hour and allowed to cool to room temperature. The succinimide is removed by filtration and the bromomethyl cresol red is crystallized from acetic acid.

To a solution of dimethylformamide (25 ml) containing the bromoethyl cresol red derivative (0.025 g) is added a tenfold molar excess of allylamine. The reaction mixture is heated with stirring at 50°C under argon in the dark for six hours. The reaction mixture is then cooled to room temperature and the solvent removed under high vacuum.

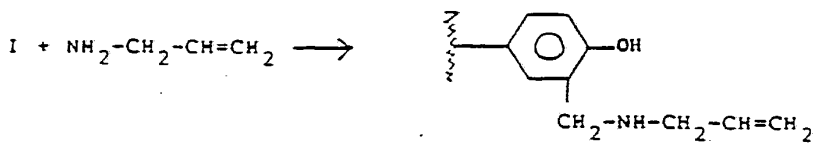
The reaction product of the bromomethyl cresol red and allylamine is dissolved in DMF (50 ml) together with 1 g of acrylamide and 10mg 2,2'-azobisisobutyronitrile. Into this solution is placed aminoalkyl glass, in the form of a fiber tip, which has been previously treated with a mixture of acryloyl chloride (0.10 g), pyridine (20 ml), and N,-N'-dimethylamino pyridine (0.010 g) for two hours. The resulting amidated fiber is heated with the bromomethyl cresol red allylamine product and acrylamide is formed at the end of the fiber.

A simplified reaction scheme is as follows:

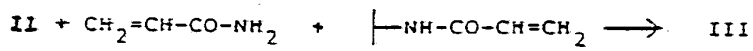




I



II



In II, the remainder of the molecule is as in I. III is the glass fiber to which a copolymer of acrylamide and II is covalently attached.

It will be apparent that a new and useful method of making optical fibers having enhanced capacity for fluorescence, etc., and new and useful optical fibers having such enhanced properties have been provided.

Example 15
Preparation and Use
of a Fluorescent Polycarbonamide

The cleaved end of a silica core step index, glass-on-glass optical fiber, was treated with a 10% solution of aminopropyltriethoxysilane in toluene overnight at 100°C. The well-rinsed fiber was inserted through a condenser attached to a flask charged with diaminodecane (137 mg), sebacoyl chloride (190 mg), perylene-3,9-dicarboxylic acid chloride (3 mg), triethylamine (107 mg) and chloroform (100 ml). The solution was refluxed, and a fluorescent polymer was

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4941

allowed to form and grow from the end of the fiber. After one hour, the fiber was removed and rinsed.

When properly filtered blue light was launched into the fiber, fluorescent green light could be collected (after it had traveled back along the optical fiber) by use of a dichroic mirror and appropriate optical filter. The intensity of the green light was inversely related to the amount of oxygen in the environment surrounding the polymer tip. This was observed when the polymer tip was in a gaseous or aqueous environment.

Example 16

Preparation of a Fluorescent Silicone

A sample of the diallyl ester of perylene-3,9-dicarboxylic acid (3 mg) was mixed with a 1 ml sample of a methylhydrodimethyl siloxane copolymer, and a small amount of platinum catalyst was added. Upon heating, a homogeneous fluorescent green or yellow material was formed. The intensity of the fluorescence emission of this material varies with the oxygen content of its environment. The material may be mounted at the end of a fiber by a mechanical means such as a capillary, and the fiber can then be used as an optrode.

For example, a piece of 240 μ ID Celgard™ hollow porous fiber was slipped over the end of a 140 μ plastic-clad silica optical fiber. A sample of the partially cured polymer was then wicked into the hollow fiber. The fiber was then heated while the polymer cured to form a solid material. The fluorescence emission from this tip, when monitored as described in Example 1, was inversely related to the oxygen concentration of its environment. This was observed in both gaseous and aqueous environments, including canine

blood. This behavior could still be observed when the optical fiber had been subjected to steam sterilization.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4943

WE CLAIM:

1. A fiber optic sensing device for measuring a chemical or physiological parameter of a body fluid or tissue, comprising an optical fiber to one end of which is attached a polymer including a plurality of photoactive moieties selected from the group consisting of chromophores and lumophores, the photoactive moieties spaced apart from each other at a distance sufficient to minimize chemical or physical interaction therebetween while optimizing the density thereof.

2. The device of claim 1, wherein the polymer is covalently bound to the fiber.

3. The device of claim 2, wherein the polymer is covalently bound to the fiber through an aminoalkyl linking group.

4. The device of claim 1, wherein the polymer is ionically bound to the fiber.

5. The method of claim 1, wherein the polymer is attached to the fiber by adsorption.

6. The device of claim 1, wherein the polymer is selected from the group consisting of polyacrylamides, polylysines, polymethacrylates, polyurethanes, polyethers, polysiloxanes and mixtures thereof.

7. The device of claim 1, wherein the distance between the photoactive moieties is such that

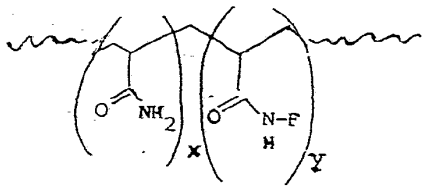
concentration quenching or exciton interaction is substantially prevented.

8. The device of claim 1, wherein a plurality of polymer chains are attached to the fiber, and wherein the chains are spaced apart so that the distance between active moieties on different chains is greater than about 4 angstroms.

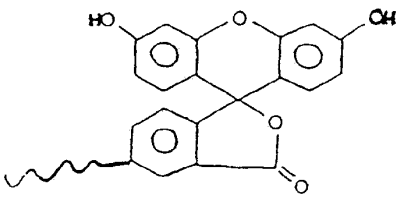
9. The device of claim 1, wherein the polymer is an inherently fluorescent polymer.

10. An inherently fluorescent polymer including a plurality of photoactive moieties selected from the group consisting of chromophores, lumophores and combinations thereof, the photoactive moieties spaced apart from each other at a distance sufficient to minimize chemical or physical interaction therebetween while optimizing the density thereof.

11. A polymer having the structure



where x represents the number of nonfluorescent monomer units, y represents the number of fluorescent monomer units, and F represents a fluorophore moiety having the structure



Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4946

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US88/00041

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) [3]

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

IPC(4): G01N 21/00
U.S. Cl. 422/68; 252/301.35

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched [4]

Classification System [5]	Classification Symbols
US	128/633-667; 422/68; 252/301.32, 301.35, 408.1; 250/461.1; 436/172.

Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched [6]

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT [14]

Category * [15]	Citation of Document, [16] with indication, where appropriate, of the relevant passages [17]	Relevant to Claim No. [18]
Y	US, A, 3,612,866 (STEVENS), 17 OCT. 1971, See entire document.	1-10
Y	US, A, 4,200,110 (PETERSEN et al.), 29 APRIL 1980, See entire document.	1-10
Y	US, A, 4,577,109 (HIRSCHFIELD) 18 MARCH 1986, See entire document.	1-10
A	US, A, 4,018,884 (CLEELAND et al.), 19 APRIL 1977, See entire document.	11

* Special categories of cited documents: [15]

"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

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search [2]	Date of Mailing of this International Search Report [2]
23 MAY 1988	17 JUN 1988
International Searching Authority [1]	**Signature of Authorized Officer** [20]
ISA/US	T.J. WALLEN

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (October 1981)

PCT WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 5 : C07H 21/00, C07K 1/04, 1/06 C07K 5/10, 7/06, C12N 15/10 C12N 15/11	A1	**(11) International Publication Number:** WO 93/06121 **(43) International Publication Date:** 1 April 1993 (01.04.93)

(21) International Application Number: PCT/US92/07815

(22) International Filing Date: 16 September 1992 (16.09.92)

(30) Priority data:
762,522 18 September 1991 (18.09.91) US

(60) Parent Application or Grant
(63) Related by Continuation
US 07/762,522 (CIP)
Filed on 18 September 1991 (18.09.91)

(71) Applicant *(for all designated States except US):* AFFYMAX TECHNOLOGIES N.V. [NL/NL]; De Ruyderkade 62, Curaco (NL).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only) :* DOWER, William, J. [US/US]; 761 Partridge Avenue, Menlo Park, CA 94025 (US). BARRETT, Ronald, W. [US/US]; 562 Carlisle Way, Sunnyvale, CA 94087 (US). GALLOP, Mark, A. [NZ/US]; 1735 Woodland Avenue, #9, East Palo Alto, CA 94303 (US).

(74) Agents: SMITH, William, M.et al.; Townsend and Townsend, One Market Plaza, 20th Floor, Steuart Tower, San Francisco, CA 94105 (US).

(81) Designated States: AU, CA, JP, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE).

Published
With international search report.

(54) Title: METHOD OF SYNTHESIZING DIVERSE COLLECTIONS OF OLIGOMERS

(57) Abstract

A general stochastic method for synthesizing random oligomers can be used to synthesize compounds to screen for desired properties. The use of identification tags on the oligomers facilitates identification of oligomers with desired properties.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4948

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	FI	Finland	MN	Mongolia
AU	Australia	FR	France	MR	Mauritania
BB	Barbados	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgium	GB	United Kingdom	NL	Netherlands
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norway
BG	Bulgaria	GR	Greece	NZ	New Zealand
BJ	Benin	HU	Hungary	PL	Poland
BR	Brazil	IE	Ireland	PT	Portugal
CA	Canada	IT	Italy	RO	Romania
CF	Central African Republic	JP	Japan	RU	Russian Federation
CG	Congo	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CH	Switzerland	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovak Republic
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	SU	Soviet Union
CZ	Czech Republic	MC	Monaco	TD	Chad
DE	Germany	MG	Madagascar	TG	Togo
DK	Denmark	ML	Mali	UA	Ukraine
ES	Spain			US	United States of America

METHOD OF SYNTHESIZING DIVERSE COLLECTIONS OF OLIGOMERS

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates generally to stochastic methods for synthesizing random oligomers, with particular emphasis on particle-based synthesis methods. The invention also relates to the use of identification tags on the particles to facilitate identification of the oligomer sequence synthesized. Yet another aspect of the invention relates to the use of tagged oligomer libraries in receptor-binding studies.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The relationship between structure and activity of molecules is a fundamental issue in the study of biological systems. Structure-activity relationships are important in understanding, for example, the function of enzymes, the ways in which cells communicate with each other, and cellular control and feedback systems. Certain macromolecules are known to interact and bind to other molecules having a very specific three-dimensional spatial and electronic distribution. Any large molecule having such specificity can be considered a receptor, whether the molecule is an enzyme catalyzing hydrolysis of a metabolic intermediate, a cell-surface protein mediating membrane transport of ions, a glycoprotein serving to identify a particular cell to its neighbors, an IgG-class antibody circulating in the plasma, an oligonucleotide sequence of DNA in the genome, or the like. The various molecules that receptors selectively bind are known as ligands.

Many assays are available for measuring the binding affinity of known receptors and ligands, but the information that can be gained from such experiments is often limited by the number and type of available ligands. Novel ligands are sometimes discovered by chance or by application of new techniques for the elucidation of molecular structure, including x-ray crystallographic analysis and recombinant genetic techniques for proteins.

Small peptides are an exemplary system for exploring the relationship between structure and function in biology. A peptide is a polymer composed of amino acid monomers. When the twenty naturally occurring amino acids are condensed into polymeric molecules, the resulting polymers form a wide variety of three-dimensional configurations, each resulting from a particular amino acid sequence and solvent condition. The number of possible pentapeptides of the 20

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4950

naturally occurring amino acids, for example, is 20^5 or 3.2 million different peptides. The likelihood that molecules of this size might be useful in receptor-binding studies is supported by epitope analysis studies showing that some antibodies recognize sequences as short as a few amino acids with high specificity. Furthermore, the average molecular weight of amino acids puts small peptides in the size range of many currently useful pharmaceutical products. Of course, larger peptides may be necessary for many purposes, and polypeptides having changes in only a small number of residues may also be useful for such purposes as the analysis of structure-activity relationships.

Pharmaceutical drug discovery is one type of research that relies on studies of structure-activity relationships. In most cases, contemporary pharmaceutical research can be described as the process of discovering novel ligands with desirable patterns of specificity for biologically important receptors. Another example is research to discover new compounds for use in agriculture, such as pesticides and herbicides.

Prior methods of preparing large numbers of different oligomers have been painstakingly slow when used at a scale sufficient to permit effective rational or random screening. For example, the "Merrifield" method (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154 (1963), which is incorporated herein by reference) has been used to synthesize peptides on a solid support. In the Merrifield method, an amino acid is covalently bonded to a support made of an insoluble polymer. Another amino acid with an alpha protected group is reacted with the covalently bonded amino acid to form a dipeptide. The protective group is removed, and a third amino acid with an alpha protective group is added to the dipeptide. This process is continued until a peptide of a desired length and sequence is obtained. Using the Merrifield method, one cannot economically and practically synthesize more than a few peptide sequences in a day.

To synthesize larger numbers of oligomer sequences, others have proposed the use of a series of reaction vessels for oligomer synthesis. For example, a tubular reactor system may be used to synthesize a linear oligomer on a solid phase support by automated sequential addition of reagents. This method still does not enable the synthesis of a sufficiently large number of oligomer sequences for effective economical screening.

Methods of preparing a plurality of oligomer sequences are also known in which a foraminous container encloses a known quantity of reactive solid

supports, the solid supports being larger in size than openings of the container. See U.S. Patent No. 4,631,211, incorporated herein by reference. The containers may be selectively reacted with desired materials to synthesize desired sequences of product molecules. As with other methods known in the art, this method cannot practically be used to synthesize a sufficient variety of polypeptides for effective screening.

Other techniques have also been described. One bead-based method is described in PCT patent publication No. 92/00091, incorporated herein by reference. These methods include the synthesis of peptides on 96 plastic pins that fit the format of standard microtiter plates. See PCT patent publications 84/03564; 86/00991; and 86/06487, each of which is incorporated herein by reference. Unfortunately, while these techniques have been somewhat useful, substantial problems remain. For example, these methods continue to be limited in the diversity of sequences which can be economically synthesized and screened.

Others have developed recombinant methods for preparing collections of oligomers. See PCT patent publication Nos. 91/17271 and 91/19818, each of which is incorporated herein by reference. In another important development, scientists combined the techniques of photolithography, chemistry, and biology to create large collections of oligomers and other compounds on the surface of a substrate. See U.S. Patent No. 5,143,854 and PCT patent publication Nos. 90/15070 and 92/10092, each of which is incorporated herin by reference.

In the recombinant and VLSIPS™ combinatorial methods, one can uniquely identify each oligomer in the library by determining the coding sequences in the recombinant organism or phage or by the location of the oligomer on the VLSIPS™ chip. In other methods, however, the identity of a particular oligomer may be difficult to ascertain. What is needed in these latter methods is an efficient and simple-to-use method for tagging each particle. Although tagging methods have been developed for large objects, see PCT patent publication Nos. 90/14441 and 87/06383, each of which is incorporated herein by reference, such methods are still needed for combinatorial libraries of oligomers.

From the above, one can recognize that improved methods and apparatus for synthesizing a diverse collection of chemical sequences would be beneficial.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a general stochastic method for

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4952

synthesizing libraries of random oligomers. The random oligomers are synthesized on solid supports, or particles, but may be cleaved from these supports to provide a soluble library. The oligomers are composed of a sequence of monomers, the monomers being any member of the set of molecules that can be joined together to form an oligomer or polymer, i.e., amino acids, carbamates, sulfones, sulfoxides, nucleosides, carbohydrates, ureas, phosphonates, lipids, esters, combinations of the same, and the like. The library is then screened to isolate individual oligomers that bind to a receptor or possess some desired property. Each oligomer sequence in the library is unique, in a preferred embodiment. In another preferred embodiment, the solid supports are nonporous beads. The solid supports may be composed of a single particle, or two or more linked particles.

A further embodiment of the invention relates to the use of an identifier tag to identify the sequence of monomers in the oligomer. The identifier tag, which may be attached directly to the oligomer with or without an accompanying particle, to a linker attached to the oligomer, to the solid support upon which the oligomer is synthesized, or to a second particle attached to the oligomer-carrying particle, may be any recognizable feature that in some way carries the required information, and that is decipherable at the level of one or a few solid supports. The solid supports may be joined to the oligomers and the identifier tag by means of one or more linker molecules.

In a preferred embodiment, the identifier tag will be an oligonucleotide, preferably composed of pyrimidines or pyrimidines and purine analogs or any type of nucleoside that will not degrade under the coupling conditions used to assemble the oligomer library. The oligonucleotide identifier tag may contain a 5' and a 3' amplification site, to allow amplification of the tag by, for example, the polymerase chain reaction (see U.S. Patent Nos. 4,683,202; and 4,965,188, each of which is incorporated herein by reference). A DNA sequencing primer site, which may be specific for each step of the oligomer synthesis, may also be included in the oligonucleotide tag in addition to the amplification primer sites. The tag may be designed to include, in the oligonucleotide sequence, information allowing identification of the monomer associated with the addition of the particular tag. The oligonucleotide tag will be about 50 to 100 nucleotides in length, in a preferred embodiment.

In another preferred embodiment, the identifier tag may be composed of a set of light-addressable compounds, such as fluorescent or phosphorescent

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4953

compounds that can be photobleached, which compounds are incorporated into the beads or particles on which the oligomers of the oligomer library are synthesized. Such compounds are widely known in the art.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Fig. 1 is a schematic representation of combinatorial oligomer synthesis on particles.

Fig. 2 is a schematic representation of concurrent combinatorial oligomer synthesis and particle tagging.

Fig. 3 describes one method of bead functionalization, the compatible chemistries for peptide synthesis and round by round attachment of oligonucleotide identifier tags, including synthesis of amino-functionalized beads, the structure of protected 5' maleimidyl oligonucleotides, amino acid coupling and introduction of a thiol "handle," step-specific oligonucleotide attachment to a bead, subsequent amino acid coupling(s) and oligonucleotide attachment(s), and peptide and oligonucleotide deprotection.

Fig. 4 is a schematic representation of one example of an oligonucleotide tag.

Fig. 5 illustrates nucleoside phosphoramidites derivatized with photolabile protecting groups for parallel peptide/oligonucleotide synthesis.

Fig. 6 illustrates 5'-DMT-3'-(O-allyl N,N'-diisopropyl phosphoramidite) nucleoside derivatives for parallel peptide/oligonucleotide synthesis.

Fig. 7 illustrates the preparation of a bifunctional bead material for parallel synthesis of peptides and oligonucleotides.

Fig. 8 illustrates the parallel assembly of oligonucleotide-tagged peptides on beads.

Fig. 9 shows a schematic representation of the experiment described in Example 5, in which two populations of oligomers on beads are prepared, tagged, mixed, sorted, and identified by the method of the present invention.

Fig. 10 shows resolution of the two populations of beads by FACS in the experiment described in Example 5. Values along the horizontal axis indicate relative fluorescence (log scale). Values along the vertical axis indicate relative numbers of beads. Non-fluorescently labeled beads are represented by peak A. Flourescently labeled beads are represented by peak B. The ratio of the larger peak to the smaller peak is 15:1.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4954

Fig. 11 shows pictures of ethidium bromide stained, UV irradiated agarose gels of PCR products obtained by amplification after FACS of two bead populations and amplification of the tags on the sorted beads, with controls, as described in Example 5. Gel A shows the results with sorted fluorescent beads: lane 1 -- $2.4x10^6$ copies (100 bead equivalents) of 95 mer tag; lanes 2-7 -- PCR product from single fluorescent beads; lanes 8-10 -- PCR product from ten fluorescent beads; lanes 11-13 -- PCR product from one hundred fluorescent beads; and lane 14 -- $1.2x10^6$ copies (100 bead equivalents) of 110 mer tag. Gel B shows the result with sorted non-fluorescent beads: lane 1 -- $1.2x10^6$ copies of 110 mer tag; lanes 2-7 -- PCR product from single non-fluorescent beads; lanes 8-10 -- PCR product from ten non-fluorescent beads; lanes 11-13 -- PCR product from one hundred non-fluorescent beads; and lane 14 -- $2.4x10^6$ copies of 95 mer tag. Gel C shows the results with the control reactions: lanes 1,12 -- DNA size standards; lanes 2, 3 -- no tag control reactions; lanes 4, 5 -- 1 bead equivalent of soluble 95 mer tag; lanes 6, 7 -- 10 bead equivalents of soluble 95 mer tag; lanes 8, 9 -- 1 bead equivalent of soluble 110 mer tag; and lanes 10, 11 -- 10 bead equivalents of soluble 110 mer tag.

DESCRIPTION OF THE SPECIFIC EMBODIMENTS

The present invention provides novel methods and instruments for producing large synthetic oligomer libraries. In a preferred embodiment of the present invention, each member of such a library is uniquely labeled in a manner that specifies the identity of the sequence of the oligomer corresponding to that member. Methods for screening such libraries and reagents useful for producing the libraries are also provided.

Glossary

The following terms are intended to have the following general meanings as they are used herein:

Complementary or substantially complementary: These terms refer to base pairing between nucleotides or nucleic acids, such as, for instance, between the two strands of a double stranded DNA molecule or between an oligonucleotide primer and a primer binding site on a single stranded nucleic acid to be sequenced or amplified. "Complementary" nucleotides are, generally, A and T (or A and U), and C and G, as is well known to those of skill in the art. Two single stranded RNA or DNA molecules are said to be "substantially complementary" when the nucleotides of one

strand, optimally aligned, pair with at least about 80% or more of the nucleotides of the other strand.

Alternatively, substantial complementarity exists when an RNA or DNA strand will hybridize under selective hybridization conditions to a complementary nucleic acid. Typically, selective hybridization will occur when there is at least about 55% complementarity over a stretch of at least 14 to 25 nucleotides, but more selective hybridization will occur as complementarity increases to 65%, 75%, 90%, and 100%. See Kanehisa, Nucleic Acids Res. 12:203 (1984), incorporated herein by reference.

Stringent hybridization conditions will typically include salt concentrations of less than about 1 M, such as less than 500 mM, and will often include salt concentrations of less than 200 mM. The hybridization temperature for oligomers will typically be greater than 22°C, such as greater than about 30°C, and will often be in excess of about 37°C. Longer fragments may require higher hybridization temperatures for specific hybridization. As other factors may dramatically affect the stringency of hybridization (such factors include base composition, length of the complementary strands, presence of organic solvents, and extent of base mismatching), the combination of factors is more important than the absolute measure of any one factor alone.

Epitope: The portion of an antigen molecule delineated by the area of interaction with the subclass of receptors known as antibodies is an "epitope."

Identifier tag: An "identifier tag" is a physical attribute that provides a means whereby one can identify which monomer reactions an individual solid support has experienced in the synthesis of an oligomer. The identifier tag also records the step in the synthesis series in which the solid support visited that monomer reaction. The identifier tag may be any recognizable feature, including for example: a microscopically distinguishable shape, size, color, optical density, etc.; a differential absorbance or emission of light; chemically reactivity; magnetic or electronic encoded information; or any other distinctive mark with the required information, and decipherable at the level of one (or a few) solid support(s). A preferred example of such an identifier tag is an oligonucleotide sequence. An "identifier tag" can be coupled directly to the oligomer synthesized, whether or not a solid support is used in the synthesis. In this latter embodiment, the identifier tag serves as the "support" for oligomer synthesis.

Ligand: A "ligand" is a molecule that is recognized by a particular receptor. The agent bound by or reacting with a receptor is called a "ligand", a term

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4956

which is definitionally meaningful only in terms of its counterpart receptor. The term "ligand" does not imply any particular molecular size or other structural or compositional feature other than that the substance in question is capable of binding or otherwise interacting with the receptor. Also, a "ligand" may serve either as the natural ligand to which the receptor binds, or as a functional analogue that may act as an agonist or antagonist. Ligands that can be investigated by this invention include, but are not restricted to, agonists and antagonists for cell membrane receptors, toxins and venoms, viral epitopes, hormones, sugars, cofactors, peptides, enzyme substrates, cofactors, drugs (e.g., opiates, steroids, etc.), and proteins.

Monomer: A "monomer" is any member of the set of molecules which can be joined together to form an oligomer or polymer. The set of monomers useful in the present invention includes, but is not restricted to, for the example of peptide synthesis, the set of L-amino acids, D-amino acids, or synthetic amino acids. As used herein, "monomer" refers to any member of a basis set for synthesis of an oligomer. For example, dimers of L-amino acids form a basis set of 400 "monomers" for synthesis of polypeptides. Different basis sets of monomers may be used at successive steps in the synthesis of a polymer.

Oligomer or Polymer: The "oligomer" or "polymer" sequences of the present invention are formed from the chemical or enzymatic addition of monomer subunits. Such oligomers include, for example, both linear, cyclic, and branched polymers of nucleic acids, polysaccharides, phospholipids, and peptides having either alpha-, beta-, or omega-amino acids, heteropolymers, polyurethanes, polyesters, polycarbonates, polyureas, polyamides, polyethyleneimines, polyarylene sulfides, polysiloxanes, polyimides, polyacetates, or other polymers, as will be readily apparent to one skilled in the art upon review of this disclosure.

Peptide: A "peptide" is an oligomer in which the monomers are alpha amino acids joined together through amide bonds. Alternatively, a "peptide" can be referred to as a "polypeptide." In the context of this specification, one should appreciate that the amino acids may be the L-optical isomer or the D-optical isomer. Peptides are more than two amino acid monomers long, but more often are more than 5 to 10 amino acid monomers long and can be even longer than 20 amino acids, although peptides longer than 20 amino acids are more likely to be called "polypeptides." Standard single letter abbreviations for amino acids are used (e.g., P for proline). These abbreviations are included in Stryer, Biochemistry, Third Ed. (1988), which is incorporated herein by reference.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4957

Oligonucleotides: An "oligonucleotide" is a single-stranded DNA or RNA molecule, typically prepared by synthetic means. Those oligonucleotides employed in the present invention will usually be 50 to 150 nucleotides in length, preferably from 80 to 120 nucleotides, although oligonucleotides of different length may be appropriate in some circumstances. For instance, in one embodiment of the invention, the oligonucleotide tag and the polymer identified by that tag are synthesized in parallel. In this embodiment, the oligonucleotide tag can be built nucleotide-by-nucleotide in coordination with the monomer-by-monomer addition steps used to synthesize the oligomer. In addition, very short, i.e., 2 to 10 nucleotides, oligonucleotides may be used to extend an existing oligonucleotide tag to identify a monomer coupling step. Suitable oligonucleotides may be prepared by the phosphoramidite method described by Beaucage and Carruthers, Tetr. Lett. 22:1859-1862 (1981), or by the triester method, according to Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc. 103:3185 (1981), both incorporated herein by reference, or by other methods such as by using commercial automated oligonucleotide synthesizers.

Operably linked: A nucleic acid is "operably linked" when placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For instance, a promoter or enhancer is "operably linked" to a coding sequence if the promoter causes the transcription of the sequence. Generally, operably linked means that the DNA sequences being linked are contiguous and, where necessary to join two protein coding regions, contiguous and in reading frame.

Receptor: A "receptor" is a molecule that has an affinity for a given ligand. Receptors may be naturally-occurring or manmade molecules. Also, receptors can be employed in their unaltered natural or isolated state or as aggregates with other species. Receptors may be attached, covalently or noncovalently, to a binding member, either directly or via a specific binding substance. Examples of receptors that can be employed in the method of the present invention include, but are not restricted to, antibodies, cell membrane receptors, monoclonal antibodies, antisera reactive with specific antigenic determinants (such as on viruses, cells, or other materials), polynucleotides, nucleic acids, lectins, polysaccharides, cells, cellular membranes, and organelles. Receptors are sometimes referred to in the art as "anti-ligands." As the term "receptor" is used herein, no difference in meaning is intended. A "ligand-receptor pair" is formed when two macromolecules have combined through molecular recognition to form a complex.

Other examples of receptors that can be investigated by this invention

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4958

include, but are not restricted to:

Microorganism receptors: Determination of ligands that bind to microorganism receptors, such as specific transport proteins or enzymes essential to survival of microorganisms, is useful in discovering new classes or types of antibiotics. Of particular value would be antibiotics against opportunistic fungi, protozoa, and those bacteria resistant to the antibiotics in current use.

Enzymes: For instance, the binding site of any enzyme, such as the enzymes responsible for cleaving neurotransmitters, is a receptor. Determination of ligands that bind to certain enzymes, and thus modulate the action of the enzymes that cleave the different neurotransmitters, is useful in the development of drugs that can be used in the treatment of disorders of neurotransmission.

Antibodies: For instance, the invention may be useful in investigating the ligand-binding site on an antibody molecule that combines with the epitope of an antigen of interest. Determining a sequence that mimics an antigenic epitope may lead to the development of vaccines or lead to the development of related diagnostic agents or compounds useful in therapeutic treatments such as for autoimmune diseases (e.g., by blocking the binding of the "self" antibodies).

Nucleic Acids: The invention may be useful in investigating sequences of nucleic acids acting as binding sites for cellular proteins ("trans-acting factors"). Such sequences may include, e.g., enhancers or promoter sequences.

Catalytic Polypeptides: Polymers, preferably polypeptides, which are capable of promoting a chemical reaction involving the conversion of one or more reactants to one or more products are "catalytic polypeptides." Such polypeptides generally include a binding site specific for at least one reactant or reaction intermediate and an active functionality proximate to the binding site, which functionality is capable of chemically modifying the bound reactant. Catalytic polypeptides are described in, Lerner et al., Science 252: 659 (1991), which is incorporated herein by reference.

Hormone receptors: For instance, "hormone receptors" include the receptors for insulin and growth hormone. Determination of the ligands which bind with high affinity to a hormone receptor is useful in the development of, for example, an oral replacement of the daily injections which diabetics must take to relieve the symptoms of diabetes, and in the other case, a replacement for human growth hormone, which can only be obtained from cadavers or by recombinant DNA technology. Other examples include the vasoconstrictive hormone receptors;

determination of ligands that bind to those receptors may lead to the development of drugs to control blood pressure.

Opiate receptors: Determination of ligands that bind to the opiate receptors in the brain is useful in the development of less-addictive replacements for morphine and related drugs.

Substrate or Solid Support: A "substrate or solid support" is a material having a rigid or semi-rigid surface. Such materials will preferably take the form of small beads, pellets, disks, or other convenient forms, although other forms may be used. In some embodiments, at least one surface of the substrate will be substantially flat. A roughly spherical shape is preferred.

Synthetic: A compound is "synthetic" when produced by in vitro chemical or enzymatic synthesis. The synthetic libraries of the present invention may be contrasted with those in viral or plasmid vectors, for instance, which may be propagated in bacterial, yeast, or other living hosts.

I. Method for Producing Large Synthetic Oligomer Libraries

A general method of random oligomer synthesis is provided by the present invention. The method can be used to produce the enormous numbers of compounds available with recombinant systems and to utilize the monomer set diversity available with chemical synthesis methods. By means of the present method, one can readily produce up to 10^{12} different oligomers, a dramatic improvement over previous methods. The invention also provides a facile means of oligomer identification.

The general method comprises producing a large, highly diverse collection or library, each member of such a library comprising a single oligomer sequence (e.g., a peptide). The sequence may be soluble or may be bound to a solid support. When bound to a solid support, the oligomer is usually attached by means of a linker. The linker, prior to attachment, has an appropriate functional group at each end, one group appropriate for attachment to the support and the other group appropriate for attachment to the oligomer. Such a collection may contain, for example, all combinations of n monomers assembled into X length oligomers yielding, n^X different compounds. The collection may also contain oligomers having different monomer units at, for example, only one or a small number of positions, while having an identical sequence at all other positions. The general method typically involves synthesizing the oligomers in a random combinatorial

("stochastic") fashion by chemical and/or enzymatic assembly of monomer units.

A synthetic oligomer library may be produced by synthesizing on each of a plurality of solid supports a single oligomer sequence, the oligomer sequence being different for different solid supports. The oligomer sequence is synthesized in a process comprising the steps of: (a) apportioning the supports in a stochastic manner among a plurality of reaction vessels; (b) exposing the supports in each reaction vessel to a first monomer; (c) pooling the supports; (d) apportioning the supports in a stochastic manner among the plurality of reaction vessels; (e) exposing the supports in each reaction vessel to a second monomer; and (f) repeating steps (a) through (e) from at least one to twenty times. Typically, substantially equal numbers of solid supports will be apportioned to each reaction vessel. In one embodiment of the method, the monomers are chosen from the set of amino acids, and the resulting oligomer is a peptide.

As a specific example of the method, one may consider the synthesis of peptides three residues in length, assembled from a monomer set of three different monomers: A, B, and C. The first monomer is coupled to three different aliquots of beads, each different monomer in a different aliquot, and the beads from all the reactions are then pooled (see Fig. 1). The pool now contains approximately equal numbers of three different types solid supports, with each type characterized by the monomer in the first residue position. The pool is mixed and redistributed to the separate monomer reaction tubes or vessels containing A, B, or C as the monomer. The second residue is coupled.

Following this reaction, each tube now has beads with three different monomers in position one and the monomer contained in each particular second reaction tube in position 2. All reactions are pooled again, producing a mixture of beads each bearing one of the nine possible dimers. The pool is again distributed among the three reaction vessels, coupled, and pooled. This process of sequential synthesis and mixing yields beads that have passed through all the possible reaction pathways, and the collection of beads displays all trimers of three amino acids (3^3 = 27). Thus, a complete set of the trimers of A, B, and C is constructed. As can be readily appreciated, the use of a sufficiently large number of synthesis beads helps to ensure that the set completely represents the various combinations of monomers employed in this random, combinatorial synthesis scheme.

This method of assembling oligomers from many types of monomers requires using the appropriate coupling chemistry for a given set of monomer units

or building blocks. Any set of building blocks that can be attached to one another in a step-by-step fashion can serve as the monomer set. The attachment may be mediated by chemical, enzymatic, or other means, or by a combination of any of these means. The resulting oligomers can be linear, cyclic, branched, or assume various other conformations as will be apparent to those skilled in the art. Techniques for solid state synthesis of polypeptides are described, for example, in Merrifield, supra. Peptide coupling chemistry is also described in The Peptides, Vol. 1 (eds. Gross, E., and J. Meienhofer, Academic Press, Orlando (1979)), which is incorporated herein by reference.

To synthesize the oligomers, a collection of a large number of the solid supports is apportioned among a number of reaction vessels. In each reaction, a different monomer is coupled to the growing oligomer chain. The monomers may be of any type that can be appropriately activated for chemical coupling or accepted for enzymatic coupling. Because the reactions may be contained in separate reaction vessels, even monomers with different coupling chemistries can be used to assemble the oligomers (see The Peptides, supra). The coupling time for some of the monomer sets may be long. For this reason, the preferred arrangement is one in which the monomer reactions are carried out in parallel. After each coupling step, the solid supports on which are synthesized the oligomers of the library are pooled and mixed prior to re-allocation to the individual vessels for the next coupling step. This shuffling process produces solid supports with many oligomer sequence combinations. If each synthesis step has high coupling efficiency, then substantially all the oligomers on a single solid support have the same sequence. That sequence is determined by the synthesis pathway (type and sequence of monomer reactions) for any given solid support at the end of the synthesis. The maximum length of the oligomers is typically less than about 20, usually from 3 to 8 residues in length, but in some cases a length of 10 to 12 residues is preferred. Protective groups known to those skilled in the art may be used to prevent spurious coupling (see The Peptides, Vol. 3 (eds. Gross, E., and J. Meienhofer, Academic Press, Orlando (1981), which is incorporated herein by reference).

Modifications of this completely random approach are also possible. For example, the monomer set may be expanded or contracted from step to step; or the monomer set could be changed completely for the next step (e.g., amino acids in one step, nucleosides in another step, carbohydrates in another step), if the coupling chemistry were available (see Gait, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach,

IRL Press, Oxford (1984); Friesen and Danishefsky, J. Amer. Chem. Soc. 111:6656 (1989); and Paulsen, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 25:212 (1986), all of which are incorporated herein by reference). A monomer unit for peptide synthesis, for example, may include single amino acids or larger peptide units, or both. One variation is to form several pools of various sequences on solid supports to be distributed among different monomer sets at certain steps of the synthesis. By this approach, one can also build oligomers of different lengths with either related or unrelated sequences, and one can fix certain monomer residues at some positions while varying the other residues, to construct oligomer frameworks wherein certain residues or regions are altered to provide diversity.

The chemical or enzymatic synthesis of the oligomer libraries of the present invention typically takes place on solid supports. The term "solid support" as used herein embraces a particle with appropriate sites for oligomer synthesis and, in some embodiments, tag attachment and/or synthesis. There are various solid supports useful in preparation of the synthetic oligomer libraries of the present invention. Solid supports are commonly used for solid phase synthesis of, for example, peptides and nucleic acids and other oligomers as enumerated above, and thus are well known to those skilled in the art.

With enough solid supports and efficient coupling, one can generate complete sets of certain oligomers, if desired. In general, the solid support size is in the range of 1 nm to 100 μm, but a more massive solid support of up to 1 mm in size may be used. The appropriate size of the solid support depends on (1) the number of oligomer synthesis sites and identifier tag attachment sites desired; (2) the number of different compounds to be synthesized (and the number of solid supports bearing each oligomer that are needed for screening); and (3) the effect of the size of the solid supports on the specific screening strategies [e.g., fluorescence-activated cell sorters (FACS)] to be used.

As a specific example, solid supports of 1 μm in diameter may be used. If each reaction contains approximately 0.2 mL of solid supports, and the oligomers are synthesized from a set of 50 monomers (50 parallel reactions), then a total of 10 mL of solid supports, or approximately 10^{13} solid supports, would be required. If one wishes to make hexamers with these 50 monomers, then there are over 1.5×10^{10} possible sequences, and each specific sequence would be represented on about 10^3 solid supports. An estimated capacity of each bead, based on the capacity of commonly used peptide synthesizing resins, is about 0.1 pg of peptide per bead. By this estimation,

then, each solid support would have about 100 amol or 10^8 oligomer chains.

To improve washing efficiencies, solid supports less porous than typical peptide synthesis resins are preferable. These supports will have a lower density of growing chains, but even with a decrease in capacity of several orders of magnitude, sufficient oligomer densities can be produced for efficient screening. With the less porous supports, a greater proportion of the oligomers will be accessible for binding to the receptor during the screening process. Also, the less porous supports will reduce the carryover of tags from one reaction to the next, thus improving the accuracy of reading the dominant (correct) tags.

Such solid supports may be of any shape, although they will preferably be roughly spherical. The supports need not necessarily be homogenous in size, shape, or composition; although the supports usually and preferably will be uniform. In some embodiments, supports that are very uniform in size may be particularly preferred. In another embodiment, however, two or more distinctly different populations of solid supports may be used for certain purposes.

Solid supports may consist of many materials, limited primarily by capacity for derivatization to attach any of a number of chemically reactive groups and compatibility with the chemistry of oligomer synthesis and tag attachment. Suitable support materials include glass, latex, heavily cross-linked polystyrene or similar polymers, gold or other colloidal metal particles, and other materials known to those skilled in the art. Except as otherwise noted, the chemically reactive groups with which such solid supports may be derivatized are those commonly used for solid state synthesis of the respective oligomer and thus will be well known to those skilled in the art. The solid supports of the present invention do not include living cells, viruses, or cloning vectors such as phage vectors or plasmids.

II. Method for Producing Tagged Synthetic Oligomer Libraries

In a preferred embodiment of the invention, the oligomers comprising the library also are attached to an identifier tag that can be easily decoded to report the sequence of each oligomer. The identifier tags may be attached either to the oligomer or to the solid support to which the oligomer is attached. The attachment is preferably by means of a linker that, prior to attachment, has an appropriate functional group at each end, one group appropriate for attachment to the support and the other group appropriate for attachment to the identifier tag. Alternatively, the identifier tag may be attached to a monomer incorporated into the oligomer or attached directly to the

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4964

same linker that binds the oligomer to the solid support. In the latter embodiment, the linker has, prior to attachment, a third functional group appropriate for the attachment of the identifier tag.

A synthetic oligomer library that incorporates identifier tags is produced by synthesizing on each of a plurality of solid supports a single oligomer sequence and one or more identifier tags identifying the oligomer sequence. The tagged synthetic oligomer library is synthesized in a process comprising the steps of: (a) apportioning the supports among a plurality of reaction vessels; (b) exposing the supports in each reaction vessel to a first oligomer monomer and to a first identifier tag monomer; (c) pooling the supports; (d) apportioning the supports among a plurality of reaction vessels; and (e) exposing the supports to a second oligomer monomer and to a second identifier tag monomer. As noted above, one can also practice the invention in a mode in which there is no solid support; in this mode, the tag is attached directly to the oligomer being synthesized. The steps of either process typically will be repeated one or more times, but usually, will be repeated less than 20 times.

The solid supports can be exposed to (or coupled with) an oligomer monomer and an identifier tag at the same time, or sequentially. In either event, the supports are then pooled and exposed to the second oligomer monomer and second identifier tag. As before, these steps are repeated, typically from one to about 20 times. The invention is described herein primarily with regard to the preparation of molecules containing sequences of amino acids, but the invention can readily be applied to the preparation of other oligomers and to any set of compounds that can be synthesized in a component-by-component fashion, as can be appreciated by those skilled in the art.

In another embodiment, the same solid support is used for synthesizing all members of the library, but the members are cleaved from the support prior to screening. In this embodiment, synthesis of tagged oligomers may be accomplished utilizing very large scale immobilized polymer synthesis (VLSIPS™) techniques. See U.S. Patent No. 5,143,854 and PCT patent publication No. 92/10092, each of which is incorporated herein by reference. An array of oligonucleotides is synthesized on the VLSIPS™ chip, each oligonucleotide linked to the chip by a cleavable group such as a disulfide. In one embodiment, each oligonucleotide tag has an amine group at the free end and only contains pyrimidine or pyrimidine and purine analog bases. In addition each oligonucleotide contains binding sites for amplification, i.e., PCR primer sites and optionally a sequencing primer site. A short section of each

oligonucleotide uniquely codes the monomer sequence of the oligomer to be tagged. Then, e.g., peptides are synthesized, optionally from the free terminal amine groups on each oligonucleotide, so that each peptide is linked to a tag. The whole collection of oligonucleotide-peptide may be released from the chip to create a soluble tagged oligomer library.

More preferably, however, the oligomer library is constructed on beads or particles. One method of bead functionalization, with compatible chemistries for peptide synthesis and round by round attachment of oligonucleotide identifier tags, is shown in Figs. 3.1-3.6. Glass beads are derivatized using aminopropyltriethoxysilane and a beta-alanine spacer group is coupled using activated ester methodology. The oligonucleotide tags may optionally incorporate a biotin group to facilitate purification, hybridization, amplification, or detection (see Pierce ImmunoTechnology Catalog and Handbook, 1991, incorporated herein by reference). Commercially available Fmoc protected amino acids and standard BOP coupling chemistry is employed for peptide synthesis (see The Peptides, supra). Protected polypyrimidine (e.g., cytidine protected as N^4-Bz-C) and/or purine analog containing oligonucleotides resistant to the coupling and deprotection reagents used in peptide synthesis are attached using maleimide chemistry to unmasked thiol groups incorporated into growing peptide chains at low frequency (i.e., 0.1%) as cysteine residues with masked thiol groups (which masks may be selectively removed prior to tagging). In other embodiments of the invention, one may not need to use protected nucleosides or oligonucleotides.

However, to maintain the integrity of an oligonucleotide tag during peptide synthesis, one may need to use different combinations of protecting groups and/or synthetic nucleotides to avoid degradation of the tag or the oligomer synthesized. In general, polypyrimidine oligonucleotide tags are relatively stable under typical peptide synthesis conditions, as opposed to oligonucleotide tags that contain natural purine nucleotides, but a polypyrimidine nucleotide tag may be somewhat refractory to amplification by PCR. One may need to incorporate purine bases, or analogs tested for ability to withstand peptide coupling (and deprotection) conditions, into the tag to acheive a desired efficiency of amplification. For purposes of the present invention, the tag optionally may contain from 10 to 90%, more preferably 35 to 50%, and most preferably 33 to 35%, purine or purine analog nucleotides. The oligonucleotides optionally may contain phosphate protecting groups (e.g., O-methyl phosphates) with greater base stability than the standard beta-

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4966

cyanoethyl group, which may be susceptible to piperidine cleavage. In such cases, peptide and oligonucleotide deprotection can be effected by sequential treatment with thiophenol, trifluoroacetic acid, and ethanolic ethylenediamine at 55 degrees C.

In another embodiment, photolabile alpha-amino protecting groups are used in conjunction with base-labile side chain protecting groups for the amino acids, and standard beta-cyanoethyl protecting groups are used for the oligonucleotide tags.

In another embodiment, oligonucleotides containing both modified or synthetic purines and pyrimidines may be synthesized in parallel with peptides using conventional Fmoc/^{t}Bu protected amino acids. In this method, one can also use O-allyl and N-allyloxycarbonyl groups to provide protection for phosphate oxygens and the exocyclic amines of the nucleoside bases, respectively (see Hayakawa et al., J. Amer. Chem. Soc. 112: 1691-1696 (1990), incorporated herein by reference). By employing the mild oxidant ^{t}BuOOH for oxidation at the phosphorous, one can minimize oxidation of the amino acids methionine, tryptophan, and histidine (see Hayakawa et al., Tetr. Lett. 27:4191-4194 (1986), incorporated herein by reference). Use of pyridinium hydrochloride/imidazole as a phosphporamidite activator leads to selective 5'-O-phosphitylation at the expense of low levels of spurious reaction at nitrogen on the peptide or oligonucleotide (see Gryaznov and Letsinger, Nucleic Acids Research 20: 1879-1882 (1992) incorporated herein by reference). The lability of purine nucleotides to strong acid (e.g., TFA) is avoided by use of phosphoramidites of the purine nucleoside analogs 7-deaza-2'-deoxyadenosine and 7-deaza-2'-deoxyguanosine (see Barr et al., BioTechniques 4:428-432 (1986), and Scheit, Nucleotide Analogs: Synthesis and Biological Function pp. 64-65 (John Wiley and Sons, New York), both incorporated herein by reference).

The fully assembled peptide and oligonucleotide chains may be deprotected by first treating the products with 30% piperidine in DMF to remove amino-terminal Fmoc groups. Then, the allylic protecting groups are removed using THF containing tris (dibenzylideneacetone) dipalladium-chloroform complex, triphenylphosphine, and n-butylamine/formic acid, followed by a THF wash, an aqueous sodium N,N-diethyldithiocarbamate wash, and a water wash. Finally, the acid-labile amino acid protecting groups are removed by treatment with 95:5 TFA/water.

Other methods also provide effective orthogonal protection during the parallel assembly of oligonucleotides and peptides. These methods include use of acid-labile protecting groups on phosphates and exocyclic amines of deoxycytidine, 7-

deaza-deoxyadenosine, and 7-deaza-deoxyguanosine sufficiently robust to resist the 3% trichloroacetic acid used in 5'-0-detritylation; use of photochemically removable protecting groups on these residues; and combinations of such acid and photolabile groups (for photolabile protecting groups for phosphate, see Baldwin et al., Tetr. Lett. 46: 6879-6884 (1990), incorporated herein by reference; see also figure 5).

III. Identifying the Sequence of any Oligomer

The present invention provides a method for identifying the composition and sequence of any of the oligomers in the library. By tracking the synthesis pathway that each oligomer has taken, one can deduce the sequence of monomers of any oligomer. The method involves linking an identifier tag to the oligomer that indicates the monomer reactions and corresponding step numbers that define each oligomer in the library. After a series of synthesis steps (and concurrent identifier tag additions), one "reads" the identifier tag(s) associated with an oligomer to determine the sequence of that oligomer.

For example, one might attach microscopically recognizable, alphanumeric tags to each bead (see Fig. 2): "A1" means that the bead participated in the A-monomer reaction at step 1, "C2" means that the bead participated in the C-monomer reaction at step 2, and "B3" means B-monomer was added in step 3, and so on. At the end of the 3-step synthesis, the bead would have three tags attached, e.g., A1, C2, and B3, indicating that the sequence of the peptides on the bead is ACB. This scheme requires a number of distinct identifier tags equal to at most the product of the number of different monomers and the number of synthesis steps (nine in this example). The number of identifier tags is reduced if the symbols are attached to one another in the order of the steps: A, A-C, A-C-B. In this case only as many identifier tags are needed as monomers. One builds the identifier tag in much the same way as the peptides, so as to preserve a record of what was monomer was added, and in which addition step.

The identifier tags therefore identify each monomer reaction that an individual library member or solid support has experienced and record the step in the synthesis series in which each monomer is added. The tags may be attached immediately before, during, or after the monomer addition reaction, as convenient and compatible with the type of identifier tag, modes of attachment, and chemistry of oligomer synthesis. The identifier tag is added when the solid supports that have undergone a specific monomer addition step are physically together and so can be

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4968

tagged as a group, i.e., prior to the next pooling step.

In some cases, of course, when only a small number of monomer units of an oligomer are varied, one may need to identify only those monomers which vary among the oligomers, as when one wants to vary only a few amino acids in a peptide. For instance, one might want to change only 3 to 6 amino acids in peptides 6 to 12 amino acids long, or one might want to change as few as 5 amino acids in polypeptides up to 50 amino acids long. One may uniquely identify the sequence of each peptide by providing for each solid support an identifier tag specifying only the amino acids varied in each sequence, as will be readily appreciated by those skilled in the art. In such cases, all solid supports may remain in the same reaction vessel for the addition of common monomer units and apportioned among different reaction vessels for the addition of distinguishing monomer units.

The identifier tag can be associated with the oligomer through a variety of mechanisms, either directly, through a linking molecule, or through a solid support upon which the oligomer is synthesized. In the latter mode, one could also attach the tag to another solid support that, in turn, is bound to the solid support upon which the oligomer is synthesized.

IV. Types of Identifier Tags

The identifier tag may be any recognizable feature that is, for example: microscopically distinguishable in shape, size, color, optical density, etc.; differently absorbing or emitting of light; chemically reactive; magnetically or electronically encoded; or in some other way distinctively marked with the required information, and decipherable at the level of one (or few) solid supports. In one embodiment, each bead or other solid support in the library incorporates a variety of fluorophores, or other light addressable type of molecules, the spectral properties of which can be changed and therefore used to store information. In one such mode, a bead incorporates a variety of fluorophors, each of which can be selectively photobleached, and so rendered incapable of fluorescence or of diminished fluoresence. During each coupling step, the bead is irradiated (or not) to photobleach (or not) one or more particular types of fluorophors, thus recording the monomer identity in the oligomer synthesized. See Science 255: 1213 (6 Mar. 1992), incorporated herein by reference.

One can construct microscopically identifiable tags as small beads of recognizably different sizes, shapes, or colors, or labeled with bar codes. The tags can be "machine readable" luminescent or radioactive labels. The identifier tag can also

be an encodable molecular structure. The information may be encoded in the size (e.g. length of a polymer) or the composition of the molecule. The best example of this latter type of tag is a nucleic acid sequence, i.e., RNA or DNA assembled from natural or modified bases.

Synthetic oligodeoxyribonucleotides are especially preferred information-bearing identifier tags. Oligonucleotides are a natural, high density information storage medium. The identity of monomer type and the step of addition is easily encoded in a short oligonucleotide sequence and attached, for example, to each peptide synthesis bead. When a single bead is isolated by screening, e.g., for receptor binding, the attached oligonucleotides can be amplified by methods such as PCR (see PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis, M, Gelfand, D., Sninsky, J. and White, T., Academic Press, San Diego 1990), incorporated herein by reference), or by other nucleic acid amplification techniques, such as the ligase chain reaction and the self-sustained sequence replication system. The amplified product can be easily sequenced or otherwise identified to decode the identity of the peptide on the bead. For this purpose, one can use any of a variety of sequencing methods, including sequencing by sequence-specific probe hybridization.

Alternatively, the information may be encoded in the length rather than, or in addition to, the sequence of the oligonucleotide. If only oligonucleotide length is utilized to represent each specific monomer addition to the oligomer, then the identity of the oligomer can be decoded by amplifying the oligonucleotide, as described above, and identifying the labels through any of a variety of size-separation techniques, including polyacrylamide gel electrophoresis or capillary electrophoresis.

There are several ways that oligonucleotides can be used as identifier tags. The oligonucleotides can be assembled base-by-base before, during, or after the corresponding oligomer (e.g., peptide) synthesis step. In one case of base-by-base synthesis, the tag for each step is a single nucleotide, or at most a very few nucleotides (i.e., 2 to 5). This strategy preserves the order of the steps in the linear arrangement of the oligonucleotide chain grown in parallel with the oligomer. To preserve the chemical compatibility of the parallel synthetic steps (oligonucleotides and peptides, for example), one can modify the standard synthesis chemistries.

One variation of base-by-base assembly is the block-by-block approach; encoded sets of nucleotides ("codons") of 5 to 10 or more bases are added as protected, activated blocks. Each block carries the monomer-type information, and the order of addition represents the order of the monomer addition reaction. Alternatively, the

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4970

block may encode the oligomer synthesis step number as well as the monomer-type information.

One could also attach protected (or unprotected) oligonucleotides containing amplification primer sites, monomer-specific information, and order-of-reaction information, from 10 to 50 to 150 bases in length, at each step. At the end of a series of n oligomer synthesis steps, there would be n differently encoded sets of oligonucleotide identifier tags associated with each oligomer sequence. After identifying the oligomers with ligand activity, the associated oligonucleotides are amplified by PCR and sequenced to decode the identity of the oligomer.

V. Linking the Identifier Tag(s) to the Oligomer

The identifier tags may be attached to chemically reactive groups (unmasked thiols or amines, for example) on the surface of a synthesis support functionalized to allow synthesis of an oligomer and attachment or synthesis of the oligonucleotide identifier tag. The tags could also be attached to monomers that are incorporated into a small proportion of the oligomer chains; or as caps on a small number of the oligomer chains; or to reactive sites on linkers joining the oligomer chains to the solid support.

In one embodiment, the solid supports will have chemically reactive groups that are protected using two different or "orthogonal" types of protecting groups. The solid supports will then be exposed to a first deprotection agent or activator, removing the first type of protecting group from, for example, the chemically reactive groups that serve as oligomer synthesis sites. After reaction with the first monomer, the solid supports will then be exposed to a second activator which removes the second type of protecting group, exposing, for example, the chemically reactive groups that serve as identifier tag attachment sites. One or both of the activators may be in a solution that is contacted with the supports.

In another embodiment, the linker joining the oligomer and the solid support may have chemically reactive groups protected by the second type of protecting group. After reaction with the first monomer, the solid support bearing the linker and the "growing" oligomer will be exposed to a second activator which removes the second type of protecting group exposing the site that attaches the identifier tag directly to the linker, rather than attachment directly to the solid support.

When activators or deprotection agents are incorporated into the

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4971

method of preparing a synthetic peptide library having a plurality of different members, each member comprising a solid support attached to a different single peptide sequence and an oligonucleotide identifier tag identifying said peptide sequence, the method comprises: a) apportioning the solid supports among a plurality of reaction vessels; b) reacting the solid supports with a solution in each reaction vessel and treating sequentially with (1) a first activator to remove a first type of protective group from the solid support, (2) a first amino acid or peptide to couple said amino acid or peptide to said solid support at sites where said first type of protective group has been removed; (3) a second activator to remove a second type of protective group from the solid support; and (4) a first nucleotide or oligonucleotide tag to couple said tag at sites where said second type of protective group has been removed; c) pooling the solid supports; d) apportioning the pooled solid supports among a plurality of reaction vessels; and e) repeating step (b) to couple a second amino acid or peptide and a second nucleotide or oligonucleotide tag to said solid support.

As noted above, the invention can also be carried out in a mode in which there is no solid support, and the tag is attached directly (or through a linker) to the oligomer being synthesized. The size and composition of the library will be determined by the number of coupling steps and the monomers used during the synthesis. Those of skill in the art recognize that either the tag or the monomer may be coupled first, in either embodiment.

Another possible embodiment is the use of two solid supports, such as beads, that are physically linked together, one with synthesis sites (or linkers) for the oligomer and one with attachment sites (or linkers) for the identifier tags. This arrangement allows the segregation of oligomers and identifier tags into discrete "zones" and permits the use of widely different chemically reactive groups and chemistries for attachment. The solid supports can be derivatized separately and then linked under conditions where all or nearly all of the synthesis solid supports will have a tag-attachment solid support in tow. The solid supports can be of different sizes, as for example a large synthesis bead with several (or many) smaller tag-attachment beads linked. In one embodiment, the first solid support will have at least one attached amino acid and the second solid support will have at least one attached nucleotide.

The mode of linking the two beads is constrained by the chemistry of oligomer synthesis. The most obvious means of linking the beads is with a

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4972

heterobifunctional cross-linking agent (for examples of such agents, see Pierce ImmunoTechnology Catalog and Handbook pp. E10-E18 (1991)) interacting with the dominant chemically reactive groups on each species of solid support.

VI. Encoding the Identifier Tag Information

The choice of bases used in an oligonucleotide identifier tag is dictated by the chemistry of oligomer synthesis. For example, the use of strong acid to deprotect peptides would depurinate nucleic acids. Therefore, when standard chemistries for peptide synthesis are employed, the pyrimidines C and T could be used in a binary code. Thus, in a preferred embodiment, the identifier tag will be an oligopyrimidine sequence.

In another embodiment, the lability of purine nucleotides to strong acid may be overcome through the use of the purine nucleoside analogs, such as 7-deaza-2'-deoxyadenosine and 7-deaza-2'-deoxyguanosine (see Barr et al., BioTechniques 4:428-432 (1986), and Scheit, Nucleotide Analogs: Synthesis and Biological Function pp. 64-65 (John Wiley and Sons, New York), both of which are herein incorporated by reference). Use of these or other analogs would permit the use of a quaternary or other, as opposed to a binary, encoding scheme.

Information retrieval from oligonucleotide identifier tags is possible through various encryption schemes, two of which are described below. In the first, the oligomer sequence information is at least in part encoded in the length of the oligonucleotide. Each different monomer added at a given step in the oligomer synthesis may be represented by an oligonucleotide tag of unique length. The oligonucleotide inherently contains amplification sites, such as PCR priming sequences, characteristic of the given step-number in the oligomer synthesis. Determination of the oligomer composition at any given position in the sequence then involves amplifying the tag using the PCR priming sequence characteristic for that step in the synthesis and size-separating the amplification products utilizing techniques well known in the art, such as gel or capillary electrophoresis (using the tagging oligonucleotides as standards) This embodiment is particularly useful when one desires to make a library of compounds related to a lead sequence. One need only tag during steps in which a site being analoged is synthesized.

In addition to length, oligomer sequence information can also be encoded in the sequence of bases comprising the oligonucleotide tag. This type of encryption is of value not only in the embodiment in which one attaches a different

oligonucleotide tag at each coupling step but also in the embodiment in which one extends an oligonucleotide tag at each coupling step. For example, as shown in Fig. 4, one may use oligonucleotides of up to about 100 bases (or somewhat longer), each having seven regions, as described below.

Region 1 is a 3'-PCR primer site (20 to 25 bases). This site is used in conjunction with another PCR site (at the 5'-end of the oligonucleotide) to prime amplification by PCR. Other amplification methods may also be used.

Region 2 is a "step-specific" DNA sequencing primer site (15-20 bases). This site is specific for the particular numbered step in the synthesis series. All the oligonucleotides added to all the beads at a particular step will have this sequence in common. Each numbered step will have a highly specific primer site representing that step.

Region 3 is a spacer (20-30 bases). A spacer segment of variable length, but preferably 20 to 30 bases long, places the coding site sufficiently distant from the sequencing primer site to give a good "read" through the monomer encoding or identification region.

Region 4 is a monomer identification region (8 bases). Each base in this string represents one bit of binary code, where, for example, T = 0 and C = 1. Each set of step-specific identifier tags consists of 8 bases with a 1 (C) or a O (T) at each of the 8 positions. These may be thought of as switches set to "on" or "off" at the different positions. Each monomer type is encoded by a mixture of 1 to 8 of these "switches."

Region 5 is a step number confirmation region (4 bases plus 2 bases on either side for region distinction). Four bits in this short stretch encode the step number. This is redundant to the sequencing primer but can be used to confirm that the proper primers were used and that the right step is decoded.

Region 6 is a repeat of the monomer identification region (8 bases). This region has the same information as region 4, and is used to confirm monomer identity. Installing this second monomer encoding region also increases the probability that a good sequencing "read" will be obtained.

Region 7 is a 5'-PCR primer site (20 to 25 bases). This site serves as a site for annealing the second PCR primer for amplification of the sequence. The length of oligonucleotides with all seven of these features, some of which are optional, will commonly be between 75 and 125 bases.

An 8 bit format can encode 256 different monomer types. The number of steps that can be encoded is determined by the number of step-specific sets (8 per set) of

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4974

oligonucleotides on hand. With 10 sets (80 oligos) one can encode up to 256 different monomers assembled into oligomers up to 10 units long (thus providing encoding capability for up to $256^{10} = 1.2 \times 10^{24}$ oligomer sequences). The coded identifier tags may be used so that each monomer is assigned a specific binary number (e.g. Ala = 00000001, Gly = 00000110, etc.). The appropriate oligonucleotides are combined to give the correct binary code.

VII. Recovering and Decoding the Identifier Tag Information

When specific beads are isolated in a receptor screening experiment, the beads can be segregated individually by a number of means, including: infinite dilution, micromanipulation, or preferably, fluorescence activated cell sorting (FACS), although, with respect to the present invention, FACS is more accurately "fluorescence activated oligomer or solid support sorting" (see Methods in Cell Biology, Vol. 33 (Darzynkiewicz, Z. and Crissman, H.A., eds., Academic Press); and Dangl and Herzenberg, J. Immunol. Methods 52:1-14 (1982), both incorporated herein by reference). Once the desired beads have been isolated, one needs to identify the tag to ascertain the sequence of the oligomer on the bead.

To facilitate tag identification, one has a variety of options. For instance, one could read the tag directly from the bead by sequencing or hybridization, if the tag is an oligonucleotide. One can also amplify oligonucleotide tags to facilitate tag identification. The oligonucleotide identifier tags carried by a single solid support or oligomer can be amplified in vivo, by cloning, or in vitro, e.g., by PCR. If the limit of detection is on the order of 100 molecules, then at least 100 or more copies of each oligonucleotide tag on a bead would be required. Copies of the tag are produced, either as single stranded oligonucleotides, double-stranded nucleic acids, or mixtures of single and double-stranded nucleic acids, by any of a variety of methods, several of which are described below, and the amplified material is sequenced. In the embodiment of the invention in which a separate and distinct oligonucleotide tag is added at each monomer addition step (as opposed to extending an existing tag at each step), one can amplify all tags at once and then divide the amplified material into as many separate sequencing reactions as there were oligomer synthesis steps (employing a different sequencing primer for each type of tag). In this embodiment, one could also design the tags so that each tag could be amplified separately from the other tags by appropriate choice of primer sequences. The sequencing reactions are performed and run on a standard sequencing gel, and the oligomer sequence is

deduced from the code revealed in the resulting sequence information.

An alternative strategy is to use common PCR primers and common sequencing primers (the sequencing primer may even overlap completely or partially with a PCR primer site) and identify the step by hybridization to oligonucleotide probes that are complementary to each step-specific sequence in the oligonucleotides from the bead. A single set of sequencing reactions is performed on all of the amplified oligonucleotides from a single bead, and the reaction products are run in a single set of lanes on a gel. The reaction products are then transferred to a suitable hybridization membrane and hybridized to a single step-specific probe (see Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982), which is incorporated herein by reference). After detection of the resulting signal, the probe is washed from the membrane and another step-specific probe is hybridized. One could also use the procedure described in EPO publication No. 237,362 and PCT publication No. 89/11548, each of which is incorporated herein by reference.

Parallel hybridization provides an alternative to sequential hybridization. The sequencing reactions are divided into a number of aliquots equal to the number of peptide synthesis steps and run in a separate set of lanes for each on the sequencing gel. After transfer of the reaction products to a suitable membrane, the membrane is cut to separate the sets of lanes. Each lane set is then hybridized to one of a plurality of step-specific oligonucleotide probes (see "Uniplex DNA sequencing" and "Multiplex DNA sequencing," in Plex Luminescent Kits Product Catalog, Bedford, MA, 1990, incorporated herein by reference).

As noted above, a single synthesis solid support (or an attached bead bearing a tag, or in solution in a "well") may only comprise a few hundred copies of each oligonucleotide tag. These tags may be amplified, e.g., by PCR or other means well known to those skilled in the art, to provide sufficient DNA to be sequenced accurately. The ability to decode the oligomers depends on the number of available oligonucleotide identifier tags, the level of amplification that can be achieved from the available tags, and the accuracy of sequencing that amplified DNA.

The most commonly used in vitro DNA amplification method is PCR. Alternate amplification methods include, for example, nucleic acid sequence-based amplification (Compton, Nature 350:91-92 (1991), incorporated herein by reference) and amplified antisense RNA (Van Gelder et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:7652-7656 (1988), incorporated herein by reference), and the self-sustained sequence replication system (3SR, see Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4976

(1990), incorporated herein by reference).

If PCR amplification of an oligonucleotide identifier tag is employed, one may encounter "PCR product contamination," caused by the product of one PCR reaction contaminating a subsequent PCR reaction mixture designed to amplify other tags having the same PCR primer binding sites. One may prevent this problem by introducing lability into the product sequences and treating subsequent reactions so as to destroy potential contamination carried over from previous reactions. A specific example of this strategy, for which commercial kits are sold by PECI and Life Technologies, is to introduce dUMP into the product. Treating each new PCR reaction with uracil-N-glycosidase degrades any dU-containing DNA present, preventing amplification of the contaminant. The template DNA, which contains no dU (only dT) is not affected. Of course, the glycosidase is removed or inactivated before amplification is begun.

Some of the tags described above for peptide synthesis have the unusual characteristic of containing only pyrimidines. This means that the uracil glycosidase strategy (Perkin Elmer Cetus Instruments (PECI) Catalog, Alameda (1991), incorporated herein by reference) will work on only half of the strands produced--those containing T's (or U's). One cannot introduce dUMP into the complementary, purine-only strand; however, the purine strand is highly vulnerable to acid depurination and alkaline-mediated scission of the backbone. The combination of these treatments can greatly reduce problems with product contamination. Another approach to preventing carryover contamination involves incorporation of a restriction site (EarI could be used for polypyrimidine tags) into the oligonucleotide tag and digestion with the corresponding restriction enzyme prior to amplification of a reaction suspected of being contaminated with the tag. This method only works if the tag to be amplified will not be cleaved by the enzyme, as would generally be the case for a single stranded oligonucleotide tag.

For sequencing amplified DNA, one usually desires to generate single stranded templates. This generation may be accomplished by any of several means. One such means is asymmetric PCR, where an excess of one of the primers is used to amplify one strand to a level 10 to 100-fold higher than the other (see, for example, U.S. Patent No. 5,066,584, incorporated herein by reference). Another means of providing a single stranded template is to by biotinylate one of the primers and purify or remove the resulting strand by adsorption to immobilized streptavidin (Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook, 1991, incorporated herein by reference).

Yet another means involves generation of RNA transcripts (representing only one of the strands) from an RNA polymerase promoter and sequencing the transcripts with reverse transcriptase (Sommer et al., Chapter 25, In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, supra, incorporated herein by reference). If the tags are composed of only pyrimidine nucleotides, then all purine strands can be eliminated by acid/base treatment, leaving the pyrimidine strand for sequencing.

The use of separate sequencing primers for each step-specific oligonucleotide requires a separate, conventional sequencing reaction for each step-specific primer. Using primers that are differentially labeled would allow the identifier tags from a single solid support to be sequenced in a single reaction and run in a single lane set (2 lanes) on a gel. There are now commercially available primers labeled with distinguishable fluorophores that are suitable for this purpose (ABI Catalog, incorporated herein by reference). Sets of chemiluminescent labels now distributed commercially may also be used (Bronstein et al., BioTechniques 8: 310-314 (1990), incorporated herein by reference).

DNA sequencing enzymes which may be employed in the present invention include Taq DNA polymerase, E. coli DNA polymerase I (or the Klenow fragment), T7 polymerase, Sequenase™ and Sequenase II™ (Modified T7 DNA polymerases), Bst DNA polymerase, and reverse transcriptase (from AMV, MMLV, RSV, etc., see USB Enzymes for DNA Sequencing, U.S. Biochemical Corp, 1991, Cleveland OH, incorporated herein by reference).

The sequence of an oligonucleotide tag may also be identified by a high fidelity DNA hybridization technique. To this end, very large scale immobilized polymer synthesis with oligonucleotides may be useful (see PCT patent publication Nos. 92/10587 and 92/10588, each of which is incorporated herein by reference).

VIII. Screening Receptors with Synthetic Oligomer Libraries

The tagged synthetic oligomer libraries of the present invention will have a wide variety uses. By way of example, these libraries can be used in determining peptide and nucleic acid sequences that bind to proteins, finding sequence-specific binding drugs, identifying epitopes recognized by antibodies, and evaluating a variety of drugs for clinical and diagnostic applications, as well as combinations of the above. Peptides as short as about five amino acids long might be useful in receptor-binding studies, for example.

Synthetic oligomers displayed on small beads can be screened for the

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4978

ability to bind to a receptor. The receptor may be contacted with the library of synthetic oligomers, forming a bound member between an receptor and the oligomer able to bind the receptor. The bound member may then be identified. As one example, the receptor may be an immunoglobulin.

The techniques for selection of individual beads displaying ligands on their surface are analogous to FACS methods for cloning mammalian cells expressing cell surface antigens or receptors. Therefore, methods for selecting and sorting beads will be readily apparent to those skilled in the art of cell sorting. For example, a receptor can be labelled with a fluorescent tag and then incubated with the mixture of beads displaying oligomers. After washing away unbound or non-specifically bound receptors, one can then use FACS to sort the beads and to identify and isolate physically individual beads showing high fluorescence.

Alternatively, affinity adsorption techniques can be employed in conjuction with the libraries of the invention. The mixture of beads can be exposed to a surface on which a receptor has been immobilized (see PCT patent publication No. 91/07087, incorporated herein by reference). After washing to remove unbound beads, one can then elute beads bound to the surface using conditions that reduce the avidity of the oligomer/receptor interaction (low pH, for example). The process of affinity adsorption can be repeated with the eluted beads, if desirable. Finally, individual beads are physically separated, for example, by limited dilution, by FACS, or by methods similar to those in which cells are incubated with a receptor coupled to small superparamagnetic beads and then cells expressing a ligand for the receptor are extracted using a high power magnet (see Miltenyi et al., Cytometery 11:231-238 (1990), incorporated herein by reference). Magnetically selected cells can be further analyzed and sorted using FACS. Radionucleotides may also serve to label a receptor.

Alternatively, the present invention can be used to generate libraries of soluble tagged oligomers, which can be used with a variety of screening methods. For instance, the oligomer library can be synthesized on beads with an identifying tag encoding the oligomer sequence. The microscopic beads are placed in individual compartments or wells that have been "nanofabricated" in a silicon or other suitable surface. The oligomers are cleaved from the beads and remain contained within the compartment along with the bead and the attached identifier tag(s). In one embodiment, the bottom surface is coated with the receptor, and after the addition of binding buffer and a known ligand for that receptor that is fluorescently labelled, one effectively has a solution phase competition assay for novel ligands for the receptor.

The binding of the fluorescently labelled ligand to the receptor is estimated by confocal imaging of the monolayer of immobilized receptor. Wells with decreased fluorescence on the receptor surface indicate that the released oligomer competes with the labelled ligand. The beads or the tag in wells showing competition are recovered, and the oligonucleotide tag is amplified and sequenced to reveal the sequence of the oligomer.

The beads are loaded in the wells by dispersing them in a volume of loading buffer sufficient to produce an average of one bead per well. In one embodiment, the solution of beads is placed in a reservoir above the wells, and the beads are allowed to settle into the wells. Cleavage of the oligomers from the beads may be accomplished using chemical or thermal systems, but a photocleavable system is preferred.

Recovery of identifier-tagged beads from positive wells may be effectuated by a micromanipulator plucking out individual beads. However, a preferred mode involves the use of beads that have been previously labelled with a fluorescent tag. A laser of the appropriate wavelength is then used to bleach the resident beads in only the positive wells. All the beads are then removed en masse and sorted by FACS to identify the bleached positives. The associated tags may then be amplified and decoded.

In a variation of this assay, the oligomer and tag may be synthesized attached to a common linker, which, in turn, is bound to the solid support. After placing the beads in the wells, one can cleave the linker from the bead, producing a tagged oligomer in solution. An immobilized receptor, such as a receptor bound to a bead or a receptor immobilized on one surface of the well, can be screened in a competition assay with the oligomer and a fluorescently labeled ligand. Instead of recovering the beads, one may recover the beads bearing immobilized receptors and sort the beads using FACS to identify positives (diminished fluorescence caused by the library oligomer competing with the labeled ligand) or one can determine the fluorescence emitting from the well surface coated with receptor. The associated identifier tag may then be amplified and decoded.

In a third variation of this approach, soluble tagged oligomers, produced either by cleavage of the linked oligomer and tag from the solid support as described above, or synthesized by theVLSIPS™ method described above, or synthesized in solution without a solid support, are incubated with an immobilized receptor. After a wash step, the bound, tagged oligomers are released from the receptor by, e.g., acid

treatment. The tags of the bound oligomers are amplified and decoded.

IX. An Automated Instrument for Oligomer Synthesis and Tagging

The coupling steps for some of the monomer sets (amino acids, for example) require a lengthy incubation time, and a system for performing many monomer additions in parallel is desirable. This can be accomplished with an automated instrument able to perform 50 to 100 parallel reactions (channels). Such an instrument is capable of distributing the reaction mixture or slurry of synthesis solid supports, under programmable control, to the various channels for pooling, mixing, and redistribution.

Much of the plumbing typical of peptide synthesizers is required, with a large number of reservoirs for the diversity of monomers and the number of tags (up to 80 for a 10 step synthesis, in one embodiment) employed. The tag dispensing capability will translate simple instructions into the proper mixture of tags and dispense that mixture. Monomer building blocks will also be dispensed, as desired, as specified mixtures. Reaction agitation, temperature and time control may be provided. An appropriately designed instrument may also serve as a multi-channel peptide synthesizer capable of producing 1 to 50 mgs (crude) of up to 100 specific peptides for assay purposes. See PCT patent publication 91/17823, incorporated herein by reference.

EXAMPLE I. SYNTHESIS ON GLASS BEADS OF 4 FLUORESCENTLY TAGGED PENTAPEPTIDES

A. Derivatization of Glass Beads

About 0.5 g of 3-10 um diameter silica beads (Polyscience) were washed with refluxing 10% aqueous HNO_3 for 20 min. The beads were pelleted and washed with distilled water (5x) and methanol (3x) and dried at 125 degrees C for 12 hours. Beads were vortexed with a 5% solution of aminopropyltriethoxysilane in acetone for 10 hours, pelleted and then washed with acetone (2x), ethanol (5x), and methylene chloride (2x) and dried at 125 degrees C for 45 min. Beads were suspended in dry DMF (1 mL) containing diisopropylethylamine (17 µl, 100 µmoles) and a solution of Fmoc-b-alanine, pentafluorophenyl ester (200 mg, 420 µmoles, Peninsula Labs) in distilled water (1.5 mL) was added. After vortex treatment for 11 hours, the beads were pelleted and washed with DMF (3x) and methylene chloride (2x). Beads were treated with a 10% solution of acetic anhydride in DMF containing 0.05 mol of 4-

dimethylaminopyridine to cap any underivatized aminopropyl groups, and then washed with DMF (2x) and methylene chloride (2x). Beads were vortexed with a 20% solution of piperidine in DMF and the release of the Fmoc-piperidine adduct quantitated by monitoring the absorbance spectrum of the supernatant at 302 nm (ϵ_{302} = 7800 M^{-1} cm^{-1}). An estimate of the degree of substitution of 10 µmoles of amino groups/g beads was thus obtained. Finally, the beads were washed with ethanol (5x) and methylene chloride (2x) and then dried at 85 degrees C for 12 hours.

B. Preparation of Boc-Gly-L-Phe-L-Leu-OH

Glycyl-L-Phenylalanyl-L-leucine (552 mg, 1.5 mmol, Bachem) was dissolved in a solution containing distilled water (10 mL) and 1 M NaOH (1.5 mL). The solution was cooled in an ice bath and was treated with a solution of di-tert-butyl pyrocarbonate (337 mg, 1.5 mmol) in p-dioxane (12 mL). A white precipitate rapidly formed but redissolved after stirring at room temperature for 4 hours. The solution was concentrated to dryness in vacuo, the residue taken up in water (5 mL), and the pH adjusted to 2.5 by the addition of 1 M $KHSO_4$. The aqueous suspension was extracted with EtOAc (2x, 15 mL), the organic layer separated, and dried over $MgSO_4$. After removal of the solvent in vacuo, the residue was triturated with hexane to afford Boc-Gly-L-Phe-L-Leu-OH as a white solid (yield=642 mg, 98%).

C. Preparation of Gly-L-Phe-L-Leu Beads

Boc-Gly-L-Phe-L-Leu-OH (44 mg, 0.1 mmol), benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (44 mg, 0.1 mmol) and 1-hydroxybenzotriazole hydrate (14 mg, 0.104 mmol) were dissolved in dry DMF (1 mL). Diisopropylethylamine (20 µl, 0.115 mmol) was then added and 0.65 mL of this solution was immediately transferred to a microcentrifuge tube containing 80 mg of amino derivatized glass beads. The sealed tube was vortexed for 3.5 hours, and the beads were then pelleted and washed with DMF (3x) and methylene chloride (2x). The beads were then deprotected with a 50% solution of trifluoroacetic acid in methylene chloride for 30 min., washed with methylene chloride (2x), ethanol (2x), and methylene chloride (2x), and dried at 55 degrees C for 1 hour.

D. Preparation of Gly-Gly-L-Phe-L-Leu Beads (SEQ ID NO:10)

Fmoc-glycine pentafluorophenyl ester (46 mg, 0.1 mmol) was dissolved in dry DMF (1 mL) containing diisopropylethylamine (17 µl, 0.1 mmol). About 0.65

mL of this solution was added to 20 mg of Gly-L-Phe-L-Leu beads in a microcentrifuge tube, and the tube was vortexed for 3 hours. The beads were pelleted and washed with DMF (4x) and methylene chloride (2x). Deprotection was effected by treatment with a 20% solution of piperidine in DMF for 30 min. The beads were washed with DMF (2x), ethanol (2x), and methylene chloride (2x) and dried at 60 degrees C for 4 hours.

E. Preparation of L-Pro-Gly-L-Phe-L-Leu Beads (SEQ ID NO:11)

Fmoc-L-proline pentafluorophenyl ester (50 mg, 0.1 mmol) was dissolved in dry DMF (1 mL) containing diisopropylethylamine (17 µl, 0.1 mmol). About 0.65 mL of this solution was added to 20 mg of Gly-L-Phe-L-Leu beads in a microcentrifuge tube, and the tube was vortexed for 3 hours. The beads were pelleted and washed with DMF (4x) and methylene chloride (2x). Deprotection was effected by treatment with a 20% solution of piperidine in DMF for 30 min. The beads were washed with DMF (2x), ethanol (2x), and methylene chloride (2x) and dried at 60 degrees C for 4 hours.

F. Fluorescein Staining of Gly-Gly-L-Phe-L-Leu Beads

About 5.4 mg of Gly-Gly-L-Phe-L-Leu beads were suspended in 450 µl of aqueous borate buffer (pH 8.5) and 54 µl of a 10 µM solution of fluorescein isothiocyanate (FITC) added. After vortex treatment for 1.5 hours, the beads were washed with buffer (5x), ethanol (2x), and methylene chloride (2x). FACS analysis indicated that approximately 10% of available amino groups had been titrated with FITC.

G. Co-coupling of L-Tyrosine and Biotin to Mixture of L-Pro-Gly-L-Phe-L-Leu and FITC labelled Gly-Gly-L-Phe-L-Leu Beads

5 mg of FITC labelled Gly-Gly-L-Phe-L-Leu beads and 5 mg L-Pro-Gly-L-Phe-L-Leu beads were mixed together in a single tube, vortexed with a 0.1 mM solution of diisopropylethylamine in methylene chloride, and the suspension was divided into two equal portions. The beads were pelleted, and to one portion was added a solution containing Fmoc-O-tert-butyl-L-tyrosine pentafluorophenyl ester (59 mg, 95 µmol), N-hydroxysuccinimidobiotin (1.7 mg, 5 µmol) and diisopropylethylamine (17 µl, 100 µmol) in dry DMF (1 mL). After vortexing for 3 hours the beads were washed with distilled water (2x), ethanol (2x), methylene

chloride (2x) and DMF (lx). Fmoc deprotection was effected by treatment with a 20% solution of piperidine in DMF for 30 min., and tert-butyl side chain protecting groups were removed by treatment with 25% trifluoroacetic acid in methylene chloride for 30 min. The pelleted beads were washed with methylene chloride (2x), ethanol (2x), and TBS (lx).

H. R-Phycoerythrin Staining of Biotinylated L-Tyr-(Gly/L-Pro)-Gly-L-Phe-L-Leu Beads (Mixture of SEQ ID NO:12 and SEQ ID NO:13)

Biotinylated L-tyrosine beads from (G) above were suspended in TBS (0.5 mL) and treated with 10 µl of R-phycoerythrin-avidin conjugate (Molecular Probes) for 30 min. Pelleted beads were washed with TBS (5x).

I. Co-coupling of L-Proline and Biotin to Mixture of L-Pro-Gly-L-Phe-L-Leu and FITC labelled Gly-Gly-L-Phe-L-Leu Beads (Mixture of SEQ ID NO:15 and SEQ ID NO:14)

5 mg of a mixture of L-Pro-Gly-L-Phe-L-Leu and FITC labelled Gly-Gly-L-Phe-L-Leu beads were treated with a solution containing Fmoc-L-proline pentafluorophenyl ester (48 mg, 95 µmol), N-hydroxysuccinimidobiotin (1.7 mg, 5 µmol), and diisopropylethylamine (17 µl, 100 µmol) in dry DMF (1 mL). After vortex treatment for 3 hours, the beads were washed with DMF (2x), ethanol (2x), methylene chloride (2x), and DMF (lx). Fmoc deprotection was effected by treatment with a 20% solution of piperidine in DMF for 30 min., and by way of control, the beads were treated with 25% trifluoroacetic acid in methylene chloride for 30 min. The pelleted beads were washed with methylene chloride (2x), ethanol (2x), and TBS (lx).

J. Tri-Color Staining of Biotinylated L-Pro-(Gly/L-Pro)-Gly-L-Phe-L-Leu Beads

Biotinylated L-proline beads from (i) above are suspended in TBS (0.5 mL) and treated with 20 µl Tri-Color: streptavidin conjugate (Caltag Labs) for 30 min. Pelleted-beads are washed with TBS (5x).

K. Selection of Beads Containing Peptide Ligands for Monoclonal Antibody 3E7

Monoclonal antibody 3E7 was raised against the opioid peptide beta-endorphin. The binding specificity of MAb 3E7 has been well characterized by

solution assays with chemically synthesized peptides. The equilibrium binding constants (Kd) of the peptides considered here are as follows: YGGFL is 6.6 nM; and YPGFL, PPGFL, and PGGFL are each >1 mM; thus, only the peptide YGGFL shows appreciable affinity for the antibody.

A mixture of beads containing either YGGFL, YPGFL, PGGFL, or PPGFL and their respective tags (see above) are added in phosphate buffered saline (PBS) containing monoclonal antibody 3E7 that has been previously conjugated to colloidal superparamagnetic microbeads (Miltenyi Biotec, West Germany). After a 16 hr incubation at 4 degrees C, beads which bind the 3E7 antibody are selected using a high strength magnet. The selected beads are then analyzed by flow cytometry. Analysis of the selected beads reveals that they contain both fluorescein and R-phycoerythrin, indicating that only beads displaying the peptide YGGFL are selected by the 3E7 antibody.

EXAMPLE 2: SYNTHESIS ON GLASS BEADS OF 4 PENTAPEPTIDES TAGGED WITH OLIGONUCLEOTIDE IDENTIFIERS

A. Synthesis of Identifier Oligonucleotides (I)-(IV)

The oligonucleotide identifier tags (I)-(IV) have the sequences shown below. The regions complementary to the 5' and 3' PCR primers are underlined. The regions complementary to the step-specific sequencing primers are shown in lower case: there are two steps in this example. The monomer encoding region is shown in bold type: CT_7 encodes Gly, TCT_6 encodes L-Pro, and $TTCT_5$ encodes L-Tyr in this case. Thus oligos (I)-(IV) code respectively for Gly in position 2, L-Pro in position 2, L-Tyr in position 1, and L-Pro in position 1.

(I) 5'-B^1B^2-CTTTCTTCCTCTCCCTCTTTTCTCCTCTCTTTTTTTCTC
CTTCTTTTTTTCTCTCCCTCTCTCCTCTCTCccctttctctcctttc
ctCCTCTCCTCTCTCTTCTTTCC-3' (SEQ ID NO:1)

(II) 5'-B^1B^2-CTTTCTTCCTCTCCCTCTTTTCTCCTCTTCTTTTTTCTC
CTTTCTTTTTTCTCTCCCTCTCTCCTCTCTCccctttctctcctttc
ctCCTCTCCTCTCTCTTCTTTCC-3' (SEQ ID NO:2)

(III) 5'-B^1B^2-CTTTCTTCCTCTCCCTCTTTTCTCCTCTTTCTTTTTTCTC
CTTTTCTTTTTTCTCTCCCTCTCTCCTCTCTCtcttcctttcccctct
ctctctCCTCTCCTCTCTCTCTTCTTTCC-3' (SEQ ID NO:3)

(IV) 5'-B^1B^2-CTTTCTTCCTCTCCCTCTTTTCTCCTCTTCTTTTTTCTC CTTTCTTTTTTCTCTCCCTCTCTCCTCTCTCtcttcctttcccctct ctctctCCTCTCCTCTCTCTCTTCTTTCC-3' (SEQ ID NO:4)

where: B^1 =p-Maleimido-C_6H_4-$(CH_2)_3$-C(O)NH-$(CH_2)_6$-O-PO_2-O-, and B^2 = CH_2-CH[$(CH_2)_4$-NH-Biotin]-CH_2-O-PO_2-O-.

Oligos (I)-(IV) are synthesized on an ABI PCR-mate synthesizer using commercially available (Sigma) DMT-O-Me phosphoramidites. The N^4-amino group of cytidine is protected as the benzoyl derivative. The 5' terminal (Bl) and penultimate (B2) phosphoramidites are respectively N-MMT-C_6-AminoModifer (Clonetech) and Biotin Phosphoramidite (Glen Research) for each oligonucleotide. The fully protected O-methyl phosphotriester oligomers are cleaved from the CPG support by treatment with concentrated NH_4OH at 25 degrees C for 1 hour. The crude products are purified by affinity chromatography on a monomeric avidin-agarose column (Pierce), and the full-length material is eluted with 2 mM biotin. The 5'-MMT group is removed by treatment with 80% acetic acid for 1 hour at 25 degrees C, and the solution is evaporated to dryness. The products are dissolved in PBS, pH 8.0, and treated with a 50-fold excess of succinimidyl 4-(p-maleimidophenyl) butyrate (Pierce) in DMF for 30 min. The modified, protected oligonucleotides are desalted by RP-HPLC, lyophilized and stored under nitrogen.

The primers used for PCR and sequencing are prepared in the normal fashion and are shown below:

5' PCR Primer 5'-TCCTCTCCCTCTTTTCTCCTCT-3' (corresponds to bases 7-28 of SEQ ID NO:1)

3' PCR Primer 5'-Biotin-GGAAAGAAGAGAGAGGAGAGG-3' (SEQ ID NO:5)

Step #1 Sequencing Primer 5'-AGAGAGGGGAAAGGAAGA-3' (SEQ ID NO:6)

Step #2 Sequencing Primer 5'-AGGAAAGGAGAGAAAGGG-3' (SEQ ID NO:7)

B. Preparation of Gly-Gly-L-Phe-L-Leu Beads Bearing Identifier Oligo (I)

5 mg of Gly-L-Phe-L-Leu beads are treated with a solution containing Fmoc-Gly-OH (99.95 µmol), Fmoc-Cys(Npys)-OH (0.05 µmol, Calbiochem), benzotriazol-1-yloxytris-(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (100

μmol), 1-hydroxybenzotriazole hydrate (100 μmol), and diisopropylethylamine (150 μmol) in dry DMF (1 mL) for 2 hours. The beads are washed with DMF (2x) and then with methanol (2x) and then treated with a 10 mM DTT solution in methanol for 30 min. to deprotect the cysteine residues. The beads are quickly washed with ice-cold methanol (2x), pelleted, and then reacted for 20 min with 100 μl of a 0.1 mM solution of oligo (I) in methanol. After washing with methanol (2x) and then with DMF (2x), the beads are deprotected for 20 min. with 20% piperidine in DMF. Finally, the beads are washed with DMF (2x), methanol (2x), and then methylene chloride (2x) and dried at 45 degrees C for 1 hour.

C. Preparation of L-Pro-Gly-L-Phe-L-Leu Beads Bearing Identifier Oligo (II)

5 mg of Gly-L-Phe-L-Leu beads are treated as in (b) above, substituting Fmoc-L-Pro-OH and Oligo (II) for Fmoc-Gly-OH and Oligo (I), respectively.

D. Preparation of(OtBu)-L-Tyr-(Gly/L-Pro)-Gly-L-Phe-L-Leu Beads Bearing Identifier Oligos (III and I/II)

Beads from (b) and (c) are pooled and divided into two equal portions. One portion is treated as in (b), substituting Fmoc(OtBu)-L-Tyr-OH and Oligo (III) as appropriate.

E. Preparation of L-Pro-(Gly/L-Pro)-Gly-L-Phe-L-Leu Beads Bearing Identifier Oligos (IV and I/II)

The second pool is treated as before, substituting Fmoc-L-Pro-OH and Oligo (IV) as appropriate.

F. Reconstitution and Deprotection of the Peptide Library

Beads from (d) and (e) are pooled, and the phosphate, amino acid side-chain, and nucleotide exocyclic amino protecting groups are removed as follows. A one hour treatment with a 1:2:2 mixture of thiophenol: triethylamine: p-dioxane is followed by washing the beads with methanol (2x) and then methylene chloride (2x), and then the beads are treated for 5 min. with 95:5 trifluoroacetic acid: ethanedithiol. After a wash with methanol (3x), the beads are treated at 55 degrees C with 1:1 ethylenediamine: ethanol for 1 hour and then washed first with ethanol (2x) and then with PBS (2x). This collection of beads constitutes the library and contains approximately equal quantities of the 4 immobilized peptides YGGFL, YPGFL, PGGFL

and PPGFL. Additionally, each bead carries two distinct 113 bp oligonucleotide sequences encoding the identities of both the first and second amino acids of the peptide on that bead.

G. PCR Amplification of Oligonucleotide Identifier Tag

After a FAC sort of affinity purified beads into individual 0.5 mL polypropylene tubes, 25 µl of TBS containing 0.1 µg salmon sperm DNA (as carrier) are added together with 25 µl of 2X PCR Amplification Buffer (PECI) to each tube. The 2X buffer contains: 100 mM KCl; 20 mM Tris-Cl, pH 8.4, 20 degrees C; 6 mM $MgCl_2$; 0.4 mM dNTP's; 1 µM of 5' PCR primer; 1 µM of 3' PCR primer; and 100 units/ml Taq DNA polymerase.

After buffer addition, the sample is covered with 50 µl of mineral oil and transferred to an automated thermal cycler. In the thermal cycler, the samples are heat denatured at 95 degrees C for 2 min., and then cycled 35 times through 3 steps: 95 degrees C/30 sec., 60 degrees C/1 min., 72 degrees C/1 min., which steps are followed by an incubation at 72 degrees C for an additional 5 min. and then the tubes are cooled and held at 15 degrees C until ready for processing on streptavidin beads. The mixture is heated to 95 degrees C to denature the strands, and the biotinylated purine strand and excess 3' PCR primer are removed by addition of streptavidin-coated beads. The tubes are centrifuged at 12K rpm for 5 min. The supernatant is used in the sequencing reactions, as described below.

H. Sequencing of PCR Amplified Oligonucleotide Tags

The amplified oligonucleotides from individual bead isolates are sequenced in a pair of reactions (using ddA or ddG as chain terminators) with either the Step #1-specific or the Step #2-specific sequencing primers.

To anneal the template and primer, for each set of two sequencing lanes, a single annealing and subsequent labeling reaction is run by combining 8.5 µl of sequencing primer (conc.= 0.25 pmol/µl), 1.5 µl Sequenase™ 5X sequencing buffer (200 mM Tris HCl, pH 7.5; 100 mM $MgCl_2$; and 250 mM NaCl), and 10 µl of template DNA from the amplification supernatant above. The samples are heated for 2 minutes at 65 degrees C and allowed to cool slowly to room temperature (approx. 10 minutes).

The labeling reaction is performed as follows. Sequenase™ (v2.0) is diluted 1 : 20 with TE (10 mM Tris HCl, pH 7.5; and 1 mM EDTA), and a labeling

cocktail containing a 2 : 3.5 ratio of diluted enzyme to labeling mix (i.e., a 4 : 2 : 1 mixture of 150 nM dGTP, 0.1 M dithiothreitol, alpha-^{35}S-dATP, >1000 Ci/mmol) is prepared. About 5.5 µl of the cocktail are incubated with 10 µl of annealed template/primer (from (i)) at 25 degrees C for 5 min.

The termination reactions are performed as follows. 6 µl of labeling reaction mixture are added to 5 µl of each of the appropriate ddXTP termination reaction mixes (i.e., 80 µM dGTP, 80 µM dATP, 50 mM NaCl, and 8 µM ddGTP or 8 µM ddATP). After incubation at 37 degrees C for 5 min., about 8 µl of Stop Solution (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, and 0.05% xylene cyanol) are added to each of the termination reactions.

The sequencing gel is comprised of 6% total acrylamide (19:1 acrylamide/bis), 0.09 M Tris base, 0.09 M boric acid, 1 mM EDTA, and 7 M urea. The gel is polymerized by addition of 1.9 µl of 25% ammonium persulfate per mL and 0.72 µl of TEMED per mL of above gel solution. The gel is allowed to polymerize at least one hour and is prerun at least 20 minutes prior to sample loading. Gel plates are then maintained between 40 and 50 degrees C prior to and during the run.

Reactions are heated to 85-95 degrees C for 2 minutes prior to loading, and the gel is run until the bromophenol blue dye reaches the bottom of the gel. The sequences of interest run between the bromophenol and xylene cyanol markers. The information required to identify the sequence of monomers in the oligomers attached to the bead is contained in the DNA sequence information.

EXAMPLE 3: PARALLEL SYNTHESIS OF PEPTIDES AND OLIGONUCLEOTIDE TAGS ON CARBOXYL BEADS

A. Synthesis of Phosphoramidites (I)-(IV)

The 3'-(allyl N,N'diisopropyl-phosphoramidites) of 5'-DMT derivatives of: (1) N^6-(allyloxy)carbonyl-7-deaza-2'-deoxyadenosine; (2) N^4-(allyloxy)carbonyl-2'-deoxy-cytidine; (3) N^2-(allyloxy)carbonyl-7-deaza-2'-deoxyguanosine; and (4) thymidine (see Figure 6), are prepared according to the procedures of Hayakawa et al., J. Amer. Chem. Soc. 112: 1691-1696 (1990), incorporated herein by reference).

B. Derivatizing Carboxyl Beads With a Diamine Linker

Preparation of a bifunctional bead material for parallel synthesis of peptides and oligonucleotides is illustrated in Figure 7. Three 50 mg aliquots of 4.5 µm diameter polystyrene/polydivinylbenzene/polymethylmethacrylate/COOH beads

(Bangs' Laboratories) were each placed in a separate microcentrifuge tube and treated as follows. First, the beads were treated with 0.1 N aqueous HCL (3 mL) and stirred by vortexing for 15 minutes. The beads were then pelleted with a microcentrifuge, the liquid supernatant decanted, and the remaining bead pellet successively washed (by vortexing, pelleting, and decanting: a process referred to as "washed") with water (3 x 1 mL) and dimethylformamide (DMF, 3 x 1 mL).

The compounds 2-(1H-benzotriazol-1-y1)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU, 38 mg, 0.10 mmol), 1-hydroxybenzotriazole (HOBT, 15mg, 0.10 mmol), and DMF (0.5 mL) or dichloromethane (0.5 mL) were added to the bead pellet. Diisopropylethylamine (DIEA, 54 µl, 0.30 mmol) was added, and the suspension was vortexed for 1 min. The compound 4,9-dioxa-1,12-dodecanediamine (20 µl, 0.10 mmol) was then added, and the reaction was vortexed for 30 minutes. The reaction was then diluted with DMF (1 mL), the beads were pelleted, and the supernatant decanted. The pellet was treated with 9:1 DMF/water (1.0 mL) and vortexed for 15 minutes. The beads were then pelleted, the supernatant decanted, and the beads washed with DMF (3 x 1.0 mL).

C. Attaching Peptide and Oligonucleotide Synthesis Linkers

100 mg of the beads are treated with a mixture of 4-Fmoc-aminobutyric acid (0.1 mmol) and 4-p,p'-dimethoxytrityl (DMT)-hydroxybutyric acid (0.1 µmol) in the presence of HBTU (0.1 mmol), HOBt (0.1 mmol), and DIEA (0.1 mmol) in 9:1 CH_2Cl_2:DMF (1.0 mL). After vortex treatment for 30 minutes, the reaction mixture is diluted with DMF (1.0 mL), the beads pelleted, and the supernatant decanted. The beads are washed with DMF (3 x 1.0 mL). The coupling procedure is then repeated with fresh reagents, and the beads are pelleted and washed as described above.

D. Building a 3' PCR Priming Site on the Hydroxy Linkers

The parallel assembly of oligonucleotide-tagged peptides on beads is illustrated in Figure 8. A PCR priming site of 20-25 nucleotides is assembled as follows. Note that all reagents used are anhydrous, and reactions occur under an atmosphere of dry argon. About 10 mg of the beads are subjected to an eight-step reaction sequence to couple a protected phosphoramidite. The reaction steps are: (1) beads are washed for 0.5 minutes with acetonitrile (MeCN); (2) DMT groups are removed with 3% trichloroacetic acid in CH_2Cl_2 for 1.5 minute; (3) beads are washed with MeCN for 3 minutes; (4) beads are treated with 0.1 M phosphoramidite (I, II, III,

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4990

or IV) in MeCN containing either 0.5 M (4-nitrophenyl) tetrazole or 0.5 M pyridinium hydrochloride and 1.0 M imidazole for 2 min.; (5) beads are washed with MeCN for 0.5 minutes; (6) beads are capped with a mixture of Ac_2O/2,6-lutidine/THF (1:1:8) containing 5% DMAP; (7) beads are oxidized with 1 M ^tBuOH in CH_2Cl_2 for 0.8 minutes; and (8) beads are washed for 0.5 minutes with MeCN. Steps one through eight are repeated from one to 25 times to assemble a PCR priming site of up to 25 nucleotides.

E. Coupling of First Amino Acid to Amino Linkers

Peptide and nucleotide couplings may be alternated, as illustrated in Figure 8. To couple an amino acid (or peptide), the Fmoc group is first removed from the beads by treatment with 30% piperidine in DMF for 60 min. The beads are washed 3 times with DMF. The beads are then treated with a solution containing the appropriate amino acid (0.1 M), HBTU (0.1 M), HOBt (0.1 M), and DIEA (0.1 M) in 9:1 CH_2Cl_2:DMF for 30 min. The coupling is then repeated with fresh reagents for a further 30 min. and the beads are washed with DMF (3x) and then with MeCN (3x).

F. Construction of First Oligonucleotide "Codon"

A "codon" of about 3 to 5 nucleotides uniquely representing the identity of the first amino acid is then built at the 5' end of the oligonucleotide chain using the 8-step coupling cycle in procedure (d) above.

G. Coupling of Subsequent Amino Acids and "Codon" Construction

The methods of procedures (e) and (f) are then repeated using the appropriate amino acid and nucleotide building blocks until the desired peptide and the oligonucleotide coding region are completely assembled.

H. Construction of a 5' PCR Priming Site

The 8-step coupling cycle of procedure (d) is used to build a 20-25 nucleotide PCR priming site on the 5' terminus of the oligonucleotide chains.

I. Deprotection of the Oligonucleotide and Peptide Chains

The fully assembled peptide and oligonucleotide chains are deprotected as follows. The amino-terminal Fmoc groups are removed by treatment with 30% piperidine in DMF and then a wash with THF (3x). To remove the allylic protecting

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4991

groups, the beads are treated with a THF solution containing tris(dibenzylideneacetone) dipalladium-chloroform complex (0.02 M), triphenylphosphine (0.2 M), and 1:1 n-butylamine/formic acid (1.2 M) at 50°C for 30 min. and the pelleted beads are washed with THF. The beads are washed with 0.1 M aqueous sodium N,N-diethyldithiocarbamate and then water to remove traces of palladium. The amino acid protecting groups are then removed by treatment with 95:5 TFA/water for 30 min. "Scavenger" reagents such as 1,2-ethanedithiol and thioanisole may also be included in this acidic deprotection medium (e.g., 2% of each by volume). Finally, the fully deprotected beads are washed with aqueous buffer and are ready for interaction with a biological receptor.

EXAMPLE 4: LIBRARY PREPARATION AND SCREENING

In this example, two populations of amine derivatized beads were labeled with oligonucleotides possessing base sequences uniquely characteristic of each bead population. The population labeled with an oligonucleotde 95 bases in length (95 mer) was subsequently coupled to the peptide YGGFL. The population of beads labeled with an oligonucleotide 110 bases in length (110 mer) was coupled to phenyalanine (F). The beads were then mixed in the ratio of twenty F/110 mer beads for each YGGFL/95 mer bead and stained with a fluorescently labeled antibody 3E7 that binds the peptide YGGFL with high affinity. Individual fluorescently stained beads could then be sorted by FACS directly into PCR tubes. After PCR, 5 of 6 fluoresently stained beads gave rise to a fragment of amplified DNA 95 bp long. PCR of the remaining single bead gave rise to small DNA fragments, possibly being primer dimer.

The oligonucleotides used in this experiment are the two tags, two PCR primers, and one sequencing primer. The same PCR and sequencing primers were used for the two tags. The two tags differ in their sequence and length. Both tags were composed of the bases 7-deazaA, C, and T.

The 95 mer tag has the sequence:

CCA CTC ACT ACC ACT CTA CTA TAA CCA CCC CTT CCT ATT CCA AAA TTA CAA Act tat ctc aac tac atc tCA CAC TCA CTC ATC TCT ACA TCT AC (SEQ ID NO:8)

The 110 mer tag has the sequence:

CCA CTC ACT ACC ACT CTA CTA TAA CCC TCC CCT ATT CCA AAA TTA CAT CCT ATT CCA AAA TTA CAA Act tat ctc aac tac atc tCA CAC TCA CTC ATC TCT

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4992

ACA TCT AC (SEQ ID NO:9)
For each target the underlined sequences represent PCR primer binding sites: the sense primer is at the 5'-end, and the anti-sense primer is at the 3'-end. Also, for each target the small case sequence represents the sequencing primer binding site.

A. Bead Preparation

Beads were purchased from Bang's Laboratories (979 Keystone Way, Carmel, IN 46032) and are composed of carboxylated polystyrene (4.5 μm average diameter). These beads were subjected to diamine derivitization by the process described below.

Beads (200 mg) were treated with 1.0 mL of 1 N HCl and vortexed 15 min. The beads were pelleted, decanted, and washed with three times (3x) with 1.0 mL of water each wash and then washed 3x with 1.0 mL of DMF each wash. To the washed pellet was added 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU; 38 mg, 0.1 mmole), 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HOBT; 15 mg, 0.1 mmole), 500 μL of methylene chloride, and 54 μL of diisopropylethylamine (DIEA; 0.3 mmole). After vortex treatment for 2 min., 20 μL of diamine (4,9-dioxa-1,12-dodecanediamine; 94 μmole) were added. After vortex treatment for 30 min, 1.0 mL of DMF was added, and the beads were pelleted by centrifugation. The supernatant was removed, and 1.0 mL of 10% water in DMF was added. The beads were vortexed an additional 15 min. and finally washed 3x with 1.0 mL of DMF each wash.

B. Oligonucleotide Attachment

Two different target oligonucleotides were employed in this experiment: a 95 mer and a 110 mer. These oligonucleotides were composed of the bases cytidine, thymidine, and 7-deaza adenosine. The oligonucleotides were synthesized with a primary amino group on the 5'-terminus (5'-amino modifier C-12, Glen Research). Lyophilized oligonucleotide (600 pmole) was dissolved in 5 μL of 0.5 M Na-phosphate, pH 7.7, and the solution was treated with 10 μL of 0.2 M disuccinimydylsuberate (DSS). The reaction proceeded 10 min., and then 85 μL of ice-cold water were added. Unreacted DSS was removed by centrifugation. The supernatant was passed through a G25 spin column that had been equilibrated with water. The eluant was immediately frozen and lyophilized to isolate the 5'-N-hydroxysuccinamide ester of the oligonucleotide.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4993

This activated oligonucleotide was dissolved in 50 µL of 0.1 M Na-phosphate, pH 7.5, which contained 0.1 mg/mL of sonicated salmon sperm DNA. This solution was added to 10 mg of diamine derivitized beads. After vortex treatement for 3 hr., the beads were washed 2x with 0.4 mL of 0.1 M Na-phosphate, pH 7.5, each wash, and then washed 2x with 0.4 mL of 0.1 N NaOH. Finally, the beads were washed with 3x with 0.4 mL of pH 7.5 buffer.

C. Peptide Attachment

To Boc-YGGFL or Boc-Phe (Boc = t-butoxy-carbonyl amine protecting group; 0.1 mmole) was added HBTU (0.1 mmole), HOBT (0.1 mmole), 1.0 mL of 10% DMF in methylene chloride, and DIEA (0.3 mmole). After vortex treatment to dissolve the solids, 0.4 mL of the peptide solution was added to 3 mg of oligonucleotide-labeled beads. The solution containing Boc-YGGFL was added to beads labeled with the 95 mer, and the solution containing Boc-Phe was added to beads labeled with the 110 mer. The reaction mixtures were vortexed 30 min. and then diluted with DMF, centrifuged, decanted, and the bead pellets washed with 3x with 1.0 mL of THF. The Boc protecting groups were removed by treating the beads with 0.4 mL of 95% trifluoroacetic acid for 10 min. The deprotection reaction was then diluted with THF, centrifuged, and decanted, and the beads were washed with 3x with 1.0 mL of DMF each wash. Finally, the beads were washed with 3x with 0.5 mL of 0.1 M Na-phosphate, pH 7.5, each wash and stored as a slurry (10 mg/mL).

D. Mixing, Staining, and Sorting

The beads coupled with the 95 mer and YGGFL were mixed with the beads that were coupled to the 110 mer and F in the ratio of 1:20. Thus, 0.1 mg of 95 mer/YGGFL beads (2 million beads) were mixed with 2.0 mg of the 110 mer/Phe beads (40 million beads). The mixture was suspended in blocking buffer (PBS, 1% BSA, and 0.05% Tween-20) and incubated at room temperature for 1 hr. The beads were next pelleted by centrifugation and resuspended in a solution of an FITC-labeled monoclonal antibody 3E7 that binds the peptide YGGFL (1 µg/mL). The suspension was incubated 0.5 hr on ice and then centrifuged to isolate the bead pellet.

The beads were resuspended in PBS for delivery into the fluorescence activated cell sorting (FACS) instrument (Becton Dickinson FACSORT Plus). Beads that had bound to the fluorescently labeled antibody were identified by their

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4994

acquired fluorescence, and fluorescent beads were isolated by sorting into PCR tubes. One, ten, or one hundred fluorescent beads were sorted into each PCR tube. In an analogous manner, non-fluorescent beads were also sorted into PCR tubes.

E. Amplification of Sorted Beads

To each PCR tube containing a bead or beads was added 25 µL of PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.7; 10 mM KCL; 10 mM $(NH4)_2SO_4$; 2 mM $MgCl_2$; 0.1% Triton X-100; 0.14 mg/mL BSA; 200 µm dATP; 200 µm dGTP; 200 µm dCTP; 200 µm dTTP; 2 µm primer #1; 2 µm primer #2; and 0.5 units of Pfu DNA polymerase). Reactions were subjected to 40 cycles of 95°C for 0.5 min., 55°C for 1 min., and 72°C for 1 min.

Gel loading dye (2 µL) was added to 10 µL of each PCR, and the sample was run on a 2% low melting point agarase gel. DNA fragments were visualized by staining with ethidium bromide and exposure to UV light. Five of six of the tubes containing single flourescent beads gave rise to DNA fragments 95 base pairs in length, confirming that these beads were coupled to YGGFL and not F. Tubes containing 10 or 100 fluorescent beads also gave rise to 95 mer DNA fragments. Conversly, none of the tubes containing 1, 10, or 100 non-fluorescent beads gave rise to 95 mer fragments.

There were, however, anomalous amplification products smaller than 110 bp from amplification of the tags of non-fluorescent beads. These anomalous products may have arisen through the use of unprotected oligonucleotide tags in this example, which may have allowed the free exocyclic amines to couple to the F amino acid, thereby rendering the tag subject to anomalous amplification. This problem would not have affected the 95 mer tag to the same extent, because YGGFL would be less reactive with the exocyclic amines than F.

EXAMPLE 5: LIBRARY SYNTHESIS AND SCREENING

This example is illustrated schematically in Figure 9. Briefly, a single population of amine derivatized beads (prepared as described in Example 4) was coupled to glycine. The population was then divided into two equal parts, and each part was labeled with a characteristic oligonucleotide that would uniquely identify the bead subpopulation. The subpopulation that had been labeled with an oligonucleotde 95 bases in length (the 95 mer described in Example 4) was subsequently coupled to the peptide YGGFL. The population of beads that had been

labeled with an oligonucleotide 110 bases in length (the 110 mer described in Example 4) was coupled to the peptide FLFLF. (SEQ ID NO:16) The beads were then mixed in the ratio of twenty FLFLF/110 mer beads for each YGGFL/95 mer bead (i.e., 20:1) and stained with a fluorescently labeled antibody (3E7) that binds the peptide sequence YGGFL with high affinity. Individual fluorescently stained beads and unstained beads were sorted directly into PCR tubes. Upon PCR, all the fluoresently stained beads gave rise to a fragment of amplified DNA 95 base pairs in length, and all the unstained beads gave rise to a fragment 110 base pairs in length.

A. Peptide Coupling Step #1

To Fmoc-Gly (Fmoc = 9-fluorenylmethoxycarbonyl amine protecting group; 0.1 mmole) was added HBTU (0.1 mmole), HOBT (0.1 mmole), 1.0 mL of 10% DMF in methylene chloride, and DIEA (0.3 mmole). After vortex treatment to dissolve the solids, 0.4 mL of the solution containing the activated amino acid was added to 50 mg of diamine derivatized beads. The reaction mixture was vortexed 30 min. and then diluted with DMF, centrifuged, decanted, and the bead pellet washed twice with 1.0 mL of DMF. The coupling reaction was then repeated. The beads were then treated with 1.0 mL of 30% piperidine in DMF with vortexing for 1 hr. to deprotect the glycine amino group.

B. Oligonucleotide Labeling

Two different target oligonucleotides were employed in this experiment: the 95 mer and 110 mer described in Example 4. Half of the bead sample described above (25 mg) was labeled with the 95 mer, and the other half was labeled with the 110 mer. These oligonucleotides are composed of 2'-deoxy-cytidine, thymidine, and 2'-deoxy-7-deaza-adenosine. The oligonucleotides were synthesized with a primary amino group on the 5'-terminus (MMT-C12-Aminomodifier, Clonetech Laboratories, Inc.). Lyophilized oligonucleotide (1.5 nmole) was dissolved in 10 µL of 0.5 M Na-phosphate, pH 7.7, and the solution was then treated with 20 µL of 0.2 M disuccinimydylsuberate (DSS). The reaction proceeded 10 min., and then, 70 µL of ice-cold water were added. Unreacted DSS was removed by centrifugation. The supernatant was passed through a G-25 spin column that had been equilibrated with water. The eluant was immediately frozen and lyophilized to isolate the 5'-N-hydroxysuccinamide ester of the oligonucleotide. This activated oligonucleotide was dissolved in 100 µL of 0.1 M Na-phosphate, pH 7.5, which

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4996

contained 0.1 mg/mL of sonicated salmon sperm DNA. This solution was added to 25 mg of glycine-coupled beads. After vortex treatment for 3 hr., the beads were washed twice with 0.4 mL of 0.1 M Na-phosphate, pH 7.5, and twice with 0.4 mL of 0.1 N NaOH. Finally, the beads were washed three times with 0.4 mL of pH 7.5 buffer.

C. Peptide Coupling Step #2

To Boc-YGGFL or Boc-FLFLF (Boc = t-butoxy-carbonyl amine protecting group; 0.02 mmole) was added HBTU (0.02 mmole), HOBT (0.02 mmole), 0.190 mL of 10% DMF in methylene chloride, and DIEA (0.06 mmole). After vortextreatment to dissolve the solids, the solution was diluted ten-fold in 10% DMF in methylene chloride. An aliquot of this solution (0.345 mL) was added to the glycine-coupled and oligonucleotide-labeled beads (25 mg). The solution containing Boc-YGGFL was added to beads labeled with the 95 mer, and the solution containing Boc-FLFLF was added to beads labeled with the 110 mer. The reaction mixtures were vortexed 30 min. and then diluted with DMF, centrifuged, decanted, and the bead pellets washed three times with 1.0 mL of THF. The Boc protecting groups were removed by treating the beads with 0.4 mL of 95% trifluoroacetic acid for 10 min. The deprotection reaction was then diluted with THF, centrifuged, decanted, and the beads washed three times with 1.0 mL of DMF. Finally, the beads were washed three times with 0.5 mL of 0.1 M Na-phosphate, pH 7.5, and stored as a slurry (10 mg/mL).

D. Mixing, Staining, and Sorting

The beads coupled to the 110 mer and FLFLF were mixed with the beads that were coupled to the 95 mer and YGGFL in the ratio of 20:1. Thus, 0.1 mg of 95 mer/YGGFL beads (2 million beads) were mixed with 2.0 mg of the 110 mer/FLFLF beads (40 million beads). The mixture was suspended in blocking buffer (PBS, 1% BSA, 0.05% Tween-20) and incubated at room temperature for 1 hr. The beads were next pelleted by centrifugation and resuspended in a solution of an FITC-labeled monoclonal antibody (3E7) that recognizes the peptide sequence YGGFL (1 μg/mL). The suspension was incubated 0.5 hr. on ice and then centrifuged to isolate the bead pellet.

The beads were resuspended in PBS for delivery into the fluorescence activated cell sorting (FACS) instrument (Becton Dickinson FACSORT Plus). Beads that had bound to the fluorescently labeled antibody were identified by their

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
4997

acquired fluorescence (see Figure 10), and homogeneous samples of either fluorescent or non-fluorescent beads were isolated by sorting into PCR tubes. One, ten, or one hundred beads of each type were sorted into each PCR tube.

E. PCR of Sorted Beads

To each PCR tube containing a bead, or beads, was added 25 µL of PCR mix (20 mM Tris-HCl, pH 8.7, 10 mM KCL, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2 mM $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100, 0.14 mg/mL BSA, 200 µM dATP, 200 µM dGTP, 200 µM dCTP, 200 µM dTTP, 2 µM of each primer (as described in Example 4), and 0.5 units of Pfu DNA polymerase). Reactions were subjected to 40 cycles of 95°C for 0.5 min., 55°C for 1 min., and 72°C for 1 min. Gel loading dye (2 µL) was added to 10 µL of each PCR and the sample run on a 2% low melting point agarose gel. DNA fragments were visualized by staining with ethidium bromide and exposure to UV light. Six single bead samples, three 10 bead samples, and three 100 bead samples were amplified from both the fluorescent and non-fluorescent populations. All the bead samples from the flourescent population produced only DNA fragments 95 base pairs in length, and all the samples from the non-fluorescent population produced only fragments 110 base pairs in length (see Figure 11).

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: DOWER, WILLIAM J
BARRETT, RONALD W
GALLOP, MARK A
NEEDELS, MICHAEL C

(ii) TITLE OF INVENTION: METHOD OF SYNTHESIZING DIVERSE COLLECTIONS OF OLIGOMERS

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 16

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
(A) ADDRESSEE: TOWNSEND AND TOWNSEND
(B) STREET: 1 MARKET PLAZA, STEUART TOWER, SUITE 2000
(C) CITY: SAN FRANCISCO
(D) STATE: CALIFORNIA
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 94105

(v) COMPUTER READABLE FORM:
(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER:
(B) FILING DATE:
(C) CLASSIFICATION:

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
(A) NAME: Smith, William M.
(B) REGISTRATION NUMBER: 30,223
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 11509-36-1

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
(A) TELEPHONE: 415-543-9600
(B) TELEFAX: 415-543-5043

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 111 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

CTTTCTTCCT CTCCCTCTTT TCTCCTCTCT TTTTTTCTCC TTCTTTTTTT CTCTCCCTCT 60

CTCCTCTCTC CCCTTTCTCT CCTTTCCTCC TCTCCTCTCT CTCTTCTTTC C 111

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 111 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

CTTTCTTCCT CTCCCTCTTT TCTCCTCTTC TTTTTTCTCC TTTCTTTTTT CTCTCCCTCT 60

CTCCTCTCTC CCCTTTCTCT CCTTTCCTCC TCTCCTCTCT CTCTTCTTTC C 111

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 115 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

CTTTCTTCCT CTCCCTCTTT TCTCCTCTTT CTTTTTCTCC TTTTCTTTTT CTCTCCCTCT 60

CTCCTCTCTC TCTTCCTTTC CCCTCTCTCT CTCCTCTCCT CTCTCTCTTC TTTCC 115

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 115 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

CTTTCTTCCT CTCCCTCTTT TCTCCTCTTC TTTTTTCTCC TTTCTTTTTT CTCTCCCTCT 60

CTCCTCTCTC TCTTCCTTTC CCCTCTCTCT CTCCTCTCCT CTCTCTCTTC TTTCC 115

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 23 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

GGAAAGAAGA GAGAGAGGAG AGG 23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 18 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

AGAGAGGGGA AAGGAAGA 18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 18 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

AGGAAAGGAG AGAAAGGG 18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 95 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

CCACTCACTA CCACTCTACT ATAACCACCC CTTCCTATTC CAAAATTACA AACTTATCTC 60

AACTACATCT CACACTCACT CATCTCTACA TCTAC 95

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 110 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

CCACTCACTA CCACTCTACT ATAACCCTCC CCTATTCCAA AATTACATCC TATTCCAAAA 60

TTACAAACTT ATCTCAACTA CATCTCACAC TCACTCATCT CTACATCTAC 110

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 4 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

Gly Gly Phe Leu
1

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 4 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

Pro Gly Phe Leu
1

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 5 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

Tyr Gly Gly Phe Leu
1 5

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5003

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 5 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

Tyr Pro Gly Phe Leu
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 5 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

Pro Gly Gly Phe Leu
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 5 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

Pro Pro Gly Phe Leu
1 5

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5004

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 5 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

Phe Leu Phe Leu Phe
1 5

WE CLAIM:

1. A synthetic oligomer library comprising a plurality of different members, each member comprising an oligomer composed of a sequence of monomers linked to one or more identifier tags identifying the sequence of monomers in said oligomer.

2. The library of claim 1, wherein said linkage between said oligomer and said identifier tag comprises a solid support.

3. The library of claim 2, wherein said linkage between said oligomer and said identifier tag comprises a linker between said identifier tag and said solid support and a linker between said solid support and said oligomer.

4. The library of claim 1, wherein said linkage between said oligomer and said identifier tag comprises a linker between said oligomer and said identifier tag.

5. The library of claim 2, wherein said linkage between said oligomer and said identifier tag comprises a linker joining said oligomer and said identifier tag to which linker said solid support is also joined.

6. The library of claim 1, wherein said linker comprises a first bead linked to a second bead, wherein said oligomer is attached to the first bead and said identifier tag is attached to the second bead.

7. The library of claim 1, wherein said identifier tag is attached to said oligomer.

8. The library of claim 1 that has about 10^6 different members.

9. The library of claim 1, wherein said oligomer is a peptide.

10. The library of claim 1, wherein said identifier tag is a fluorescent marker.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5006

11. The library of claim 1, wherein said identifier tag is an oligonucleotide.

12. The library of claim 2, wherein:
i) the library has greater than about 10^6 members;
ii) the oligomer is a peptide; and
iii) the identifier tag is an oligonucleotide.

13. A synthetic oligomer library produced by synthesizing on each of a plurality of solid supports a single oligomer sequence, said oligomer sequence being different for different solid supports, which library is synthesized in a process comprising the steps of:
a) apportioning said supports among a plurality of reaction vessels;
b) exposing said supports in each reaction vessel to a first monomer;
c) pooling said supports;
d) apportioning said supports among a plurality of reaction vessels;
e) exposing said supports in each reaction vessel to a second monomer; and
f) repeating steps a) through e) from at least one to twenty times.

14. A tagged synthetic oligomer library produced by synthesizing on each of a plurality of solid supports a single oligomer sequence and one or more identifier tags identifying said oligomer sequence, said oligomer sequence and identifier tags synthesized in a process comprising the steps of:
a) apportioning said supports among a plurality of reaction vessels;
b) exposing said supports in each reaction vessel to a first oligomer monomer and to a first identifier tag;
c) pooling said supports;
d) apportioning said supports among a plurality of reaction vessels;

e) exposing said supports to a second oligomer monomer and to a second identifier tag monomer; and

f) repeating steps a) through e) from at least one to twenty times.

15. The library of claim 14, wherein said oligomer sequence is a peptide, and said identifier tag is an oligonucleotide.

16. The library of claim 15, wherein said identifier tag comprises purine analog bases.

17. The library of claim 14, wherein said oligomer is cleaved from the solid support after completion of oligomer synthesis.

18. A method of preparing a tagged synthetic oligomer library comprising a plurality of different members, each member comprising a solid support having attached a single oligomer sequence and one or more identifier tags identifying said oligomer sequence, said method comprising the steps of:

a) apportioning said supports among a plurality of reaction vessels;

b) reacting said supports in each reaction vessel with a first oligomer monomer;

c) reacting said supports in each reaction vessel with a first identifier tag;

d) pooling said supports;

e) apportioning said pooled supports among a plurality of reaction vessels;

f) reacting said pooled supports in each reaction vessel with a second oligomer monomer;

g) reacting said pooled supports in each reaction vessel with a second identifier tag; and

h) repeating steps a) through g) from at least one to twenty times.

19. The method of claim 18 wherein said solid supports in each

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5008

reaction vessel are reacted first with said identifier tag and then with said oligomer monomer.

20. A solid support comprising a first particle attached to a second particle, said first particle linked to an oligomer and said second particle linked to an oligonucleotide, and wherein said oligomer is other than an oligonucleotide.

21. A method of recording each step in a sequence of oligomer monomer additions in the synthesis of an oligomer library, the method comprising adding an identifier tag in conjunction with the addition of each monomer, and performing at least two cycles of monomer and tag addition, thereby forming a series of identifier tags identifying said oligomer sequence.

22. The method of claim 21, wherein said identifier tag monomer is a fluorescent marker.

23. The method of claim 21, wherein said identifier tag monomer is a nucleotide or oligonucleotide.

24. The method of claim 23, wherein said oligomer monomer is an amino acid, peptide, or combination thereof.

25. The method of claim 24, further comprising the steps of amplifying said identifier tag sequence, thereby forming an amplified identifier tag; and sequencing said amplified identifier tag.

26. The method of claim 21,wherein after the addition of a first identifier tag, subsequent identifier tags are attached to the terminus of a preexisting tag.

27. A method of synthesizing a peptide and an oligonucleotide on a solid support, said method comprising:

a) preparing a bifunctional solid support containing a first type of active site blocked with a first type of protecting group and a second type of active site blocked with a second type of protecting group;

b) reacting said solid support with an activator to remove said first type of protecting group thereby exposing said first type of active site;

c) coupling an oligonucleotide monomer or an oligonucleotide to said first type of active site;

d) reacting said solid support with an activator to remove said second type of protecting group thereby exposing said second type of active site;

e) coupling a peptide monomer or peptide to said second type of active site; and

f) repeating steps (b) through (e) from one to twenty times.

28. The method of claim 27, wherein said solid support comprises polystyrene/polydivinylbenzene/polymethylmethacrylate COOH beads.

29. The method of claim 27, wherein said bifunctional solid support contains an amine active site and a hydroxyl active site.

30. The method of claim 27, where said bifunctional solid support is produced by:

(a) derivatizing polystyrene/polydivinylbenzene/ polymethylmethacrylate COOH beads with a 4,9-dioxa-1,12-dodecanediamine linker;

(b) treating said beads with 4-Fmoc-aminobutyric acid and 4-p,p'-dimethoxytrityl-hydroxybutyric acid in the presence of HBTU, HOBt and DIEA.

31. The method of claim 27, wherein said oligonucleotide is assembled using 3'-(allyl N,N'-diisopropyl-phosphoramidites) of 5'-DMT derivatives of:

(a) N^6-(allyloxy)carbonyl-7-deaza-2'deoxyadenosine;

(b) N^4-(allyloxy)carbonyl-2'deoxycytidine;

(c) N^2-(allyloxy)carbonyl-7-deaza-2'deoxyguanosine; and

(d) thymidine.

32. The method of claim 27, wherein said oligonucleotide is assembled using photochemically removable protecting groups on said nucleotides.

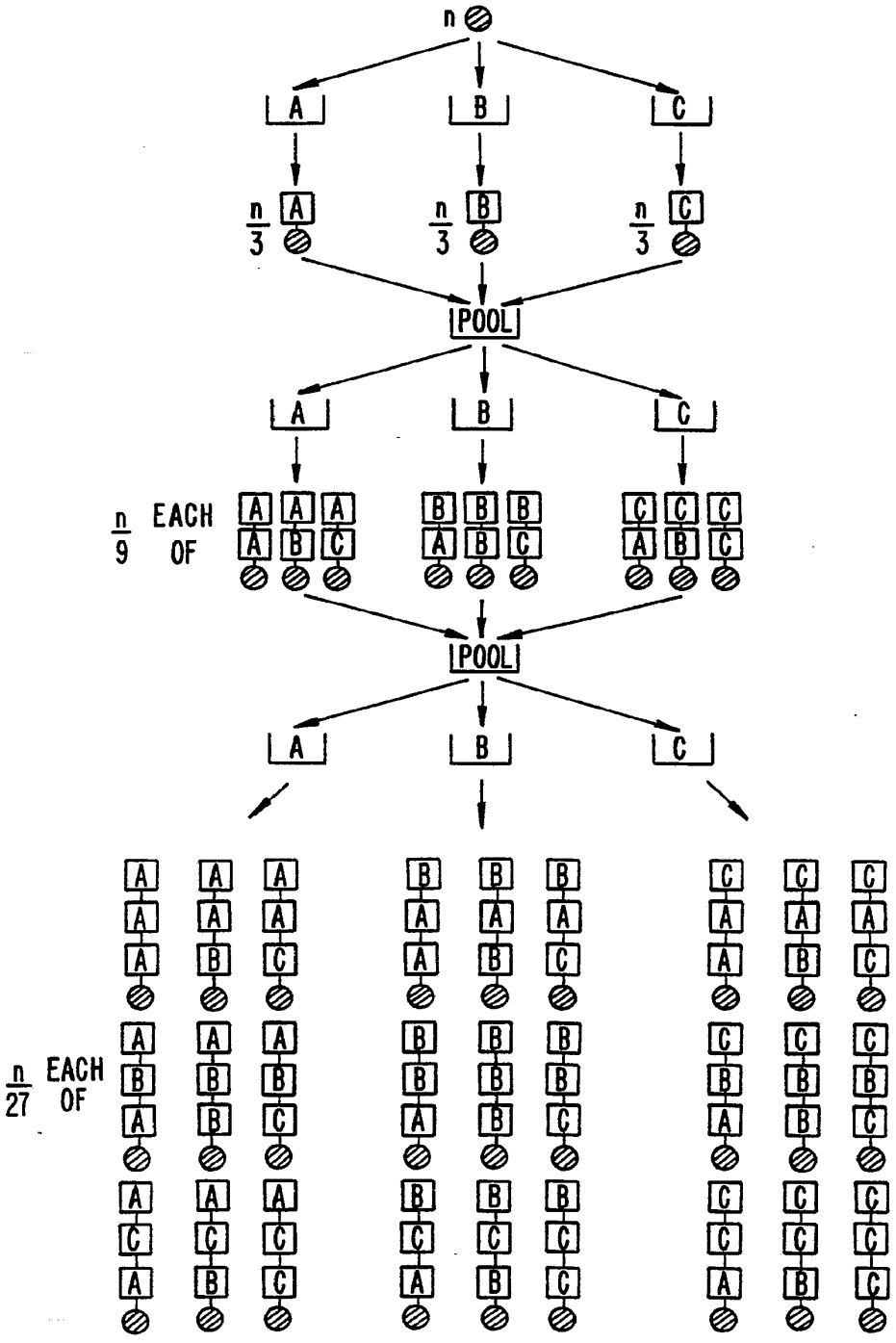


FIG. 1.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5011

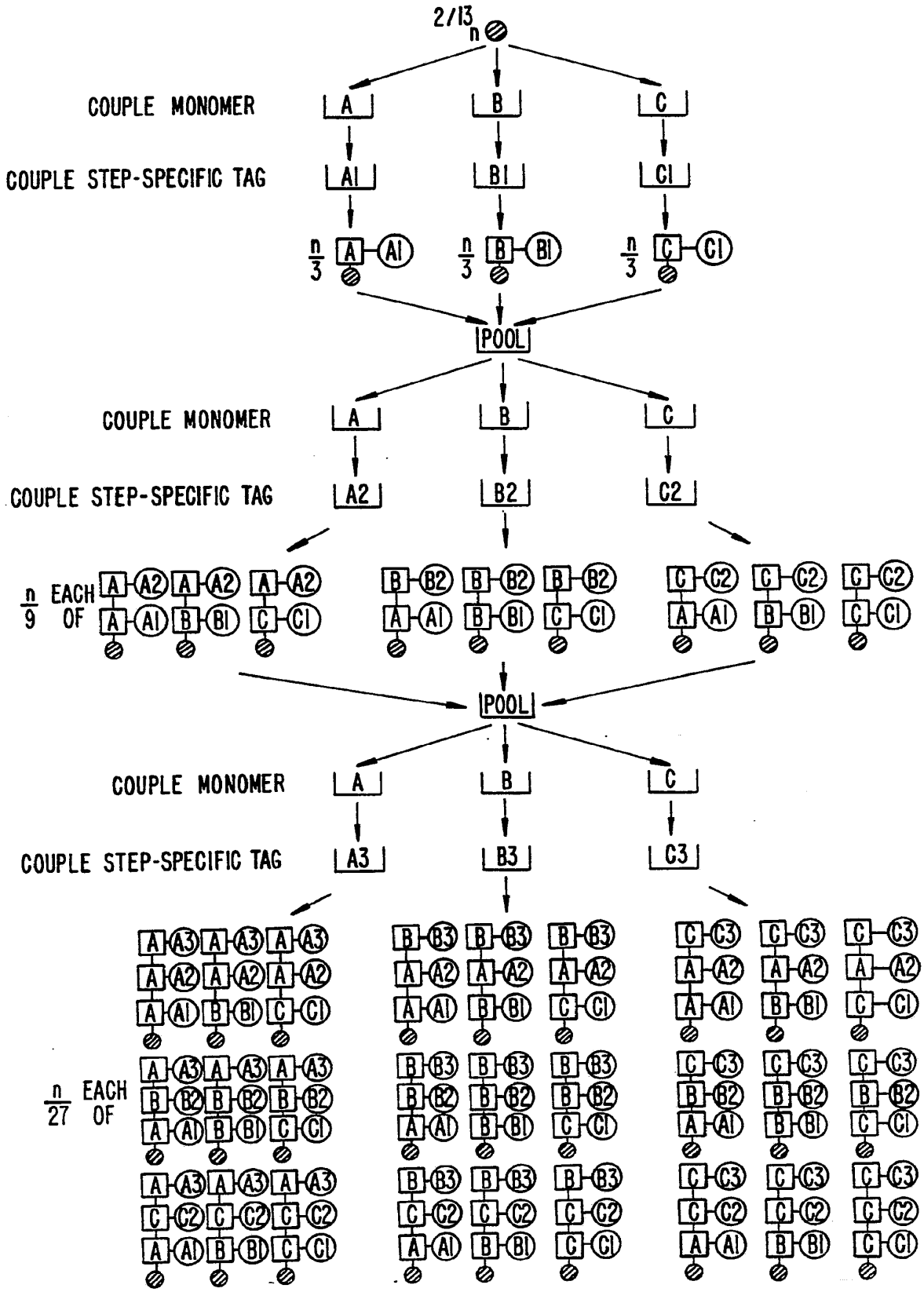


FIG. 2.

SUBSTITUTE SHEET

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5012

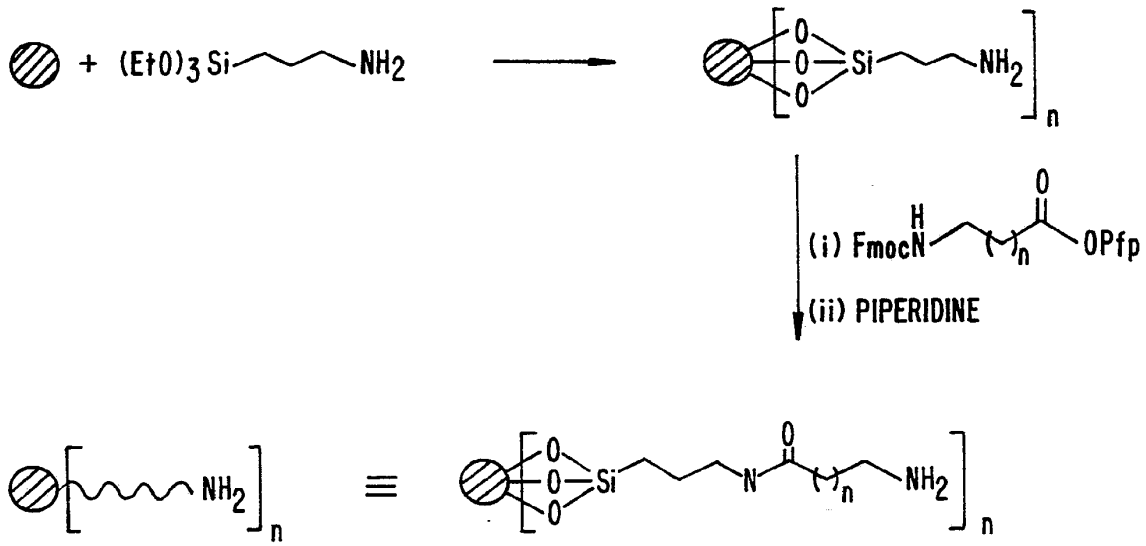


FIG. 3.1

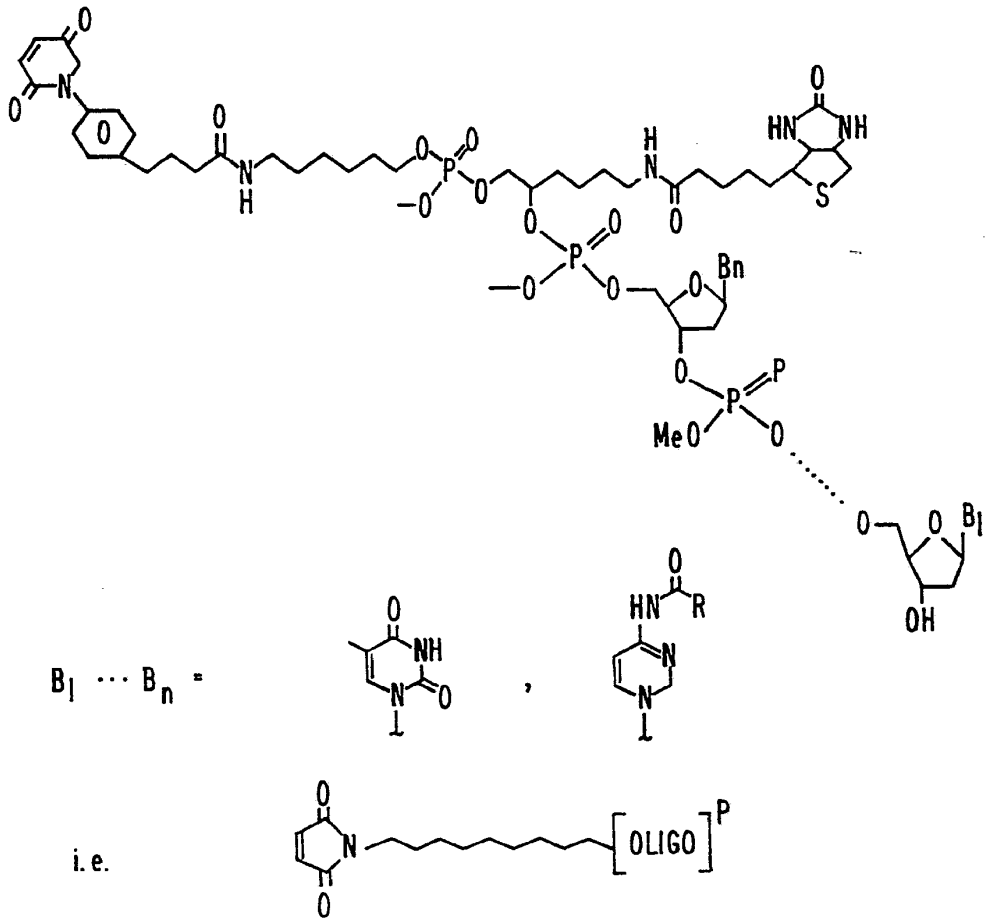


FIG. 3.2

SUBSTITUTE SHEET

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5013

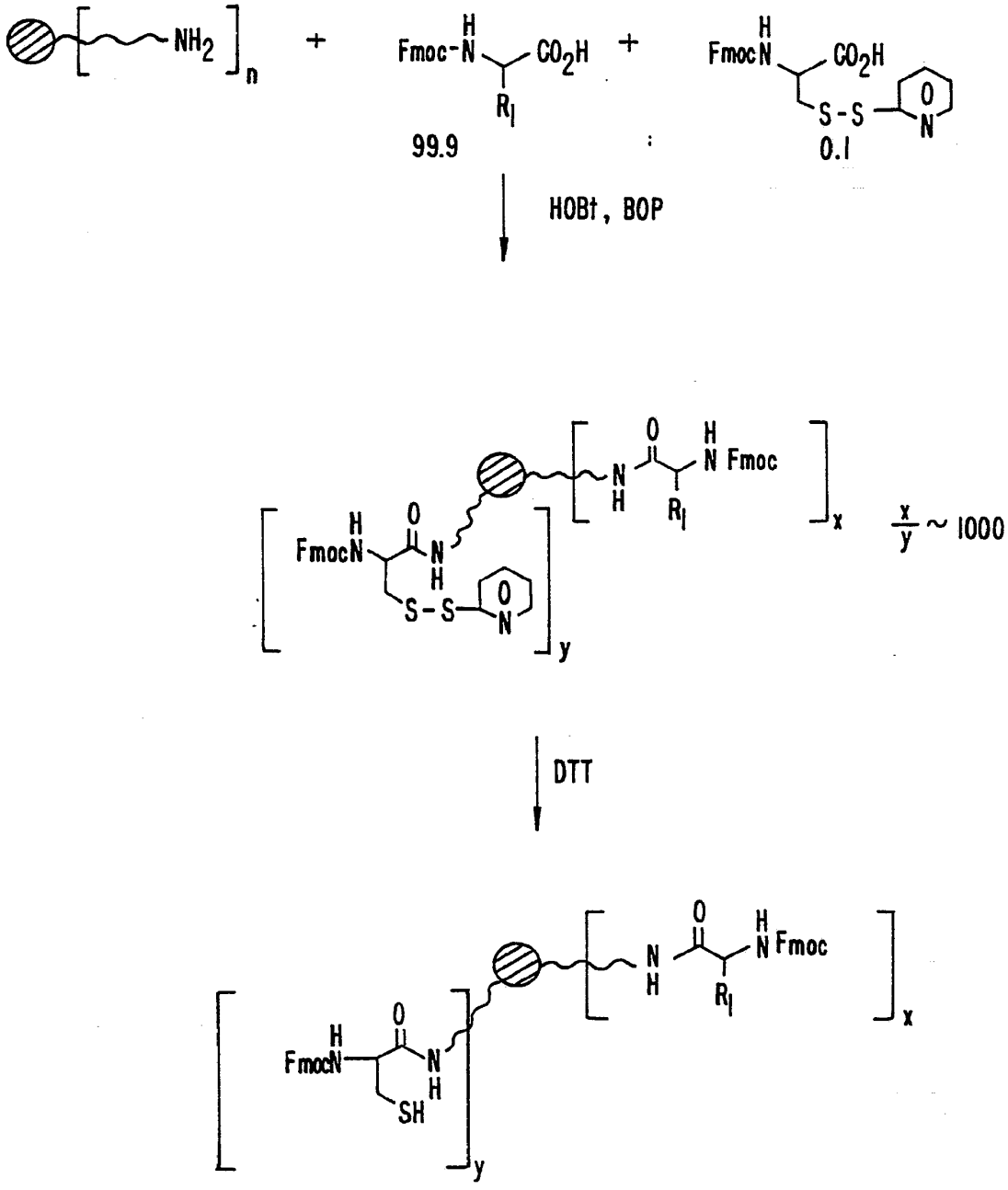


FIG. 3.3

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5014

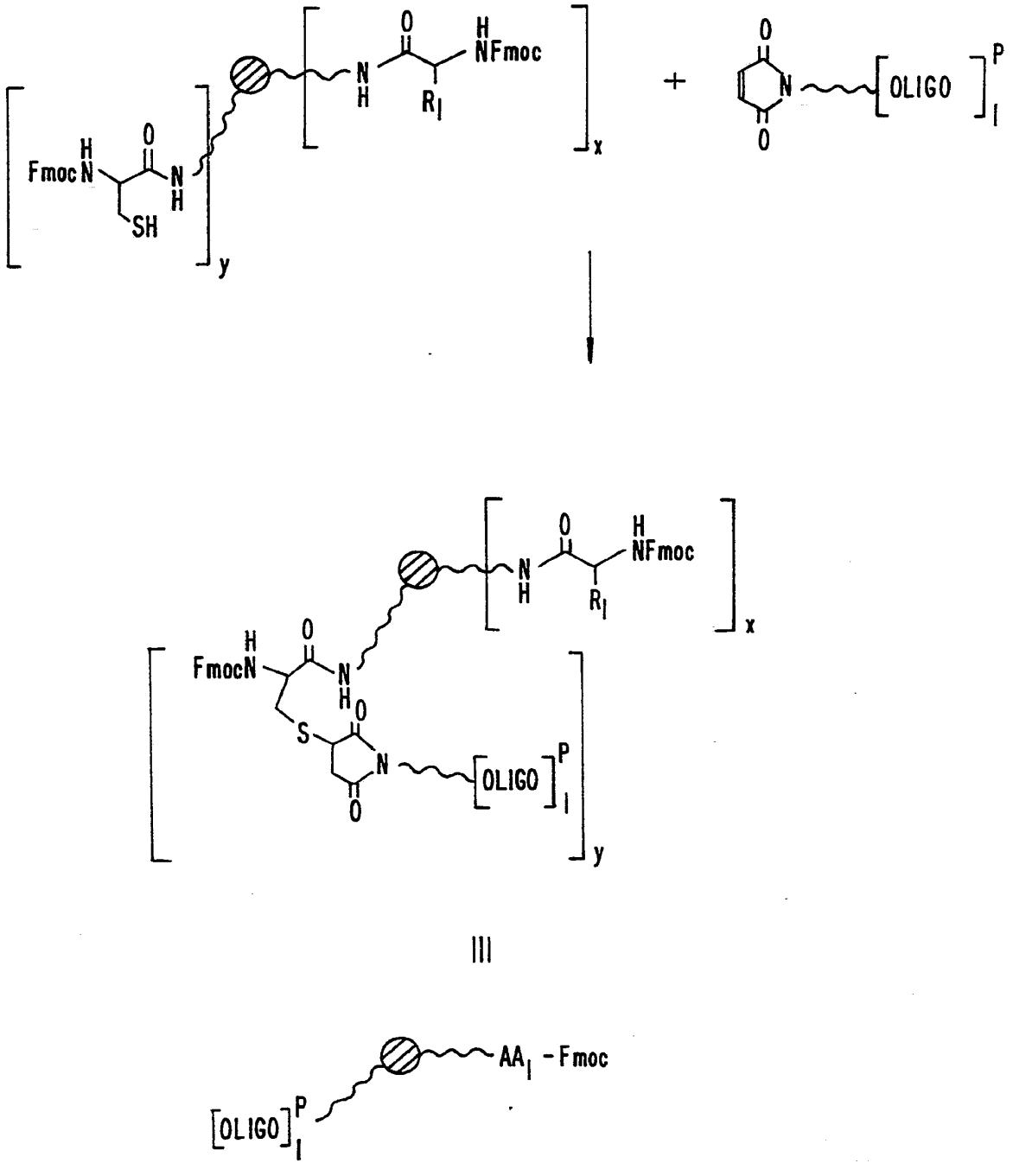


FIG. 3.4

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5015

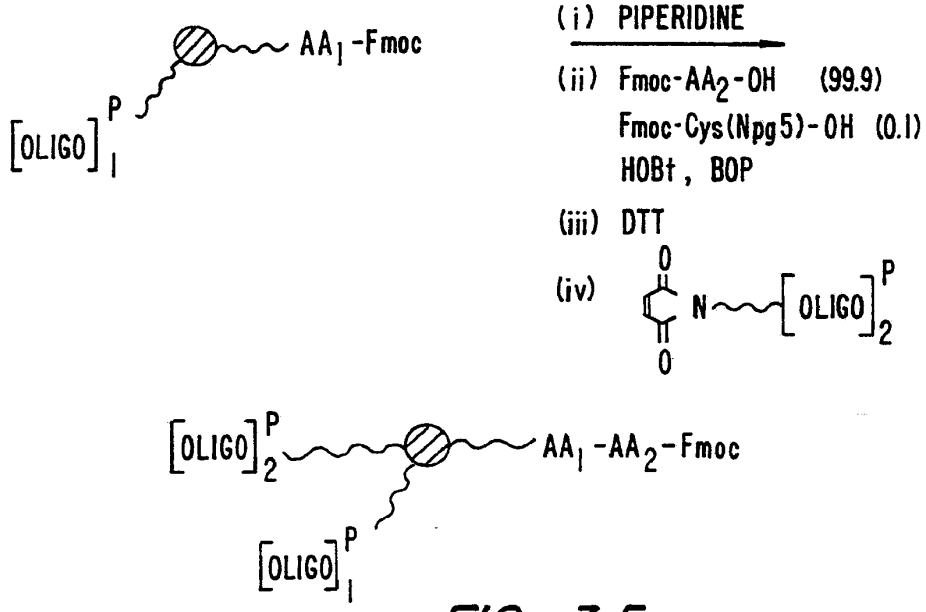


FIG. 3.5

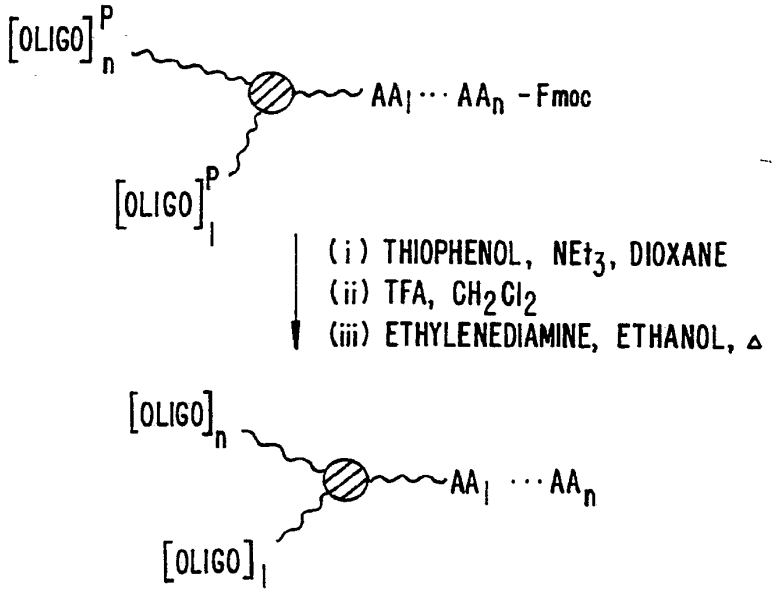


FIG. 3.6

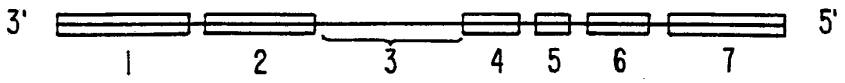


FIG. 4.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5016

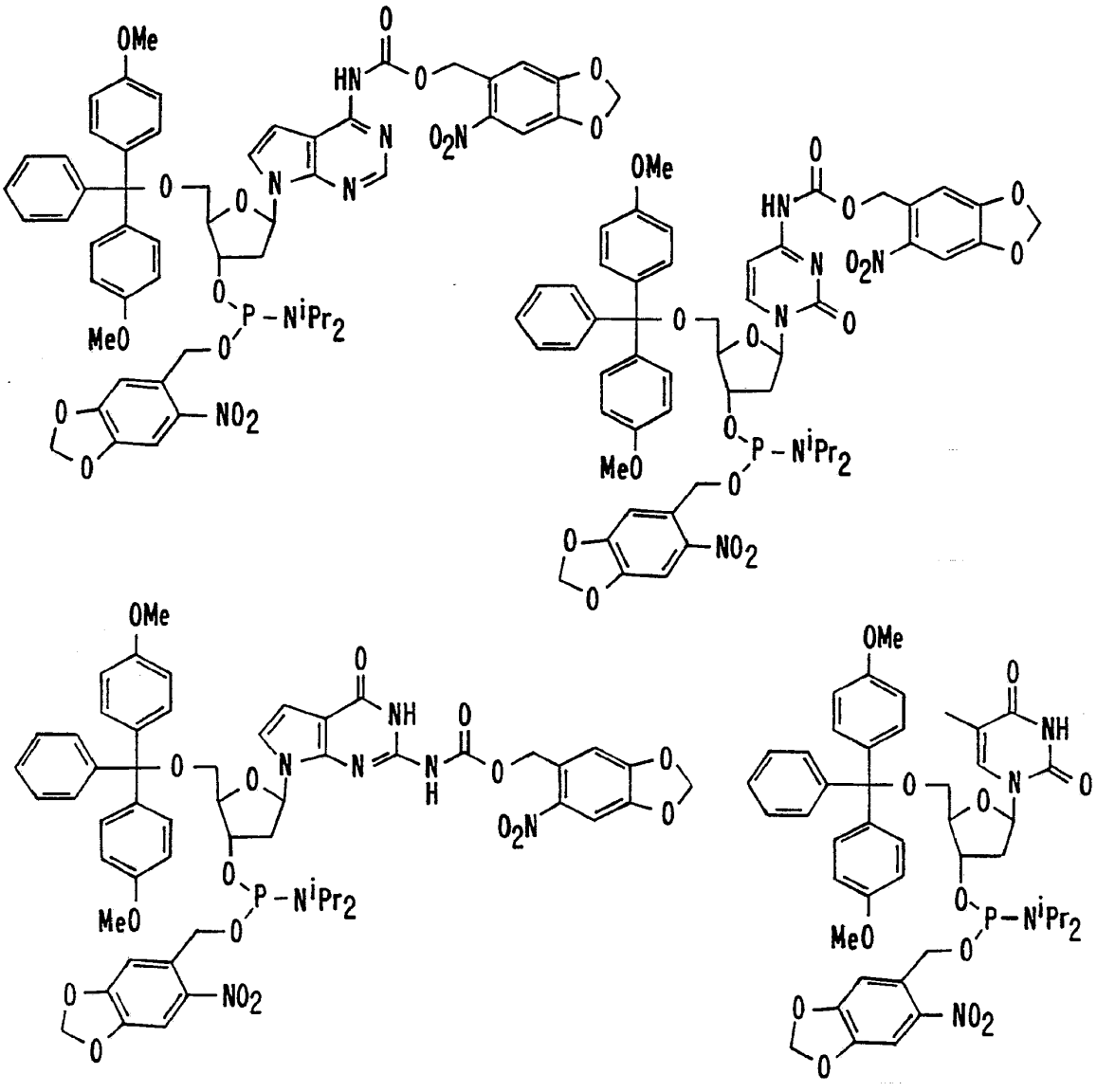


FIG. 5.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5017

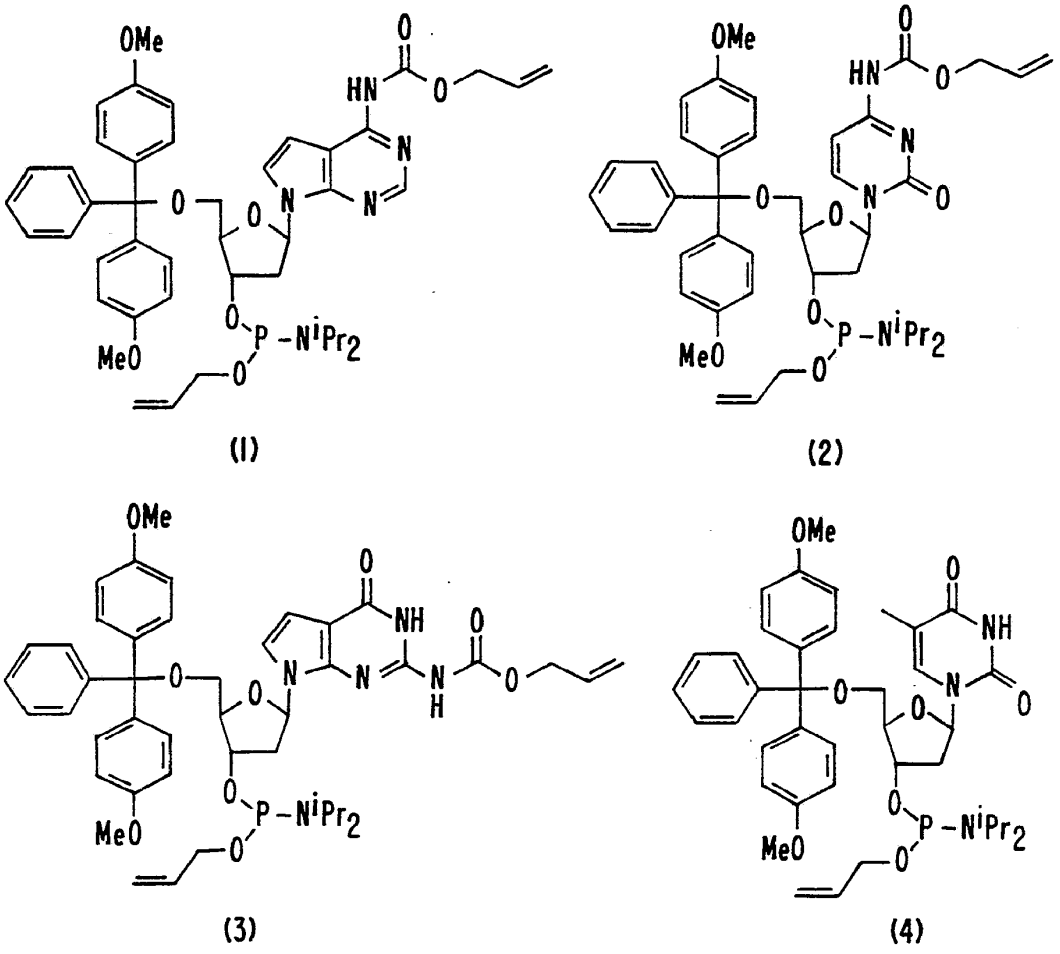


FIG. 6.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5018

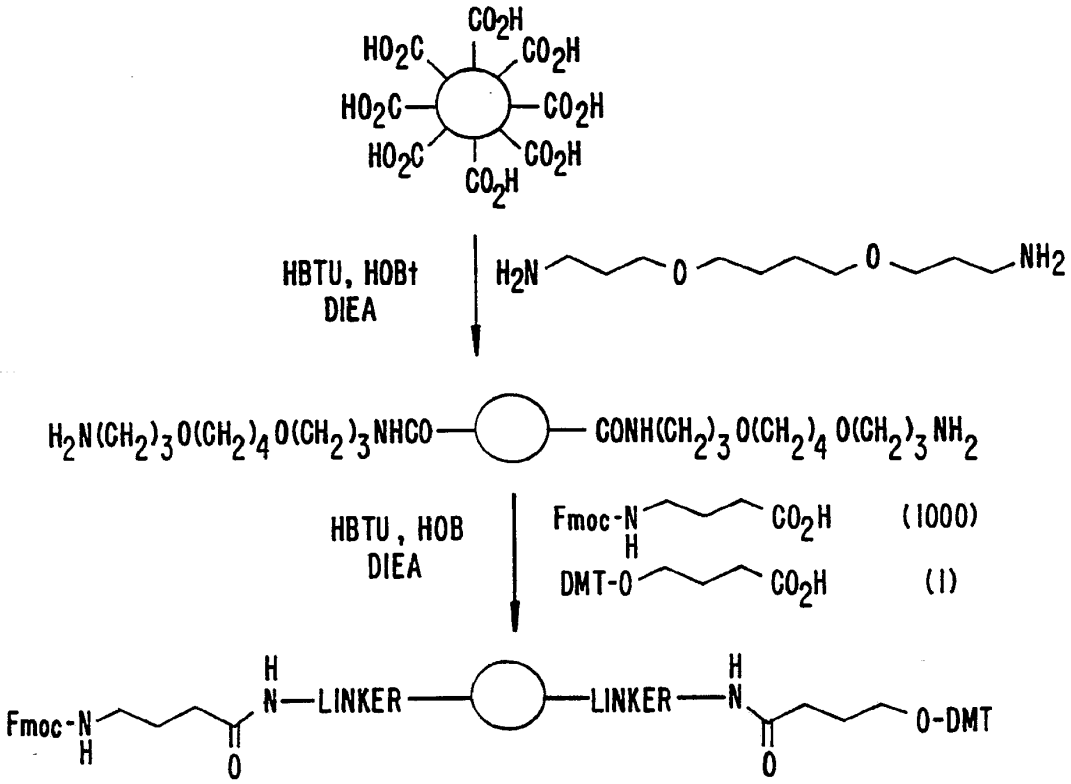


FIG. 7.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5019

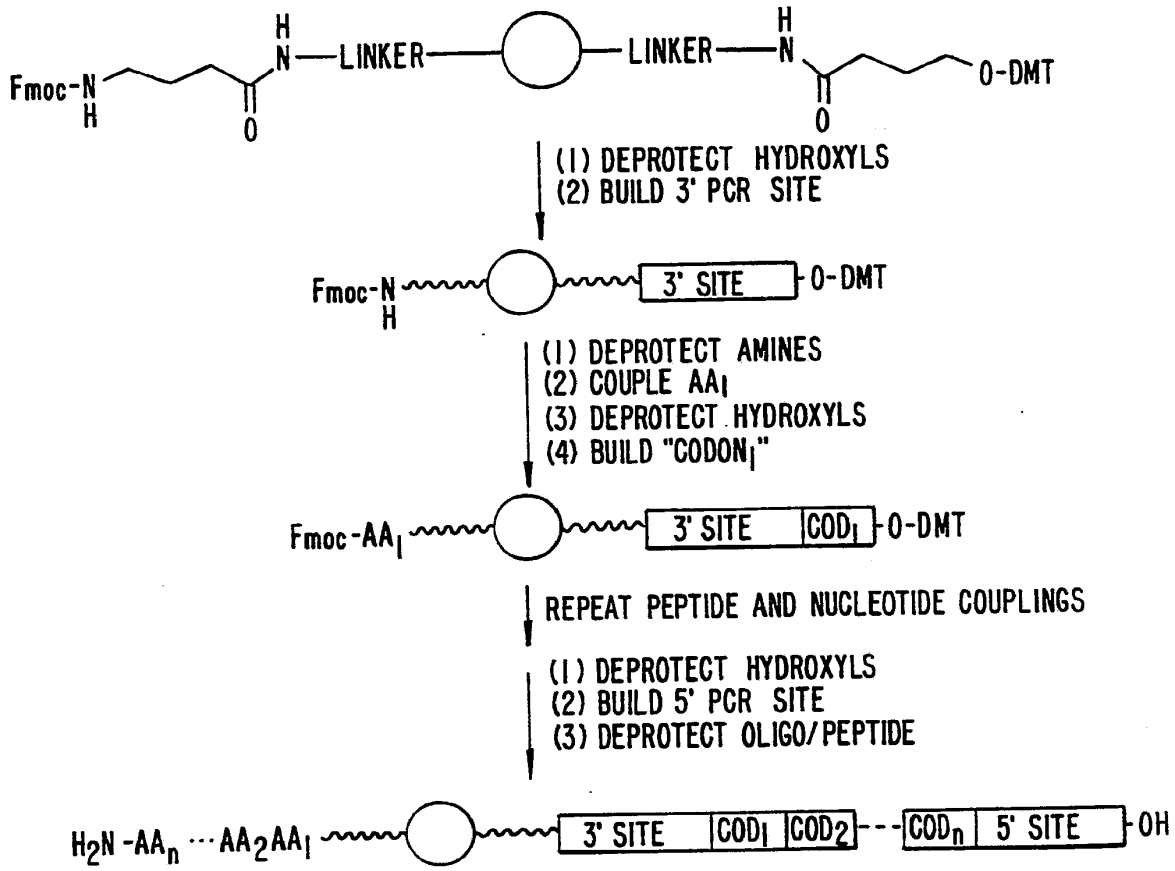


FIG. 8.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5020

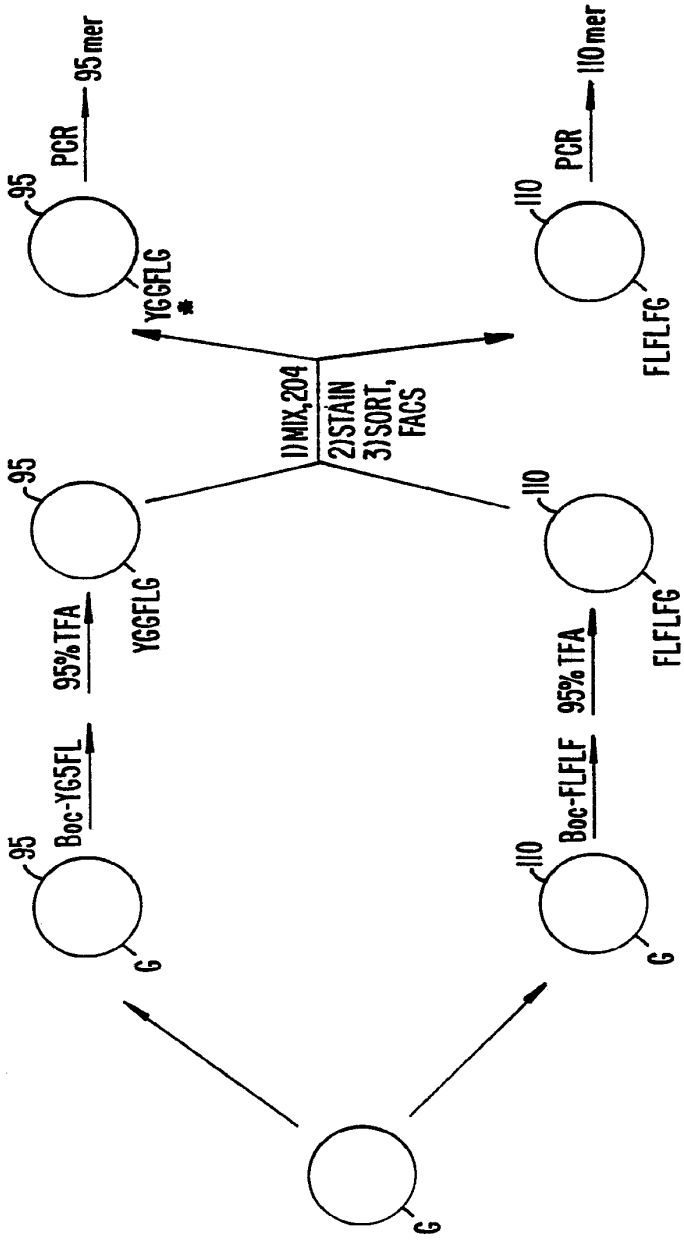


FIG. 9.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5021

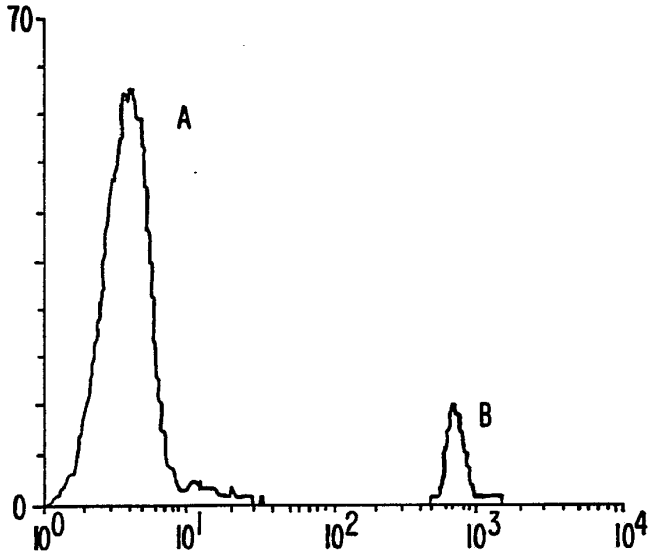


FIG. 10.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5022

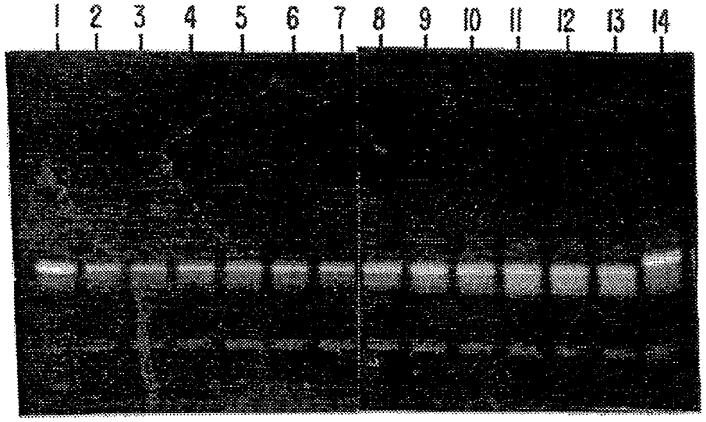


FIG. IIA.

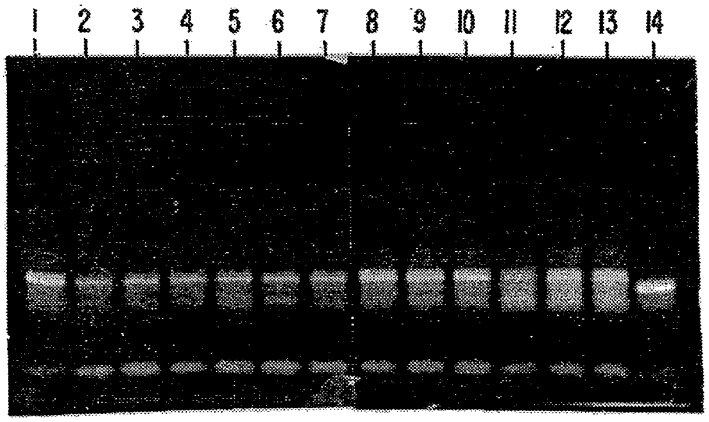


FIG. IIB.

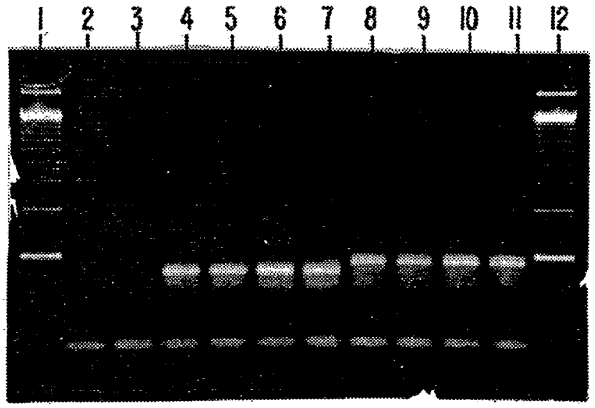


FIG. IIC.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5023

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US92/07815

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(5) :C07H 21/00; C07K 1/04, 1/06, 5/10, 7/06; C12N 15/10, 15/11
US CL :536/27; 435/91; 530/334, 335
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 536/27; 435/91; 530/334, 335

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Please See Extra Sheet.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Vol. 81, issued July 1984, Geysen et al, "Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid", pages 3998-4002, see Abstract.	1-7, 9, 12-14, 18, 19, 21, 24, 26
Y	Science, Vol. 251, issued 15 February 1991, Fodor, et al, "Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis", pages 767-773, see especially Figures 3 and 6.	1-10, 13, 17-19, 21, 22, 24, 32
Y,P	Nature, Vol. 354, issued 07 November 1991, Lam et al, "A new synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity", pages 82-84, see especially Figure 1.	1-10, 13, 14, 17-19, 21, 22, 24
Y	US, A, 4,713,326 (Dattagupta et al) 15 December 1987, see Abstract.	20, 27-30
Y	US, A, 4,818,681 (Dattagupta) 04 April 1989, see especially columns 5 and 6.	20, 27-31

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance

"E" earlier document published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 December 1992

Date of mailing of the international search report
14 DEC 1992

Name and mailing address of the ISA/
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231
Facsimile No. NOT APPLICABLE

Authorized officer
DAVID SCHREIBER

Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US92/07815

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 4,855,225 (Fung et al) 08 August 1989, see entire document.	10, 22
Y	US, A, 4,882,269 (Schneider et al) 21 November 1989, see Abstract and Figure 1.	11, 12, 15, 16, 20, 23, 25, 26, 27

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5025

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US92/07815

B. FIELDS SEARCHED
Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

CAS, MEDLINE, APS, BIOSIS, WORLD PATENT INDEX,
search terms: propyl phosporamidite, solid phase, peptide, oligonucleotide, polynucleotide, polymerization, synthesis, random, separation, purification, photochemical, protection, removal, dodecanediamine, linker, crosslink, FMOC, dimethoxytrityl, HBTU, HOBT, DIEA

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5026

PCT WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 5 : C07K — A2

(11) International Publication Number: WO 93/24517

(43) International Publication Date: 9 December 1993 (09.12.93)

(21) International Application Number: PCT/HU93/00030

(22) International Filing Date: 20 May 1993 (20.05.93)

(30) Priority data:
P 92 01687 21 May 1992 (21.05.92) HU

(71)(72) Applicants and Inventors: FURKA, Árpád [HU/HU]; Csengery u. 23, H-1074 Budapest (HU). SEBESTYÉN, Ferenc [HU/HU]; Bácskai u. 44, H-1145 Budapest (HU).

(74) Agent: SOMFAI & PARTNERS; Industrial Rights Co. Ltd., Pozsonyi út 38.II.5., H-1137 Budapest (HU).

(81) Designated States: AU, CA, JP, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Published
Without international search report and to be republished upon receipt of that report.

(54) Title: PEPTIDE SUB-LIBRARY KITS

(57) Abstract

The subjects of the invention are kits comprising free or support bound peptide mixtures (sub-libraries) as components, methods for their preparation and method for their use in discovery of bioactive peptides as potential drugs. Groups of free peptide mixtures (sub-libraries) forming components of the kit may carry different color or fluorescent labels facilitating their identification. The solid support in kits comprising support bound peptides may carry color or fluorescent labels as well, but the size or the specific gravity of the beads are also used as markers. The kits can be applied in all kinds of biological screening tests, including binding tests with macromolecules (like proteins), cells or tissues. The amino acid sequences of bioactive peptides can generally be determined in three stages: (i) determination of amino acid occurrence list by use of amino acid tester sub-kit, (ii) determination of occurrence library by use of the first sub-kit, and (iii) determination of sequences by use of second sub-kits.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5027

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	FR	France	MR	Mauritania
AU	Australia	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	United Kingdom	NL	Netherlands
BE	Belgium	GN	Guinea	NO	Norway
BF	Burkina Faso	GR	Greece	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	HU	Hungary	PL	Poland
BJ	Benin	IE	Ireland	PT	Portugal
BR	Brazil	IT	Italy	RO	Romania
CA	Canada	JP	Japan	RU	Russian Federation
CF	Central African Republic	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CG	Congo			SE	Sweden
CH	Switzerland	KR	Republic of Korea	SK	Slovak Republic
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kazakhstan	SN	Senegal
CM	Cameroon	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CS	Czechoslovakia	LK	Sri Lanka	TD	Chad
CZ	Czech Republic	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	UA	Ukraine
DK	Denmark	MG	Madagascar	US	United States of America
ES	Spain	ML	Mali	VN	Viet Nam
FI	Finland	MN	Mongolia		

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5028

Peptide sub-library kits.

The subject of the invention comprises special peptide kits, processes for their synthesis and methods for their application in identification of biologically active peptides (named "domino strategy") which can be utilized as potential drugs. Components of the kits are multicomponent mixtures of free or support bound peptides or peptide derivatives. Submission in logical order of components of the kits to binding experiments with living cells, tissues or proteins or execution of other kinds of biological or biochemical tests, and evaluation of their result, makes possible to determine the amino acid sequence of the bioactive peptides.

The invention is based on the highly efficient synthetic method introduced by the inventors and their colleagues: (i) Furka et al. Abstr. 14th Int. Congr. Biochem., Prague, Czechoslovakia, 1988, Vol 5, p. 47.; (ii) Furka et al. Abstr. 10th Int. Symp. Med.Chem., Budapest, Hungary, 1988, p. 288.; (iii) Furka et al. Int. J. Peptide Protein Res., 1991, 37, 487-493. This "portioning-mixing" method makes possible to prepare in a couple of days multicomponent peptide mixtures comprising, for example, all possible sequences of: tripeptides (8 thousand), tetrapeptides (160 thousand), pentapeptides (3.2 million) etc. It is a characteristic feature of this solid phase method that all peptide molecules formed on one bead of the solid support have the same sequence.

Later on Lam et al. (Nature, 1991, 354, 82-84) published a method identical with that of ours for the synthesis of support bound peptide mixtures and developed an identification procedure based on specific binding of protein molecules to the bead carrying the bioactive peptide, and determination of the sequence of the active peptide by using a sequenator. Houghten and his colleagues (Nature, 1991, 354, 85-86) described a slightly modified version of our synthetic method together with an iterative identification procedure applicable for mixtures of free peptides.

Fodor et al. (Science, 1991, 251, 767-773) also developed a new synthetic and identification method in which the peptides were synthesized in different but predetermined locations on the surface of a glass

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5029

microscope slide. In the method of Scott and Smith (Science,1990, 249, 386-390) the peptide sequences are expressed on the surface of phage after inserting into its genome random nucleotide sequences.

Definitions and notations. The multicomponent peptide mixtures are usually called *peptide libraries*. Libraries synthesized by the "portioning-mixing" method can be deduced by varying amino acids in the different positions of peptides. This is experimentally accomplished by repeating the following operations: (i) dividing the support before coupling into equal portions, (ii) coupling a different amino acid to each portion, then (iii) mixing the portions. Before describing the invention in details some additional definitions are introduced.

The name *normal library* is used for mixtures formed by varying the same number of amino acids in all positions. If this is not the case, one can speak about *general libraries*. *Standard libraries* will represent a special case of the normal libraries where the 20 common amino acids are varied in all positions. Cysteine is often omitted and only the remaining 19 amino acids are varied. These mixtures are named *standard-C libraries*. A special combined library, containing a genetic series of standard libraries will be named *genetic library*. E.g., the genetic pentapeptide library includes all standard libraries from dipeptides to pentapeptides. The use of D-amino acids, derivatives of amino acids or non-common amino acids besides the common ones can be indicated by the name: *extended library*.

Any kind of library - except genetic libraries - may be considered as parent library and can be divided into sub-libraries. *Sub-libraries* are special partial libraries of parent libraries and can be synthesized by omitting the variation of the amino acids in one or more positions, while in the rest of positions they are varied like in the parent library. A non-varied position is occupied by the same amino acid in all peptides. Sub-libraries may be classified according their order: the first, second, third etc. order sub-libraries have one, two, three, etc. non-varied positions, respectively. Table 1 shows how the amino acids are varied in a first order standard pentapeptide sub-library.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5030

Table 1.

c	Varied amino acids
1	A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
2	E
3	A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
4	A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
5	A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y

Table 2 demonstrates variations in a second order general pentapeptide sub-library.

Table 2.

c	Varied amino acids
1	A,C,D,E,F,G,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
2	A
3	L
4	A,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
5	A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y

Examples for the synthesis of both the first and the second order sub-libraries of general libraries were described in the original presentation of the "portioning-mixing" method (cited above) although the terms introduced here were obviously not used.

The number of amino acid units in peptides is denoted by *n*. Coupling positions (*c*) are numbered from the C-terminus to express the order of couplings in the synthesis. The symbol *p* is used to indicate the number of amino acids varied in a coupling position. In the case of normal libraries *p* is constant while in general libraries may vary depending on coupling position. Symbol *k* is used to indicate the order of a sub-library.

Amino acids are denoted by one letter symbols: A (alanine),

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5031

C (cysteine), D (aspartic acid), E (glutamic acid), F (phenylalanine), G (glycine), H (histidine), I (isoleucine), K (lysine), L (leucine), M (methionine), N (asparagine), P (proline), Q (glutamine), R (arginine), S (serine), T (threonine), V (valine), W (tryptophane), Y (tyrosine).

The symbol of sub-libraries comprises one or more pairs of a figure and a capital letter. The figure indicates the non-varied coupling position, while the letter is the symbol of the amino acid occupying it. The symbols of the first order sub-library of Table 1 and of the second order sub-library of Table 2 are 2E and 2A3L, respectively.

The number of peptides (N) in a standard peptide library depends on the number of residues: $N=20^n$, and that in one of its sub-library - in addition to n - depends on the order, too: $N=20^{(n-k)}$. Sub-libraries are classified according to the relative coupling positions of the non varied amino acids. For example, 2E and 2A3L are c 2 type first order and c 2,3 type second order sub-libraries, respectively. The number of types of sub-libraries (T) depends on both the order and the number of residues, and can be expressed by a simple formula.

$$T = \binom{n}{k}$$

For example, there are 10 types of second order pentapeptide sub-libraries which can be classified into two groups (Table 3):

Table 3.

vicinal types:	c	1,2	2,3	3,4	4,5
disjunkt types:	c	1,3	2,4	3,5	
	c	1,4	2,5		
	c	1,5			

Collections of sub-libraries of the same order are called *sub-kits*. The *first order sub-library sub-kits*, alternatively named *first sub-kits* comprise all possible first order sub-libraries of a parent peptide library. The first order sub-library sub-kit (Table 4) belonging to a standard pentapeptide library has 100 components.

Table 4.

1A,1C,1D,1E,1F,1G,1H,1I,1K,1L,1M,1N,1P,1Q,1R,1S,1T,1V,1W,1Y
2A,2C,2D,2E,2F,2G,2H,2I,2K,2L,2M,2N,2P,2Q,2R,2S,2T,2V,2W,2Y
3A,3C,3D,3E,3F,3G,3H,3I,3K,3L,3M,3N,3P,3Q,3R,3S,3T,3V,3W,3Y
4A,4C,4D,4E,4F,4G,4H,4I,4K,4L,4M,4N,4P,4Q,4R,4S,4T,4V,4W,4Y
5A,5C,5D,5E,5F,5G,5H,5I,5K,5L,5M,5N,5P,5Q,5R,5S,5T,5V,5W,5Y

Another sub-kit can be derived by combining those first order sub-libraries which carry identical amino acids in their non-varied coupling position (and are found in a column of Table 4). This sub-kit is named *amino acid tester sub-kit*.

ΣA,ΣC,ΣD,ΣE,ΣF,ΣG,ΣH,ΣI,ΣK,ΣL,ΣM,ΣN,ΣP,ΣQ,ΣR,ΣS,ΣT,ΣV,ΣW,ΣY

A *second order sub-library sub-kit* comprises all possible second order sub-libraries of a given type or a collection of these. A 2,3 type second order sub-library sub-kit belonging to a standard pentapeptide library has 400 components (partially listed in Table 5. The vicinal type (see Table 3) second order sub-library sub-kit (belonging to the same parent library), which is particularly important in practice, has 1600 components. A collection of higher order sub-library sub-kits of a parent

Table 5.

2A3A,2C3A,2D3A,2E3A,2F3A,2G3A,.....,2R3A,2S3A,2T3A,2V3A,2W3A,2Y3A
2A3C,2C3C,2D3C,2E3C,2F3C,2G3C,.....,2R3C,2S3C,2T3C,2V3C,2W3C,2Y3C
2A3D,2C3D,2D3D,2E3D,2F3D,2G3D,.....,2R3D,2S3D,2T3D,2V3D,2W3D,2Y3D
.....
.....
.....
2A3V,2C3V,2D3V,2E3V,2F3V,2G3V,.....,2R3V,2S3V,2T3V,2V3V,2W3V,2Y3V
2A3W,2C3W,2D3W,2E3W,2F3W,2G3W,.....,2R3W,2S3W,2T3W,2V3W,2W3W,2Y3W
2A3Y,2C3Y,2D3Y,2E3Y,2F3Y,2G3Y,.....,2R3Y,2S3Y,2T3Y,2V3Y,2W3Y,2Y3Y

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5033

peptide library is named *second sub-kit*. Collections of different order sublibrary sub-kits used in sequence determinations are called *sub-library kits*.

Description of the invention

The object of the present invention is a kit of peptide mixtures for determination of the amino acid sequences of bioactive peptides in a parent peptide library comprising a "first sub-kit" which consists of a complete set of first order sub-libraries of said parent peptide library and a "second sub-kit" of peptide mixtures consisting of a complete set of vicinal and disjunct type second order and possibly higher order sub-libraries of the same parent peptide library or a partial library (occurrence library) of the same parent peptide library and possibly also comprising an amino acid tester sub-kit consisting of combined components of the "first sub-kit". In screening experiments done with a series of properly selected sub-libraries, sufficient information can be gathered to determine the sequences of the bioactive peptides.

A preferred embodiment of our invention is the kit wherein the components of the first sub-kit are special partial libraries of the parent peptide library in which the same amino acid occupies a certain position in all peptides while in the rest of positions the amino acids are varied like in the parent peptide library. If a screening experiment is carried out with a first order sub-library, and the response is negative, it means, that the amino acid occupying the non-varied coupling position does not occur in that position of the bioactive peptides. If the response is positive, on the other hand, the amino acid in question does occur in the non-varied position in at least some of the active peptides.

Components of the second sub-kit are special partial libraries of the parent peptide library in which two positions are occupied by the same two amino acids in all peptides while in the rest of positions the amino acids are varied like in the parent peptide library. Since the second order sub-libraries have two non varied positions they can be used to check the occurrence of a pair of amino acids in two coupling positions. Both the vicinal and disjunct type representatives are important which can be used

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5034

like dominoes in assembling the amino acid sequences of the bioactive peptides. Higher order sub-library sub-kits may also be included into the second sub-kit.

According to the invention components of the amino acid tester sub-kit are combined mixtures of all components of the first sub-kit in which the same amino acid occupies the non-varied position. The result of a screening experiment executed with a component of the amino acid tester sub-kit shows whether or not a certain amino acid occurs in any position of the bioactive peptides.

The number of amino acid residues of the peptides of parent peptide libraries might be preferably in the range of 2 to 25. Other ranges may be used as well.

According to the invention all kinds of amino acids can be used as subunits of peptides in the synthesis of the kit, like D-amino acids, unusual amino acids and/or derivatives of amino acids. The invention also refers to kits comprising mixtures of free or support-bound peptides.

The number of components in sub-library kits - and as a consequence the number of screening tests to be done - is in some cases quite considerable. Taking this in consideration we introduce in this invention labeling of sub-libraries. If some or all sub-libraries of a kit or sub-kit are labeled, the number of its components (and consequently the number of experiments in screening) can thoroughly be reduced, since the labeled sub-libraries can be mixed. The labels make the mixed sub-libraries distinguishable. For example, if 5 markers are used assigned to label coupling positions in the sub-kit demonstrated in Table 4, then sub-libraries of each column can be mixed resulting in 20 components instead of 100. Application of even a single marker in support bound kits (taking into consideration the unlabeled components) halves the number of components. The use of 20 markers assigned to amino acids makes possible to mix the components found in each row of Table 4 leading to only 5 components. By applying 20 markers the 400 components indicated in Table 5 can be replaced by 20 ones. The use of label carrying kits is advised when the kits are screened by binding experiments. Labeling can be applied in both support bound and free peptide kits. The applied colors have to be distinguished by eye or a suitable instrument (e.g. image processor). Among others the preferred colors may be: black, blue, green, cyan, red,

brown, light blue, light green, light cyan, light red, yellow.

Thus, according to our invention, it is an advantageous form of kits of free peptides in which color and/or fluorescent marker groups are attached to the C- and/or N-termini of peptides.

In the case of support-bound kits, addition to color or fluorescence, the size of otherwise uniform size beads or the specific gravity of the beads can also be used as markers in the synthesis of labeled support bound kits. Glass and polymer beads, for example, can easily be distinguished as a consequence of the difference in their specific gravity.

We have found that kits are preferable whereby the components of the kits are mixtures of sub-libraries attached to solid supports differing in color and/or fluorescence and/or specific gravity and/or the size of the beads, where the color and/or the fluorescence and/or the specific gravity and/or the size of the beads refer to (i) the coupling position of the non-varied amino acid, (ii) the amino acid occupying the non-varied position (iii) both the non-varied amino acid and its position, thus making the mixed sub-libraries distinguishable.

A further embodiment of our invention are the processes for the synthesis of the above peptide sub-library kits. The processes were designed so as to use the minimum number of coupling steps in the synthesis and they comprise combination and/or repetition of at least one of the operations described below (Operations Op/i to Op/xv).

Operations Op/i to Op/xv.

(i) Portioning into p equal portions of a solid support or an amino acylated support or a mixed amino acylated support or a support carrying peptides or a support carrying a mixture of peptides where p is the number of amino acids varied in the parent peptide library in a given coupling position.

(ii) Removal of the terminal amino-protecting group then coupling a different protected amino acid to each of p portions.

(iii) Mixing p portions.

(iv) Removal of $1/(n-r+1)$ part of each of p portions giving samples B, and the residues which are named (if any remaining) samples A, where r and n are the number of amino acid residues already attached to the support and the number of amino acid residues

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5036

in the peptides of the parent peptide library, respectively.

(v) Execution of operations (i) to (iii) on each of *p* samples.

(vi) Execution of operations (i)-(ii) on each of *p* portions.

(vii) Two sets of B-samples, each set comprising *p* samples, are combined in pairs containing the same amino acid residue in the non-varied position of the peptides to form *p* combined samples, named B-samples.

(viii) Coupling a different protected amino acid to each of *p* portions.

(ix) Execution of operations (i) to (iii) on one sample.

(x) Submission of each of *p* portions to removal of R^2 protecting group of the support and to coupling with a different color or fluorescent marker.

(xi) Removal of terminal amino-protecting group and coupling a different color or fluorescent marker to each of *p* portions.

(xii) Portioning of each of *p* equal samples into *p* equal portions.

(xiii) Removal of $1/(n-r)$ part of each of *p* portions otherwise the same as operation (iv).

(xiv) Submission of each of *p* portions to removal of R^2 protecting group of the support and to coupling with a different color or fluorescent marker.

(xv) Removal of $1/(n-r-1)$ part of each of *p* portions, otherwise the same as operation (iv).

According to a preferable embodiment of our invention there is provided a process for the synthesis of first sub-kit which comprises unlabeled free peptides in which the process is started with *p* equal samples of N-protected O-aminoacyl support, all samples differing in the aminoacyl residue.

(i) First, the samples are submitted to operation Op/iv, then samples A are consecutively submitted to operations Op/iii, Op/i and Op/ii and the resultant mixtures are used as starting samples in the next cycle of operations.

(ii) Samples B are submitted $(n-r)$ times to operation Op/v then the samples are taken apart.

(iii) The cycle of operations (i) to (ii) of this procedure is

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5037

repeated (n-2) time.

Finally all samples are submitted to deprotection and cleavage from the support.

A process for preparing a first sub-kit of peptides bound to unmarked support in which a sample of solid support, carrying blocked primary amino groups attached through a spacer, is first submitted to deprotection, operations Op/i and Op/viii, then the samples are treated according operations (i) to (iii) of the previous process and finally all samples are submitted to deprotection.

We also introduce a process for preparing a first sub-kit of free peptides carrying color or fluorescent labels at their C-terminus assigned to the amino acid residues occupying the non-varied positions.

(i) The process is started with p equal samples of polymer or glass supports comprising N-protected O-aminoacyl groups wherein the aminoacyl group is a color or fluorescent marker differing in color or fluorescence of the label of the support.

(ii) The samples are submitted to operation Op/xiii.

(iii) Samples A (if any remaining) are submitted to operation Op/v then are used as starting samples in the next cycle of operations.

(iv) Samples B are submitted to operation Op/ii, then mixed and submitted consecutively (n-r) times to operation Op/ix then the sample is taken apart.

(v). Operations (ii) to (iv) of this procedure are repeated (n-1) times.

(vi) All samples are submitted to deprotection and cleavage from the support.

According to our invention we describe a process for synthesizing a first sub-kit of a normal parent peptide library bound to color and/or fluorescent support where the color, or the fluorescence, or the size or the specific gravity of the beads or combinations of these characteristics are assigned to the amino acid residues occupying the non-varied position.

(i) The process is started with p equal samples of polymer and glass supports comprising free or protected primary amino groups wherein the beads are colored or fluorescent, differing in at least

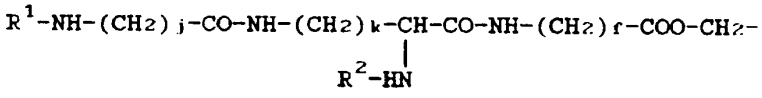
one of the mentioned characteristics.

(ii) The samples are submitted to operations (ii) to (v) of the previous process and finally all samples are submitted to deprotection.

In order to further enhance the economy of the synthesis of labeled sub library sub-kits, special solid supports were devised and introduced in this invention and methods are described for their use in the synthesis of labeled support-bound sub-kits and sub-kits of free peptides carrying the label at their C-terminus. Our experiences clearly show that much labour can be saved in the synthesis of sub-kits if the synthesis is started with unlabeled support and the labels are introduced right before or right after building into peptides the non-varied amino acids. The solid supports (one for support bound kits and another one for kits of free peptides) devised for this purpose contain two kinds of protected primary amino groups. The two kinds of protecting groups can be removed independently. One of the protecting groups is removed to free the site of peptide synthesis the other one to allow coupling with the marker molecule. The color or fluorescent molecules applied as markers need to carry a functional group - among other possibilities a free carboxyl group - which make possible attachment to a free amino group. The advantages of this "in the course labeling" becomes clear if one compares to each other some characteristics of the three kinds of syntheses: (1) synthesis of unlabeled first sub-kits, (2) synthesis on labeled supports and (3) synthesis on unlabeled supports with "in the course introduction" of the label. When (1) is carried out, after the introduction of the non-varied amino acids the samples have to be treated individually. From this stage of the synthesis the number of coupling cycles to be executed are multiplied by a factor identical with the number of the varied amino acids (say 19). In (2) the synthesis is started with say 19 different solid supports which have to be treated individually (and executing 19 times the same operations) until the non-varied amino acids are introduced. After this stage the samples can be mixed and the number of operations in every position is reduced by a factor of 19. If (3) is used, one can start the synthesis with one sample. After introduction of the non-varied amino acids, the samples can be mixed again to follow with one sample, since the labels are already introduced (right before or right after executing

coupling with the non-varied amino acids). So reduced number of operations are needed both before and after the introduction of the non-varied amino acids.

As a preferable embodiment in our invention of the type of synthesis described in the previous paragraph we provide an economical process for the synthesis of a first sub-kit of free peptides carrying color or fluorescent labels at their C-terminus assigned to the amino acid residues occupying the non-varied positions. The process is started with one sample of polymer or glass supports comprising O-acylated hydroxymethyl groups corresponding to the following general formula where R^1 and R^2 are protecting groups, j, k, and r are integers 1 to 6.



(i) The sample is submitted to operations Op/i and Op/ii.

(ii) The samples are then submitted to operation Op/iv.

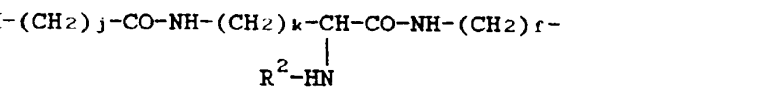
(iii) Samples B are submitted to operation Op/x, then the samples are mixed and submitted (n-r) times to operation Op/ix and the sample is taken apart.

(iv) Samples A (if any remaining) are mixed then submitted to operations Op/i and Op/ii, then are used as starting samples in the next cycle of operations.

(v) The cycle of operations (ii) to (iv) of this procedure is repeated (n-1) times.

(vi) All samples are submitted to deprotection and cleavage from the support.

As a further preferable realization of our invention a very economical process is introduced for synthesizing a first sub-kit bound to color and/or fluorescent supports, using solid support comprising acylaminoalkyl groups corresponding to the following general formula 1 where R^1 and R^2 are protecting groups, j, k, and r are integers 1 to 6.



The color or fluorescent markers assigned to the amino acid residues

occupying the non-varied position are attached to the support in the course of the peptide synthesis. The synthesis is started with one sample of support which is submitted to operations (i) to (v) of the previous procedure, finally, all samples are submitted to deprotection.

A process for synthesizing a first sub-kit of free peptides carrying color or fluorescent labels at their N-terminus assigned to the amino acid residues occupying the non-varied positions is a further preferable embodiment of our invention. N-terminal labeling is achieved by attaching color or fluorescent marker molecules (directly of *via* a spacer) to the N-terminal amino group of the peptides usually by acylation. The process is started with p equal samples of N-protected O-aminoacyl support, all samples differing in the aminoacyl residue.

(i) First, the samples are submitted to operation Op/iv.

(ii) Samples B are $(n-r)$ times consecutively submitted to operation Op/v. Then operation Op/xi is executed and after mixing, the sample is taken apart.

(iii) samples A (if any remaining) are consecutively submitted to operations Op/iii, Op/i and Op/ii and the resultant mixtures are used as starting samples in the next cycle of operations.

(iv) the cycle of operations (i) to (iii) of this procedure is repeated $(n-1)$ times then all samples are submitted to deprotection and cleavage from the support.

According to a preferable realization of our invention a process is introduced for synthesizing an amino acid tester sub-kit of free peptides comprising the following steps:

(i) The process is started with p equal samples of N-protected O-aminoacyl support, all samples differing in the acylamino residue.

(ii) First, the samples are submitted to operation Op/iv. On samples A (if any remaining) operations Op/iii, Op/i and Op/ii are consecutively executed then the samples are used in the next cycle operations. Samples B together with the resultant B samples of of the previous cycle (if executed) are submitted to operation Op/vii.

(iii) If $r < n$ samples B are submitted to operation Op/v otherwise are taken apart.

(iv) Cycle comprising operations (ii) to (iii) of this procedure are repeated $(n-1)$ times.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5041

(v) Finally, the resultant B samples are submitted to deprotection and cleavage from the support.

A process for synthesizing an amino acid tester sub-kit of peptides bound to unlabeled support has also been realized in our invention. The process is started with a sample of solid support, carrying blocked primary amino groups attached through a spacer. The sample is first consecutively submitted to deprotection and operations Op/i and Op/viii. Then the samples are treated according to operations (ii) to (iv) of the previous procedure. Finally the resultant B samples are submitted to deprotection.

Another preferable process in our invention is the synthesis of a sub-kit comprising all vicinal type second order sub-libraries of a parent peptide library of unlabeled soluble peptides, in which the process is started with p equal samples of O-acylamino support, all samples differing in the acylamino residue.

(i) The samples are submitted to operation Op/xi. Samples A (if any remaining) are consecutively submitted to operations Op/iii, Op/i, Op/ii then the resultant A samples are used in the next cycle of operations. Samples B are submitted to operation Op/vi then the unmixed resultant samples are one by one submitted to $n-r$ consecutive cycles of operations Op/i to Op/iii. All resultant samples originating from samples B are taken apart.

(ii) Cycle of operations (i) of this claim is repeated $n-2$ times.

(iii) All samples are submitted to cleavage and deprotection.

Our invention includes a process for synthesizing a sub-kit bound to unlabeled support comprising all vicinal type second order sub-libraries of a parent peptide library, in which a sample of solid support, carrying blocked primary amino groups attached through a spacer, is consecutively submitted to deprotection, operations Op/i and Op/viii, then the samples are treated according operations (i) to (ii) of the previous procedure, and finally, all samples are submitted to deprotection.

According to a preferable embodiment of our invention, a process is provided for synthesizing a sub-kit comprising all vicinal type second order sub-libraries of a parent peptide library of soluble peptides, carrying color or fluorescent labels at their C-terminus, assigned to the

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5042

amino acid residue occupying the lower coupling position of the two vicinal non-varied positions, in which the process is started with *p* equal samples of solid support comprising N-protected O-aminoacyl groups wherein the aminoacyl group is a color or fluorescent marker, differing in color or fluorescence of the label of the support.

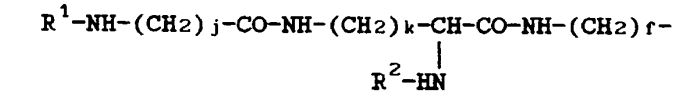
(i) first, operation Op/xv is executed. Samples A (if any remaining) are submitted to operation Op/v then the resultant A samples are used in the next cycle of operations. Samples B are consecutively submitted to operations Op/ii, Op/iii), Op/i) and Op/ii), then the resultant samples are submitted to *n-r* consecutive cycles of operation Op/v) then the samples are taken apart.

(ii) cycle of operations (i) of this procedure is repeated (*n*-2) times.

(iii) Finally all samples are submitted to cleavage and deprotection.

A process for synthesizing a sub-kit comprising all vicinal type second order sub-libraries of a normal parent library of peptides bound to color or fluorescent supports, when the color or fluorescence of the support is assigned to the amino acid residue occupying the lower coupling position of the two vicinal non-varied positions is a further preferable embodiment of our invention. The process is started with *p* equal samples of polymer and glass supports comprising free or protected primary amino groups, wherein the beads are colored or fluorescent, differing in color or fluorescence of the label of the support. The samples are submitted to operations (i) to (ii) of the previous procedure, finally all samples are submitted to deprotection.

As an economical embodiment of our invention we introduce a process for synthesizing a sub-kit comprising all vicinal type second order sub-libraries of a normal parent library of peptides bound to color or fluorescent supports, when the color or fluorescence of the support is assigned to the amino acid residue occupying the lower coupling position of the two vicinal non-varied positions, and in which the process is started with a single deprotected sample of polymer and glass support comprising acylaminoalkyl groups corresponding to the following general formula 1 where R^1 and R^2 are protecting groups, j, k, and r are integers 1 to 6.



The color or fluorescent labels are attached to the support in the course of the peptide synthesis.

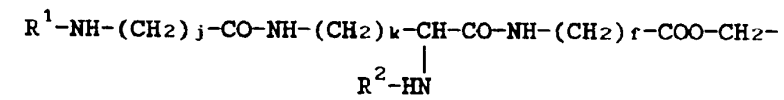
(i) The sample is submitted to operations Op/i and Op/ii.

(ii) The samples are submitted to operation Op/xiii. Samples A (if any remaining) are consecutively submitted to operations Op/iii, Op/i, Op/ii then the resultant A samples are used in the next cycle of operations. Samples B are submitted to operation Op/x, then mixed and submitted to operations Op/i and Op/ii then the resultant samples are submitted to *n-r* consecutive cycles of operation Op/v then the samples are taken apart.

(iii) Cycle of operations (ii) of this procedure is repeated *n*-2 times.

(iv) Finally all samples are submitted to deprotection.

According to our invention we describe an economical process for the synthesis of a sub-kit comprising all vicinal type second order sub-libraries of a normal parent library of peptides bound to color or fluorescent supports, when the color or fluorescence of the support is assigned to the amino acid residue occupying the lower coupling position of the two vicinal non-varied positions. The process is started with a single deprotected sample of solid support comprising O-acylated hydroxymethyl groups corresponding to the following general formula where R^1 and R^2 are protecting groups, j, k, and r are integers 1 to 6



and the color or fluorescent labels are introduced in the course of the peptide synthesis. The sample is submitted to operations (i) to (iii) of the previous procedure then all samples are submitted to deprotection and cleavage.

According to our invention, determination of the amino acid sequences of the bioactive peptides of a parent peptide library can be accomplished in three stages by using the domino strategy. There are no special

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5044

requirements concerning the screening experiments used.

(i) First a screening experiment is carried out with all components of the amino acid tester kit. The positive answers show which amino acids occur in the active peptides regardless of their coupling position. The list of these amino acids is named *amino acid occurrence list*.

(ii) In the second stage, the screening experiments are done with a properly selected set of components of the first sub-kit to determine the coupling positions of the amino acids of the amino acid occurrence list. If, for example, alanine is present in the amino acid occurrence list of a pentapeptide parent library, one has to do screening experiments - among others - with the following first order sub-libraries: 1A, 2A, 3A, 4A and 5A. The result of these experiments show which amino acids vary in the different coupling positions of the bioactive peptides. These amino acids together with their coupling positions define a partial library of the parent one, named *occurrence library*. All bioactive peptides are present in the occurrence library, together with inactive ones but the total number of components is highly reduced relative to that of the parent library.

(iii) The third stage comprises determination of the sequences by use of the selected components of the second sub-kit. To exemplify this, let's suppose that the amino acid variations in the coupling positions 1 and 2 of the occurrence library are A, G and P, T, respectively. One has to determine whether P or T or both follow A, and, whether P or T or both follow G in different active sequences. Screening tests with 1A2P, 1A2T, 1G2P and 1G2T answer the questions. Then the amino acids varied in coupling positions 2,3 and 3,4 etc. of the occurrence library have to be similarly examined. Two different approaches can be followed in these experiments: (a) using selected components of the presynthesized second sub-kit of the parent peptide library or (b) synthesizing and using the second sub-kit the occurrence library.

If labeled support-bound sub-library kits are screened one has to observe the color or/and size etc. of the beads which bind macromolecules or cells. When labelled soluble kits are screened the gained color or/and

fluorescence of the examined macromolecules, cells or tissues guides the experimenter in determining which component of the kit binds to the target.

Polymer and glass supports comprising free or protected primary amino groups, wherein the beads are colored or fluorescent are important objects of our invention. Color or fluorescent supports can be prepared by coupling a color or fluorescent marker molecule (and a spacer) to the surface of the beads. Those molecules can be used for this purpose which carry a functional group for attachment to the support - preferably a carboxyl group - and have another functional group - preferably an amino group - for coupling to the peptides or to a spacer. These color or fluorescent amino acids form a bridge between the solid support and the peptides.

Polymer and glass supports, comprising acylaminoalkyl groups corresponding to the following general formula where R^1 and R^2 are protecting groups, j, k, and r are integers 1 to 6, are important objects

$$R^1\text{-NH-(CH}_2\text{)}_j\text{-CO-NH-(CH}_2\text{)}_k\text{-CH(R}^2\text{-HN)-CO-NH-(CH}_2\text{)}_r\text{-}$$

of our invention since they make possible introduction of the color or fluorescent label in the course of the synthesis of bound and labeled sub-library sub-kits. The built in marker molecules will form a bridge between the beads and the peptides to be synthesized.

Solid supports, carrying N-protected O-aminoacyl groups wherein the aminoacyl group is a color or fluorescent marker, are use in synthesis of sub-library kits comprising peptides labeled at their C-terminal part with color or fluorescent markers. The markers are color or fluorescent amino acid type molecules which form a bridge between the surface of the beads and the synthesized peptides and they remain attached to the peptides when the peptides are removed from the support at the end of the synthesis.

We also introduce solid supports comprising O-acylated hydroxymethyl groups corresponding to the following general formula where R^1 and R^2 are protecting groups, j, k, and r are integers 1 to 6.

$$R^1\text{-NH-(CH}_2\text{)}_j\text{-CO-NH-(CH}_2\text{)}_k\text{-CH(R}^2\text{-HN)-CO-NH-(CH}_2\text{)}_r\text{-COO-CH}_2\text{-}$$

We also introduce in our invention a special azo dye 4-[4-[N-Ethyl-N-[3-[*tert*-butyloxy-carbonyl]aminopropyl]amino]phenylazo]-benzoic acid (EPAP) and O-acylated as well as N-acylated polymer or glass supports derived by its use.

Advantages of the invention. The sub-library kits introduced in this invention may be regarded as new, generally applicable tools in screening of peptide mixtures. The "domino strategy" based on these kits is very economical and involves no condition of any kind concerning the method used in the screening experiments. Furthermore, support bound or free sub-library kits are promising equally good results, and the constituent amino acids are by no means restricted to the common natural ones. On the contrary, our synthetic and screening strategy can be applied to mixtures of any other kinds of bio-oligomers that can be synthesized by the solid phase method.

Support bound mixtures can be screened without the use of expensive sequenators and the method is independent of the current state of art of sequence determination of peptides incorporating unusual amino acids. Moreover, since no degradation is needed in sequence determinations the components of the kits are easily regenerated opening the possibility for a very economical multiple usage.

In screening of free peptide mixtures the use of sub-library kits and the "domino strategy" makes possible to determine the sequence of bioactive peptides in less screening steps than other methods do. Moreover, since no peptide synthesis is needed in determinations the method can easily be used by biologists lacking the special skills of peptide chemists.

The described syntheses of unlabeled sub-library kits are optimized so to use the less possible number of coupling cycles. Further reduction in the number of coupling cycles is achieved by using labeled polymers in the synthesis. The economy of the synthesis is even more increased by using special supports designed to allow introduction of the labels in the course of peptide synthesis.

The following examples are intended to demonstrate - but by no means limit - our invention.

Examples

Example 1

N-Ethyl-N-[3-[*tert*-butyloxycarbonyl]aminopropyl]aniline

N-Ethyl-N-[3-aminopropyl]aniline (S.L.Shapiro et al., J.Amer.Chem. Soc. 1959, 81, 3083-3088) (1.78 g; 10 mmol) is reacted with di-*tert*-butyl dicarbonate according to L.Moroder et al. (Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 1976, 357, 1651-1653) to yield an oily product (90%).

Example 2

4-[4-[N-Ethyl-N-[3-[*tert*-butyloxycarbonyl]aminopropyl]amino]-phenylazo]benzoic acid (EPAP)

4-Aminobenzoic acid (1.23 g; 9 mmol) dissolved in a mixture of ethanol (25 mL) and cc. hydrochloric acid (5 mL) is reacted with sodium nitrite (0.62 g; 9 mmol), the temperature being kept between 0° and 5°C. To the ice-cold solution of the diazonium salt, sodium acetate (4.1 g) then N-ethyl-N-[3-[*tert*-butyloxycarbonyl]-aminopropyl]aniline (Example 1) (2.5 g; 9 mmol) in ethanol (6 mL) are added. The mixture is stirred for 4 h at room temperature then allowed to stand overnight. The brick-red precipitate is filtered, washed with water and dried. The crude product is recrystallized from toluene to yield 2.4 g (62%).

Example 3

Assortment of polymer resin beads by size

Aminomethylated styrene-divinyl benzene (99:1) copolymer beads (10 g) (Mitchell et al., J.Amer.Chem.Soc. 1976, 98, 7357-7362; 1 meq N/g; 200-400 mesh [0.038-0.075 mm]) are sieved by using an upper and a lower sieve, 230 mesh (0.063 mm) and 325 mesh (0.045 mm), resp. The sieving results in three fractions of beads: 1. fine (325-400 mesh, 0.038-0.045 mm; 2 g), 2. medium (230-325 mesh, 0.045-0.063 mm; 5 g), 3. coarse (200-230 mesh, 0.063-0.075 mm; 3 g).

Example 4

Coarse Boc-Gaba-aminomethyl resin beads

Coarse aminomethyl resin beads (Example 3; 1 g) are swollen in dichloromethane (DCM), filtered, and a mixture of ethyl diisopropyl amine (EDIA) and DCM (1:9, v/v) (10 mL) is added. The mixture is shaken for 5 min, filtered, and the treatment with the former reagent solution is repeated. The mixture is allowed to stand for 15 min then filtered. To a

solution of 0.81 g (4 mmol) Boc-γ-aminobutyric acid (Boc-Gaba) in DCM (5 mL), 1-hydroxybenzo- triazole (HOBt) (0.8 g; 5.2 mmol) then diisopropyl carbodiimide (DIC) (0.62 mL; 4 mmol) is added. The aminomethyl resin is suspended in this solution. The mixture is shaken for 3 h at room temperature, then the resin is filtered and washed (4x DCM, 2x ethanol [EtOH]). The beads which give negative test with ninhydrin (Kaiser et al., Anal.Biochem. 1970, 34, 595-598) are dried over P_2O_5.

Example 5

Fine Boc-Gaba-EPAP-aminomethyl resin beads

Fine aminomethyl resin beads (Example 3; 1 g) are swollen in DCM, filtered, and a mixture of EDIA and DCM (1:9, v/v) (10 mL) is added. The mixture is shaken for 5 min, filtered, and the washing with the former reagent solution is repeated. The mixture is allowed to stand for 15 min then filtered. To a solution of 1.70 g (4 mmol) EPAP (Example 2) in dimethyl formamide (DMF) (30 mL), HOBt (0.8 g; 5.2 mmol) then DIC (0.62 mL; 4 mmol) is added. The aminomethyl resin is suspended in this solution. The mixture is shaken for 3 h at room temperature. The red resin beads are filtered and washed (3x DMF, 3x DCM), filtered and a mixture of DCM and trifluoroacetic acid (TFA) (2:1, v/v) (10 mL) is added. The mixture is shaken for 5 min, filtered, again DCM/TFA mixture (10 mL) added and, after shaking for 30 min, the mixture is filtered, washed with DCM, MeOH, DCM, MeOH, 2x DCM. The resin is treated with EDIA and, after washing, with Boc-Gaba, HOBt and DIC according to Example 4.

Example 6

Nε-[Boc-Gaba]-Nα-Fmoc-L-Lysyl aminomethyl resin beads (BGFL-aminomethyl resin beads)

Coarse aminomethyl resin beads (Example 3; 1 g) are treated as described in Example 4. The difference is that instead of Boc-Gaba, Nα-Fmoc-Nε-Boc-L-lysine (1.87 g; 4 mmol) is used. After coupling, the resin is reacted with DCM/TFA mixture (Example 5) then with EDIA and, after washing, with Boc-Gaba, HOBt and DIC according to Example 4.

Example 7

EPAP-Hydroxymethyl resin

Chloromethylated styrene-divinyl benzene (99:1) copolymer beads (Bio-Rad; 200-400 mesh; 1.26 meq Cl/g) (1 g) are swollen in DMF (30 mL) then EPAP (Example 2) (1.53 g; 3.6 mmol) and potassium fluoride (KF) (0.3 g) are

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5049

added. The mixture is stirred for 24 h at 50° then washed with DMF, DCM and EtOH. The red beads are dried over P_2O_5.

Example 8

Nε-Boc-Nα-Fmoc-L-Lysyl-[4-aminobutyryl]-hydroxymethyl resin (BFLG-hydroxymethyl resin)

Chloromethylated styrene-divinyl benzene (99:1) copolymer beads (see Example 7) (1 g) are swollen in DMF (30 mL) then Boc-Gaba (0.73 g; 3.6 mmol) and KF (0.3 g) are added. The mixture is stirred for 24 h at 50°, washed with DMF and DCM, filtered, and a mixture of DCM and TFA (2:1, v/v) (10 mL) is added. The mixture is shaken for 5 min, filtered, shaken with a new portion (10 mL) of DCM/TFA, filtered and washed with DCM, MeOH, DCM, MeOH and 2x DCM. The resin is treated with EDIA and, after washing, with Nα-Fmoc-Nε-Boc-L-lysine, HOBt and DIC as described in Example 4 (lysine derivative is used instead of Boc-Gaba).

Example 9

Mixing of resin beads

Portions of resin beads (including starting resins, aminoacyl- and peptidyl-resins) are swollen in a mixture of DCM and DMF (2:1, v/v), poured and rinsed into a common polyethylene (PE) vessel. Swelling and rinsing require 5 mL liquid/100 mg of resin sample. The resultant mixture is shaken for 15 min then is ready for immediate portioning.

Example 10

Portioning of resin beads

A resin sample swollen in DCM/DMF (Example 9) is portioned by volume, using a 5 mL PE measuring pipette, into the reaction vessels (PE tubes fitted with plastic frit).

Example 11

Coupling of a Boc-amino acid to the resin beads

A sample of one of polymer supports described in Examples 4-8 or an Nα-Boc-aminoacyl- or an Nα-Boc-peptidyl resin containing 0.1 mmol of protected α-amino groups is placed into the reaction vessel (see Example 10). During the forthcoming operations the resin is shaken with different reagent solutions or washing solvents and at the end of operations the liquids are removed by suction. The operations are:
A/ Swelling (in the case of dry resin sample): 2x3 mL DCM, 2x5 min.
B/ Removal of Boc-groups: DCM/TFA 2:1 (v/v) 3 mL, 2 min; the same mixture,

3 mL, 30 min. C/ Washing: DCM, MeOH, DCM, MeOH, DCM, DCM, 3 mL and 5 min each. D/ Deprotonation: DCM/EDIA 9:1 (v/v) 3 mL, 2 min; the same mixture, 3 mL, 8 min. E/ Washing: DCM 3x3 mL, 9 min each. F/ Preparation of active ester: Boc-amino acid (side chain protecting groups used: OBzl for Asp and Glu, Bzl for Ser, Thr and Tyr, Z for Lys, Tos for Arg and His) (0.4 mmol) is dissolved in DCM/DMF 3:1 (v/v) (2 mL) in a separate vessel (in the case of Boc-Gln, Boc-Asn, Boc(Tos)-Arg and Boc(Tos)-His, the solvent is 2 mL of DMF) and, with stirring, HOBt (0.08 g; 0.52 mmol) then DIC (0.062 mL; 0.4 mmol) are added. G/ Coupling: The solution of active ester (see F) is added to the resin (prepared in section E of this Example), the mixture is shaken for 3 h at room temperature. H/ Washing: DMF (3x) then DCM (3x), 3 mL and 5 min each.

Example 12

Removal of Fmoc-groups

Resins carrying 0.1 mmol of a peptide mixture prepared by the use of resins described in Examples 6 or 8 as starting materials, are swollen in DCM then DMF (2x3 mL, 3 min each), shaken with DMF/piperidine (1:1, v/v) (3 mL) for 20 min, filtered and washed with 2x3 mL of DMF, dioxane/water 1:1, DMF and DCM, 5 min each.

Example 13

Labeling of peptides bound to BGFL-aminomethyl resin beads

Resin sample carrying a peptide mixture prepared by the use of BGFL-aminomethyl resin (Example 6) as starting materials, with free α-amino groups on the linker lysine residue after removal of Fmoc-groups as described in Example 12, is subjected to operations described in Example 11 F-H. Instead of a Boc-amino acid, however, marker molecules like 5-dimethylamino-1-naphthalenesulfonyl-Gaba (Dns-Gaba), 7-hydroxy-coumarin 4-acetic acid (HCAA) and EPAP (see Example 2) are used.

Example 14

Labeling of peptides to be cleaved from BFLG-hydroxymethyl resin beads

Resin sample carrying a peptide mixture prepared by the use of BFLG-hydroxymethyl resin (Example 8) as starting material, with free α-amino groups on the linker lysine residue after removal of Fmoc-groups described in Example 12, is treated according to Example 13.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5051

Example 15

Labeling of peptides at their N-termini

Resin sample carrying a peptide mixture prepared by the use of Boc-aminoacyl resin esters as starting materials, is subjected to operations described in Example 11 B-E, then to operations of Example 11 F-H (coupling with one of marker molecules; see Example 13).

Example 16

Removal of protecting groups from resin-bound peptides

Resin-bound peptide mixtures prepared by the use of resin beads described in Examples 4, 5 and 6 as starting materials, are treated with a mixture of trifluoromethanesulfonic acid (TFMSA) and TFA according to Yajima et al. (J.Chem.Soc., Chem.Commun. 1974, 107-108), then washed with ether and MeOH, dried over P_2O_5.

Example 17

Cleavage of peptides from the resin

Resin (50 mg), carrying peptide mixtures prepared from resins described in Examples 7 or 8, or from commercially available Boc-aminoacyl resin esters, is treated with TFMSA/TFA (see Example 16), the resin is filtered off, then the acidic reaction mixture is added to dry ether (25 mL). The mixture is allowed to stand overnight at -20°C. The precipitate is collected by filtration, washed twice with ether and dried over KOH.

Example 18

Mixing, portioning, coupling

Samples of 19 different protected aminoacyl resins are mixed (Example 9) then portioned (Example 10) resulting in 19 new samples which are separately coupled with one of the following amino acid derivatives according to Example 11: Boc-Ala, Boc(Tos)-Arg, Boc-Asn, Boc-Asp(OBzl), Boc-Gln, Boc-Glu(OBzl), Boc-Gly, Boc(Tos)-His, Boc-Ile, Boc-Leu, Boc(Z)-Lys, Boc-Met, Boc-Phe, Boc-Pro, Boc(Bzl)-Ser, Boc(Bzl)-Thr, Boc-Trp, Boc(Bzl)-Tyr, Boc-Val.

Example 19

Synthesis of the first sub-kit of a free standard-C tetrapeptide library

/i/ 2.0 mmol samples of the 19 kinds of Boc-amino acid resin esters are submitted to 3 consecutive cycles of operations described as A-cycle in the next paragraph of this Example.

/ii/ A-cycle: 0.5 mmol of each sample is removed and the 19 removed

samples are taken apart for use in B-cycles. The residual parts of samples are subjected to operations described in Example 18 to produce 19 new samples.

/iii/ Each of the 3x19 samples removed in A-cycles is repeatedly submitted to the following B-cycles of operations until it attains the tetrapeptide size.

/iv/ B-cycle: Each sample is divided into 19 equal portions, one of the 19 common Boc-amino acids is coupled to each portion then the portions are mixed resulting in 19 samples.

/v/ The 19 final samples of /ii/ and the 3x19 final samples of /iii/ are cleaved from the support according to Example 17.

Example 20

Synthesis of the first sub-kit of a resin-bound standard-C tetrapeptide library

19 kinds of Boc-aminoacyl-Gaba-aminomethyl resin beads are prepared by the use of different Boc-amino acids and the resin described in Example 4, according to Example 11. 2.0 mmol samples of the resultant 19 resins are submitted to 3 consecutive A-cycles (Example 19/ii) then operations described in Example 19 iii and iv. The protecting groups from the 76 resin-bound final samples are removed according to Example 16.

Example 21

First sub-kit of a free standard-C tetrapeptide library carrying color- and/or fluorescence-labels at the C-termini of peptides starting from labeled resin esters

/i/ 19 kinds of color- and/or fluorescence-labeled resin esters (2.0 mmol each) are used as starting materials and submitted to 4 consecutive main cycles.

/ii/ Main cycle: 0.5 mmol of each resin sample is removed and taken apart as B-sample. Each of the remaining samples (A-samples; if any remaining) is submitted to the following operations: dividing into 19 equal parts, each part is coupled with a different Boc-amino acid according to Example 11 then the samples are mixed and taken apart for using as starting material in the next cycle. Each of B-samples is coupled with a different Boc-amino acid according to Example 11, then the samples are mixed. If the peptides are shorter then tetrapeptides, the sample is submitted to consecutive inner cycles until the tetrapeptide size is

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5053

attained.

/iii/ Inner cycle of the main cycle: The sample is divided into 19 parts, each part is coupled with a different Boc-amino acid then the samples are mixed.

/iv/ Finally the peptides of the 4 samples are cleaved from the support according to Example 17.

Example 22

First sub-kit of a resin-bound standard-C tetrapeptide library synthesized on beads differing from each other by their color, fluorescence and/or size

19 kinds of colorless (Example 4), colored (Example 5) and fluorescent derivatives of fine and coarse aminomethyl resin beads (Example 3) are used as staring materials and submitted to operations described in paragraphs /ii/ and /iii/ of Example 21. The protecting groups from the 4 final samples are removed according to Example 16.

Example 23

First sub-kit of a free standard-C tetrapeptide library carrying color or fluorescent labels at the C-termini of peptides (labeling in the course)

BFLG-hydroxymethyl resin (Example 8) is divided into 19 equal portions and each of them is submitted to operations described in Example 11 resulting in 19 different Boc-aminoacyl-BFLG-hydroxymethyl resins, 2.0 mmol of each.

/i/ The resultant resins are submitted to 3 consecutive E-cycles of the following operations.

/ii/ E-cycle: 0.5 mmol of each sample is removed. The 19 removed samples are taken apart for use in F-cycles. The residual parts of the samples are mixed together, divided into 19 equal parts, and each new part is coupled with a different Boc-amino acid.

/iii/ Fmoc-group is removed from each sample obtained after the last E-cycle according to Example 12 then each sample is coupled with a different color and/or fluorescence marker (see Example 14) and the samples are mixed together to produce one of the 4 final samples.

/iv/ Each of the sets of 19 samples removed and taken apart in the different E-cycles, is treated as described in /iii/ of this Example, then repeatedly submitted to the F-cycles of operations, described in the next paragraph, until it attains the tetrapeptide size and produce 3 final samples.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5054

/v/ F-cycle: The sample is divided into 19 equal portions, each portion is coupled with a different Boc-amino acid then the new portions are mixed together.

/vi/ The peptides of the 4 final samples (originated in /iii/ and /iv/) are cleaved from the support according to Example 17.

Example 24

Labeled first sub-kit of a resin-bound standard-C tetrapeptide library (labeling in the course)

19 kinds of Boc-aminoacyl resin beads (2.0 mmol of each) are prepared according to Example 11, using BGFL-aminomethyl resin beads (Example 6). On these Boc-aminoacyl resins, operations described in Example 23 i to 23 v are executed. The protecting groups from the 4 final samples are removed according to Example 16.

Example 25

First sub-kit of a free normal pentapeptide library carrying color labels at the N-termini of peptides

/i/ 2.0 mmol samples of 10 different Boc-amino acid resin esters (resin esters of Boc-Ala, Boc(Tos)-Arg, Boc-Asp-OBzl, Boc-Glu(OBzl), Boc-Gly, Boc(Z)-Lys, Boc-Phe, Boc-Pro, Boc(Bzl)-Ser and Boc(Bzl)-Tyr) are submitted to 4 consecutive G-cycles of the following operations.

/ii/ G-cycle: 0.4 mmol of each sample is removed and taken apart for use in H-cycles. The residual parts of samples are mixed together, divided into 10 portions, then each portion is coupled with a different Boc-amino acid (Example 11). The resultant samples (except the remainder produced in the last cycle) are used as starting samples in the next cycle.

/iii/ Each of the sets of 10 samples removed in G-cycles is repeatedly submitted to the following H-cycles of operations until it attains the pentapeptide size.

/iv/ H-cycle: Each sample is submitted to the following operations: dividing into 10 equal portions, one of the Boc-amino acids listed in /i/ of this Example is coupled to each portion, then the sets of 10 resultant portions are mixed together.

/v/ The 10 remainder samples of the 4th G-cycle as well as the 4x10 samples produced in H-cycles are one by one coupled with Boc-Gaba (likewise Example 11) resulting in 5 sets of 10 samples. Then each set is

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5055

treated as follows: each of the 10 samples is coupled with one of different color markers as described in Example 15, then mixed together to produce 1 final sample.

/vi/ The final samples obtained in /v/ are cleaved from the support according to Example 17.

Example 26

Amino acid tester sub-kit of a free standard-C tripeptide library

/i/ 19 samples (numbered from 1 to 19) of 2.1 mmol Boc-amino acid resin esters - containing the amino acid residues in order of A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y - are submitted to 3 consecutive I-cycles of operations.

/ii/ I-Cycle: 0.7 mmol of each sample is removed (inheriting the number of the original sample) and the samples are taken apart for use as starting samples in operations described in paragraph /iii/. The residual parts of samples (if any remaining) are mixed together, divided into 19 numbered portions, then each portion is coupled with a different Boc-amino acid in order described in paragraph /i/. The resultant numbered samples are used as starting samples in the next I-cycle.

/iii/ Each of 19 samples removed in the first I-cycle is treated as follows: the sample is divided into 19 portions. Each portion is coupled with a different Boc-amino acid then mixed. In this way 19 new numbered samples are formed.

/iv/ Each of the 19 samples removed in the second I-cycle is united with its identically numbered pair obtained in paragraph /iii/ and the new sample is carrying the same number. Each of 19 united samples is treated as follows: the sample is divided into 19 new portions, and each portion is coupled with a different Boc-amino acid then mixed to one sample carrying the original number.

/v/ Each of the 19 samples obtained in /iv/ is united with the identically numbered sample removed in the third I-cycle to produce 19 final samples.

/vi/ The peptides of 19 final samples are cleaved from the support according to Example 17.

Example 27

Amino acid tester sub-kit of a resin-bound standard-C tripeptide library

19 samples (numbered from 1 to 19) of 2.1 mmol Boc-aminoacyl-Gaba-amino-

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5056

methyl resin (see Examples 4 and 11) - containing the amino acid residues in order of A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y - are submitted to 3 consecutive I-cycles of Example 26 then operations described in Example 26 iii to 26 v are executed. The protecting groups from the 19 resin-bound final samples are removed according to Example 16.

Example 28

Second order vicinal sub-library sub-kit of a free standard-C tetrapeptide library

1.5 mmol samples of the 19 kinds of Boc-amino acid resin esters are submitted to 3 consecutive main cycles of the following operations.

Main cycle: 0.5 mmol of each sample is removed; they are taken apart as B-samples. The residual parts of samples (A-samples; if any remaining) are mixed together, divided into 19 portions, each portion is coupled with a different Boc-amino acid.

Each of the 19 B-samples is treated as follows: the sample is divided into 19 portions then each portion is coupled with a different Boc-amino acid then the resultant 19x19 samples are submitted to the following inner cycle of operations until they attain the tetrapeptide size.

Inner cycle: each of the 19x19 samples is treated as follows: divided into 19 parts. Each part is coupled with one of the 19 Boc-amino acids then mixed together (end of both cycles).

The peptides of the 3x361 final samples are cleaved from the support according to Example 17 to obtain the kit of 1,2-, 2,3- and 3,4-types of second order vicinal sub-libraries.

Example 29

Second order vicinal sub-library sub-kit of a resin-bound normal tetrapeptide library

1.5 mmol samples of 10 different Boc-aminoacyl-GABA-aminomethyl resins (prepared from resin described in Example 4 according to Example 11; kinds of Boc-amino acid resin esters are listed in Example 25) are treated as described in Example 28 with the following modifications: 10 kinds of samples are used instead of 19; the number of final samples is 3x100 instead of 3x361; the final samples are treated as described in Example 16.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5057

Example 30

Labeled second order vicinal sub-library sub-kit of a free normal tetrapeptide library, synthesized on labeled supports

2.1 mmol samples of 9 kinds of color or fluorescence labeled resins (see Example 7) are submitted to 3 consecutive main cycles of operations.

Main cycle: 0.7 mmol of each resin sample is removed and taken apart as B-sample. The residual parts of samples (if any remaining) are named A-samples. Each of A-samples is treated as follows: the sample is divided into 9 portions, each portion is coupled with one of the 9 Boc-amino acids (Boc-amino acids listed in Example 25 are used with the following modifications: Boc-Pro is omitted; D-Phe is used instead of Phe). The lengthened samples are mixed together to form a new sample used as one of the starting samples in the next main cycle.

Each of B-samples is coupled with a different Boc-amino acid (see above), the 9 new samples are mixed together, divided into 9 portions, each portion is coupled with a different Boc-amino acid. The resultant 9 samples are consecutively submitted to the inner cycles of operations until they attain the tetrapeptide size.

Inner cycle: Each of the 9 samples (if the peptides are shorter than tetrapeptides) is treated as follows: the sample is divided into 9 portions and each portion is coupled with one of Boc-amino acids (see above) then mixed. The mixed samples (if shorter than tetrapeptides) are used as starting samples in the next inner cycle.

This is the end of both cycles.

The peptides of 3x9 final samples obtained are cleaved from the support according to Example 17.

Example 31

Second order vicinal sub-library sub-kit of a normal tetrapeptide library bound to color or fluorescent supports

2.1 mmol samples of 9 kinds of color or fluorescence labeled resins (see Example 5) are treated according to Example 30 with the exception of the last step in which the protecting groups are removed from the final samples as described in Example 16.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5058

Example 32

Labeled resin-bound second order vicinal sub-library sub-kit of a normal tetrapeptide library (labeling in the course)

21 mmol of BGFL-aminomethyl resin beads (Example 6) is divided into 10 equal parts. Each part is coupled with one of 10 Boc-amino acids (Boc-amino acids listed in Example 25 are used with a single modification: Boc-L-α-aminobutyric acid is applied instead of Boc-Pro). The resultant samples are submitted to 3 consecutive main cycles of operations.

Main cycle: 0.7 mmol of each resin sample is removed and taken apart as one of the B-samples. The residual parts of samples (A-samples; if any remaining) are mixed together then divided into 10 parts and each of them is coupled with a different Boc-amino acid (see above). The resultant samples are used as starting samples in the next main cycle.

Each of B-samples is treated as follows: the Fmoc-group is removed according to Example 12 then the sample is coupled with a color or fluorescence marker (see Example 14). The resultant B-samples are mixed together and divided into 10 portions. Each of new portions is coupled with a different Boc-amino acid. The resultant 10 samples are consecutively submitted to the inner cycles of operations until they attain the tetrapeptide size.

Inner cycle: Each of the samples (if the peptides are shorter than tetrapeptides) is treated as follows: divided into 10 equal portions, the portions are coupled with different Boc-amino acids (see above) then mixed. The samples (if the peptides are shorter than tetrapeptides) are used as starting samples in the next inner cycle.

This is the end of both cycles.

The protecting groups of the 3x10 final samples are removed according to Example 16.

Example 33

Second order vicinal sub-library sub kit of a free normal tetrapeptide library carrying color or fluorescent labels at the C-termini of peptides (labeling in the course)

21 mmol of BFLG-hydroxymethyl resin (Example 8) is treated according to Example 32 with the exception of the last step in which the peptides of the final samples are cleaved from the support as described in Example 17.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5059

Example 34

Screening of 4A first order standard-C tetrapeptide sub-library (4A4), bound to unlabeled support, with rat red blood cells

The experiment is carried out as recently described by Sebestyén et al. (Bioorg. Med. Chem. Letters 1993, 3, 413-418). 0.5 mg of 4A4 and 0.5 mL of red blood cell suspension (prepared from heparinized rat blood; the cells are washed and centrifuged 3 times before use to remove serum proteins) is kept at 0°C for 15 min, shaking gently several times, then pipetted into 10 mL Seglen's suspension buffer (Ssb). The diluted suspension is gently centrifuged (200 rpm, 3 min) to facilitate sedimentation of the beads. The excess of cells is removed by carefully pipetting out the supernatant. The sediment is diluted with 3 mL Ssb, pipetted into a Petri-dish and surveyed in an inverted microscope.

Although most of the beads are bare, some are completely covered with cells so screening test of 4A4 is considered positive.

Example 35

Screening with a support-bound standard-C tetrapeptide amino acid tester sub-kit.

All of the 19 components of the support-bound standard-C tetrapeptide amino acid tester sub-kit are submitted to the screening test described in Example 34. All tests resulting in formation of at leas some completely covered beads are considered positive and the amino acid appearing in symbol of the component giving positive result is included into the amino acid occurrence list.

Example 36

The use of the components of an unlabeled resin-bound first sub-kit of a standard-C tetrapeptide library in screening.

To the amino acid occurrence list, A, E, H, K, L, N, Y, the following components of the first order sub-library sub-kit described in Example 20 are selected for screening described in Example 34: 1A, 2A, 3A, 4A, 1E, 2E, 3E, 4E, 1H, 2H, 3H, 4H, 1K, 2K, 3K, 4K, 1L, 2L, 3L, 4L, 1N, 2N, 3N, 4N, 1Y, 2Y, 3Y, 4Y. The amino acids appearing in the symbol of the components giving positive results are entered - from position to position - into the list of amino acids varied in the occurrence library.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5060

Example 37

The use of the components of an unlabeled resin-bound second order standard-C tetrapeptide sub-library sub-kit in screening.

In order to determine the sequences of the active peptides present in the occurrence library demonstrated in Table 6 the following components of the

Table 6.

1	A
2	E, K
3	L, N
4	H, Y

second order sub-library sub-kit described in Example 29 (or synthesized as the second order vicinal sub-library sub-kit of the occurrence library) are submitted to the screening test (Example 34): 2E3L, 2E3N, 2K3L, 2K3N, 3L4H, 3L4Y, 3N4H, 3N4Y. The active components may be used as dominoes in determining the sequences of the active peptides present in the occurrence library as shown below.

1A
2E3L
3L4H

The deduced sequence is: ^{C} 1 4 AELH

Written in usual order: HLEA

In some cases testing with disjunct second order sub-libraries is also needed.

Example 38

First sub-kit of a free general tripeptide library

/i/ 1.0 mmol samples of each of Boc-amino acid resins derived from Ala, Asn, Gly, Met, Pro and Val are used as starting materials. One-third of each of 6 samples is removed and taken apart (B1-samples).

/ii/ The residual parts of each sample (A1-samples) are mixed then portioned into 4 equal parts. Each part is coupled with one of the

following Boc-amino acids: Boc-Glu(OBzl), Boc-Leu, Boc(Z)-Lys and Boc-Phe.
/iii/ Half of each of the resultant 4 samples (see paragraph /ii/) is removed and taken apart (B2-samples). The residual parts of each sample (A2-samples) are mixed then divided into 10 equal parts. Each part is coupled with one of the Boc-amino acids listed in Example 25 to produce 10 final samples.
/iv/ Each B1-sample (see paragraph /i/) is treated as follows: divided into 4 equal parts and each part is coupled with one of Boc-amino acids listed in paragraph /ii/ then mixed.
/v/ Each of the resultant 4 samples (see paragraph /iv/) is treated as follows: divided into 10 equal parts and each part is coupled with one of Boc-amino acids listed in Example 25 then mixed.
/vi/ Each B2-sample (see paragraph /iii/) is treated as described in paragraph /v/.
/vii/ The 3x10 final samples obtained in paragraphs /iii/, /v/ and /vi/ are treated according to Example 17.

Example 39

Labeled second order 1,3 and 2,4 type disjunct sub-library sub-kit of a resin-bound normal tetrapeptide library. The labels refer to the lower non-varied coupling position (labeling in the course)

20 mmol of BGFL-aminomethyl resin beads (Example 6) is divided into 10 equal parts. Each part is coupled with one of 10 Boc-amino acids (Boc-amino acids listed in Example 25 are used with a single modification: Boc-L-α-aminobutyric acid is applied instead of Boc-Pro). The resultant samples are submitted to 2 consecutive main cycles of operations.
Main cycle: 1.0 mmol of each resin sample is removed and taken apart as one of the B-samples. The residual parts of samples (A-samples; if any remaining) are mixed together then divided into 10 parts and each of them is coupled with a different Boc-amino acid (see above). The resultant samples are used as starting samples in the next main cycle.
Each of B-samples is treated as follows: the Fmoc-group is removed according to Example 12 then the sample is coupled with a color or fluorescence marker (see Example 14). The resultant 10 samples are consecutively submitted to two inner cycles of operations.
Inner cycle: The resultant B-samples are mixed together and divided into 10 portions. Each of new portions is coupled with a different

Boc-amino acid. This is the end of main cycle and the inner cycle.
Each of the samples coming out from the second inner cycle (if the peptides are shorter than tetrapeptides) is treated as follows: divided into 10 equal portions, the portions are coupled with different Boc-amino acids (see above) then mixed. The protecting groups of the 2x10 final samples are removed according to Example 16.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5063

CLAIMS

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A kit of peptide mixtures for determination of the amino acid sequences of bioactive peptides in a parent peptide library comprising
a "first sub-kit" which consists of a complete set of first order sub-libraries of said parent peptide library and
a "second sub-kit" of peptide mixtures consisting of a complete set of vicinal and disjunct type second order and possibly higher order sub-libraries of the same parent peptide library or a partial library (occurrence library) of the same parent peptide library
and possibly also comprising an amino acid tester sub-kit ("third sub-kit"), consisting of combined components of the first sub-kit.

2. A kit according to claim 1 wherein the components of the first sub-kit are special partial libraries of the parent peptide library in which the same amino acid occupies a certain position in all peptides while in the rest of positions the amino acids are varied like in the parent peptide library.

3. A kit according to claim 1 wherein the components of the second sub-kit are special partial libraries of the parent peptide library in which the same two positions are occupied by the same two amino acids in all peptides while in the rest of positions the amino acids are varied like in the parent peptide library.

4. A kit according to claim 1 wherein the components of the amino acid tester kit sub-kit are combined mixtures of all those components of the first sub-kit in which the non-varied position is occupied by the same amino acid.

5. A kit according to any of claims 1 to 4 in which the number of amino acid residues of the peptides of parent peptide libraries is in the range of 2 to 25.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5064

6. A kit according to any of claims 1 to 5 in which the amino acid subunits of peptides are L-amino acids, D-amino acids, unusual amino acids and/or derivatives of amino acids.

7. A kit according to any of claims 1 to 6 comprising mixtures of free or support-bound peptides.

8. A kit of free peptides according to any of claims 1 to 7 in which color and/or fluorescent marker groups are attached to the C- and/or N-termini of peptides.

9. A kit according to any of claims 1 to 7 in which the components of the kits are mixtures of sub-libraries attached to solid supports differing in color and/or fluorescence and/or specific gravity and/or the size of the beads, where the color and/or the fluorescence and/or the specific gravity and/or the size of the beads refer to (i) the coupling position of the non-varied amino acid, (ii) the amino acid occupying the non-varied position (iii) both the non-varied amino acid and its position, thus making the mixed sub-libraries distinguishable.

10. Process for the synthesis of peptide sub-library kits according to any of claims 1 to 9 which comprises combination and/or repetition of at least one of the following operations;

(i) portioning into p equal portions of a solid support or an amino acylated support or a mixed amino acylated support or a support carrying peptides or a support carrying a mixture of peptides where p is the number of amino acids varied in the parent peptide library in a given coupling position;

(ii) each of p portions are submitted to removal of the terminal amino-protecting group and coupling with a different protected amino acid;

(iii) mixing p portions;

(iv) removal of $1/(n-r+1)$ part of each of p portions giving samples B, and the residues which are named (if any remaining) samples A, where r and n are the number of amino acid residues already attached to the support and the number of amino acid residues

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5065

in the peptides of the parent peptide library, respectively;

(v) execution of operations (i) to (iii) on each of *p* samples;

(vi) execution of operations (i)-(ii) on each of *p* portions;

(vii) two sets of B-samples, each set comprising *p* samples, are combined in pairs containing the same amino acid residue in the non-varied position of the peptides to form *p* combined samples, named B-samples;

(viii) coupling a different protected amino acid to each of *p* portions;

(ix) execution of operations (i) to (iii) on one sample;

(x) submission of each of *p* portions to removal of R^2 protecting group of the support and to coupling with a different color or fluorescent marker;

(xi) removal of terminal amino-protecting group and coupling a different color or fluorescent marker to each of *p* portions;

(xii) portioning of each of *p* equal samples into *p* equal portions;

(xiii) removal of $1/(n-r)$ part of each of *p* portions otherwise the same as operation (iv);

(xiv) submission of each of *p* portions to removal of R^2 protecting group of the support and to coupling with a different color or fluorescent marker;

(xv) removal of $1/(n-r-1)$ part of each of *p* portions, otherwise the same as operation (iv).

11. Process for the synthesis of first sub-kit according to any of claim 10 which comprises unlabeled free peptides in which the process is started with *p* equal samples of N-protected O-aminoacyl support, all samples differing in the aminoacyl residue;

(i) first, the samples are submitted to operation (iv) of claim 10, then samples A are consecutively submitted to operations (iii), (i) and (ii) of claim 10 and the resultant mixtures are used as starting samples in the next cycle of operations;

(ii) samples B are submitted $(n-r)$ times to operation (v) of claim 10 then the samples are taken apart;

(iii) the cycle of operations (i) to (ii) of this claim is

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5066

repeated (n-2) times;

(iv) all samples are submitted to deprotection and cleavage from the support.

12. A process according to claim 10 for preparing a first sub-kit of peptides bound to unmarked support in which a sample of solid support, carrying blocked primary amino groups attached through a spacer, is first submitted to deprotection, operations (i) and (viii) of claim 10, then the samples are treated according operations (i) to (iii) of claim 11, and finally all samples are submitted to deprotection.

13. A process according to claim 10 for preparing a first sub-kit of free peptides carrying color or fluorescent labels at their C-terminus assigned to the amino acid residues occupying the non-varied positions;

(i) the process is started with p equal samples of solid supports comprising N-protected O-aminoacyl groups wherein the aminoacyl grop is a color or fluorescent marker differing in color or fluorescence of the label of the support;

(ii) the samples are submitted to operation (xiii) of claim 10;

(iii) samples A (if any remaining) are submitted to operation (v) of claim 10 then are used as starting samples in the next cycle of operations;

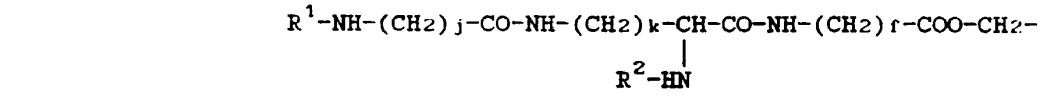
(iv) samples B are submitted to operation (ii) of claim 10, then mixed and submitted consecutively (n-r) times to operation (ix) of claim 10 then the sample is taken apart;

(v) operations (ii) to (iv) of this claim are repeated (n-1) times;

(vi) all samples are submitted to deprotection and cleavage from the support.

14. A process for synthesizing a first sub-kit of free peptides carrying color or fluorescent labels at their C-terminus assigned to the amino acid residues occupying the non-varied positions, in which the process is started with one sample of solid support comprising O-acylated hydroxymethyl groups corresponding to the following general formula where R^1 and R^2 are protecting groups, j, k, and r are integers 1 to 6;

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5067



(i) the sample is submitted to operations (i) and (ii) of claim 10;

(ii) the samples are then submitted to operation (iv) of claim 10;

(iii) samples B are submitted to operation (x) of claim 10, then the samples are mixed and submitted (n-r) times to operation (ix) of claim 10 and the sample is taken apart;

(iv) samples A (if any remaining) are mixed then submitted to operations (i) and (ii) of claim 10, then are used as starting samples in the next cycle of operations;

(v) The cycle of operations (ii) to (iv) of this claim is repeated (n-1) times;

(vi) all samples are submitted to deprotection and cleavage from the support.

15. A process for synthesizing a first sub-kit of free peptides carrying color or fluorescent labels at their N-terminus assigned to the amino acid residues occupying the non-varied positions, in which the process is started with p equal samples of N-protected O-aminoacyl support, all samples differing in the aminoacyl residue;

(i) first, the samples are submitted to operation (iv) of claim 10;

(ii) samples B are (n-r) times consecutively submitted to operation (v) of claim 10, then to one operation (xi) of claim 10, and after mixing, the sample is taken apart;

(iii) samples A (if any remaining) are consecutively submitted to operations (iii), (i) and (ii) of claim 10 and the resultant mixtures are used as starting samples in the next cycle of operations;

(iv) the cycle of operations (i) to (iii) of this claim is repeated (n-1) times;

(v) all samples are submitted to deprotection and cleavage from the support.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5068

16. A process for synthesizing an amino acid tester sub-kit of free peptides comprising the following steps:

(i) the process is started with *p* equal samples of N-protected O-aminoacyl support, all samples differing in the acylamino residue;

(ii) first, the samples are submitted to operation (iv) of claim 10;

(iii) on samples A (if any remaining) operations (iii), (i) and (ii) of claim 10 are consecutively executed then the samples are used in the next cycle operations;

(iv) samples B together with the resultant B samples of the previous cycle (if executed) are submitted to operation (vii) of claim 10;

(v) if $r < n$ samples B are submitted to one operation (v) of claim 10 otherwise are taken apart;

(vi) cycle comprising operations (ii) to (v) of this claim are repeated (n-1) times;

(vii) finally, the resultant B samples are submitted to deprotection and cleavage from the support.

17. A process for synthesizing an amino acid tester sub-kit of peptides bound to unlabeled support comprising the following steps:

(i) the process is started with a sample of solid support, carrying blocked primary amino groups attached through a spacer;

(ii) The sample is first consecutively submitted to deprotection and operations (i) and (viii) of claim 10;

(iii) then the samples are treated according to operations (ii) to (vi) of claim 16;

(vi) finally the resultant B samples are submitted to deprotection.

18. A process for synthesizing a first sub-kit of a normal parent peptide library bound to color and/or fluorescent support where the color, or the fluorescence, or the size or the specific gravity of the beads or combinations of these characteristics are assigned to the amino acid residues occupying the non-varied position;

(i) the process is started with *p* equal samples of polymer and

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5069

glass supports of different bead sizes comprising free or protected primary amino groups wherein the beads are colored or fluorescent, differing in at least one of the mentioned characteristics;

(ii) the samples are submitted to operations (ii) to (v) of claim 13;

(iii) finally all samples are submitted to deprotection.

19. A process for synthesizing a first sub-kit bound to color and/or fluorescent supports, using solid support comprising acylaminoalkyl groups corresponding to the following general formula where R^1 and R^2 are protecting groups, j, k, and f are integers 1 to 6

$$R^1\text{-NH-(CH}_2\text{)}_j\text{-CO-NH-(CH}_2\text{)}_k\text{-CH(}R^2\text{-HN)-CO-NH-(CH}_2\text{)}_f\text{-}$$

and the color or fluorescent markers assigned to the amino acid residues occupying the non-varied position are attached to the support in the course of the peptide synthesis;

(i) the synthesis is started with one sample of support;

(ii) the sample is submitted to operations (i) to (v) of claim 14;

(iii) finally, all samples are submitted to deprotection.

20. A process for synthesizing a sub-kit comprising all vicinal type second order sub-libraries of a parent peptide library of unlabeled soluble peptides, in which the process is started with *p* equal samples of O-acylamino support, all samples differing in the acylamino residue;

(i) the samples are submitted to operation (xiii) of claim 10;

(ii) samples A (if any remaining) are consecutively submitted to operations (iii), (i), (ii) of claim 10 then the resultant A samples are used in the next cycle of operations;

(iii) samples B are submitted to operation (vi) of claim 10 then the unmixed resultant samples are one by one submitted to *n-r* consecutive cycles of operations (i) to (iii) of claim 10;

(iv) all resultant samples originating from samples B are taken apart;

(v) cycle of operations (i) to (iv) this claim are repeated *n*-2

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5070

times;

(vi) all samples are submitted to cleavage and deprotection.

21. A process for synthesizing a sub-kit bound to unlabeled support comprising all vicinal type second order sub-libraries of a parent peptide library, in which a sample of solid support, carrying blocked primary amino groups attached through a spacer, is consecutively submitted to deprotection, operations (i) and (viii) of claim 10, then the samples are treated according operations (i) to (v) of claim 20, and finally all samples are submitted to deprotection.

22. A process for synthesizing a sub-kit comprising all vicinal type second order sub-libraries of a parent peptide library of soluble peptides, carrying color or fluorescent labels at their C-terminus, assigned to the amino acid residue occupying the lower coupling position of the two vicinal non-varied positions, in which the process is started with *p* equal samples of solid support comprising N-protected O-aminoacyl groups wherein the aminoacyl group is a color or fluorescent marker, differing in color or fluorescence of the label of the support;

(i) first, operation (xv) of claim 10 is executed;

(ii) samples A (if any remaining) are submitted to operation (v) of claim 10, then the resultant A samples are used in the next cycle of operations;

(iii) samples B are consecutively submitted to operations (ii), (iii), (i) and (ii) of claim 10, then the resultant samples are submitted to $n-r$ consecutive cycles of operation (v) of claim 10 then the samples are taken apart;

(iv) cycle of operations (i) to (iii) of this claim is repeated $(n-2)$ times;

(v) all samples are submitted to cleavage and deprotection.

23. A process for synthesizing a sub-kit comprising all vicinal type second order sub-libraries of a normal parent library of peptides bound to color or fluorescent supports, when the color or fluorescence or the size or the specific gravity of the support is assigned to the amino acid residue occupying the lower coupling position of the two vicinal non-varied positions, and in which the process is started with *p* equal

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5071

samples of polymer and glass supports comprising free or protected primary amino groups, wherein the beads of different size are colored or fluorescent, differing in at least one of the mentioned characteristics of the support, then the samples are submitted to operations (i) to (iv) of claim 22, finally all samples are submitted to deprotection.

24. A process for synthesizing a sub-kit comprising all vicinal type second order sub-libraries of a normal parent library of peptides bound to color or fluorescent supports, when the color or fluorescence of the support is assigned to the amino acid residue occupying the lower coupling position of the two vicinal non-varied positions, and in which the process is started with a single deprotected sample of solid support comprising acylaminoalkyl groups corresponding to the following general formula where R^1 and R^2 are protecting groups, j, k, and r are integers 1 to 6

$$R^1\text{-NH-(CH}_2)_j\text{-CO-NH-(CH}_2)_k\text{-CH(R}^2\text{-HN)-CO-NH-(CH}_2)_r\text{-}$$

and the color or fluorescent labels are attached to the support in the course of the peptide synthesis;

(i) the sample is submitted to operations (i) and (ii) of claim 10;

(ii) the samples are submitted to operation (xiii) of claim 10;

(iii) samples A (if any remaining) are consecutively submitted to operations (iii), (i), (ii) of claim 10 then the resultant A samples are used in the next cycle of operations;

(iv) samples B are submitted to operation (x) of claim 10, then mixed and submitted to operations (i) and (ii) of claim 10 then the resultant samples are submitted to n-r consecutive cycles of operation (v) of claim 10 then the samples are taken apart;

(v) cycle of operations (ii) to (iv) of this claim is repeated n-2 times;

(vi) all samples are submitted to deprotection.

25. A process for synthesizing a sub-kit comprising all vicinal type second order sub-libraries of a normal parent library of peptides bound to color or fluorescent supports, when the color or fluorescence of the

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5072

support is assigned to the amino acid residue occupying the lower coupling position of the two vicinal non-varied positions, and in which the process is started with a single deprotected sample of polymer or glass supports comprising O-acylated hydroxymethyl groups corresponding to the following general formula where R^1 and R^2 are protecting groups, j, k, and f are integers 1 to 6

$$R^1\text{-NH-(CH}_2\text{)}_j\text{-CO-NH-(CH}_2\text{)}_k\text{-CH(R}^2\text{-HN)-CO-NH-(CH}_2\text{)}_f\text{-COO-CH}_2\text{-}$$

and the color or fluorescent labels are introduced in the course of the peptide synthesis;

(i) the sample is submitted to operations (i) to (v) of claim 24;

(ii) all samples are submitted to deprotection and cleavage.

26. A method for determination of the amino acid sequences of bioactive peptides ("domino strategy") using kits according to claims 1 to 9 whereby
the use of unlabeled sub-kits comprises three consecutive steps;

(i) determination of the amino acid occurrence list by executing the screening experiments with all components of the amino acid tester sub-kit;

(ii) determination of the occurrence library by carrying out screening experiments with selected components of the first sub-kit;

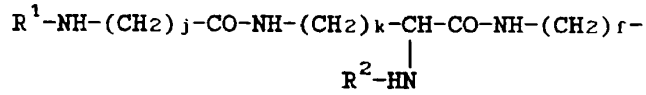
(iii) determination of the amino acid sequences by the domino like use in screening of selected components of the second sub-kit(s) of the parent peptide library or by synthesizing the second sub-kit of the occurrence library and doing screening tests with its components;

while when using labelled kits the experiments described in (i) can be omitted, those of (ii) are executed with all components of the first sub-kit, and (iii) is applied unchanged.

27. Polymer and glass supports comprising free or protected primary amino groups, wherein the beads are colored or fluorescent.

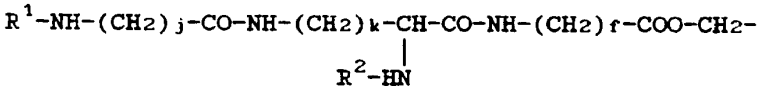
Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5073

28. Polymer and glass support comprising acylaminoalkyl groups corresponding to the following general formula where R^1 and R^2 are protecting groups, j, k, and f are integers 1 to 6.



29. Polymer or glass supports comprising N-protected O-aminoacyl groups wherein the aminoacyl group is a color or fluorescent marker.

30. Polymer or glass supports comprising O-acylated hydroxymethyl groups corresponding to the following general formula where R^1 and R^2 are protecting groups, j, k, and f are integers 1 to 6.



31. Polymer or glass supports according to any of claims 27 and 29 derived by the use of 4-[4-[N-Ethyl-N-[3-[*tert*-butyloxycarbonyl]amino-propyl]amino]phenylazo]benzoic acid (EPAP) as color marker.

32. 4-[4-[N-Ethyl-N-[3-[*tert*-butyloxy-carbonyl]aminopropyl]amino]-phenylazo]benzoic acid (EPAP).

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5074

WO9525116

Publication Title:

Method and substrate for performing multiple sequential reactions on a matrix

Abstract:

A method and apparatus are provided for preparing a substrate upon which is located microdrop-sized loci at which chemical compounds are synthesized or diagnostic tests are conducted. The loci are formed by applying microdrops from a dispenser from which a microdrop is pulse fed onto the surface of the substrate.

Data supplied from the esp@cenet database - http://ep.espacenet.com

This Patent PDF Generated by Patent Fetcher(TM), a service of Patent Logistics, LLC

PCT WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 6 : C07H 21/00, C12Q 1/68 — A1

(11) International Publication Number: **WO 95/25116**

(43) International Publication Date: 21 September 1995 (21.09.95)

(21) International Application Number: PCT/US95/03143

(22) International Filing Date: 14 March 1995 (14.03.95)

(30) Priority Data:
08/213,857 16 March 1994 (16.03.94) US

(71) Applicant: CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY [US/US]; 1201 East California Boulevard, Pasadena, CA 91125 (US).

(72) Inventors: BALDESCHWIELER, John, D.; 571 Busch Place, Pasadena, CA 91105 (US). GAMBLE, Robert, C.; 3390 Ellington Villa Drive, Altadena, CA 91001 (US). THERIAULT, Thomas, P.; 203 39th Street, Manhattan Beach, CA 90266 (US).

(74) Agents: SWANSON, Barry, J. et al.; Swanson & Bratschun, L.L.C., 8400 East Prentice Avenue #200, Englewood, CO 80111 (US).

(81) Designated States: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, UZ, VN, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO patent (KE, MW, SD, SZ, UG).

Published
With international search report.

(54) Title: METHOD AND APPARATUS FOR PERFORMING MULTIPLE SEQUENTIAL REACTIONS ON A MATRIX

(57) Abstract

A method and apparatus are provided for preparing a substrate upon which is located microdrop-sized loci at which chemical compounds are synthesized or diagnostic tests are conducted. The loci are formed by applying microdrops from a dispenser from which a microdrop is pulse fed onto the surface of the substrate.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5076

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	**GB**	United Kingdom	**MR**	Mauritania
AU	Australia	**GE**	Georgia	**MW**	Malawi
BB	Barbados	**GN**	Guinea	**NE**	Niger
BE	Belgium	**GR**	Greece	**NL**	Netherlands
BF	Burkina Faso	**HU**	Hungary	**NO**	Norway
BG	Bulgaria	**IE**	Ireland	**NZ**	New Zealand
BJ	Benin	**IT**	Italy	**PL**	Poland
BR	Brazil	**JP**	Japan	**PT**	Portugal
BY	Belarus	**KE**	Kenya	**RO**	Romania
CA	Canada	**KG**	Kyrgystan	**RU**	Russian Federation
CF	Central African Republic	**KP**	Democratic People's Republic of Korea	**SD**	Sudan
CG	Congo			**SE**	Sweden
CH	Switzerland	**KR**	Republic of Korea	**SI**	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	**KZ**	Kazakhstan	**SK**	Slovakia
CM	Cameroon	**LI**	Liechtenstein	**SN**	Senegal
CN	China	**LK**	Sri Lanka	**TD**	Chad
CS	Czechoslovakia	**LU**	Luxembourg	**TG**	Togo
CZ	Czech Republic	**LV**	Latvia	**TJ**	Tajikistan
DE	Germany	**MC**	Monaco	**TT**	Trinidad and Tobago
DK	Denmark	**MD**	Republic of Moldova	**UA**	Ukraine
ES	Spain	**MG**	Madagascar	**US**	United States of America
FI	Finland	**ML**	Mali	**UZ**	Uzbekistan
FR	France	**MN**	Mongolia	**VN**	Viet Nam
GA	Gabon				

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5077

METHOD AND APPARATUS FOR PERFORMING MULTIPLE SEQUENTIAL REACTIONS ON A MATRIX

FIELD OF THE INVENTION

The present invention is directed to a method and apparatus for performing sequential reactions on a plurality of sites on a matrix using noncontiguous microdrop-sized loci. The apparatus and method are useful for performing a test or synthesis involving sequential steps such as DNA sequencing, DNA diagnostics, oligonucleotide and peptide synthesis, screening tests for target DNA, RNA or polypeptides, synthesis of diverse molecules, DNA separation technology whereby DNA binds to target molecules, preparation of polysaccharides, methods for making complementary oligonucleotides, and any other test, sequencing or synthetic method utilizing a sequence of steps at a locus. An advantage or improvement can be obtained by providing loci so that combinations of different reactions may be conducted on the same matrix.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Methods are known for performing a plurality of sequential tests or reactions at loci on a matrix by attachment of molecules to a solid phase. Typically, a solid phase is prepared having a free functional group such as a hydroxy group, amino group, etc. and linking groups are attached to the surface by way of covalent linkages. These linkers serve as "handles"

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5078

to which molecules may be attached for sequential synthesis of such linear molecules as polypetides and polynucleotides. A disadvantage of such solid state synthesis is that the entire substrate or a large portion of the substrate must be exposed to a single reagent, such as the reagent which is the next molecule to be attached to the substrate, a rinsing agent or a deprotecting agent.

In some instances, locations on the substrate can be selectively treated if the reaction to be conducted is photolytic in nature, so masks may be prepared to expose selected areas to the activating radiation. However, an obvious disadvantage is that reactions must be devised which can be conducted by photolytic activation and different masks must be used to shield portions of the substrate at which the reaction is undesired.

The present invention provides a method whereby reactions may be conducted on noncontiguous microdrop-sized loci on a substrate. Since the reagents according to the present invention are in liquid form, virtually any chemical reaction which may be conducted in solution or suspension may be performed.

It is therefore an object of the present invention to provide a method and apparatus for performing a plurality of sequential reactions on a substrate whereby the reactions are conducted on microdrop-sized loci and, if desired, a different sequence of reactions may be conducted at each locus.

Furthermore, an object of the present invention is to provide a method and apparatus for conducting a plurality of sequential reactions on a matrix using

liquid reagents whereby the chemical reactions may be performed in solution or suspension.

These and other objects of the invention will be apparent from the following description, the appended claims and from the practice of the invention as described herein.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a method and apparatus for performing a plurality of chemical reactions at different sites on a substrate wherein the same or different tests, sequencing or synthetic reactions may be conducted at the loci. The invention provides a substrate having a surface which has chemical moieties that are reactive with reagents that are dispensed from a microdrop dispensing device. These reagents may be molecules that become attached to the surface in the microdrop loci to which they are dispensed, as in the application of activated nucleic acid phosphoramidites, or the reagents may modify the surface in the microdrop loci for subsequent chemical reactions, as in the deprotection of the 5' hydroxyl group during the synthesis of oligonucleotides. In the case of delivery of reagents that become attached to the surface, the invention provides a substrate having a surface to which a first reagent can be attached by dispensing microdrops of the reagent in liquid form onto the substrate. The dispenser is displaced relative to the surface and at least one microdrop is applied thereto containing the same or a different reagent. By repeating this using the same or a different first reagent in liquid form, a plurality of loci on the surface may be prepared wherein the reagents covalently attach at microdrop-sized loci wherein the boundaries of each locus are not contiguous to any adjacent locus. The surface

may then be washed to remove unattached reagent. If needed, the entire surface may be treated, or alternatively, a selected subset of loci may be treated, with deprotecting reagents to expose reactive sites of the molecules attached to the surface. The deprotecting reagent may also be dispensed from the device. Then one or more microdrops containing a second reagent in liquid form may be dispensed at selected loci on the substrate surface, whereby the second reagent is selected to react with the molecules already attached to the matrix. The dispenser is again displaced relative to the surface to apply the second reagent at different loci using the same or a different second reagent which reacts with the respective attached molecules. Again, the entire surface will be washed to remove unreacted second reagents. Then the entire surface or selected subsets of loci may be treated with deprotecting agents, and this process may be repeated.

In the case of delivery of reagents that modify the reactivity of the surface, the invention provides a substrate having a surface to which the reagent is applied by dispensing one or more microdrops onto the substrate. The dispenser is displaced relative to the surface and one or more microdrops are applied thereto. This process may continue until the desired set of microdrop-sized loci have been modified by the application of reagent. The surface may then be washed to remove excess reagent. The entire surface or a selected subset of loci, may be treated with a reagent that becomes attached to the loci modified by the microdrop dispensed reagent, or alternatively a reagent may be applied that becomes attached to the surface except at the loci that were previously modified by the microdrop dispensed reagent. If the

reagents that become attached to the surface contain chemical moieties that can be modified by the microdrop dispensed reagent, the process may be repeated such that the same or different loci are modified by the microdrop dispensed reagent and then reacted with a reagent or reagents that become attached to the modified loci until the desired compounds have been synthesized on the substrate.

It will also be recognized that a combination of the above strategies may be employed wherein both the reagents that become attached to the surface in microdrop loci and reagents that modify the surface in microdrop loci are dispensed by the microdrop dispensing device.

Upon completing the desired number of sequential steps at the loci on the substrate, the compounds may be removed selectively or non-selectively, if desired, from the substrate using cleavage reagents which remove compounds bound through linking groups to solid substrates. Cleavage agents include enzymatic or other chemical agents, which may also be dispensed as microdrops at selected loci. It will be appreciated, for example, in the case of diagnostic methods, isolation of the final compound located in each of the loci is not important, therefore cleavage of the compound from the substrate is an optional step.

In some circumstances, it may be desirable to analyze the molecules directly upon cleavage from the substrate by such techniques as mass spectrometry. In such instances, it is desirable to provide a linker (the moiety through which the molecule in question is attached to the substrate) which is cleavable by electron beam, laser, or other energy

source so that molecules at a locus may be selectively cleaved from the substrate. This is particularly advantageous for analyzing the molecules by mass spectrometry, whereby the laser or electron beam cleaves the molecules from the substrate, ionization occurs, and the ions are accelerated into a mass spectrometer.

The substrate may be a solid, such as glass, prepared to receive linkers attached to the surface. Porous substrates, such as paper or synthetic filters may be used, as well as filters (such as those sold by Nucleopore™) having straight, parallel micropores. In such a microporous substrate, the reactions may take place within the pores, thus amplifying the potential signal at the locus.

It will also be recognized that the present invention provides a method for determining the presence of an analyte in a sample by contacting the sample with a device prepared according to the present invention having a plurality of microdrop-sized loci of covalently attached reagents whereby the analyte binds to at least some of the reagents. Detection of the loci at which binding occurs may be performed by conventional methods such as fluorescence, chemiluminescence, colorimetric detection, radioactive label detection, and the like.

The present invention also provides a method for delivery of microdrops to the substrate that relies on positioning the substrate such that the separation between the dispenser and substrate is less than the separation required for free droplet formation. In this configuration, the liquid column emerging from the nozzle due to the applied pressure pulse impacts upon the substrate before a droplet forms (i.e., a

column of liquid stretches between the nozzle and substrate). The impact upon the substrate alters the flow of liquid from the nozzle such that a much smaller amount of liquid is ultimately delivered to the substrate as compared to the case where distinct droplets are formed. This method allows for much closer spacing of loci on the substrate and higher positional precision for the placement of loci.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1A shows a substrate having microdrop sized loci on one surface. FIG. 1B shows the cross-section of a microporous substrate with straight, parallel micropores having a microdrop-sized locus containing attached molecules.

FIG. 2 is a schematic side view of a microdrop dispenser and substrate.

FIG. 3 is a schematic illustration of two loci at which different peptides are prepared.

FIG. 4 is a schematic illustration of a flexible, continuous substrate used with the method of the invention.

DESCRIPTION OF PREFERRED EMBODIMENTS

The present invention provides a method for performing a plurality of sequential reactions on a substrate. The surface of the substrate contains chemical moieties that react with reagents that are dispensed from a microdrop dispensing device. The reagents may be molecules that become attached to the surface of the substrate in the microdrop loci to which they are dispensed or the reagents may modify

the surface of the substrate to facilitate the formation of a covalent bond between the surface and a second reagent. In the latter case, the entire surface or a selected subset of loci may then be treated with a second reagent that becomes covalently attached to the loci modified by the first reagent. If only a selected subset of loci are treated with the second reagent, this step may be repeated with a third reagent that becomes attached to another subset of loci modified by the first reagent.

The present invention may be utilized to prepare, for example, molecules such as peptides. In a preferred embodiment a linker molecule is provide as the first reagent whereby one end of the linker will be attached to the substrate surface. The other end of the linker will be adapted to form a linkage with the carboxy terminal of an amino acid or peptide, to form, for example, an amide or ester linkage. This end of the linker may be initially chemically protected by protecting groups such as t-butoxycarbonyl groups (t-BOC) or other protecting groups known in the peptide synthesis art. By application of a second reagent onto the locus which removes a protecting group, such as acid solution, the protecting group may be removed. The next reagent applied at each locus would then be an amino terminal-protected and side-chain protected amino acid or polypeptide, preferably having an activated C-terminal group for linking the C-terminal to the end of the linker. This process may be repeated with the same or different amino acids or peptides at each of the microdrop loci until the substrate includes the peptides of desired sequences and lengths. Thereafter, the protective groups are removed from some or all of the peptides, as desired. The deprotection may be achieved using a common deprotection agent, which removes the protecting

groups on side chains and the amino ends simultaneously, as is known in the peptide synthesis art. The peptides may be cleaved from the linker using methods known to those of ordinary skill in the peptide synthesis art which cleave peptides from a solid support as, for example, used in the Merrifield synthesis technique.

It will be realized that a particular advantage of this method is that, by keeping a record of the reagents utilized at each of the microdrop sized loci, peptides of different lengths and sequences maybe made concurrently on the same substrate. Such peptides may have a variety of uses including, but not limited to, screening for biological activity whereby the respective peptide sequences at each locus is exposed to a labeled or unlabeled peptide receptor, such as an antibody, a cell receptor, or any other variety of receptor.

The method according to the present invention may also be utilized to prepare oligonucleotides by sequentially dispensing through the microdrop dispenser protected nucleic acids. These may be added sequentially at each locus using the same or different nucleic acids or polynucleotides. Preferably, the 3'-end of the oligonucleotide will be attached to the linker molecule and the oligonucleotide will be synthesized from the 3' end to the 5' end using known techniques for oligonucleotide synthesis. The protecting groups are preferably those known in the oligonucleotide synthesis art. The oligonucleotide may be utilized, for example, for hybridization with an unknown oligonucleotide to determine the sequence of the unknown oligonucleotide.

An oligonucleotide synthesized at one locus may be

utilized to synthesize its complementary oligonucleotide by using DNA polymerase. Preferably, the locus will comprise straight pores in a porous substrate. The complementary oligonucleotide may then be removed by washing a denaturing agent through the pores onto a new substrate, thereby resulting in one substrate (the original porous substrate) containing the oligonucleotides which were originally synthesized, and another substrate containing their complements.

An array of synthesized oligonucleotides may be used to generate an array of complementary oligonucleotides by using pre-synthesized oligonucleotides, optionally containing a reactive chemical moiety such as a spacer with a primary amine that attaches to the phosphate chain. In this embodiment, the pre-synthesized oligonucleotides are hybridized to the array of oligonucleotide prepared with the microdrop dispenser. The localized complementary oligonucleotides are preferably removed from the synthesized array in denaturing conditions and washed onto a second substrate. This second substrate is preferably a material such as a nylon or nitrocellulose membrane, or surface with amino reactive linkers, where the oligonucleotides become immobilized. Preferably a flow system onto the second substrate is utilized such that the net flow is essentially perpendicular to the original substrate so that the complementary oligonucleotides in adjacent loci do not intermingle. This may also be accomplished by employing an electric field that is perpendicular to the original substrate such that the complementary oligonucleotides electrophorese onto the second substrate.

In yet another embodiment of the present invention the substrate to which oligonucleotides are attached may

be used as a tool in gene therapy whereby mutations may be identified in a genome. For example, oligos complementary to fragments of the known sequence of the normal gene may be attached to the substrate. Digestion of a single strand of the gene from the subject in question and contact with the substrate containing complementary oligo sequences may reveal oligos to which there is binding, thereby indicating the presence or absence of fragments in the subject's genome.

The substrate containing oligos may also be used to identify DNA in samples from the environment to detect, for example, the presence or absence of certain species, in the case where the DNA sequences are known, or to determine the presence of DNA fragments which anneal to the substrate in the case where the DNA sequences are unknown. The oligonucleotides may thereafter be amplified by PCR amplification technology.

If the substrate is a porous filter, membrane or other material which can be cut, the substrate may be divided into portions containing one locus (or a plurality of loci having identical or different molecules). These portions may be placed in microtiter wells for diagnostic or therapeutic tests whereby each well is separately treated with a sample.

One application of the present invention is to prepare an array of oligonucleotides for the sequencing of DNA by hybridization. The basis for this method is that a given sequence can be constructed from the knowledge of its constitutive set of overlapping sequence segments, provided there is a certain degree of uniqueness among these segments. The set of overlapping sequence segments of length n can be

obtained by hybridization of the unknown DNA to a set of *n*-mer oligonucleotides which represent all 4^n possible sequences. The advantages of sequencing by hybridization include faster sequence determination, lower cost, ease of automation and higher reliability (as compared to a single sequence reading from a gel). For an array of oligonucleotides of length *n* it is possible to determine the average length of DNA fragment that can be unambiguously sequenced. Although difficulties can arise when a fragment of length *n-1* appears in the sequence more than once, nevertheless, statistical analyses have shown sequencing by hybridization to be a feasible method. The relationship between the length of oligonucleotides and the length of the average resolvable sequence has been determined. Typical numbers are shown in Table 1. For example, an array of all 65,536 octamers can be used in the sequencing of short, 100 to 200 base pair fragments.

Furthermore, it has been shown that inclusion of a random content fixed length gap in the oligonucleotides of the array can be used to achieve higher lengths of sequence resolution. The combination of an array of all 4^8 octamers and an array of all 4^8 octamers with a random nucleotide inserted in the middle of the octamer has nearly the same resolving power as an array of all 4^9 nonamers, even though the nonamer array is twice as large.

The preferred ink jet device utilized to deliver the microdrops generates addresses less than 100 microns across, and address sizes as small as 10 microns are attainable. A primary advantage to use of the ink jet is that standard methods for oligonucleotide

synthesis that have been optimized for extremely high yields can be employed.

By employing a multiple jet device the synthesis of complete arrays of oligonucleotides can proceed four times faster and with less material than can be accomplished by performing only addressable deprotection. The simplest design to accomplish this is a five jet system, one jet each for the four phosphoramidite reagents and one jet for the activating tetrazole solution. The operation of this device is directly analogous to the operation of color ink jet printers. In every coupling cycle, for each address on the array a number is assigned to indicate the correct synthon to be added. During the reagent delivery process, the stage rasters through the addresses of the array. Tetrazole is first applied to the substrate. At each address an additional offset motion is applied to bring the correct phosphoramidite jet (A, C, G or T) in line. One or more droplets of the phosphoramidite are then dispersed. Subsequent to this a second offset motion is employed to bring the tetrazole jet in line with the address. After dispersal of the tetrazole reagent, the stage can raster to the next address for a new delivery cycle. The software for the advanced device is very similar to the control software described in the examples with a modification that a 'color' bitmap is used to represent the array. The four phosphoramidite reagents are each assigned to a specific color. During the raster through the array for delivery, the color at each pixel in the bitmap is translated to the offset motion to bring the correct reagent in line with the address. The tetrazole jet fires at every address position.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5090

The tetraethylene glycol linker is useful for single hybridization with oligonucleotides. Low non-specific binding has been observed. Longer polymers of ethylene glycol may be utilized, as well as modified phosphodiesters. Phosphoramidite reagents are commercially available that may be polymerized in a stepwise manner to yield dimethoxytrityl-capped linkers of virtually any length desired. Since this linkage is ultimately a phosphodiester with phosphates spaced by alkyl chains of only a few carbons, it will have similar hydrophilicity to standard DNA. Further, since the linker is negatively charged at neutral pH, lower non-specific binding of DNA to the substrate is expected.

To address the question of coupling efficiency and thus the sequence fidelity in the synthesized arrays the preferred method is to synthesize large arrays, where all addresses contain the same sequence, and perform Maxam-Gilbert sequencing directly on the substrate region that contains the array. Prior to the start of sequencing the array may be end-labeled with ^{32}P phosphate.

The sequencing by hybridization may require either larger arrays, for example the undecamer array, or arrays that have been optimized to obtain more information from a set of hybridization tests. For such large arrays, the complete set of undecamers has 4.2 million members, therefore small address and guard regions are advantageous. With 100 micron addresses and 50 micron guard regions, parameters that are within the capacity of examples disclosed herein, the entire undecamer array would occupy an area of 10.5x10.5 square inches.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5091

In yet another embodiment the microdrops may be used to synthesize polysaccharides using the monosaccharides as building blocks. However, it will be readily apparent that many other types of polymeric materials may be made according to the present invention whereby the same or different polymers maybe be constructed at each locus on the substrate.

In a particularly advantageous use of the present invention, small molecules may be made whereby the molecules may be built sequentially using reagents in a multistep synthesis. These need not be polymeric molecules where there is a repetitive unit. Since different reagents may be applied to one or more of the loci on the substrate, there is an advantageous diversity of structures that can be attained by the multiple and concurrent synthesis technology according to the present invention. The target compounds may be contemporaneously, but separately synthesized on the substrate to generate an ensemble of compounds which may or may not be structurally related. Each step of the synthesis which occurs at each locus should involve soluble reagents, and should occur at a reasonable yield at typical ambient temperatures, since most or all of the sites on the substrate will be essentially isothermal. For example, a benzodiazepine may be prepared from an amino acid bound to the substrate by the carbon terminus. Treatment with a microdrop containing 2-aminobenzophenone imine forms a substrate-bound imine and then treatment with TFA (trifluoro acetic acid) generates a benzodiazepine. By using different amino acids and different aminobenzophenones, an array of different benzodiazepines maybe made in this manner.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5092

Reference will be made now to the various figures which further describe the preferred modes for practicing the invention.

Referring now to the figures, in Fig. 1A there is shown a substrate 20A having on one surface thereof the microdrops 21 which define each locus at which the chemical synthesis or diagnostic reaction may take place according to the present invention. Since each microdrop is discrete and noncontiguous with adjacent microdrops, reactions may be conducted at each microdrop which are independent of reactions at other microdrops. In Fig. 1B, there is shown a microporous substrate 20B having straight, parallel micropores 40. The growing chains of molecules (41) may be attached within the pores, thus amplifying the synthesis by the additional surface area available beneath the surface of the substrate.

Referring to Fig. 2 there is shown a schematic elevation of the substrate 20 upon which is located on one surface thereof the microdrops 21. Schematically shown is the microdrop multiple jet head dispenser 22 from which, as shown, is being dispensed a microdrop 23. The microdrop is dispensed by a pressure pulse generating means 24, such as a piezoceramic driven pressure pulse device as is typically known in the art of inkjet printers. The timing and amplitude of the pulse are controlled by a suitable electrical controller 25. The location of the dispenser 22 may be suitably controlled by a computer controlled mechanical grid or arm by which precise movements of the dispenser to different locations over the surface 20 can be controlled by control means 26. A reagent source 28 may serve as a reservoir for a particular reagent which is being dispensed, with the flow of the reagent being

controlled by a flow controller 27. Alternatively, the dispenser 22 may be held stationary and the substrate 20 may be moved by appropriate controllers in a precise way to locate the microdrops on the substrate surface 20. As part of the control of the location of the dispenser 22, the controlling means 26 will also contain a memory to record the identity of each reagent and the sequence at which they were added to each microdrop locus.

Referring to Fig. 3, there is shown an elevational view of the substrate 20 and a schematic view of the elements which may be present at two of the microdrop loci. At each of the loci there is a plurality of chemical linkers 30 which are attached at one end to the substrate surface 20 and at the other end to a molecule which is being synthesized at the particular locus. In the figure the letter "A" represents an amino acid. By separate microdrop treatments in one locus the peptide having the sequence (using conventional peptide nomenclature whereby the last amino acid added to the chain is the N-terminus) the peptide $A_3A_2A_1$ has been made by applying in sequence the reagents containing the amino acids A_1, A_2 and A_3. At the other microdrop location the peptide $A_3A_4A_1$ has been made by applying in sequence the amino acid reagents containing A_1, A_4 and A_3.

Referring to Fig. 4, there is shown a schematic diagram of one embodiment of an apparatus utilizing the present invention. The substrate 35 is a continuous, flexible material to which chemicals may covalently linked, such as flexible polystyrene having surface groups to which chemical linkers may be attached, such as those used in solid phase peptide synthesis. One or more electromechanically controlled dispensers 36A and 36B are used to apply

microdrops onto the substrate 35. The movement of the substrate 35 is also electromechanically controlled in the longitudinal direction shown by the arrow. The movement of the dispensers 36A and 36B may be controlled along the transverse direction, as well as along the longitudinal direction. Excess reagent is washed off in a bath in tank 37. Detecting means 38, which is also controlled in the transverse and lateral directions, is utilized to observe the loci for either quality control or, in the case of a diagnostic use, for a signal such as fluorescence, radioactivity, polarization, chemiluminescence, etc.

EXAMPLE 1

INK JET DEVICE

A device for reagent delivery was constructed consisting of two 25 mm micrometers that provide *x* and *y* translation coupled to 10 V, 0.5 amp per phase, 200 step per revolution stepper motors. A single motor step gives a travel of 2.5 μm. A 48 V power supply with dropping resistors was incorporated to increase high speed motor torque. A piezoelectric ink jet head was mounted vertically to a third 12.5 mm micrometer. The jet was positioned to fire droplets upwards to the underside of a microscope slide held to the top of a platform with a spring loaded slide holder. Electric pulses were generated with electronics that allow all pulse parameters, such as the driving voltage, pulse duration and frequency, to be adjusted. A video camera, which translates in *x* and *y* with the jet, was positioned above the slide to monitor drop ejection by focusing on the lower slide surface. Alternately, the camera could be rotated to view across the jet nozzle with

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5095

lighting provided by a strobed LED to allow for visualization of ejected droplets.

The ink-jet device was controlled by C/C++ program ASyn, with a Windows interface incorporated such that nearly all functions can be done with a mouse which can be placed inside a glove box along with the ink jet device. ASyn provides TTL level triggering to peripheral hardware through a multi-parallel port add-in card on a PC compatible computer.

The software allows for several modes of operation including a manual move and fire, a drawing mode that 'prints' a bitmap image, and a macro execution mode that can 'print' a number of images at different locations. A bitmap is a numerical representation of a two dimensional image made up of an array of pixels. In the case of black and white image, a 1 in the bitmap produces one color while a 0 produces the other. Thus the four bytes FF, 0, FF, and 0, whose binary 'bitwise' representation is 11111111, 00000000, 11111111, and 00000000 would produce alternating white and black lines 8 pixels wide if rendered on a computer screen as a bitmap. The logic of the program divides the arrays into 'addresses' and 'guard' positions that can have variable dimensions. The decision to fire at a given address is determined by the value of a pixel in the bitmap image. The mode of firing at an address can also be controlled to give single or multiple droplets in the center of the address as well as a pattern of single droplets to fill a square address area. In addition, logic has been incorporated into ASyn to generate the appropriate bitmaps for the synthesis of combinatorial arrays of oligonucleotides.

A variety of organic solvents including dibromomethane, nitromethane, acetonitrile and dimethyl formamide were found to be suitable for ink jet delivery. Dichloromethane was not found to be suitable for room temperature delivery although a cooled jet assembly provided better results. A reagent consisting of 0.8 M $ZnBr_2$ in 9:1 nitromethane:isopropanol has been selected for the deprotection of the 5'O dimethoxytrityl protected deoxyribose during the on-chip synthesis of oligonucleotides.

While delivering water, the ink-jet pulse parameters can be readily adjusted for the delivery of single droplets free of satellites. When the jet nozzle to microscope slide separation is greater than 100 microns, the drop footprint on a glycidoxypropyl silanized slide can be varied from ~150 to ~250 microns depending on the driving voltage. When the nozzle to slide separation is less than 60 microns, the footprint is seen to decrease to between 60 and 80 microns. In this case the footprint is relatively independent of the driving voltage.

The driving pulse for the ink jet is optimized by setting the video camera to view across the nozzle of the jet with the LED strobe in the background. Driving voltage and delay parameters are adjusted while firing a continuous stream of droplets. It was found that the deprotecting reagent required a driving voltage that was approximately one third that which was required for water. A high degree of control can be exerted on the droplet size when firing deprotection reagent by adjusting the driving voltage. In the case of firing single droplets onto a slide, the size of the 'footprint' of the droplet as it spread onto the slide surface could be varied

from less than 100 μm to more than 250 μm by varying the drive voltage. A combination of suitable driving voltage in close positioning has yielded the delivery of droplets of deprotecting agent with a footprint on the order of 60 microns.

EXAMPLE 2

OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS

Oligonucleotide synthesis was performed using the ink jet to deliver deprotecting reagent.

A standard microscope slide was coated with glycidoxypropyl silane and reacted with tetraethylene glycol. A standard phosphoramidite synthetic cycle was used. The entire synthesis was performed in a dry nitrogen filled glove box. Prior to the first coupling reaction the slide was rinsed with acetonitrile (MeCN, distilled from calcium hydride) and dichoromethane (DCM) and vacuum dried for one minute. Phosphoramidite monomers were dissolved a 0.1M in acetonitrile. Tetrazole was dissolved at 0.5M in MeCN. Coupling was performed by adding 80 μl each of the tetrazole and phosphoramidite to an aluminum reaction trough. The glass slide was placed into the trough causing the liquid to spread evenly over the slide surface. Reaction was allowed to proceed for three minutes. The slide was then rinsed with MeCN and the coupling procedure repeated.

After coupling, the slide was dipped for two minutes into a Teflon and glass chamber that contained an oxidizing iodine/lutidine/MeCN/water solution purchased from Pharmacia (250μl each of Oxidation 1 and Oxidation 2). The slide was then rinsed twice with MeCN and DCM and dried in vacuum.

After drying, the slide was placed onto the ink jet platform for spraying of the appropriate pattern of deprotection reagent. The slide was allowed to sit for a period of five minutes after that last droplet was delivered. The slide was then rinsed twice with MeCN and DCM and vacuum dried in preparation for the next coupling cycle.

A the end of synthesis the slide was removed from the glove box and immersed overnight in a bath of 30% ammonia at room temperature.

A test of simple oligonucleotide synthesis was performed to generate 4x5 arrays of poly-T. In this study, 17 cycles of coupling were performed using a single spray pattern that deposited 15 droplets to all addresses. The addresses were spaced on 2 mm centers. At the end of synthesis the oligonucleotides were deblocked and hybridized with an end-labeled 15-mer of poly-A using 6x SSC/0.5%SDS and 400 ng of end-labeled probe. The synthesis of arrays of poly-T was successful.

It will be appreciated that the above described is intended to be illustrative and not restrictive and that many embodiments will be apparent to those with skill in the art upon reviewing the above description and following claims. The scope of the invention should, therefore, be determined not with reference to the above description, but should instead be determined with reference to the appended claims along with the full scope of equivalents to which such claims are entitled.

Table 1. Length of possible sequence determination versus the length of oligonucleotides used for hybridization.

Length of Oligonucleotide	Length of Sequence Identifiable*
7	80
8	180
9	260
10	560
11	1300
12	2450

*These numbers represent the length for which sequence reconstruction will be possible in 95% of all cases.

CLAIMS:

1. A method of step-by-step synthesis of an array of different chemical compounds at microdrop-sized loci, where each compound is covalently attached to or beneath the surface of a substrate comprising the steps of:

(a) applying through a single unit of a multiple reagent dispenser at least one microdrop of a first reagent in liquid form to said surface, wherein said substrate is chemically prepared to react with said first reagent to covalently attach said reagent to said substrate;

(b) displacing said multiple reagent dispenser relative to said surface, or the surface with respect to multiple reagent dispenser, and applying at least one microdrop containing either the first reagent or a second reagent from a different dispenser unit to said surface wherein said substrate is chemically prepared to react with said reagent to covalently attach said reagent to said substrate;

(c) optionally repeating step (b) at least one time using the same or different reagents in liquid form from different dispenser units wherein each of said reagents covalently attaches to said substrate to form covalently attached compounds;

(d) washing said substrate to remove unattached reagents;

(e) modifying said attached reagents;

(f) repeating steps (a) through (e) with the same or different reagents at various loci on the substrate; and

(g) optionally, selectively or nonselectively removing the attached compounds at said loci from said substrate.

2. A method of step-by-step synthesis of an array of different chemical compounds at microdrop-

sized loci, where each compound is covalently attached to or beneath the surface of a substrate comprising the steps of:

(a) applying through a single unit of a multiple reagent dispenser at least one microdrop of a first reagent in liquid form to said surface at the first locus;

(b) displacing the multiple reagent dispenser relative to said surface and applying through a second unit of a multiple reagent dispenser a second reagent to the first locus to form a mixture of reagents at the first locus wherein said substrate is chemically prepared to react with said mixture to covalently attach one or more of said reagents to said substrate at the first locus;

(c) optionally repeating steps (a) and (b) at additional microdrop sized loci of said surface where the same or different mixture of reagents are formed at each locus.

(d) washing said substrate to remove the excess reagents;

(e) modifying said attached reagents;

(f) repeating steps (a) through (e) with the same or different reagents at various loci on the substrate; and

(g) optionally, selectively or nonselectively removing the attached compounds at said loci from said substrate.

3. A method according to claim 1 or 2 wherein said substrate comprises a solid, non-porous material.

4. A method according to claim 1 or 2 wherein said substrate comprises a porous material.

5. A method according to claim 4 wherein

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5102

said porous material comprises paper.

6. A method according to claim 4 wherein said porous material comprises a sheet having internal straight, essentially parallel pores.

7. A method of preparing a substrate according to claim 1 or 2 wherein said reagents in said microdrops comprise protected or unprotected amino acids, thereby forming polypeptides attached at said loci.

8. A method of preparing a substrate according to claim 1 or 2 wherein said reagents in said microdrops comprise protected or unprotected nucleic acids, thereby forming oligonucleotides attached at said loci.

9. A method of preparing a substrate according to claim 1 or 2 wherein said reagents in said microdrops comprise protected or unprotected sugars, thereby forming oligosaccharides attached at said loci.

10. A method according to claim 8 further comprising the step of amplifying said oligonucleotides by polymerase chain reaction amplification.

11. A method according claim 8 further comprising the steps of forming the oligonucleotide complements of said attached oligonucleotides by use of polymerase and nucleic acids, and washing said complements from said substrate with a denaturing agent.

12. A method according to claim 8 further comprising the steps of hybridizing oligonucleotide complements to said attached oligonucleotides, and

washing said complements from said substrate with a denaturing agent.

13. A method according to claim 12 wherein said substrate comprises a porous membrane having straight, essentially parallel pores and said complements are removed through said pores onto a second substrate, wherein the relative locations of said complements on said second substrate correspond to the relative locations of their respective oligonucleotides on said substrate from which they were removed.

14. A method according to claim 1 or 2 wherein said reagents in said microdrops comprise chemical moieties for stepwise synthesis of target compounds, thereby forming said target compounds attached at said loci.

15. A method according to claim 1 or 2 wherein said compounds attached at said loci are cleaveable from said substrate by exposure to laser or electron beams.

16. A method according to claim 1 or 2 wherein said compounds attached at said loci are cleaveable from said substrate by chemical reagents.

17. A substrate prepared according to the method of claim 1 or 2.

18. A substrate prepared according to the method of claim 7.

19. A substrate prepared according to the method of claim 8.

20. A substrate prepared according to the method of claim 9.

21. A substrate prepared according to the method of claim 13.

22. A method for determining the presence of an analyte in a sample comprising the steps of contacting said sample with a substrate having a surface on which are contained microdrop-sized loci of covalently attached reagents, whereby said analyte binds to at least some of said reagents at said loci; and detecting the loci at which said binding occurs.

23. A method for detecting active molecules in a sample comprising the steps of contacting said sample with a substrate having a surface on which are contained microdrop-sized loci of covalently attached reagents; whereby said active molecules bind to at least some of said reagents at said loci; and detecting the loci at which said binding occurs.

24. A method according to claim 22 or 23 wherein said substrate is divided into separate portions and said portions are separately contacted with a sample.

25. A method according to claim 1 or 2 wherein said multiple reagent dispenser consists of multiple piezoelectric jet heads.

26. A method according to claim 25 wherein said quantities of first or subsequent reagents dispensed are microdrops having volumes of from 10 to about 150 picoliters.

27. A method according to claim 1 or 2

wherein said quantities of first or subsequent reagents dispensed are microdrops having volumes of from about 10 to about 150 picoliters.

28. A method of step-by-step synthesis of an array of oligonucleotides at microdrop-sized loci where each oligonucleotide is covalently attached to or beneath the surface of the substrate comprising the steps of:

(a) applying through a single unit of a multiple reagent dispenser at least one microdrop of a solution of tetrazole to the first locus;

(b) displacing said multiple reagent dispenser relative to said surface and applying through a different unit of a multiple reagent dispenser at least one microdrop of a solution of a nucleotide phosphoramidite to the first locus where the phosphoramidite and tetrazole reagents react with said surface to covalently attach the nucleotide to the surface through a phosphite bond;

(c) optionally repeating steps (a) and (b) at additional microdrop-sized loci of said surface where in step (b) the same or different nucleotide phosphoramidite is applied and the nucleotide becomes covalently attached to the surface;

(d) washing said substrate to remove unattached reagents;

(e) applying an oxidizing reagent to the entire substrate to modify the newly formed covalent attachments to phosphodiester bonds;

(f) washing said substrate to remove oxidizing agents;

(g) applying a deprotecting reagent to remove protecting groups to allow for attachment of additional nucleotides;

(h) washing said substrate to remove deprotecting reagent;

(i) optionally repeating steps (a) through (h) where the same or different nucleotide phosphoramidites are applied to the surface loci;

(j) optionally removing protecting groups from the oligonucleotides; and

(k) optionally selectively or nonselectively removing the attached oligonucleotides at said loci from said substrate.

29. A method of preparing a substrate having a plurality of non-contiguous microdrop-sized loci on a surface of said substrate, wherein at each of said loci a compound is covalently attached to or beneath said surface, comprising the steps of:

(a) applying through a single reagent dispenser to a first locus of said surface a quantity of a first liquid activating reagent wherein said reagent modifies said surface at said first locus to activate said surface for forming covalent bonds;

(b) displacing said single reagent dispenser relative to said surface and applying a quantity of said first activating reagent to said surface at a second locus and optionally repeating the displacing and applying steps at third and subsequent loci, each such locus thereby becoming modified locus;

(c) washing the substrate to remove excess reagent; and

(d) applying a quantity of a second reagent to the entire substrate, including loci modified by a steps a, b and c to yield the second reagent covalently bound to said surface at said modified loci.

30. The method of claim 29 wherein said first activating reagent is a deprotection reagent which removes protecting groups of said locus.

31. The method of claim 29 wherein said first activating reagent is an activation reagent which activates reactive groups of said locus.

32. The method of claim 29 wherein step (d) is repeated with the same or a different second reagent where the same or different loci have been modified in accordance with steps (a) through (c).

33. The method of claim 32 wherein said second reagent comprises protected or unprotected amino acids, thereby forming polypeptides attached at said loci.

34. The method of claim 32 wherein said second reagent comprises protected or unprotected nucleotides, thereby forming oligonucleotides attached at said loci.

35. The method of claim 34 wherein said activating reagent is selected from the group consisting of trichloroacetic acid in dichloromethane and zinc bromide in nitromethane:isopropanol.

36. The method of any of claims 29 through 34 wherein said quantity of activating reagent is applied by a pulse from a single piezoelectric jet head.

37. The method of claim 36 wherein said quantity of activating reagent dispensed is a microdrop having a volume of from about 10 to about 150 picoliters.

38. The method of claim 29 wherein said quantity of activating reagent dispensed is a microdrop having a volume of from about 10 to about 150

picoliters.

39. The method of any of claims 29 through 34 wherein said substrate comprises a solid, non-porous material.

40. The method of any of claims 29 through 34 wherein said substrate comprises a porous material.

41. A substrate prepared according to the method of any of claims 29 to 31.

42. The substrate according to claim 41 wherein said substrate comprises a solid, non-porous material.

43. The substrate according to claim 41 wherein said substrate comprises a porous material.

44. A substrate prepared according to the method of claim 32 wherein repeated application of the same or different second reagent results in the formation of polymers covalently bound to said surface at said loci.

45. The substrate according to claim 44 wherein said polymer is a peptide.

46. The substrate according to claim 44 wherein said polymer in an oligonucleotide.

47. A method of preparing a substrate having a plurality of non-contiguous microdrop-sized loci on a surface of said substrate, wherein at each of said loci a compound is covalently attached to or beneath said surface, comprising the steps of:

(a) positioning a piezoelectric jet

head dispenser at a predetermined distance from said substrate and applying at least one microdrop of a liquid reagent;

(b) displacing said dispenser relative to said surface and applying at least one microdrop of said liquid reagent to said surface at a second, non-contiguous locus, and optionally repeating the displacing and applying steps at third and subsequent non-contiguous loci; and

(c) wherein said predetermined distance is less than the separation distance required for free droplet formation, whereby a smaller volume of liquid reagent is delivered to said substrate per microdrop as compared to the volume per microdrop when a droplet is allowed to form before contact with said substrate.

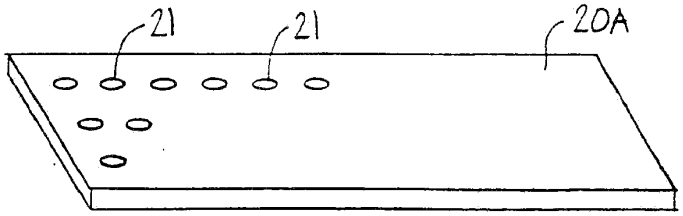


FIG. 1A.

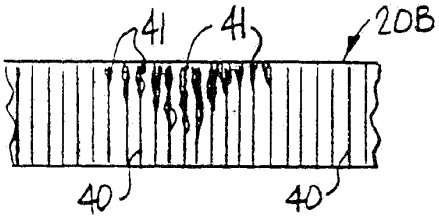


FIG. 1B.

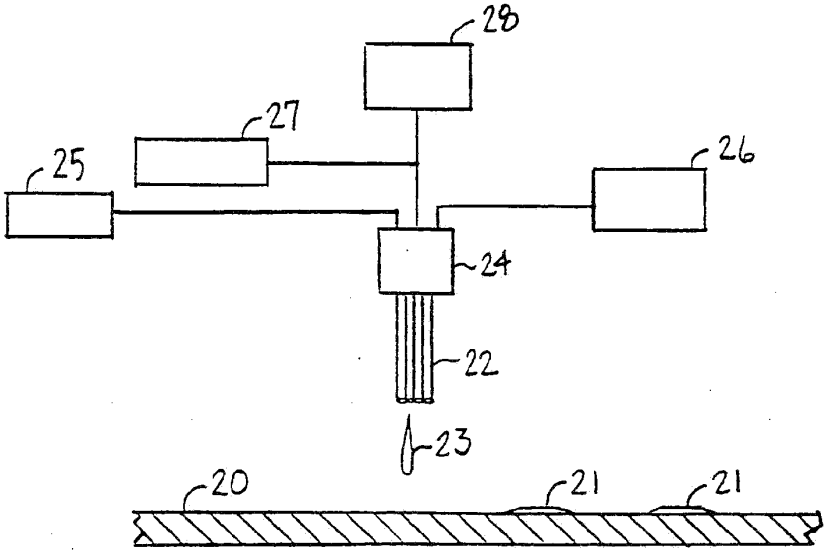


FIG. 2.

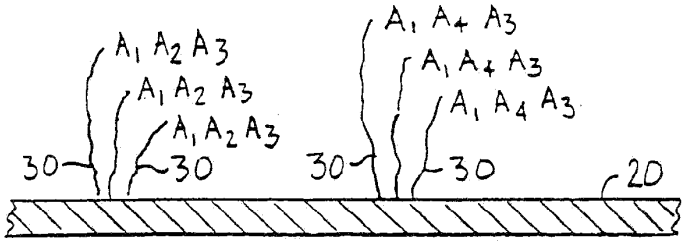

A1 A2 A3
A1 A2 A3
A1 A2 A3
A1 A4 A3
A1 A4 A3
A1 A4 A3
30
30
30
30
20

FIG. 3.

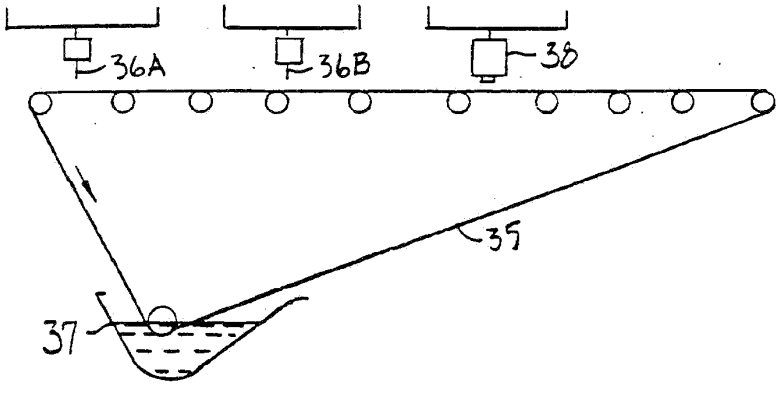

36A
36B
38
35
37

FIG. 4.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US95/03143

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) :C07H 21/00; C12Q 1/68
US CL :435/6; 536/25.3
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/6, 91.1, 91.2, 290, 810; 436/501; 536/22.1, 23.1, 25.3

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Please See Extra Sheet.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, A, 90/00626 (BEATTIE) 25 JANUARY 1990, SEE ENTIRE DISCLOSURE.	1-47
Y	US, A, 5,143,854 (PIRRUNG ET AL.) 01 SEPTEMBER 1992, SEE ENTIRE DISCLOSURE.	1-47
A	WO, A, 92/10588 (FODOR ET AL.) 25 JUNE 1992, SEE ENTIRE DISCLOSURE.	1-47
Y	WO, A, 93/17126, (CHETVERIN ET AL.) 02 SEPTEMBER 1993, SEE ENTIRE DISCLOSURE.	1-47
Y	WO, A, 89/10977 (SOUTHERN) 16 NOVEMBER 1989, SEE ENTIRE DISCLOSURE.	1-47
Y	WO, A, 90/03382 (SOUTHERN ET AL.) 05 APRIL 1990, SEE ENTIRE DISCLOSURE.	1-47

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

*	Special categories of cited documents:	"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
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier document published on or after the international filing date	"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
"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)	"&"	document member of the same patent family
"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		

Date of the actual completion of the international search 26 MAY 1995	Date of mailing of the international search report 08 JUN1995
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer ARDIN MARSCHEL Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US95/03143

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF BIOMOLECULAR STRUCTURE & DYNAMICS, VOLUME 11, NUMBER 3, ISSUED 1993, LIPSHUTZ, "LIKELIHOOD DNA SEQUENCING BY HYBRIDIZATION", PAGES 637-653, SEE ENTIRE DISCLOSURE.	1-47
X ---- Y	GENOMICS, VOLUME 13, ISSUED 1992, SOUTHERN ET AL., "ANALYZING AND COMPARING NUCLEIC ACID SEQUENCES BY HYBRIDIZATION TO ARRAYS OF OLIGONUCLEOTIDES: EVALUATION USING EXPERIMENTAL MODELS", PAGES 1008-1017, SEE THE ENTIRE DISCLOSURE.	1-6, 8, 12-17, 19, 21-24, 28-32, 34, 39-44, 46 ---------- 7, 9, 10, 11, 18, 20, 25-27, 33, 35-38, 45, 47

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet)(July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US95/03143

B. FIELDS SEARCHED
Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS, BIOSIS, MEDLINE, WPI, BIOTECH ABS. CAS
search terms: array, insitu, synthesis, hybridiz?, microdrop, microchip

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5115

PCT WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 6 :
G01N 33/53, 33/545, C07K 17/08 | **A1**

(11) International Publication Number: **WO 95/32425**

(43) International Publication Date: 30 November 1995 (30.11.95)

(21) International Application Number: PCT/US95/06392

(22) International Filing Date: 23 May 1995 (23.05.95)

(30) Priority Data:

08/247,793	23 May 1994 (23.05.94)	US
08/267,333	28 June 1994 (28.06.94)	US
08/382,542	1 February 1995 (01.02.95)	US
08/410,436	23 March 1995 (23.03.95)	US

(60) Parent Applications or Grants
(63) Related by Continuation

US	08/247,793 (CIP)
Filed on	23 May 1994 (23.05.94)
US	08/267,333 (CIP)
Filed on	28 June 1994 (28.06.94)
US	08/382,542 (CIP)
Filed on	1 February 1995 (01.02.95)
US	08/410,436 (CIP)
Filed on	23 March 1995 (23.03.95)

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION [US/US]; Corporate Intellectual Property, UW2220, 709 Swedeland Road, P.O. Box 1539, King of Prussia, PA 19406-0939 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: YAMASHITA, Dennis, Shinji [US/US]; 703 Edgewood Road, King of Prussia, PA 19406 (US). WEINSTOCK, Joseph [US/US]; 1234 Pothouse Road, Phoenixville, PA 19460 (US).

(74) Agents: DUSTMAN, Wayne, J. et al.; SmithKline Beecham Corporation, Corporate Intellectual Property, UW2220, 709 Swedeland Road, P.O. Box 1539, King of Prussia, PA 19406-0939 (US).

(81) Designated States: JP, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Published
With international search report.

(54) Title: ENCODED COMBINATORIAL LIBRARIES

(57) Abstract

Invented is a method of preparing combinatorial libraries and combinatorial libraries prepared thereby. Also invented is a method for identifying compounds having desired characteristics from a combinatorial library or a set of combinatorial libraries by the use of flow cytometry. Also invented is a method for encoding combinatorial libraries using fluorophore labeled beads.

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	**GB**	United Kingdom	**MR**	Mauritania
AU	Australia	**GE**	Georgia	**MW**	Malawi
BB	Barbados	**GN**	Guinea	**NE**	Niger
BE	Belgium	**GR**	Greece	**NL**	Netherlands
BF	Burkina Faso	**HU**	Hungary	**NO**	Norway
BG	Bulgaria	**IE**	Ireland	**NZ**	New Zealand
BJ	Benin	**IT**	Italy	**PL**	Poland
BR	Brazil	**JP**	Japan	**PT**	Portugal
BY	Belarus	**KE**	Kenya	**RO**	Romania
CA	Canada	**KG**	Kyrgystan	**RU**	Russian Federation
CF	Central African Republic	**KP**	Democratic People's Republic of Korea	**SD**	Sudan
CG	Congo			**SE**	Sweden
CH	Switzerland	**KR**	Republic of Korea	**SI**	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	**KZ**	Kazakhstan	**SK**	Slovakia
CM	Cameroon	**LI**	Liechtenstein	**SN**	Senegal
CN	China	**LK**	Sri Lanka	**TD**	Chad
CS	Czechoslovakia	**LU**	Luxembourg	**TG**	Togo
CZ	Czech Republic	**LV**	Latvia	**TJ**	Tajikistan
DE	Germany	**MC**	Monaco	**TT**	Trinidad and Tobago
DK	Denmark	**MD**	Republic of Moldova	**UA**	Ukraine
ES	Spain	**MG**	Madagascar	**US**	United States of America
FI	Finland	**ML**	Mali	**UZ**	Uzbekistan
FR	France	**MN**	Mongolia	**VN**	Viet Nam
GA	Gabon				

ENCODED COMBINATORIAL LIBRARIES

FIELD OF THE INVENTION

The field of this invention concerns combinatorial chemistry which involves the syntheses of one or more encoded combinatorial libraries where large numbers of products having varying compositions are obtained. This invention also relates to methods of encoding combinatorial libraries.

BACKGROUND OF THE INVENTION

In the continuing search for new chemical moieties that can effectively modulate a variety of biological processes, the standard method for conducting a search is to screen a variety of pre-existing chemical moieties, for example, naturally occurring compounds or compounds which exist in synthetic libraries or databanks. The biological activity of the pre-existing chemical moieties is determined by applying the moieties to an assay which has been designed to test a particular property of the chemical moiety being screened, for example, a receptor binding assay which tests the ability of the moiety to bind to a particular receptor site.

In an effort to reduce the time and expense involved in screening a large number of randomly chosen compounds for biological activity, several developments have been made to provide libraries of compounds for the discovery of lead compounds. The chemical generation of molecular diversity has become a major tool in the search for novel lead structures. Currently, the known methods for chemically generating large numbers of molecularly diverse compounds generally involve the use of solid phase synthesis, in particular to synthesize and identify peptides and peptide libraries. See, for example, Lebl et al., *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **41**, p. 201 (1993) which discloses methodologies providing selectively cleavable linkers between peptide and resin such that a certain amount of peptide can be liberated from the resin and assayed in soluble form while some of the peptide still remains attached to the resin, where it can be sequenced; Lam et al., *Nature*, **354**, p. 82 (1991) and (WO 92/00091) which disclose a method of synthesis of linear peptides on a solid support such as polystyrene or polyacrylamide resin; Geysen et al., *J. Immunol. Meth.*, **102**, p. 259 (1987) which discloses the synthesis of peptides on derivatized polystyrene pins which are arranged on a block in such a way that they correspond to the arrangement of wells in a 96-well microtiter plate; and Houghten et al., *Nature*, **354**, p. 84 (1991) and WO 92/09300 which disclose an

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5118

approach to de novo determination of antibody or receptor binding sequences involving soluble peptide pools.

The major drawback, aside from technical considerations, with all of these methods for lead generation is the quality of the lead. Linear peptides historically have represented relatively poor leads for pharmaceutical design. In particular, there is no rational strategy for conversion of a linear peptide into a non-peptide lead. As noted above, one must resort to screening large databanks of compounds, with each compound being tested individually, in order to determine non-peptide leads for peptide receptors.

It is known that a wide variety of organic reactions can be carried out on substrates immobilized on resins. These include, in addition to peptide synthesis reactions which are well known to those of ordinary skill in the art, nucleophilic displacements on benzylic halides, halogenation, nitration, sulfonation, oxidation, hydrolysis, acid chloride formation, Friedel-Crafts reactions, reduction with $LiAlH_4$, metallation, and reaction of the organometallic polymer with a wide variety of reagents. See, for example, N. K. Mathur et al., *Polymers as Aids in Organic Chemistry,* Academic Press, New York, p. 18 (1980). In addition, Farrall et al., *J. Org. Chem.*, **41**, p. 3877 (1976) describe the experimental details of some of these reactions carried out with resins.

Nonpeptidic organic compounds, such as peptide mimetics, can often surpass peptide ligands in affinity for a certain receptor of enzyme. An effective strategy for rapidly identifying high affinity biological ligands, and ultimately new and important drugs, requires rapid construction and screening of diverse libraries of non-peptidic structures containing a variety of structural units capable of establishing one or more types of interactions with a biological acceptor (e.g., a receptor or enzyme), such as hydrogen bonds, salt bridges, pi-complexation, hydrophobic effects, etc. However, work on the generation and screening of synthetic test compound libraries containing nonpeptidic molecules is now in its infancy. one example from this area is the work of Ellman and Bunin on a combinatorial synthesis of benzodiazepines on a solid support (J. Am. Chem. Soc. 114, 10997, (1992); *see* Chemical and Engineering News, January 18, 1993, page 33).

A key unsolved problem in the area of generation and use of nonpeptide libraries is the generation and use of nonpeptide libraries is the elucidation of the structure of molecules selected from a library that show promising biological activity.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5119

An attempt to uncover the structures of peptides selected from a library using unique nucleotide sequence codes. which are synthesized in tandem with the peptide library, has been described by Brenner and Lerner (Brenner, S. and Lerner, R.A. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 1992 89 . 5381-5383). The nucleotide sequence of the code attached to each peptide must be amplifiable via the polymerase chain reaction (PCR). However, nucleotide synthesis techniques are not compatible with all of the synthetic techniques required for synthesis of many types of molecular libraries. Furthermore, the close proximity of nucleotide and synthetic test compound in the library, which can result in interactions between these molecules interfering with the binding of the ligand with a target receptor of enzyme during the biological assay, also limits this approach. The nucleotide component of the library can also interfere during biological assays in a variety of other ways.

Kerr et al. (J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 2520-2531) reported synthesizing solution phase libraries of peptides, containing non-natural amino acid residues, in parallel with peptide coding strands. The peptide ligand and its coding strand in this library are covalently joined together, which allows isolation and sequence determination of pairs of synthetic test compound and corresponding code. However, as with the nucleic-acid-encoded library described by Brenner and Lerner, above, the coding peptide may interfere with the screening assay.

PCT/US93/09345 describes a method of identifying actives in a combinatorial library by attaching multiple tags in a predetermined binary coding system.

PCT/HU93/0030 describes fluorescently labeled sub-library peptide kits for use in peptide synthesis.

PCT/US94/06078 describes methods of encoding combinatorial libraries using polymeric sequences.

Many of the disadvantages of the known methods as well as many of the needs not met by them are addressed by the present invention which, as described more fully hereinafter, provides numerous advantages over the known methods.

SUMMARY OF THE INVENTION

This invention relates to a method for identifying compounds having desired characteristics and identifying essential moieties in a lead structure which comprises preparing one or more encoded combinatorial libraries from a specified set of reaction sequences and testing compounds therein for biological activity.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5120

This invention also relates to a method of encoding a single registry in each combinatorial library of a series of combinatorial libraries and combinatorial libraries with a single encoded registry.

This invention also relates to a method of encoding combinatorial libraries which comprises utilization of tagged beads.

This invention also relates to a method of encoding each choice of a combinatorial library and combinatorial libraries encoded thereby.

This invention also relates to beads with fluorescently labeled identifiers attached thereto.

Detailed Description of the Invention

As used herein, the term "beads" means any solid support material capable of providing a base for combinatorial syntheses and capable of being processed by flow cytometry, such as 1 to 2% crosslinked polystyrene, polyacrylamide, polyethylene glycol polystyrene co-polymer, preferably Tentagel 10 to 100 micron particles, most preferably Tentagel 10-30 micron particles.

As used herein, the term "sort" means to form beads into groups which have a common tagging aspect by flow cytometry.

As used herein, the term "separate" or "split" when referring to encoded beads or beads of a combinatorial library means to partition the mixture of beads into groups, each group thereinby containing a mixture, preferably a statistical mean of all members.

As used herein, the term "tag", unless otherwise indicated, means an encoding characteristic of a bead or group of beads which is capable of being sorted by flow cytometry, such as differences in size, differences in material composition, differences in flow properties, a single fluorescent marker or, preferably, a fluorescent label identifier.

As used herein, the term "fluorescent label identifier" or "identifier" means a coding label attached to a bead or group of beads either by adding ratios of a fluorophore and a non-fluorophore or by adding multiple, preferably two, different fluorophores in varying ratios.

As used herein, the term "intensity-differentiated" means an identifier (as used herein) in which varying ratios of a fluorophore and a non-fluorophore are added to a bead or group of beads.

As used herein, the term "choice" means the alternative variables for a given stage in a combinatorial synthesis (not limited to peptide chemistry), such as reactant, reagent, reaction conditions, and combinations thereof. Where the term

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5121

"stage" corresponds to a step in the sequential synthesis of a compound or ligand; the compound or ligand being the final product of a combinatorial synthesis. The term "registry", as used herein, has the same meaning as the term "stage" as indicated above.

In a preferred aspect of the invention a series of combinatorial libraries are prepared, each individual library being prepared from substantially the same specified set of reaction sequences, therein encoding a single registry within each combinatorial library and analyzing according to mixtures of compounds with a homogeneous registry. Preferably, the specific encoded registry of any library will be different from the other libraries and the number of libraries prepared will equal the number of registries in a single library.

In carrying out the synthesis to prepare the first library, one may initially begin with a number of beads, usually at least 10^3, more usually at least 10^4, and desirably at least 10^5, while generally not exceeding at least 10^{15}, more usually not exceeding at least 10^{10}, characterized in that the beads are separated into groups, the beads within each group being similarly tagged and each group being uniquely tagged, preferably by an identifier, or one group being untagged and each of the remaining groups being uniquely tagged, preferably by an identifier. The number of readily identifiable groups of beads will correspond to the number of choices in the first registry, the entirety of each group is entered into a separate container. One can use microtiter well plates, flasks, Merrifield synthesis vessels, etc. The beads will usually be divided up into groups of at least one bead each, usually a plurality of beads, generally 1000 or more, and may be 10^5 or more depending on the total number of registries involved in the library.

One would then add the appropriate agents to each of the individual containers to process them in stages (or "registries" as used herein). Once the reaction(s) is complete, one may wish to wash the beads free of any reagent, followed by combining all of the beads into a single mixture and then separating the beads according to the number of choices for the next registry. The procedure of dividing beads, followed by a synthetic stage (to form a registry), and then recombining beads is iterated until the first combinatorial library is completed.

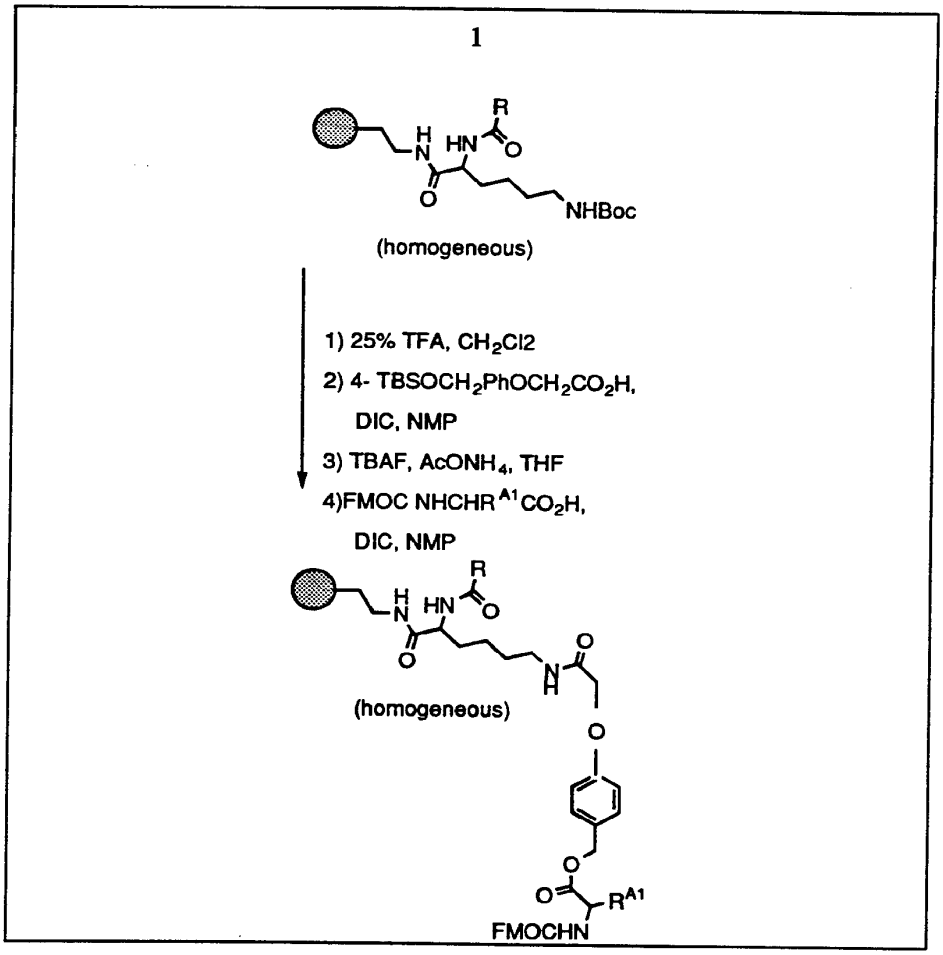
In some instances, the same reaction may be carried out in 2 or more containers to enhance the proportion of product having a particular reaction in a particular registry as compared to the other choices. In other instances, one or more of the registries may involve a portion of the beads being set aside and undergoing no reaction, so as to enhance the variability associated with the final product. In other situations, batches may be taken along different synthetic pathways.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5122

The library thus prepared will contain tagged beads which identify the reaction sequence of the first registry only.

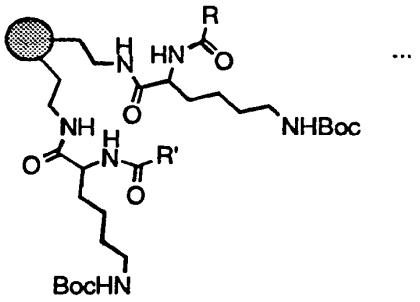
A combinatorial library containing tagged beads which identify the reaction sequence of the first registry only can be prepared as outlined in Scheme 1 below.

Scheme 1



Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5123

2



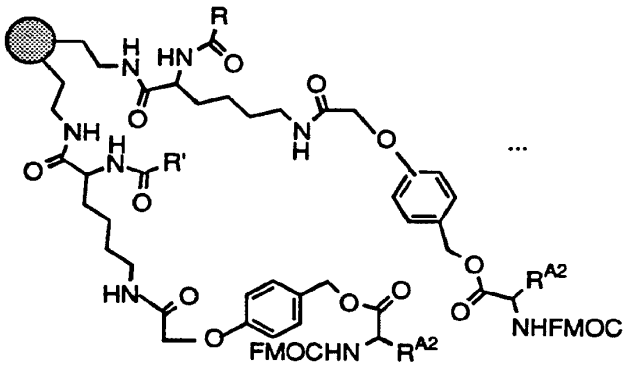
(1: 3 ratio of R:R')

1) 25% TFA, CH_2Cl2

2) 4- $TBSOCH_2PhOCH_2CO_2H$, DIC, NMP

3) TBAF, $AcONH_4$, THF

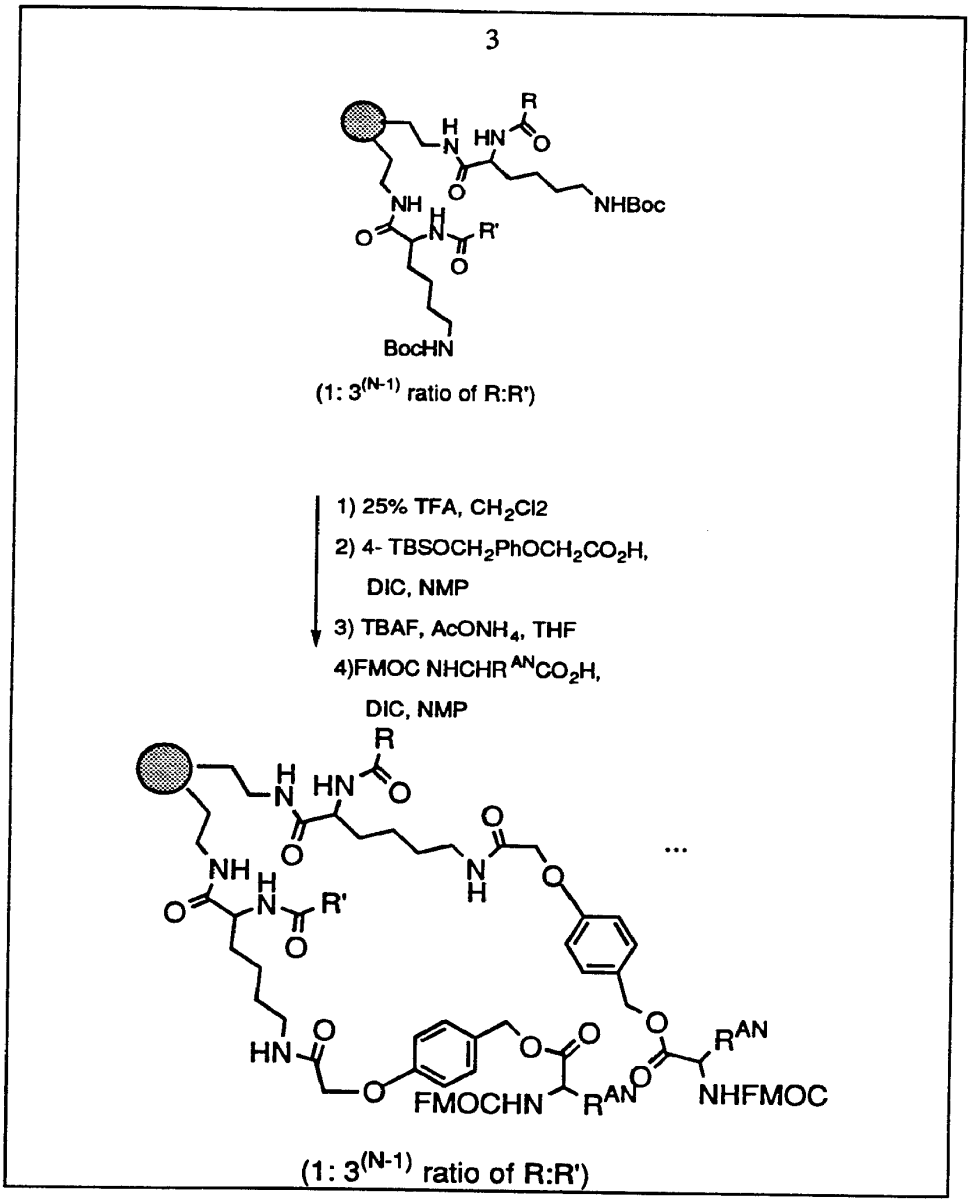
4)FMOC $NHCHR^{A2}CO_2H$, DIC, NMP



(1: 3 ratio of R:R')

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5124

3



1) Combine and separate.

2) Deprotect FMOC; couple FMOC-NHCHR$^{B1\text{-}BN}CO_2H$.

3) Repeats steps 1 and 2, except replace FMOC-NHCHR$^{B1\text{-}BN}CO_2H$ with FMOC-NHCHR$^{C1\text{-}CN}CO_2H$, ... FMOC-NHCHR$^{X1\text{-}XN}CO_2H$ until the library synthesis is complete.

4) Sort beads by flow cytometry.

5a) Cleave compounds off of sorted beads or

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5125

5b) Test compounds directly attached to beads, preferably by bio-panning or flow cytometry.

Scheme 1 outlines the preparation of a combinatorial library in which only the first registry has been encoded. As used in Scheme 1 beads with attached fluorescently labeled identifiers are derivatized with a linker that allows for cleavage of the compound to be tested. Subsequently, each group of similarly tagged beads is entered into a separate container and subjected to specified reaction conditions (or variable building blocks, as used herein) to form the first registry. Once the reaction is complete the beads are combined into a single mixture and then separated according to the number of choices in the second registry and reacted. This procedure of dividing beads, followed by subjection to specified reaction conditions, and then recombining beads is iterated until the first library is completed. The completed library is then tested for biological activity. Information on the relative activities of mixtures of the compounds with a homogeneous first registry is obtained from this library.

In carrying out the synthesis to prepare the second library, one will preferably begin with the same number of beads as used in the first library, said beads may be tagged in a similar manner as in the first library. The beads for use in the second library are first combined into a single mixture and then separated according to the number of choices for the first registry. The synthetic scheme\choices for each registry of the second library and all subsequent libraries will be substantially the same as the synthetic scheme\choices of the corresponding registry in the first library. Once the reaction(s) for the first registry of the second library is complete, one may wish to wash the beads free of any reagent, followed by combining all of the beads into a single mixture and then sorting the mixture into groups according to similarly tagged beads. Preferably this combination of beads will be sorted using flow cytometry. Once the beads from the first registry are sorted each group of similarly tagged beads is entered into a separate container and subjected to the same synthetic scheme(s)\choice(s) used for the second registry of the first library. Once the reaction(s) is complete, one may wish to wash the beads free of any reagent, followed by combining all of the beads into a single mixture and then separating the beads according to the number choices in the third registry of the first library. This procedure of dividing beads, followed by the synthetic scheme(s)\choice(s) from the corresponding registry of the first library, and then recombining the beads is iterated until the second library in completed.

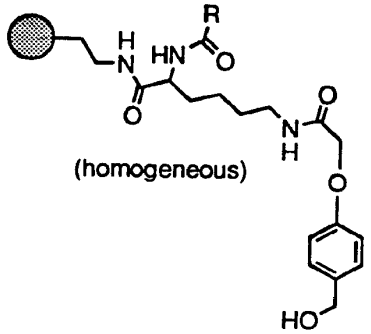
Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5126

The library thus prepared will contain tagged beads which identify the reaction sequence of the second registry only.

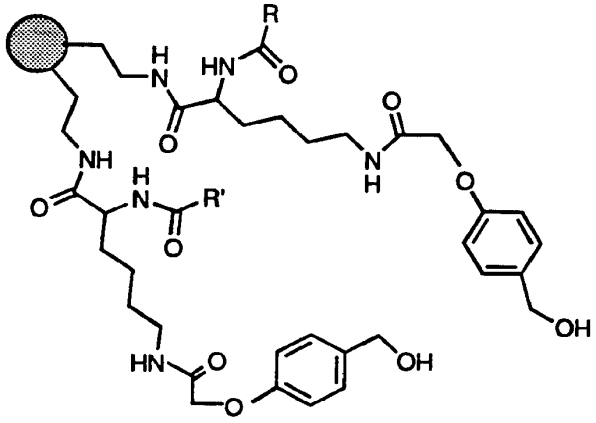
A combinatorial library containing tagged beads which identify the reaction sequence of the second registry only can be prepared as outlined in Scheme 2 below.

Scheme 2

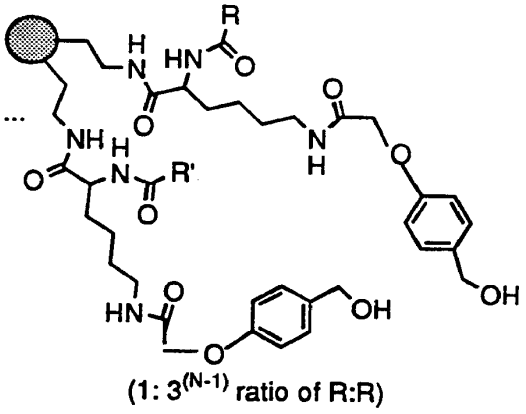
1



2



3



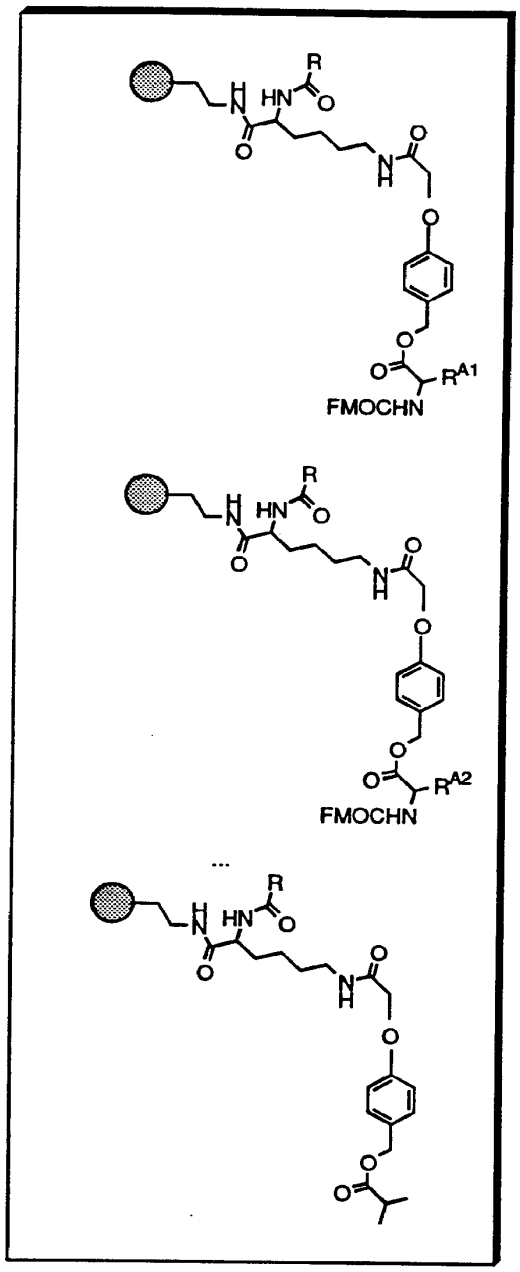
Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5127

(as prepared in Schemes 1 and 3)

1) Combine and separate.
2) Couple FMOC-NHCHR^{A1}-AN$_{CO_2H}$.
3) Combine and sort by flow cytometry.

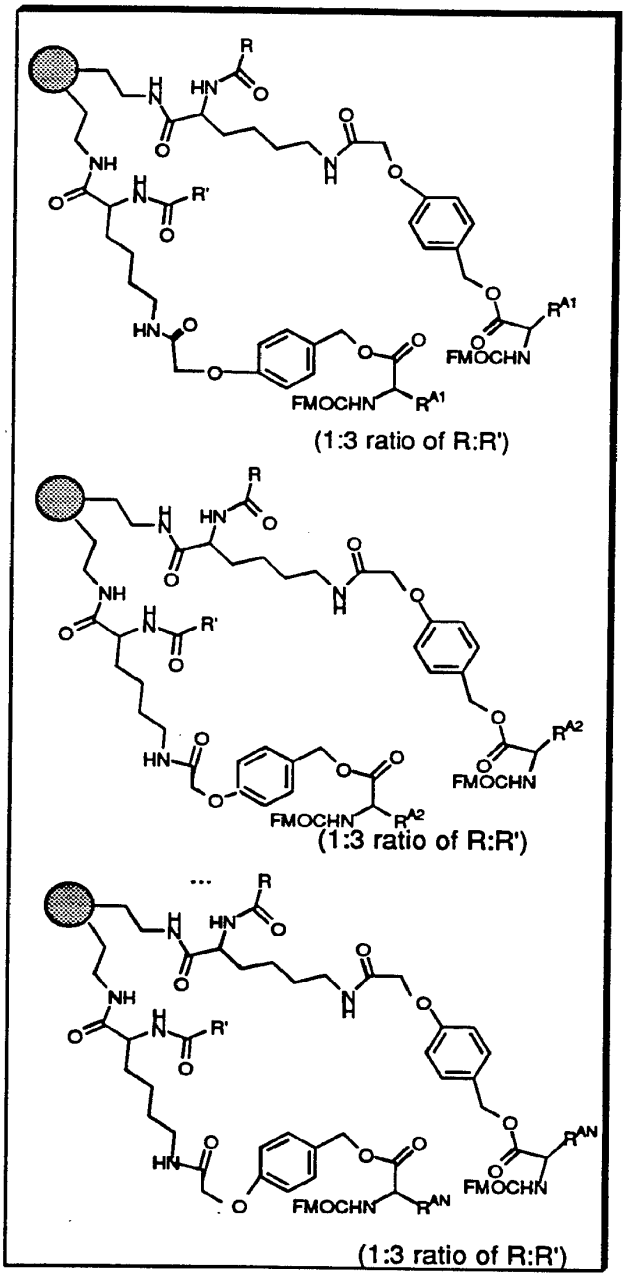
Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5128

1

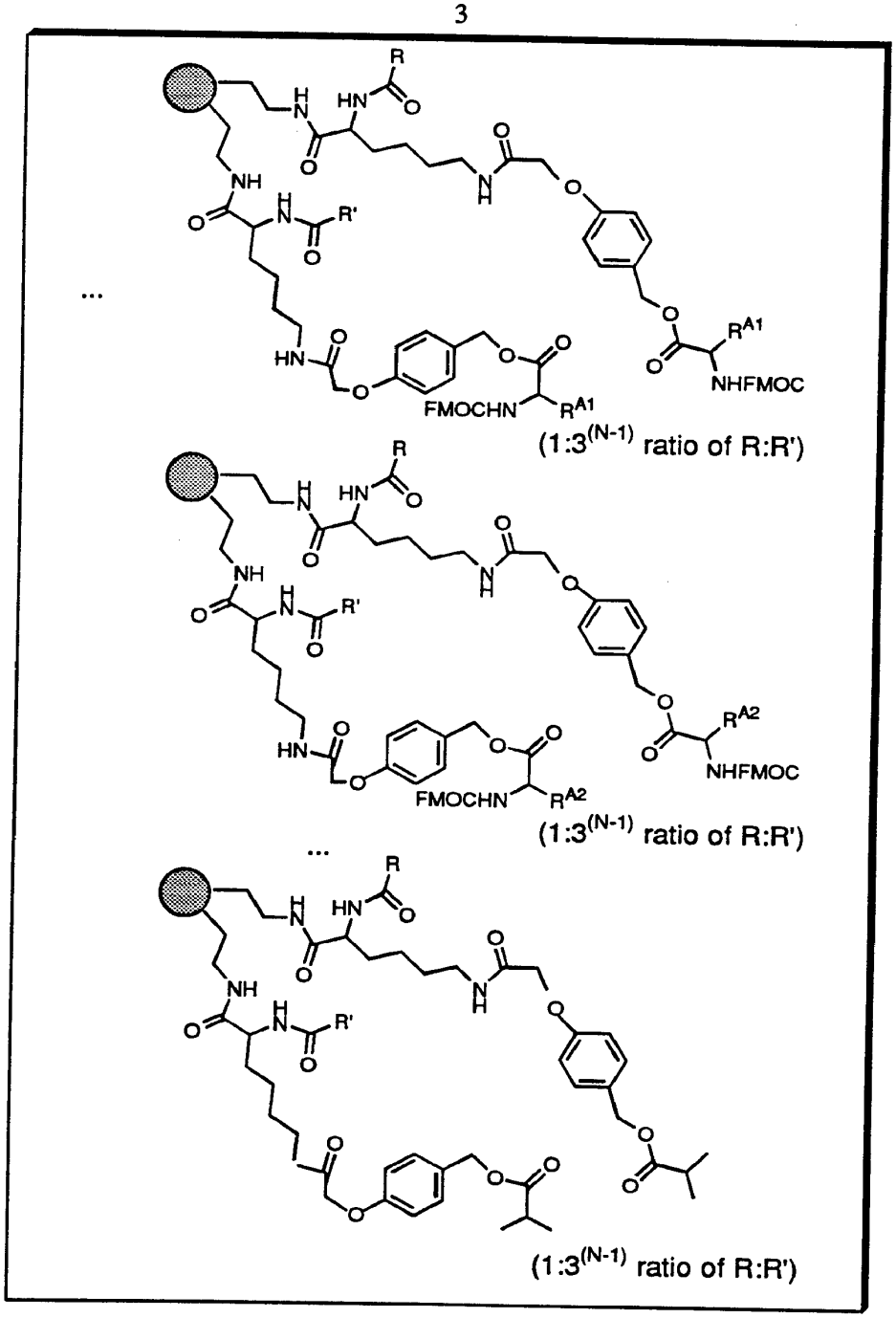


Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5129

2



Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5130



4) Deprotect FMOC; couple FMOC-NHCHR^{B1}-BNCO_2H.

5) Combine and separate.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5131

6) Repeat step 4 and 5, except replace FMOC-NHCHR^{B1}-BNCO_2H with FMOC-NHCHR^{C1}-CNCO_2H, ... FMOC-NHCHR^{X1}-XNCO_2H until the synthesis is complete.

7) Combine and sort by flow cytometry.

8a) Cleave compounds off of sorted beads or

8b) Test compounds directly attached to beads, preferably by bio-panning or flow cytometry.

Scheme 2 outlines the preparation of a combinatorial library in which only the second registry has been encoded. As used in Scheme 2 beads with attached fluorescent label identifiers are first combined into a single mixture and then separated into groups according to the number of choices in the first registry of the first library . Subsequently, each group is entered into a separate container and subjected to the same reaction conditions of the first registry of the first library to form the first registry of the second library. Once the reaction(s) is complete the beads are combined into a single mixture and then sorted into groups according to similarly tagged beads. Preferably this combination of beads will be sorted using flow cytometry. Each group of similarly tagged beads is entered into a separate container and subjected to the same reaction conditions of the second registry of the first library to form the second registry of the second library. Once the reaction is complete the beads are combined into a single mixture and then separated according to the number of choices in the third registry of the first library and reacted accordingly. This procedure of dividing the beads, fol[illegible]ed by subjection to specified reaction conditions from the corresponding r[illegible] of the first library, and then recombining the beads is iterated until the second library is completed. The completed library is then tested for biological activity. Information on the relative activities of mixtures of the compounds with a homogeneous second registry is obtained from this library.

The above process is repeated to prepare subsequent libraries (when desired), provided that the sorting procedure is performed prior to a different synthetic stage in each library. The combinatorial libraries thus prepared will contain tagged beads which identify the reaction sequence of a single registry only. Further, the identifiable\encoded registry in each combinatorial library will be different.

Subsequent Combinatorial Libraries

The preparation of a combinatorial library in which the Xth registry has been encoded utilizes the same procedure as described in Scheme 2 except that the

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5132

"combine and sort, preferably by flow cytometry" step is performed just prior to incorporation of the Xth variable building block. The completed library is then tested for biological activity. Information on the relative activities of mixtures of the compounds with a homogeneous Xth variable registry is obtained from this library.

After synthesis is complete, each library is tested separately for biological activity.

The term "testing for biological activity" or "testing for desired characteristics" as used herein includes any form of testing for pharmaceutical activity including the methods indicated below. The compounds of a library may be tested on the beads, for example by bio-panning using a soluble receptor assay, and the activities analyzed preferably by flow cytometry. Alternatively, the contents of the library may be sorted preferably by flow cytometry and the compounds tested on the beads, or the sorted compounds cleaved from the beads prior to testing.

When all of the information is combined, a population analysis of each combinatorial library is obtained revealing which variable building block(s) are important for activity and which ones are not. This type of analysis is identical to Structure Activity Relationship (SAR) studies in which the analysis of actives and inactives identify essential moieties in a lead structure. In this analysis a particular lead structure may be obtained, further multiple lead structures are potentially obtained (as in positional scanning in peptide combinatorial libraries) and initial directions for further optimization are immediately suggested.

The analysis of a three (3) registry-three (3) combinatorial library, prepared as in the above Schemes, is outlined in Table 1 below.

Table 1

First combinatorial library with encoded first Registry prepared as in Scheme 1 above.

	Registry 1		Registry 2		Registry 3
T^1	A^1	-	X	-	X
T^2	A^2	-	X	-	X
T^3	A^3	-	X	-	X

Second combinatorial library with encoded second Registry prepared as in Scheme 2 above.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5133

	Registry 1		Registry 2		Registry 3
		Sort			
T^1	X	→	B^1	-	X
T^2	X	→	B^2	-	X
T^3	X	→	B^3	-	X

Third combinatorial library with encoded third Registry prepared as indicated in 'Subsequent Combinatorial Libraries' above.

	Registry 1		Registry 2		Registry 3
				Sort	
T^1	X	-	X	→	C^1
T^2	X	-	X	→	C^2
T^3	X	-	X	→	C^3

Analysis of the first combinatorial library will yield the SAR of variable building block A. Analysis of the second combinatorial library will yield the SAR of variable building block B. Analysis of the third combinatorial library will yield the SAR of variable building block C. Analysis of the SARs of the three variable building blocks (A, B and C) will identify desired reaction sequences and suggest multiple lead structures.

In a further aspect of the invention there is provided a preferred method for encoding\tagging combinatorial libraries which utilizes fluorescent label identifiers. As used herein, the term "fluorescent label identifiers" when referring to fluorophore labeled beads means:

i) that all of the beads in a given pool will have the same fluorescence intensity and different pools will have intensities that differ from any other pool by a factor of at least 2, preferably 3 or more or

ii) that multiple, preferably 2, different fluorescent tags are used in varying ratios such that all of the beads in a given pool will have the same combination of fluorescent tags in the same ratio and different pools will have:

a) the same fluorescent tags but in ratios that differ from any other pool,

b) a different set of fluorescent tags in a specified ratio or

c) a combination of a) and b).

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5134

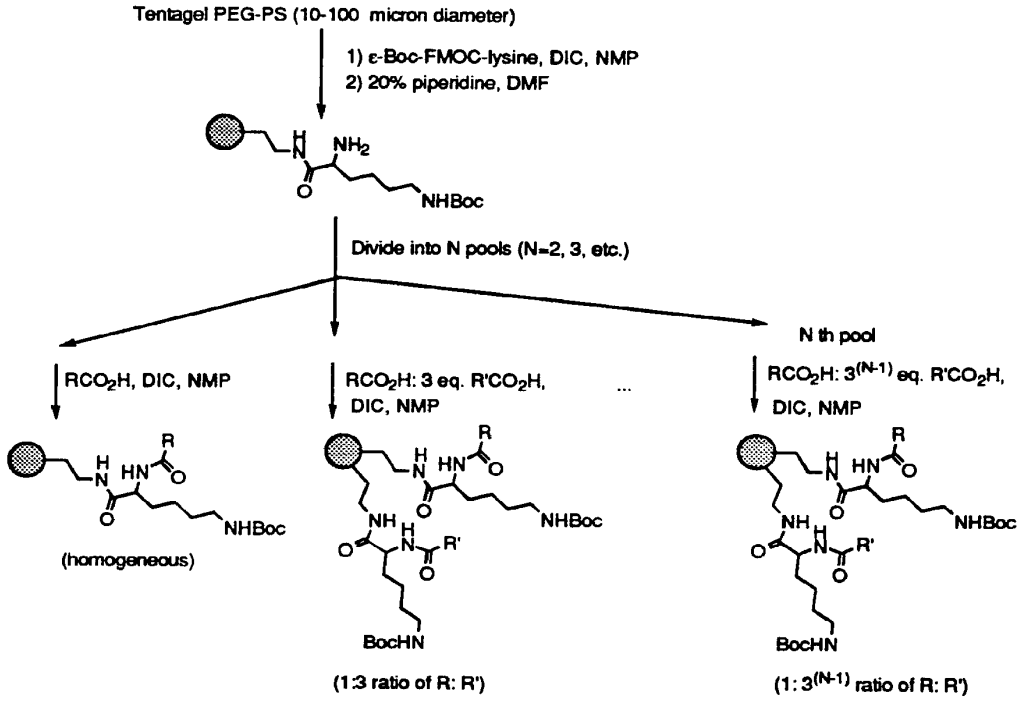
It is known that flow cytometers are able to sort beads that differ in fluorescence intensity by a factor of 2. The principles of flow cytometry and general methods for using flow cytometry are described in Grogan and Collins, Guide to Flow Cytometry Methods, Pub: Marcel Dekker, Inc. (1990).

Intensity-differentiated fluorophore-labeled beads can be prepared by derivatizing pools of beads with varying amounts of a fluorophore and a non-fluorophore or by varying the reaction time of a single reactive fluorescent tag. Additionally, multiple, preferably 2, fluorescent tags can be used in varying ratios to encoded beads. This is preferably implemented, for example, by varying the stoichiometry of a first fluorescent tag (A) and a second fluorescent tag (B), such as A:B = 1:1, 1:2, 2:1, 1:4, 4:1, etc., in the tagging step(s).

As used herein, intensity-differentiated fluorophore-labeled beads can be prepared by the method outlined in Scheme 3 below and in the Examples.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5135

Scheme 3



As used in Schemes 1 to 3 above, R is a fluorescent tag T^1 or a doping agent D and R' is a fluorescent tagT^2 or a doping agent D, provided that when R is D, R' is other that D.

As used in Scheme 3 a sample of beads, preferably Tentagel, 10-30 micron particles, is derivatized with a linker, preferably ε-Boc-FMOC lysine, by standard coupling chemistry. Alternatively, a benzyl alcohol linker such as used with the Wang linker or a benzyl halide linker such as used with the Merrifield linker, or a benzhydryl amine linker as used with the Rink linker can be attached to the beads by the formation of ethers by alkylation of alcohols, alkylation or arylation by Friedl Crafts chemistry, the formation of biaryls by palladium mediated cross-coupling chemistry or by standard amide coupling chemistry. As used in Scheme 3, a mono-deprotection step, such as 20% piperdine/ DMF, for removal of an FMOC is performed. One could also run the tagging reaction to partial completion by limiting the reaction times thereby avoiding the use of a bifunctional linker. The beads are then divided into N pools. Pool 1 is derivatized with a fluorophore, such as pyrene butyric acid. Pool 2 is derivatized with a 1:3 mixture of a fluorophore, such as pyrene butyric acid, and a non-fluorophore (hereinafter a "doping agent"),

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5136

such as butyric acid or a different fluorophore, such as perylene butyric acid. Pool N is derivatized with a 1: $3^{(N-1)}$ ratio of a fluorophore, such as pyrene butyric acid, and a doping agent, such as butyric acid or a different fluorophore, such as perylene butyric acid.

Each of these pools of beads can be differentiated from any other pool of beads by flow cytometry. Each pool of beads may also be differentiated from one another by inspection with the unaided eye, however fewer variables could be encoded this way. Further, different fluorophores with different absorption and emittance wavelengths and multiple fluorophores could be encoded by fluorescence quenching to encode additional variables. The use of multiple fluorophores, the ratio of which is the identifier, has several advantages including the ability to greatly increases the number of variables that can be identified by using the same number of tags and enabling analysis independent of bead size. Also, the same strategy can be applied to prepare beads that can be used to discriminate between library members with redundant molecular weights by fluorescence, preferably by starting with beads with at least 50 pmoles of linker.

In a particularly preferred aspect of the invention a single combinatorial library is prepared, each choice therein being encoded by a tag, preferably using fluorescent label identifiers, and tested for biological activity, preferably without mixing the final pools.

In an especially preferred aspect of the invention the "Combine and Split protocol", as described in Scheme 4 below, is utilized to synthesize encoded beads, preferably with fluorescent label identifiers attached thereto. The "Combine and Split protocol" is advantageous in that it eliminates the need to resynthesize, or parallel synthesize, libraries containing only one or two fluorescent tags. This aspect of the invention is especially attractive from a practical point of view since the encoded beads can be prepared in bulk, prior to the actual synthesis of combinatorial libraries.

An additionally preferred aspect of this invention relates to combinatorial libraries prepared using beads encoded by fluorescent label identifiers and to pharmaceutically active compounds identified by such combinatorial library.

An additionally preferred aspect of this invention relates to combinatorial libraries in which each choice therein is encoded by fluorescent label identifiers and to pharmaceutically active compounds identified by such combinatorial library.

An additionally preferred aspect of this invention relates to combinatorial libraries prepared using beads encoded by fluorescent label identifiers, wherein said

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5137

beads were obtained by the Combine and Split protocol, and to pharmaceutically active compounds identified by such combinatorial library.

An additionally preferred aspect of this invention relates to combinatorial libraries in which each choice therein is encoded by fluorescent label identifiers, wherein said beads were obtained by the Combine and Split protocol, and to pharmaceutically active compounds identified by such combinatorial library.

An example of a combinatorial library prepared according to the present invention is outlined in Scheme 4 below.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5138

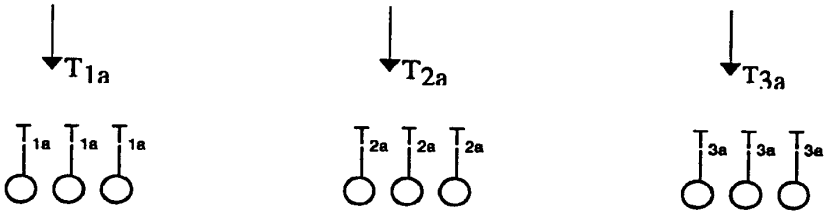
Scheme 4

Pool of Untagged Beads

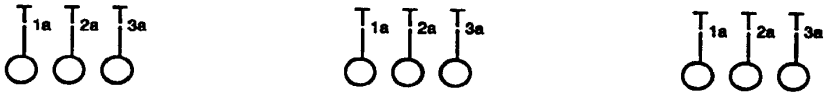


STEP 1

Add permutations (1, 2 and 3 as used in Scheme 4) of identifier T(a) (either by adding varying ratios of a fluorophore and a non-fluorophore or by adding two different fluorescent tags in varying ratios)

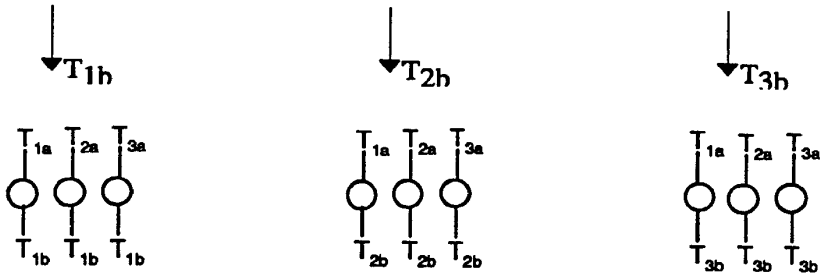


Combine and Split



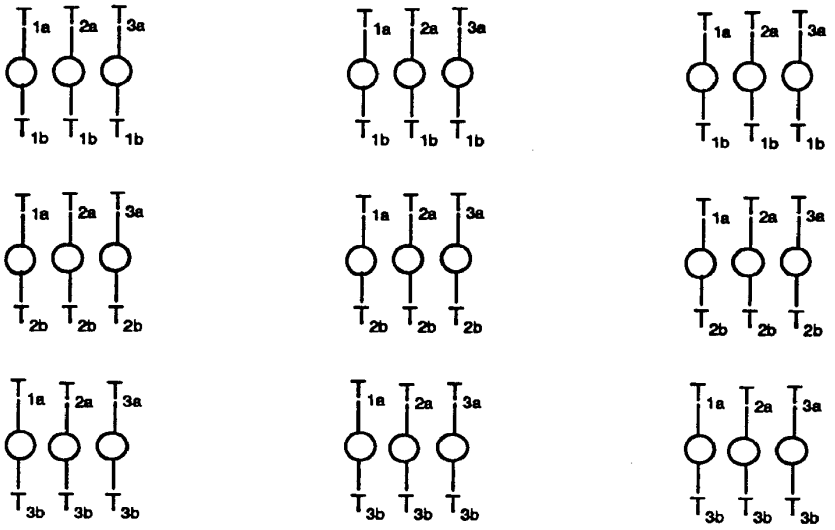
STEP 2

Add permutations (1, 2 and 3 as used in Scheme 4) of identifier T(b) (either by adding varying ratios of a fluorophore and a non-fluorophore or by adding two different fluorescent tags in varying ratios)



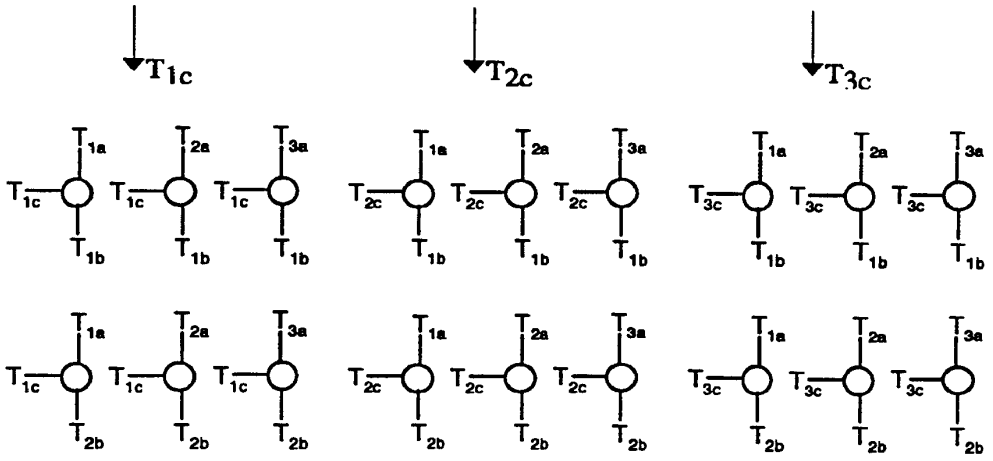
Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5139

Combine and Split

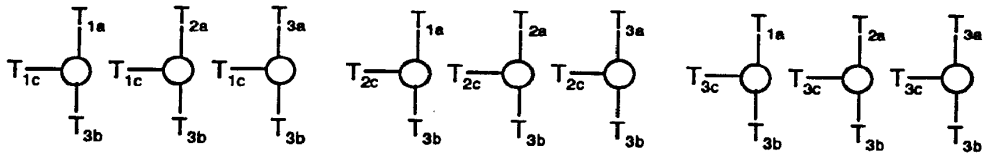


STEP 3

Add permutations (1, 2 and 3 as used in Scheme 4) of identifier T(c) (either by adding varying ratios of a fluorophore and a non-fluorophore or by adding two different fluorescent tags in varying ratios)

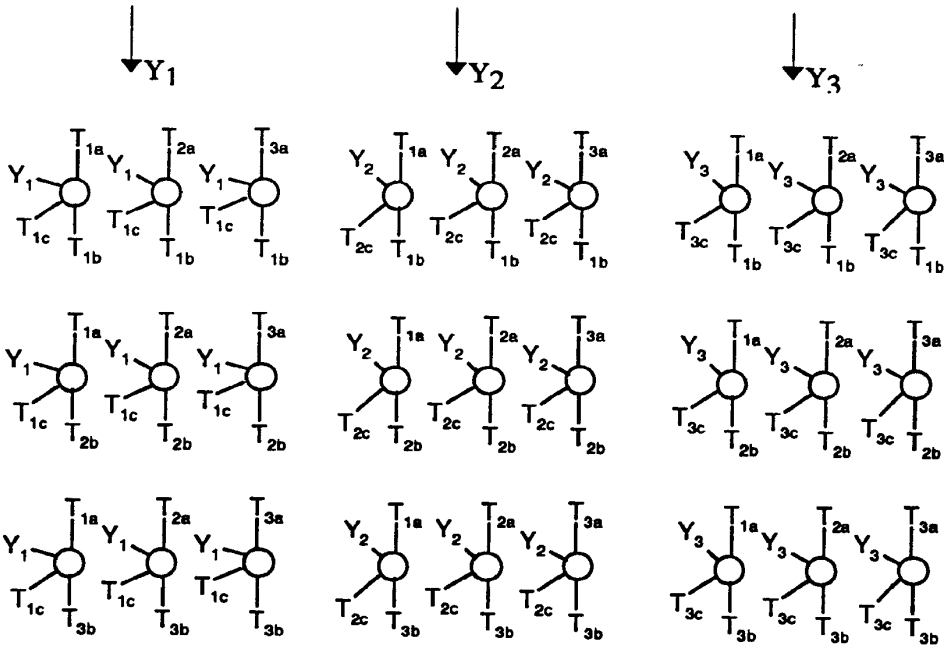


Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5140



STEP 4

Conduct Specified Reaction Conditions



as such:

Y_1 is encoded by T_{1c}

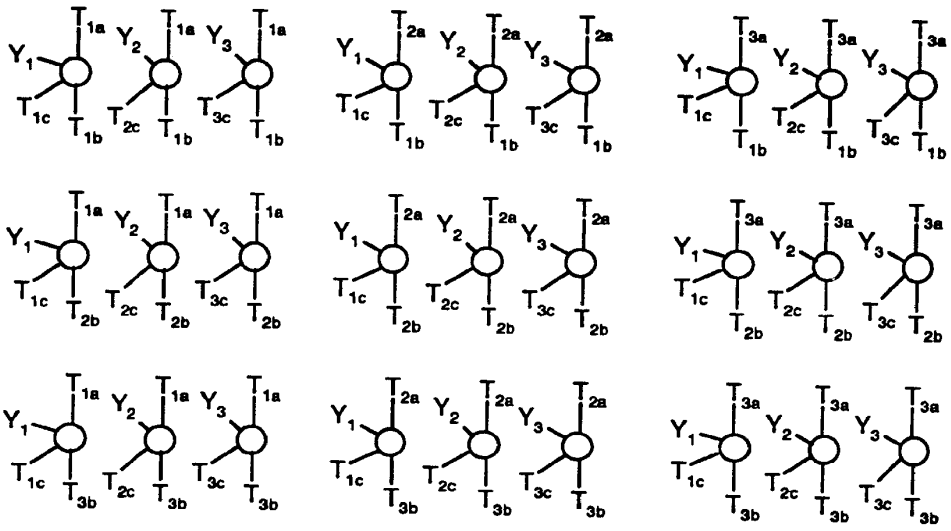
Y_2 is encoded by T_{2c}

Y_3 is encoded by T_{3c}

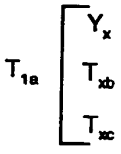
Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5141

STEP 5

Combine and Sort by T_{xa}. As used throughout Scheme 4, x is 1, 2 or 3 as utilized above

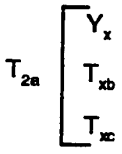


The above T_{1a} Registry can be described as



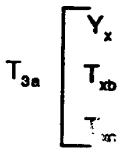
using the abbreviated terminology

The above T_{2a} Registry can be described as



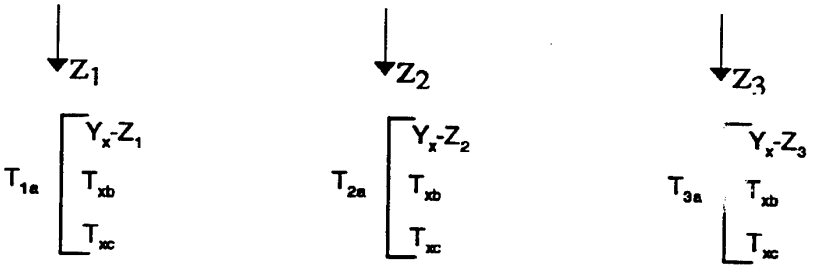
using the abbreviated terminology

The above T_{3a} Registry can be described as



using the abbreviated terminology

Conduct specified reaction conditions



Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5142

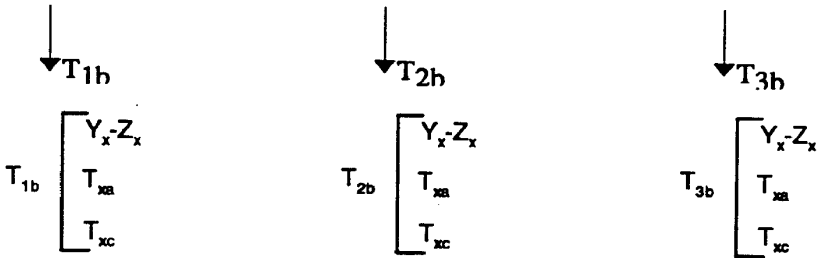
Using the above abbreviated terminology

as such:

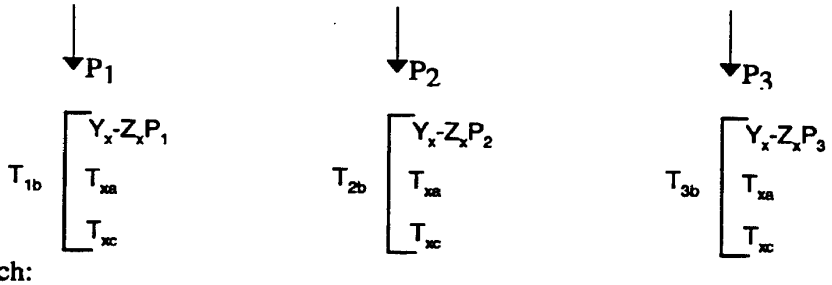
Z_1 is encoded by T_{1a} | Z_2 is encoded by T_{2a} | Z_3 is encoded by T_{3a}

STEP 6

Combine and sort by T_{xb}.



Conduct specified reaction conditions



as such:

P_1 is encoded by T_{1h} | P_2 is encoded by T_{2h} | P_3 is encoded by T_{3h}

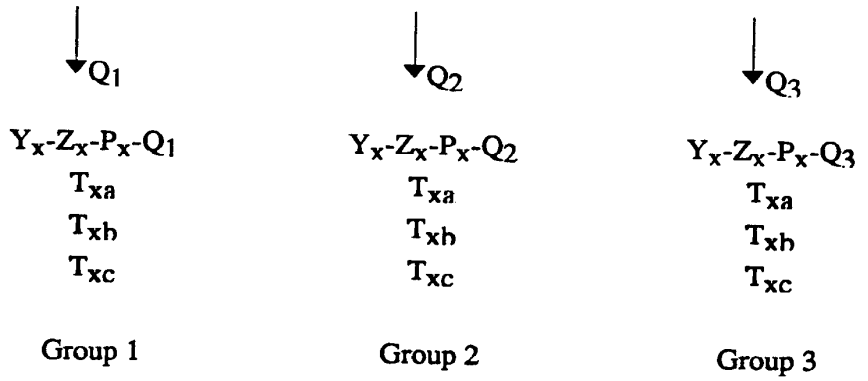
STEP 7

Combine and Split

Y_x-Z_x-P_x	Y_x-Z_x-P_x	Y_x-Z_x-P_x
T_{xa}	T_{xa}	T_{xa}
T_{xh}	T_{xh}	T_{xh}
T_{xc}	T_{xc}	T_{xc}

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5143

Conduct Specified Reaction Conditions



Scheme 4 outlines the preparation of a combinatorial library in which each choice therein is encoded by a unique identifier. As used in Scheme 4 untagged beads are encoded with the first identifier (as described in Scheme 3). The encoded beads are combined into a single mixture and then separated into groups according to the number of permutations of the second identifier. The beads are then encoded with the second identifier. (The above encoding process is repeated until groups of encoded beads of desired size is obtained). According to Scheme 4, the beads encoded with the second identifier are combined into a single mixture and then separated into groups according to the number of permutations of the third identifier. The beads are then encoded with the third identifier.

Encoded beads prepared according to the above methods and said methods represent preferred embodiments of the claimed invention.

The beads thus prepared are maintained in separate homogeneous pools of like identifiers according to the third identifier and subjected to the first stage (or registry as used herein) of specified reaction conditions. The choices of the first registry are thereinby encoded by the third identifier. The beads are then combined and sorted, preferably by flow cytometry, into homogeneous pools of like identifiers according to the first identifier. The beads thus obtained are maintained in separate pools and subjected to the second stage of specified reaction conditions. The choices of the second registry are thereinby encoded by the first identifier. The beads are then combined and sorted, preferably by flow cytometry, into homogeneous pools of like identifiers according to the second identifier. The beads thus obtained are maintained in separate pools and subjected to the third stage of specified reaction conditions. The choices of the third registry are thereinby encoded by the second identifier. The beads are then combined and separated into

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5144

groups according to the number of choices of the forth stage and subjected to the forth stage of specified reaction conditions. The pools of beads thus obtained are maintained in these separate groups and tested for biological activity. The choices of the forth registry are thereinby separately maintained.

As indicated above, each of these groups are separately tested for biological activity and analyzed, preferably by flow cytometry or by cleavage of compounds from individual groups or from smaller sets of individual groups. The exact reaction history of each active can be identified by reading the unique identifier from the corresponding bead. In the above Scheme, if an active compound is found in group 2 then one could analyze the individual bead by fluorescence detection. If T_{3c}, T_{2a}, T_{2b} were present on the bead, then the reaction history of the active structure is: Y_3-Z_2-P_2-Q_2.

By the term "Combine and Split protocol" as used herein is analogously described by the steps of Scheme 4 above. The formation of encoded beads by the Combine and Split protocol is analogously described in steps 1 to 4 of Scheme 4. The formation of combinatorial library in which each choice therein is encoded by the Combine and Split protocol is analogously described in steps 1 to 7 of Scheme 4.

Without further elaboration, it is believed that one skilled in the art can, using the preceding description, utilize the present invention to its fullest extent. The following Examples are, therefore, to be construed as merely illustrative and not a limitation of the scope of the present invention in any way.

Example 1

Preparation of fluorophore-labeled beads that can be sorted by flow cytometry by differences in the intensity of fluorescence by the method of doping.

Procedure A:

A bifunctional linker such as e-Boc-FMOC-L- lysine (8.4 g, 6 eq., 18 mmol, Novabiochem), an amide coupling agent such as diisopropyl carbodiimide (2.3 g, 2.8 ml, 6 eq., 18 mmol, Aldrich) is added to Polyethylene glycol-linked to cross-linked polystyrene beads (Tentagel M NH_2, 10 micron particle size, 15.0 g, 3 mmol, Rapp Polymere) suspended in a suitable solvent such as N-methyl pyrrolidine (300 ml) and is agitated overnight. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure and is washed with DMF (5 x 100 ml).

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5145

The beads are then agitated with 25% piperidine/ DMF (300 ml) for 15 min. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 100 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 100 ml), then air dried.

Procedure B:

The lysine derivatized beads (5.0 g), as described in Procedure A, are suspended in N-methyl pyrrolidine (100 ml), then a fluorophore such as 1-pyrene butyric acid (1.7 g, 6 eq., 6 mmol, Aldrich) and diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) are added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

The beads are then agitated in 25% TFA/ CH_2Cl_2 (100 ml) for 2 h removing the Boc protective group. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried.

The beads are then reacted with a linker group such as the t-butyl dimethyl silyl ether of 4-(methyl hydroxy-phenyl) acetic acid (1.3 g, 6 mmol), diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) in N-methyl pyrrolidine (100 ml) overnight. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure and is washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 100 ml), then air dried.

The beads are then re suspended in THF (100 ml), and a desilylating agent such as tetrabutyl ammonium fluoride(6 ml, 1.0 M solution, 6 mmol, Aldrich) / ammonium acetate (0.92 g, 12 mmol) is used to deprotect the silyl ether producing the desired benzyl alcohol derivative. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried.

Procedure C:

The beads (5 g), as prepared in Procedure B, are then suspended in N-methyl pyrrolidine (100 ml) and is then reacted with a monomer such as FMOC-L-glyine (1.8 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Procedure D:

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5146

The lysine derivatized beads (5.0 g), as described in Procedure A, are suspended in N-methyl pyrrolidine (100 ml), then a fluorophore such as 1-pyrene butyric acid (0.43 g, 1.5 eq., 1.5 mmol), and a doping agent such as butyric acid (0.4 g, 0.41 ml, 4.5 eq., 4.5 mmol) in 1:3 stoichiometry, and diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) are added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

The beads are then agitated in 25% TFA/ CH_2Cl_2 (100 ml) for 2 h removing the Boc protective group. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried.

The beads are then reacted with a linker group such as the t-butyl dimethyl silyl ether of 4-(methyl hydroxy-phenyl) acetic acid (1.3 g, 6 mmol), diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) in N-methyl pyrrolidine (100 ml) overnight. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure and is washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 100 ml), then air dried.

The beads are then resuspended in THF (100 ml), and a desilylating agent such as tetrabutyl ammonium fluoride(6 ml, 1.0 M solution, 6 mmol, Aldrich) / ammonium acetate (0.92 g, 12 mmol) is used to deprotect the silyl ether producing the desired benzyl alcohol derivative. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried.

Procedure E:

The beads (5 g), as prepared in Procedure D, are then suspended in N-methyl pyrrolidine (100 ml) and is then reacted with a monomer such as FMOC-L-alanine (1.9 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Procedure F:

The lysine derivatized beads (5.0 g), as described in Procedure A, are suspended in N-methyl pyrrolidine (100 ml), then a fluorophore such as 1-pyrene butyric acid (0.173 g, 0.6 eq., 0.6 mmol), and a doping agent such as butyric acid (0.48 g, 0.49 ml, 5.4 eq., 5.4 mmol) in 1:9 stoichiometry, and diisopropyl

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5147

carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) are added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

The beads are then agitated in 25% TFA/ CH_2Cl_2 (100 ml) for 2 h removing the Boc protective group. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried.

The beads are then reacted with a linker group such as the t-butyl dimethyl silyl ether of 4-(methyl hydroxy-phenyl) acetic acid (1.3 g, 6 mmol), diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) in N-methyl pyrrolidine (100 ml) overnight. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure and is washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 100 ml), then air dried.

The beads are then resuspended in THF (100 ml), and a desilylating agent such as tetrabutyl ammonium fluoride(6 ml, 1.0 M solution, 6 mmol, Aldrich) / ammonium acetate (0.92 g, 12 mmol) is used to deprotect the silyl ether producing the desired benzyl alcohol derivative. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried.

Procedure G:

The beads (5 g), as prepared in Procedure F, are then suspended in N-methyl pyrrolidine (100 ml) and is then reacted with a monomer such as FMOC-L-phenylalanine (2.3 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Procedure H:

The beads obtained from procedures C, E, and G are then combined and split into 3 equal portions.

Pool H1 is reacted with a monomer such as FMOC-L-glyine (1.8 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5148

Pool H2 is reacted with a monomer such as FMOC-L-alanine (1.9 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Pool H3 is reacted with a monomer such as FMOC-L-phenylalanine (2.3 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Procedure I:

The beads obtained from Procedure H are then combined and split into 3 equal portions.

Pool I1 is reacted with a monomer such as FMOC-L-glyine (1.8 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Pool I2 is reacted with a monomer such as FMOC-L-alanine (1.9 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Pool I3 is reacted with a monomer such as FMOC-L-phenylalanine (2.3 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Procedure J:

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5149

The beads obtained from Procedure I are then combined and sorted by flow cytometry into different sublibraries differentiated by the differences in intensity of fluorescence. Sublibrary components have the same first amino acid of the tripeptide.

Sublibrary J1 consists of Gly-X-X or Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ala, Gly-Gly-Phe, Gly-Ala- Gly, Gly-Ala-Ala, Gly-Ala-Phe, Gly-Phe-Gly, Gly-Phe-Ala, Gly-Phe-Phe.
Sublibrary J2 consists of Ala-X-X or Ala-Gly-Gly, Ala-Gly-Ala, Ala-Gly-Phe, Ala-Ala- Gly, Ala-Ala-Ala, Ala-Ala-Phe, Ala-Phe-Gly, Ala-Phe-Ala, Ala-Phe-Phe
Sublibrary J3 consists of Phe-X-X or Phe-Gly-Gly, Phe-Gly-Ala, Phe-Gly-Phe, Phe-Ala- Gly, Phe-Ala-Ala, Phe-Ala-Phe, Phe-Phe-Gly, Phe-Phe-Ala, Phe-Phe-Phe

Procedure K:

The beads obtained from Procedure B, D, and F are then combined and split into 3 equal portions.

Pool K1 is reacted with a monomer such as FMOC-L-glyine (1.8 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Pool K2 is reacted with a monomer such as FMOC-L-alanine (1.9 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Pool K3 is reacted with a monomer such as FMOC-L-phenylalanine (2.3 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Procedure L:

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5150

The beads obtained from Procedure K are then combined and sorted by flow cytometry into different pools differentiated by the differences in intensity of fluorescence.

Pool L1 is reacted with a monomer such as FMOC-L-glyine (1.8 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Pool L2 is reacted with a monomer such as FMOC-L-alanine (1.9 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Pool L3 is reacted with a monomer such as FMOC-L-phenylalanine (2.3 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Procedure M:

The beads obtained from Procedure L are then combined and split into 3 equal portions.

Pool M1 is reacted with a monomer such as FMOC-L-glyine (1.8 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Pool M2 is reacted with a monomer such as FMOC-L-alanine (1.9 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5151

Pool M3 is reacted with a monomer such as FMOC-L-phenylalanine (2.3 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Procedure N:

The beads obtained from Procedure M are then combined and sorted by flow cytometry into different sublibraries differentiated by the differences in intensity of fluorescence. Sublibrary components have the same second amino acid of the tripeptide.

Sublibrary N1 consists of X-Gly-X or Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ala, Gly-Gly-Phe, Ala- Gly-Gly, Ala-Gly-Ala, Ala-Gly-Phe, Phe-Gly-Gly, Phe-Gly-Ala, Phe-Gly-Phe

Sublibrary N2 consists of X-Ala-X or Gly-Ala-Gly, Gly-Ala-Ala, Gly-Ala-Phe, Ala-Ala- Gly, Ala-Ala-Ala, Ala-Ala-Phe, Phe-Ala-Gly, Phe-Ala-Ala, Phe-Ala-Phe

Sublibrary N3 consists of X-Phe-X or Gly-Phe-Gly, Gly-Phe-Ala, Gly-Phe-Phe, Ala-Phe- Gly, Ala-Phe-Ala, Ala-Ala-Phe, Phe-Phe-Gly, Phe-Phe-Ala, Phe-Phe-Phe

Procedure O:

The beads (5.0 g), as described in Procedure K, are combined and split into 3 equal portions.

Pool O1 is reacted with a monomer such as FMOC-L-glyine (1.8 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Pool O2 is reacted with a monomer such as FMOC-L-alanine (1.9 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5152

dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Pool O3 is reacted with a monomer such as FMOC-L-phenylalanine (2.3 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Procedure P:

The beads obtained from Procedure O are then combined and split into 3 equal portions.

Pool P1 is reacted with a monomer such as FMOC-L-glyine (1.8 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Pool P2 is reacted with a monomer such as FMOC-L-alanine (1.9 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Pool P3 is reacted with a monomer such as FMOC-L-phenylalanine (2.3 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Procedure Q:

The beads obtained from Procedure P are then combined and sorted by flow cytometry into different pools differentiated by the differences in intensity of fluorescence.

Pool Q1 is reacted with a monomer such as FMOC-L-glyine (1.8 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5153

reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Pool Q2 is reacted with a monomer such as FMOC-L-alanine (1.9 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

Pool Q3 is reacted with a monomer such as FMOC-L-phenylalanine (2.3 g, 6 eq., 6 mmol). Diisopropyl carbodiimide (0.76 g, 0.94 ml, 6 mmol) is added, and the reaction is agitated for 3 hours. The reaction is filtered through a glass frit under aspirator pressure, washed with DMF (5 x 30 ml), then CH_2Cl_2 (5 x 30 ml), then air dried. This procedure is repeated until the reaction is complete by the Kaiser ninhydrin test.

The pools of beads obtained from Procedure Q are already sorted into sublibraries in which the third amino acid of each component is the same the same amino acid of the tripeptide.

Sublibrary Q1 consists of X-X-Gly or Gly-Gly-Gly, Gly-Ala-Gly, Gly-Phe-Gly, Ala-Gly-Gly, Ala-Ala-Gly, Ala-Phe-Gly, Phe-Gly-Gly, Phe-Ala-Gly, Phe-Phe-Gly

Sublibrary Q2 consists of X-X-Ala or Gly-Gly-Ala, Gly-Ala-Ala, Gly-Phe-Ala, Ala-Gly-Ala, Ala-Ala-Ala, Ala-Phe-Ala, Phe-Gly-Ala, Phe-Ala-Ala, Phe-Phe-Ala

Sublibrary Q3 consists of X-X-Phe or Gly-Gly-Phe, Gly-Ala-Phe, Gly-Phe-Phe, Ala-Gly-Phe, Ala-Ala-Phe, Ala-Phe-Phe, Phe-Gly-Phe, Phe-Ala-Phe, Phe-Phe-Phe

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5154

Procedure R:

Individual sublibraries J1, J2, J3, N1, N2, N3, Q1, Q2, and Q3 are tested for biological activity either by cleaving the compounds from the beads with hydroxide or a strong acid such as HF or the compounds are tested on the beads by bio-panning or flow cytometry. The results from this testing gives a population analysis of preferred monomers in particular registries or positions.

Example 2

Preparation of fluorophore-labeled beads that can be sorted by flow cytometry by differences in the intensity of fluorescence by the method of labeling with fluorophores whose emission maximum is at different wavelengths.

Procedure:

The methods of Example 1 are used except that the doping reagent is replaced by a second fluorophore such as perylene butyric acid.

While the preferred embodiments of the invention are illustrated by the above, it is to be understood that the invention is not limited to the precise instructions herein disclosed and that the right to all modifications coming within the scope of the following claims is reserved.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5155

What is claimed is:

1. A method of encoding a series of combinatorial libraries which comprises:

a) preparing a first combinatorial library by conducting a specified set of reaction sequences on tagged beads thereinby encoding each choice of the first registry;

b) preparing a second combinatorial library from substantially the same specified set of reaction sequences as the first library wherein the tagged beads are combined and separated prior to the first reaction sequence and the beads are sorted prior to the second reaction sequence, thereinby encoding each choice of the second registry and

c) preparing subsequent libraries according the procedure in b) except that the sort step is performed prior to a different registry in each subsequent library;

provided that the number of libraries in the combinatorial library series is equal to the number of registries.

2. A series of combinatorial libraries, wherein,

a) each individual library is prepared from substantially the same specified set of reaction sequences,

b) the number of libraries is equal to the number of registries in a single library and

c) a different registry is encoded in each library.

3. The series of combinatorial libraries of claim 2 in which the encoded registries are fluorescently tagged.

4. The series of combinatorial libraries of claim 3 in which the encoded registries are encoded with fluorescent label identifiers.

5. An individual combinatorial library of claim 4.

6. A method for identifying compounds having desired characteristics which comprises:

a) preparing a series of combinatorial libraries as described in claim 1;

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5156

b) testing each library in an assay which identifies compounds having desired characteristics and

c) subjecting each library to flow cytometry, thereby obtaining groups of beads which have undergone a known reaction history.

7. Beads encoded with a fluorescent label identifier.

8. The beads of claim 7 prepared by the Combine and Split protocol.

9. A combinatorial library in which each choice therein is encoded by fluorescent label identifiers.

10. A combinatorial library of claim 9 prepared by the Combine and Split protocol.

11. A pharmaceutically active compound identified by a combinatorial library of claim 10.

12. A method of preparing combinatorial libraries which comprises sorting tagged solid support beads by flow cytometry prior to subjection to a specified set of reaction sequences.

13. A combinatorial library prepared by the method of claim 12.

Fujirebio Diagnostics, Inc. v. Quanterix Corp.
EX-1045
5157

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US95/06392

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) :G01N 33/53, 33/545; C07K 17/08
US CL :436/518, 501; 435/7.1; 530/334
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 436/518, 501; 435/7.1; 530/334

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, STN
search terms: peptide, combinatorial. library, flow cytometry, fluorescent

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA, VOLUME 90, ISSUED NOVEMBER 1993, NEEDELS ET AL., "GENERATION AND SCREENING OF AN OLIGONUCLEOTIDE-ENCODED SYNTHETIC PEPTIDE LIBRARY", PAGES 10700-10704, SEE ABSTRACT AND PAGE 10704, FIRST COLUMN.	1-13
X	NATURE, VOLUME 354, ISSUED 07 NOVEMBER 1991, LAM ET AL., "A NEW TYPE OF SYNTHETIC PEPTIDE LIBRARY FOR IDENTIFYING LIGAND-BINDING ACTIVITY", PAGES 82-84, SEE ABSTRACT, AND PAGE 82, COLUMN 2.	7-11
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA, VOLUME 90, ISSUED DECEMBER 1993, OHLMEYER ET AL., "COMPLEX SYNTHETIC CHEMICAL LIBRARIES INDEXED WITH MOLECULAR TAGS", PAGES 10922-10926, SEE ABSTRACT.	1, 2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

*	Special categories of cited documents:	"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
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier document published on or after the international filing date	"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
"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)	"&"	document member of the same patent family
"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		

Date of the actual completion of the international search 26 JULY 1995	Date of mailing of the international search report 04.08.95
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer LORA M. GREEN Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)★

Doc Code: TRAN.LET
Document Description: Transmittal Letter

USED IN LIEU OF PTO/SB/21 (07-09)

TRANSMITTAL FORM

(to be used for all correspondence after initial filing)

Total Number of Pages in This Submission	

Application Number	14/111,326-Conf. #3274
Filing Date	June 24, 2014
First Named Inventor	David Wilson
Art Unit	1649
Examiner Name	A. M. Weidner
Attorney Docket Number	Q0052.70018US01

ENCLOSURES (*Check all that apply*)

- [ ] Fee Transmittal Form
- [ ] Fee Attached
- [x] Amendment/Reply
- [ ] After Final
- [ ] Affidavits/declaration(s)
- [ ] Extension of Time Request
- [ ] Express Abandonment Request
- [ ] Information Disclosure Statement
- [ ] Certified Copy of Priority Document(s)
- [ ] Reply to Missing Parts/ Incomplete Application
- [ ] Reply to Missing Parts under 37 CFR 1.52 or 1.53
- [ ] Drawing(s)
- [ ] Licensing-related Papers
- [ ] Petition
- [ ] Petition to Convert to a Provisional Application
- [ ] Power of Attorney, Revocation Change of Correspondence Address
- [ ] Terminal Disclaimer
- [ ] Request for Refund
- [ ] CD, Number of CD(s) _____
- [ ] Landscape Table on CD
- [ ] After Allowance Communication to TC
- [ ] Appeal Communication to Board of Appeals and Interferences
- [ ] Appeal Communication to TC **(Appeal Notice, Brief, Reply Brief)**
- [ ] Proprietary Information
- [ ] Status Letter
- [ ] Other Enclosure(s) (please Identify below):

Remarks

SIGNATURE OF APPLICANT, ATTORNEY, OR AGENT

Firm Name	WOLF, GREENFIELD & SACKS, P.C.		
Signature	/Michael J. Pomianek/		
Printed name	Michael J. Pomianek		
Date	**28 April 2015**	Reg. No.	46,190

Certificate of Electronic Filing Under 37 CFR 1.8

I hereby certify that this paper (along with any paper referred to as being attached or enclosed) is being transmitted via the Office electronic filing system in accordance with 37 CFR § 1.6(a)(4).

Dated: April 28, 2015 Electronic Signature for: /Eileen M. MacKenzie/

4014376.1

Electronic Patent Application Fee Transmittal

Application Number:	14111326
Filing Date:	24-Jun-2014
Title of Invention:	METHODS OF DETERMINING A TREATMENT PROTOCOL FOR AND/OR A PROGNOSIS OF A PATIENT'S RECOVERY FROM A BRAIN INJURY
First Named Inventor/Applicant Name:	David Wilson
Filer:	Michael Pomianek/Eileen MacKenzie
Attorney Docket Number:	Q0052.70018US01

Filed as Large Entity

Filing Fees for U.S. National Stage under 35 USC 371

Description	Fee Code	Quantity	Amount	Sub-Total in USD($)
Basic Filing:				
Pages:				
Claims:				
Miscellaneous-Filing:				
Petition:				
Patent-Appeals-and-Interference:				
Post-Allowance-and-Post-Issuance:				
Extension-of-Time:				

Description	Fee Code	Quantity	Amount	Sub-Total in USD($)
Miscellaneous:				
Submission- Information Disclosure Stmt	1806	1	180	180
		Total in USD ($)		**180**

PTO/SB/06 (09-11)
Approved for use through 1/31/2014. OMB 0651-0032
U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

PATENT APPLICATION FEE DETERMINATION RECORD Substitute for Form PTO-875	Application or Docket Number 14/111,326	Filing Date 06/24/2014	☐ To be Mailed

ENTITY: ☒ LARGE ☐ SMALL ☐ MICRO

APPLICATION AS FILED – PART I

FOR	(Column 1) NUMBER FILED	(Column 2) NUMBER EXTRA	RATE ($)	FEE ($)
☐ BASIC FEE (37 CFR 1.16(a), (b), or (c))	N/A	N/A	N/A	
☐ SEARCH FEE (37 CFR 1.16(k), (i), or (m))	N/A	N/A	N/A	
☐ EXAMINATION FEE (37 CFR 1.16(o), (p), or (q))	N/A	N/A	N/A	
TOTAL CLAIMS (37 CFR 1.16(i))	minus 20 =	*	X $ =	
INDEPENDENT CLAIMS (37 CFR 1.16(h))	minus 3 =	*	X $ =	
☐ APPLICATION SIZE FEE (37 CFR 1.16(s))	If the specification and drawings exceed 100 sheets of paper, the application size fee due is $310 ($155 for small entity) for each additional 50 sheets or fraction thereof. See 35 U.S.C. 41(a)(1)(G) and 37 CFR 1.16(s).			
☐ MULTIPLE DEPENDENT CLAIM PRESENT (37 CFR 1.16(j))				
* If the difference in column 1 is less than zero, enter "0" in column 2.			TOTAL	

APPLICATION AS AMENDED – PART II

AMENDMENT 04/28/2015

	(Column 1) CLAIMS REMAINING AFTER AMENDMENT		(Column 2) HIGHEST NUMBER PREVIOUSLY PAID FOR	(Column 3) PRESENT EXTRA	RATE ($)	ADDITIONAL FEE ($)
Total (37 CFR 1.16(i))	* 20	Minus	** 20	= 0	X $80 =	0
Independent (37 CFR 1.16(h))	* 1	Minus	***3	= 0	X $420 =	0
☐ Application Size Fee (37 CFR 1.16(s))						
☐ FIRST PRESENTATION OF MULTIPLE DEPENDENT CLAIM (37 CFR 1.16(j))						
					TOTAL ADD'L FEE	0

AMENDMENT

	(Column 1) CLAIMS REMAINING AFTER AMENDMENT		(Column 2) HIGHEST NUMBER PREVIOUSLY PAID FOR	(Column 3) PRESENT EXTRA	RATE ($)	ADDITIONAL FEE ($)
Total (37 CFR 1.16(i))	*	Minus	**	=	X $ =	
Independent (37 CFR 1.16(h))	*	Minus	***	=	X $ =	
☐ Application Size Fee (37 CFR 1.16(s))						
☐ FIRST PRESENTATION OF MULTIPLE DEPENDENT CLAIM (37 CFR 1.16(j))						
					TOTAL ADD'L FEE	

* If the entry in column 1 is less than the entry in column 2, write "0" in column 3.
** If the "Highest Number Previously Paid For" IN THIS SPACE is less than 20, enter "20".
*** If the "Highest Number Previously Paid For" IN THIS SPACE is less than 3, enter "3".
The "Highest Number Previously Paid For" (Total or Independent) is the highest number found in the appropriate box in column 1.

LIE
/THUY TA/

This collection of information is required by 37 CFR 1.16. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 12 minutes to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. **SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.**
If you need assistance in completing the form, call 1-800-PTO-9199 and select option 2.

Electronic Acknowledgement Receipt

EFS ID:	22196775
Application Number:	14111326
International Application Number:	
Confirmation Number:	3274
Title of Invention:	METHODS OF DETERMINING A TREATMENT PROTOCOL FOR AND/OR A PROGNOSIS OF A PATIENT'S RECOVERY FROM A BRAIN INJURY
First Named Inventor/Applicant Name:	David Wilson
Customer Number:	23628
Filer:	Michael Pomianek/Eileen MacKenzie
Filer Authorized By:	Michael Pomianek
Attorney Docket Number:	Q0052.70018US01
Receipt Date:	28-APR-2015
Filing Date:	24-JUN-2014
Time Stamp:	19:33:57
Application Type:	U.S. National Stage under 35 USC 371

Payment information:

Submitted with Payment	no

File Listing:

Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Miscellaneous Incoming Letter	Q005270018US01-TRN-MJP.pdf	24710 4c6c8c05f3f7db29052cda9aee1740c77e23a618	no	1
Warnings:					
Information:					

2		Q005270018US01-AMN-MJP.pdf	58510 5501f2b5b6bb458dc50c2dd9b36a3d71baba1e53	yes	13

	Multipart Description/PDF files in .zip description		
	Document Description	**Start**	**End**
	Amendment/Req. Reconsideration-After Non-Final Reject	1	1
	Abstract	2	2
	Claims	3	7
	Applicant Arguments/Remarks Made in an Amendment	8	13

Warnings:	
Information:	
Total Files Size (in bytes):	83220

This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.

New Applications Under 35 U.S.C. 111
If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.

National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371
If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.

New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office
If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.

Electronic Acknowledgement Receipt

EFS ID:	22196866
Application Number:	14111326
International Application Number:	
Confirmation Number:	3274
Title of Invention:	METHODS OF DETERMINING A TREATMENT PROTOCOL FOR AND/OR A PROGNOSIS OF A PATIENT'S RECOVERY FROM A BRAIN INJURY
First Named Inventor/Applicant Name:	David Wilson
Customer Number:	23628
Filer:	Michael Pomianek/Eileen MacKenzie
Filer Authorized By:	Michael Pomianek
Attorney Docket Number:	Q0052.70018US01
Receipt Date:	28-APR-2015
Filing Date:	24-JUN-2014
Time Stamp:	19:45:55
Application Type:	U.S. National Stage under 35 USC 371

Payment information:

Submitted with Payment	yes
Payment Type	Credit Card
Payment was successfully received in RAM	$180
RAM confirmation Number	6360
Deposit Account	
Authorized User	
The Director of the USPTO is hereby authorized to charge indicated fees and credit any overpayment as follows:	

File Listing:

Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Miscellaneous Incoming Letter	Q005270018US01-TRN-MJP.pdf	24821 1827419e5ba8abb6b027e1af20bf360eaf6d3fea	no	1
Warnings:					
Information:					
2	Fee Worksheet (SB06)	Q005270018US01-FEETRN-MJP.pdf	32089 6542654b80a7dce57b24e493129e77dbd8f089fb	no	1
Warnings:					
Information:					
3		Q005270018US01-IDS-MJP.pdf	194699 3c8ae2961a9661882b5cff77bd14a18de16d2694	yes	23

Multipart Description/PDF files in .zip description

Document Description	Start	End
Transmittal Letter	1	4
Information Disclosure Statement (IDS) Form (SB08)	5	23

Warnings:					
Information:					
4	Fee Worksheet (SB06)	fee-info.pdf	31268 f3b5d0f12aaa935dd3ce9d48e8f2bd38d3c8da43	no	2
Warnings:					
Information:					
		Total Files Size (in bytes):	282877		

This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.

New Applications Under 35 U.S.C. 111
If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.

National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371
If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.

New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office
If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.

Electronic Acknowledgement Receipt

EFS ID:	22145976
Application Number:	14111326
International Application Number:	
Confirmation Number:	3274
Title of Invention:	METHODS OF DETERMINING A TREATMENT PROTOCOL FOR AND/OR A PROGNOSIS OF A PATIENT'S RECOVERY FROM A BRAIN INJURY
First Named Inventor/Applicant Name:	David Wilson
Customer Number:	23628
Filer:	Michael Pomianek/Eileen MacKenzie
Filer Authorized By:	Michael Pomianek
Attorney Docket Number:	Q0052.70018US01
Receipt Date:	28-APR-2015
Filing Date:	24-JUN-2014
Time Stamp:	19:54:38
Application Type:	U.S. National Stage under 35 USC 371

Payment information:

Submitted with Payment	no

File Listing:

Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Foreign Reference	WO2011109372_QC.pdf	9258896 1cc08da727e904fd30289c26d216813fd29bdaeb	no	77

Warnings:

Information:

2	Other Reference-Patent/App/Search documents	Q005270017WO00_ISR_WO_mailed_11-29-2012_QC.pdf	411976 025c0f3f57898d5b32c50dbc79be2720d0eb8c76	no	12
Warnings:					
Information:					
3	Other Reference-Patent/App/Search documents	Q005270017WO00_IPRP_mailed_10-24-2013_QC.pdf	288140 20f312f58781890ba51c65963fa1087629ddf644	no	10
Warnings:					
Information:					
4	Other Reference-Patent/App/Search documents	Q005270018US01_ISR_WO_mailed_10-29-2012_QC.pdf	380446 ce960989393ca6272fee761837476f4a989a26a3	no	10
Warnings:					
Information:					
5	Other Reference-Patent/App/Search documents	Q005270018US01_IPRP_mailed_10-24-2013_QC.pdf	255804 3d49cd75004907f9ad2b800cbb8d28d09063e5b8	no	8
Warnings:					
Information:					
6	Non Patent Literature	No_author_listed_Quanterix_Press_Release_11-15-2012_2pgs_QC.pdf	259436 705da00b19834c145ba19b946332997083 08bbb43	no	2
Warnings:					
Information:					
7	Non Patent Literature	No_Author_Listed_Alz_Res_Forum_Brain_Hypoxia_12-16-2011_4pgs.pdf	122323 4df3acfc16249864cb62be6b0b3fa1efb0abb70c	no	4
Warnings:					
Information:					
8	Non Patent Literature	No_Author_Listed_AACR_Press_Release_09-29-2010.pdf	149980 944f15ae49a9f4bd5ab21edb97e269405f1d3996	no	2
Warnings:					
Information:					
9	Non Patent Literature	No_Author_Listed_Pittcon_Press_Release_10-15-2009.pdf	118424 2dba1642e2d35c2e8e0a103093e39f10e50d959c	no	2
Warnings:					
Information:					
10	Non Patent Literature	No_Author_Listed_Quanterix_Press_Release_08-16-2011.pdf	735945 17df1619a77fec2554b1120cee3d7ac8b29f2389	no	2
Warnings:					
Information:					

11	Non Patent Literature	No_author_listed_Quanterix_Press_Release_07-30-2013_2pgs_QC.pdf	280425 dbd449238dd9902dfde2c535c5d688592e3641cc	no	2
Warnings:					
Information:					
12	Non Patent Literature	No_Author_Listed_Quanterix_Press_Release_09-30-2008.pdf	76094 ba717a479f576d3c074bc2466463ffc2a13293b9	no	1
Warnings:					
Information:					
13	Non Patent Literature	No_Author_Listed_Quanterix_Press_Release_08-25-2008.pdf	86266 1ac1cf167f5ccd4a2bb574f12bf637b2834b4140	no	2
Warnings:					
Information:					
14	Non Patent Literature	No_Author_Listed_Quanterix_Press_Release_08-19-2011.pdf	434036 a56ae60e999f52cc5fd7a53d98826a8c1050a785	no	1
Warnings:					
Information:					
15	Non Patent Literature	No_Author_Listed_Quanterix_Press_Release_04-12-2011.pdf	613273 a4d1d5a53c54b7a27d86eb3a27f0be2a928f4628	no	1
Warnings:					
Information:					
16	Non Patent Literature	No_author_listed_Quanterix_Press_Release_09-17-2013_2pgs_QC.pdf	242416 2f955dc0683ee0a9c32f269189a55bfd8c127b27	no	2
Warnings:					
Information:					
17	Non Patent Literature	No_author_listed_Quanterix_Press_Release_11-04-2013_1pg_QC.pdf	135671 9e07c9dea24b3949f886fe78fe2ffcd3ef3136b9	no	1
Warnings:					
Information:					
18	Non Patent Literature	No_author_listed_Quanterix_Press_Release_03-14-2014_1pg_QC.pdf	318468 48a0d7bc768cd550b4cee46831be5b3d45be10e3	no	1
Warnings:					
Information:					
19	Non Patent Literature	No_author_listed_Quanterix_Press_Release_01-22-2013_2pgs_QC.pdf	559931 867230b9df890cde6463deec3a6fa27125513c00	no	2
Warnings:					
Information:					

20	Non Patent Literature	No_author_listed_Quanterix_Press_Release_10-11-2012_1pg_QC.pdf	524027 8606875a4dc750f500c2144e9d356e497f057571	no	1
Warnings:					
Information:					
21	Non Patent Literature	No_author_listed_Whitepaper_1-0_2013_2pgs_QC.PDF	627057 087eb11d2643a65424ae9d7d74fe881517b3085c	no	2
Warnings:					
Information:					
22	Non Patent Literature	Quanterix_SingleMoleculeArrays_IQT_TechFocusDay_2010_30pages_QC.pdf	19906887 39b3cd9ed571143ebc3845eac23e87b838979e4a	no	30
Warnings:					
Information:					
23	Non Patent Literature	No_author_listed_Whitepaper_3-0_2013_4pgs.pdf	215957 10077abb2d22b23cc95a65ce2b976136e4701956	no	4
Warnings:					
Information:					
24	Non Patent Literature	Adams_et_al_AngewChem_2003_v115_p5475_QC.pdf	6500252 a2244adc39f8d09d3d82ecc2fa4dfa6769d36188	no	4
Warnings:					
Information:					
25	Non Patent Literature	Agrawal_et_al_PNAS_2008_v105_p3298_QC.pdf	722165 7d3f74e9dd5eec05c91c217d4be31e4a8ba1d6a8	no	6
Warnings:					
Information:					
26	Non Patent Literature	Agrawal_et_al_JAgricFoodChem_2007_v55_p3778_QC.pdf	500631 57bd262e4015e37407bd9155cabae1ec525d049e	no	5
Warnings:					
Information:					
27	Non Patent Literature	Ahn_et_al_AnalChem_2005_v77_p5041_QC.pdf	12036490 6b1804dc0e0f28991946fd0626ede1aa0ad3654e	no	7
Warnings:					
Information:					
28	Non Patent Literature	Ahn_et_al_ApplEnvironMicrobiol_2006_v72_p5742_QC.pdf	13365758 b853107ca227609483c7b00b7aeef774aa7948aa	no	8
Warnings:					
Information:					

29	Non Patent Literature	Albert_et_al_AnalBioanal_Chem_2002_v373_p792_QC.pdf	16313973 044f8373103ec09c3d7df5b766e6c5a0ca7c79bc	no	11
Warnings:					
Information:					
30	Non Patent Literature	Albert_et_al_ChemRev_2000_v100_p2595_QC_part_1.pdf	23297845 9bcfa4964b9ebf1de48d78451b0e6925a560011e	no	12
Warnings:					
Information:					
31	Non Patent Literature	Albert_et_al_ChemRev_2000_v100_p2595_QC_part_2.pdf	22600454 30458b1abb56e1f3e8e7d2ff5347ae9df90d7e90	no	11
Warnings:					
Information:					
32	Non Patent Literature	Albert_et_al_ChemRev_2000_v100_p2595_QC_part_3.pdf	18330699 0e7088498f57939762eb8620b14738632f3dda53	no	9
Warnings:					
Information:					
33	Non Patent Literature	Albert_et_al_AnalChem_2003_v75_p4161_QC.pdf	12162375 3ecfe25ec5748b2ac14a5c08397277d1104dfc3a	no	7
Warnings:					
Information:					
34	Non Patent Literature	Albert_et_al_AnalChem_2001_v73_p2501_QC.pdf	12233009 50dc9c92351a99743dcb0c52c74c910c571632f2	no	8
Warnings:					
Information:					
35	Non Patent Literature	Angenendt_et_al_Proteomics_2005_v5_p420_QC.pdf	506115 6b8f701fb0c75a50622ca558c8eee4233a54526a	no	6
Warnings:					
Information:					
36	Non Patent Literature	Arnaud_ChemEngNews_2007_v85_p8_QC.pdf	2237235 46fa81a8ce5e6f5859b90b6e70f3f16413feed3c	no	1
Warnings:					
Information:					
37	Non Patent Literature	Beer_et_al_Anal_Chem_2007_v79_p8471_Abst_only_QC.pdf	34231 b096eb6240a9037e5a44cee958b8ac115a07d1cb	no	1
Warnings:					
Information:					

38	Non Patent Literature	Bencic-Nagale_et_al_AnalChem_2005_v77_p6155_QC.pdf	13172866 e0c9a6a221d4184b4f885407b6e095c1a6780976	no	8
Warnings:					
Information:					
39	Non Patent Literature	Bhat_et_al_AnalBioanalChem_2009_v394_p457_QC.pdf	874113 ae7a64d5d724d5f4debce6eec3ceda485a44270b	no	11
Warnings:					
Information:					
40	Non Patent Literature	Biran_et_al_AnalBiochem_2003_v315_p106_QC.pdf	446203 88fb31f31651c4ab32d1ec210eb62824fac0bd94	no	8
Warnings:					
Information:					
41	Non Patent Literature	Biran_et_al_AnalChem_2002_v74_p3046_QC.pdf	18496792 6233d3a12d744bcbd43b93ba8c3c09eb11885481	no	9
Warnings:					
Information:					
42	Non Patent Literature	Blake_et_al_MolCell_2006_v24_p853_QC.pdf	18342102 a25565b2bbb6904c4167763570bb4b3be1be0bc7	no	13
Warnings:					
Information:					
43	Non Patent Literature	Blicharz_et_al_ProcSPIEIntSocOptEng_2006_v6380_QC.pdf	7234709 0e63207692ae1145c62b2bbe64de7f9a507d4a22	no	6
Warnings:					
Information:					
44	Non Patent Literature	Blicharz_et_al_Anal_Chem_2009_v81_p2106_QC.pdf	2312510 b6e6ec07191fa8b082f7eecdab9871a2b6142aa6	no	18
Warnings:					
Information:					
45	Non Patent Literature	Blicharz_et_al_ClinChem_2008_v54_p1473_QC.pdf	11998404 b096e52e479373709e859104cbd20851916385f2	no	8
Warnings:					
Information:					
46	Non Patent Literature	Bourzac_Tech_Rev_Published_05-13-2008_2pgs.pdf	232144 b4ea87b6d88d6f9ebe80b1239d7015ebc2a8ee78	no	2
Warnings:					
Information:					

47	Non Patent Literature	Bowden_et_al_AnalChem_2005_v77_p5583_QC.pdf	10352563 784b257c35c5a1688a50066009a46fde42b13b5d	no	6
Warnings:					
Information:					
48	Non Patent Literature	Boyden_JExpMed_1962_v115_p453.pdf	715829 e1711c5eee69bf3763adc6f1d9ae8a668b9ff227	no	14
Warnings:					
Information:					
49	Non Patent Literature	Brehm-Stecher_et_al_MicrobiolMolBiolRev_2004_v68_p538_part_1_QC.pdf	22792097 9a67ddff3fb2be2f2741283c4919bbb3c4c54077	no	11
Warnings:					
Information:					
50	Non Patent Literature	Brehm-Stecher_et_al_MicrobiolMolBiolRev_2004_v68_p538_part_2_QC.pdf	22928767 4633d910c9a64e303da99b8402951344e06e3af7	no	10
Warnings:					
Information:					
51	Non Patent Literature	Brehm-Stecher_et_al_MicrobiolMolBiolRev_2004_v68_p538_part_3_QC.pdf	1743518 21eee15aceb41f837fe0885cb4f08ed43fef3e9f	no	1
Warnings:					
Information:					
52	Non Patent Literature	Brogan_et_al_CurrOpinChemBiol_2005_v9_p494_QC.pdf	12090960 b0c99f1fd4150499470e95e7af1f17a605ea8512	no	7
Warnings:					
Information:					
53	Non Patent Literature	Bronk_et_al_AnalChem_1995_v67_p2750_part_1_QC.pdf	21780528 ac7d47b89ba9d0add0b1e162c82e1d00313dc2f8	no	5
Warnings:					
Information:					
54	Non Patent Literature	Bronk_et_al_AnalChem_1995_v67_p2750_part_2_QC.pdf	11956917 acd969eb856ae218583abb5f852d037fc6ace574	no	3
Warnings:					
Information:					
55	Non Patent Literature	Bronk_et_al_AnalChem_1994_v66_3519_QC.pdf	3172109 a0fee10c24788a27e5a9c8c49ad9d631a32d0b34	no	2
Warnings:					
Information:					

56	Non Patent Literature	Bulut_et_al_Adv_Ther_2006_v23_p12_QC.pdf	221810 86db07a1101c56e9907c62aeb9e451d1e22d3ab6	no	11
Warnings:					
Information:					
57	Non Patent Literature	Burton_et_al_LabChip_2010_v10_p843_QC.pdf	15172842 43bc4e64a8e228ef73348c0eb3f309f5083afb58	no	10
Warnings:					
Information:					
58	Non Patent Literature	Campian_et_al_Chapter77_QC.pdf	4585352 e8efa22bf46c23252134a8f105eb8be19984db57	no	5
Warnings:					
Information:					
59	Non Patent Literature	Chang_et_al_Abstract_Poster_AACC_Mtg_2012_2pgs_QC.PDF	612220 568803f2d30c6cf78f58b3b6a9be5846434279ec	no	2
Warnings:					
Information:					
60	Non Patent Literature	Chang_et_al_Abstract_Poster_AACC_Mtg_2013_2pgs.pdf	183508 1f25e8ee8729ec3d1678487673f0b67d0166250c	no	2
Warnings:					
Information:					
		Total Files Size (in bytes):	378261973		

This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.

<u>New Applications Under 35 U.S.C. 111</u>
If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.

<u>National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371</u>
If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.

<u>New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office</u>
If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.

Electronic Acknowledgement Receipt

EFS ID:	22144770
Application Number:	14111326
International Application Number:	
Confirmation Number:	3274
Title of Invention:	METHODS OF DETERMINING A TREATMENT PROTOCOL FOR AND/OR A PROGNOSIS OF A PATIENT'S RECOVERY FROM A BRAIN INJURY
First Named Inventor/Applicant Name:	David Wilson
Customer Number:	23628
Filer:	Michael Pomianek/Eileen MacKenzie
Filer Authorized By:	Michael Pomianek
Attorney Docket Number:	Q0052.70018US01
Receipt Date:	28-APR-2015
Filing Date:	24-JUN-2014
Time Stamp:	19:49:07
Application Type:	U.S. National Stage under 35 USC 371

Payment information:

Submitted with Payment	no

File Listing:

Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Foreign Reference	AU199956253_QC.pdf	10679318 b128a39d9131de2b3ebbe5fbcb534bb576477ed4	no	57

Warnings:	
Information:	

2	Foreign Reference	CN1635146A_abst_only_QC.pdf	904963 adb32bc81f5f3ba985ce9b8576903422546dac13	no	14
Warnings:					
Information:					
3	Foreign Reference	CN1950520A_Eng_abst_QC.pdf	700587 bd690ff35f05953fe34d02bab67330a74269faf7	no	14
Warnings:					
Information:					
4	Foreign Reference	DE19540098_abst_only_QC.pdf	10136559 ff518b07cd4a8a425ac54f7b91547fe0f8b9e250	no	9
Warnings:					
Information:					
5	Foreign Reference	EP0805215_QC.pdf	845702 04e193491be8fe1a0d4d2afcf9aeee5721d8d1d8	no	13
Warnings:					
Information:					
6	Foreign Reference	EP1180679_QC.pdf	11277306 44da6d48eb417320b928a7d4a4419fcb17a2ed38	no	15
Warnings:					
Information:					
7	Foreign Reference	EP1259810_abst_QC.pdf	12728926 ab514c3b33493c65bcefe1cf5d28f5c288fb947b	no	18
Warnings:					
Information:					
8	Foreign Reference	EP1721657_QC.pdf	21808816 9f4e9d82e72157d41b3221106590316fd91f2554	no	21
Warnings:					
Information:					
9	Foreign Reference	EP2267451A2_QC.pdf	2260511 dad037e3dbce9801d0c8ceb22e7c8ff07b674d40	no	32
Warnings:					
Information:					
10	Foreign Reference	JP2001-269196A_Eng_trans_QC.pdf	1742473 d15aedaf811e37f03e330dd9ad8efbe8dafd26b	no	34
Warnings:					
Information:					

11	Foreign Reference	JP2002506200_QC.pdf	15753080 05988015acca728353b05bbdf4c3759d6e7de547	no	83
Warnings:					
Information:					
12	Foreign Reference	JP2002525587_QC.pdf	12027838 1b15047cfeb4720dde21af058e25ad8b9279aae9	no	62
Warnings:					
Information:					
13	Foreign Reference	JP2002526743_QC.pdf	1559701 91dcf2403b2b31d73fd138b2d659dab63f2f981f	no	57
Warnings:					
Information:					
14	Foreign Reference	JP2004354164_Eng_trans_QC.pdf	9678942 09b50138a6adac105ed4aeb56c189eaea2d890e7	no	37
Warnings:					
Information:					
15	Foreign Reference	JP2005518553A_part_1_qc.pdf	23504974 597d8a0747b5a8343d5d768487e0d70a44b3f0be	no	26
Warnings:					
Information:					
16	Foreign Reference	JP2005518553A_part_2_qc.pdf	23179924 e49d6ec10b001181551fdbaa346baeb81ed0491b6	no	21
Warnings:					
Information:					
17	Foreign Reference	JP2005518553A_part_3_qc.pdf	24003333 875c47907a38163d55194b918b1c1cf5afd68dd0	no	22
Warnings:					
Information:					
18	Foreign Reference	JP2005518553A_part_4_qc.pdf	23480455 bbef9e5372476728d0299621739baec1c9873cfd	no	22
Warnings:					
Information:					
19	Foreign Reference	JP2005518553A_part_5_qc.pdf	22606890 255443a4637f07555c4f561321a40912d0167ef2	no	28
Warnings:					
Information:					

20	Foreign Reference	JP2006511792A_part_1_qc.pdf	23666383 ef696e5e82b804b6a6d36c093b0ef5148fde7f81	no	25
Warnings:					
Information:					
21	Foreign Reference	JP2006511792A_part_2_qc.pdf	24007135 6bc4e5e67ae422ea388605e268a5e6d7035b7dfd	no	22
Warnings:					
Information:					
22	Foreign Reference	JP2006511792A_part_3_qc.pdf	23424249 a0800b55cd25637d680863bdc2b3718cc51d2606	no	25
Warnings:					
Information:					
23	Foreign Reference	JP2006511792A_part_4_qc.pdf	15581304 85bace4d28d84a5f5f5008dcaa8fdf6a1d8cad05	no	22
Warnings:					
Information:					
24	Foreign Reference	WO8805533_QC.pdf	1276532 37d56e9c11c7c8a4278b6afd62bec68b8d4d8ffa	no	34
Warnings:					
Information:					
25	Foreign Reference	WO9306121_QC.pdf	3905802 6c603a7040ca960af532c89ba10902bea428ef43	no	79
Warnings:					
Information:					
26	Foreign Reference	WO9324517_QC.pdf	2077459 34fc9aba23e1e32cce6bdfca3c27e92aa20b521a	no	48
Warnings:					
Information:					
27	Foreign Reference	WO9525116_part_1_QC.pdf	23903704 05a8acb5572837b732d4a6e9a5844e4957c05f1c	no	32
Warnings:					
Information:					
28	Foreign Reference	WO9525116_part_2_QC.pdf	5721603 130ce692d0964681da30c11c91b2b30e04188a6e	no	9
Warnings:					
Information:					

29	Foreign Reference	WO9532425_QC.pdf	1646717 121e986310f3dd580199ce33cdbb7325e3d5bc7f	no	43
Warnings:					
Information:					
30	Foreign Reference	WO9535506_QC.pdf	24760626 c4419203e1fc63d04464beac2dc70bc3e88c34c5	no	31
Warnings:					
Information:					
31	Foreign Reference	WO9727326_QC.pdf	2243632 f2fed3acbd2c7355db662f66706025592336155e	no	47
Warnings:					
Information:					
32	Foreign Reference	WO9850782_part_1_QC.pdf	23524745 5cef128aa291af3a895b6b4ec752f61d29ebc383	no	20
Warnings:					
Information:					
33	Foreign Reference	WO9850782_part_2_QC.pdf	22988730 5a8c82b3451fe8909dab30330b7483d6df007396	no	22
Warnings:					
Information:					
34	Foreign Reference	WO9850782_part_3_QC.pdf	23264059 86ecd5340c137fff8b4ad8b1c09f9dba2dfe274c	no	24
Warnings:					
Information:					
35	Foreign Reference	WO9850782_part_4_QC.pdf	9720564 9e2eb73114b7e894f05720b008da32efb17ac8ad	no	23
Warnings:					
Information:					
36	Foreign Reference	WO9945357_QC.pdf	2739285 7fc7c03a204af6f0a395471429cb64e5db044a0e	no	61
Warnings:					
Information:					
37	Foreign Reference	WO9958948_part_1_QC.pdf	23914991 98ce06573cb5b111bd96a00d29726d9d5056b4b1	no	26
Warnings:					
Information:					

38	Foreign Reference	WO9958948_part_2_QC.pdf	23843902 8b7fac7b829dd516e0b9cd61c75d2593ff8e50f3	no	28
Warnings:					
Information:					
39	Foreign Reference	WO9958948_part_3_QC.pdf	13357568 4325dc5eab3a8f23a95cbdd48f1e29dc01f8610e	no	17
Warnings:					
Information:					
40	Foreign Reference	WO0004372_part_1_QC.pdf	23998043 04c93d2733bc08f5522db2e6a711d50da0a187f7	no	25
Warnings:					
Information:					
41	Foreign Reference	WO0004372_part_2_QC.pdf	23906250 1c4a9b0c6c9a8875f02fc6f29ff4f3dc1c3503e6	no	27
Warnings:					
Information:					
42	Foreign Reference	WO0004372_part_3_QC.pdf	23766017 806e7caa557e08e8d62d28187d5223762bafbdfe	no	54
Warnings:					
Information:					
43	Foreign Reference	WO0004372_part_4_QC.pdf	9781527 50dd124e39fc0cd6c3beaa7533b49d20a67a47d8	no	23
Warnings:					
Information:					
44	Foreign Reference	WO0047996_part_1_QC.pdf	23539501 d940207e335ea9802a14374d08a6455f143c74ac	no	24
Warnings:					
Information:					
45	Foreign Reference	WO0047996_part_2_QC.pdf	23878853 1376027749b25be53070c8fcb7ec09826d4a8605	no	23
Warnings:					
Information:					
46	Foreign Reference	WO0047996_part_3_QC.pdf	23821623 08bfb892d8efd76f4b81430eec2c6bdce47700af	no	24
Warnings:					
Information:					

47	Foreign Reference	WO0047996_part_4_QC.pdf	23596248 7408b6f395ad96fb6979deebb729828653e918f5	no	24
Warnings:					
Information:					
48	Foreign Reference	WO0047996_part_5_QC.pdf	24081673 0f8626d5a378ad4d85a8fbce3553d30aa869d739	no	48
Warnings:					
Information:					
49	Foreign Reference	WO0047996_part_6_QC.pdf	23951386 e734e8b3c0bb96d7bbff8d0263b7fee05fed2535	no	47
Warnings:					
Information:					
50	Foreign Reference	WO0047996_part_7_QC.pdf	23637818 19f4b1375311b4d7c055213a3d379082c5ca9a13	no	26
Warnings:					
Information:					
51	Foreign Reference	WO0047996_part_8_QC.pdf	23722005 88951c16a934905fe6ebba8667f952d7de2490fc	no	27
Warnings:					
Information:					
52	Foreign Reference	WO0047996_part_9_QC.pdf	24027048 d3fd7b4b96ab2b2c36ba657f435a63f89c2f2593	no	36
Warnings:					
Information:					
53	Foreign Reference	WO0047996_part_10_QC.pdf	24059191 cea691ed45fe22ab2adf76f20c7b7375f8a02902	no	31
Warnings:					
Information:					
54	Foreign Reference	WO0047996_part_11_QC.pdf	5367411 eb62418dfb4b943f4147186827b406e13c1c7ea4	no	9
Warnings:					
Information:					
55	Foreign Reference	WO0157520_Eng_abst_QC.pdf	1049241 9aa754c936edd7a25a499808098b2347765c3cd0	no	24
Warnings:					
Information:					

56	Foreign Reference	WO03054142_part_1_QC.pdf	24086937 4682893672 15b70d7bf44f8fcbf9f2496f5a25fc	no	25
Warnings:					
Information:					
57	Foreign Reference	WO03054142_part_2_QC.pdf	23847603 4d905e7f5fe97d8d0e31f20dc60e48275fa28972	no	28
Warnings:					
Information:					
58	Foreign Reference	WO03054142_part_3_QC.pdf	23815327 5d2b87a47912f45389aef5ac39ab04e12a5b1d4a	no	34
Warnings:					
Information:					
59	Foreign Reference	WO03054142_part_4_QC.pdf	7805735 88e903b905d3d435acf6b6356a6f6c7a861c00fd	no	11
Warnings:					
Information:					
			Total Files Size (in bytes):	930188725	

This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.

New Applications Under 35 U.S.C. 111
If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.

National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371
If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.

New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office
If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.

Electronic Acknowledgement Receipt

EFS ID:	22158494
Application Number:	14111326
International Application Number:	
Confirmation Number:	3274
Title of Invention:	METHODS OF DETERMINING A TREATMENT PROTOCOL FOR AND/OR A PROGNOSIS OF A PATIENT'S RECOVERY FROM A BRAIN INJURY
First Named Inventor/Applicant Name:	David Wilson
Customer Number:	23628
Filer:	Michael Pomianek/Eileen MacKenzie
Filer Authorized By:	Michael Pomianek
Attorney Docket Number:	Q0052.70018US01
Receipt Date:	28-APR-2015
Filing Date:	24-JUN-2014
Time Stamp:	20:02:45
Application Type:	U.S. National Stage under 35 USC 371

Payment information:

Submitted with Payment	no

File Listing:

Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Non Patent Literature	Wilson_et_al_Abstract_Amer_Acad_Neurol_Mtg_2011_2pgs.pdf	63701 1a0d9e0829c6680af692069f2fd77902ac55b1b3	no	2
Warnings:					
Information:					

2	Non Patent Literature	Wu_et_al_ClinChem2006_v52_p2157_QC.pdf	5391201 fcb04b38ff7529c2e8dbe55c58be96577a1c1b01	no	3
Warnings:					
Information:					
3	Non Patent Literature	Xie_et_al_AnnuRevPhysChem_1998_v49_p441_part_1_QC.pdf	23900256 a0c8c1e3db7c7a52362388090aaf7e4dbf9967f6	no	23
Warnings:					
Information:					
4	Non Patent Literature	Xie_et_al_AnnuRevPhysChem_1998_v49_p441_part_2_QC.pdf	18069487 0e17c1e5daa55f58522925f215d9ebeaabba9c67	no	18
Warnings:					
Information:					
5	Non Patent Literature	Xie_et_al_JAmChemSoc_2009_v131_p12763_QC.pdf	13591887 8cddc719e27e71ece2f30f781d1f8b72fc924c4d	no	8
Warnings:					
Information:					
6	Non Patent Literature	Xue_et_al_Nature_1995_v373_p681_QC.pdf	5387282 729bbce2cf2318b6cb0645047a65ce71abbfbf2b	no	3
Warnings:					
Information:					
7	Non Patent Literature	Yan_et_al_Abstract_Poster_Soc_Lab_Automat_Screen_Mtg_2013_2pgs_QC.PDF	388588 e8210f1b052857a3ccd2631c6515cf98983f2dab	no	2
Warnings:					
Information:					
8	Non Patent Literature	Young_et_al_NatChemBiol_2008_v4_p59_QC.pdf	17704227 79fd7d4a261b7b11c4bec83a9e4f4bd15f3222bb	no	10
Warnings:					
Information:					
9	Non Patent Literature	Zetterberg_et_al_PLoS_One_2011_v6_pE28263.pdf	729246 884f68419906f61b3d301a34b0c0f376e6246556	no	6
Warnings:					
Information:					
10	Non Patent Literature	Zetterberg_et_al_Alzheimers_Res_Ther_2013_v5_p9.pdf	175432 ad7ebcacb838756d929f28b27dc4cb9c8ca843ad	no	3
Warnings:					
Information:					

11	Non Patent Literature	Zetterberg_Presentation_2012_29pgs_QC.pdf	5069070 a2f96c70578b4cb26b40af8095470469e3198ce3	no	29
Warnings:					
Information:					
12	Non Patent Literature	Zhang_et_al_J_Biol_Chem_2007_v282_p10873_QC.pdf	409201 48ac1a846c5e6ce19fb3342e2b094cdf1d57c353	no	8
Warnings:					
Information:					
		Total Files Size (in bytes):	90879578		

This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.

<u>New Applications Under 35 U.S.C. 111</u>
If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.

<u>National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371</u>
If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.

<u>New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office</u>
If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.

Electronic Acknowledgement Receipt

EFS ID:	22147819
Application Number:	14111326
International Application Number:	
Confirmation Number:	3274
Title of Invention:	METHODS OF DETERMINING A TREATMENT PROTOCOL FOR AND/OR A PROGNOSIS OF A PATIENT'S RECOVERY FROM A BRAIN INJURY
First Named Inventor/Applicant Name:	David Wilson
Customer Number:	23628
Filer:	Michael Pomianek/Eileen MacKenzie
Filer Authorized By:	Michael Pomianek
Attorney Docket Number:	Q0052.70018US01
Receipt Date:	28-APR-2015
Filing Date:	24-JUN-2014
Time Stamp:	19:56:12
Application Type:	U.S. National Stage under 35 USC 371

Payment information:

Submitted with Payment	no

File Listing:

Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Non Patent Literature	Chang_et_al_J_Virol_Methods_2013_v188_p153.pdf	696474 c29308af159840bca7a681916edadc9dd0a6f780	no	8
Warnings:					
Information:					

2	Non Patent Literature	Chang_et_al_J_Immunol_Methods_2012_v378_p102_QC.PDF	4972443 d73d437bf325458a4a65c394109f0a7cd275f4e4	no	28
Warnings:					
Information:					
3	Non Patent Literature	Chen_et_al_BiotechnolProg_2009_v25_p929_QC.pdf	15675827 ced8adc69cafed11e3e5840eabb858718623f71	no	9
Warnings:					
Information:					
4	Non Patent Literature	Chin_et_al_Science_Editors_Choice_2008_v320_p21.pdf	490526 648ed4d61c1d939c2245f4e3ad7a8aa2e511ba37	no	2
Warnings:					
Information:					
5	Non Patent Literature	Chon_et_al_AnalBiochem_1997_v252_p246_QC.pdf	1566394 6512a5a9c988bd4bd2ea93b32db016a0945bf78b	no	9
Warnings:					
Information:					
6	Non Patent Literature	Deutsch_et_al_Cytometry_1994_v16_p214_QC.pdf	2801619 0117d70317228946 29cf347b71ed3b11f437d340	no	13
Warnings:					
Information:					
7	Non Patent Literature	DiCesare_et_al_AnalBioanal_Chem_2005_v382_p37_QC.pdf	11124173 d79cc944f3a6e22b1863844ff49c75e2bae7f89c	no	7
Warnings:					
Information:					
8	Non Patent Literature	Dickinson_et_al_Nature_1996_v385_p697_QC.pdf	7193519 bcee5e5f4c86cf5456267b723005c363c5ce6351	no	4
Warnings:					
Information:					
9	Non Patent Literature	Dickinson_et_al_AnalChem_1999_v71_p2192_QC.pdf	10735596 957ad572140eed85744886ddd8183a25ac1ed791	no	7
Warnings:					
Information:					
10	Non Patent Literature	Dickinson_et_al_Tibtech_1998_v16_p250_QC.pdf	13028065 1bad69ba76f1abe6a3b4ae9c9fc64e73ac77ee49	no	9
Warnings:					
Information:					

11	Non Patent Literature	Dolinak_et_al_Acta_Neuropathol_2000_v100_p553_QC.pdf	172604 70954415b43bbef4f5813a311c7e135ea92ac3f8	no	8
Warnings:					
Information:					
12	Non Patent Literature	Duffy_et_al_AACC_Meeting_Poster_2010_1pg_QC_pdf.pdf	3142927 27c37e0220baf7f9395772b265324d4f54c75b1c	no	1
Warnings:					
Information:					
13	Non Patent Literature	Duffy_Oakridge_Pres_04-15-2011_16pgs_QC.pdf	7166638 2e6e0e378fa2456bc7567c3d552929b14c12a98e	no	16
Warnings:					
Information:					
14	Non Patent Literature	Duffy_PowerPoint_36pgsQC.pdf	18175625 43406a1315ba9be8011ab84603b7fc104b07cf3b	no	36
Warnings:					
Information:					
15	Non Patent Literature	Duffy_The_Botulinum_J_2012_v2_p164.pdf	251002 d1602e82a4469a0d5be581258fe37b5edb380120	no	4
Warnings:					
Information:					
16	Non Patent Literature	Egner_et_al_ChemCommun_1997_p735_QC.pdf	3336731 7fc6fcf45ab9d49eb6809c645a1c297b204ff8f42	no	2
Warnings:					
Information:					
17	Non Patent Literature	Eid_et_al_Science_2009_v323_p133_QC.pdf	12054188 8417ee770a7f50c14787374e20f23524eafb43b2	no	7
Warnings:					
Information:					
18	Non Patent Literature	Ekins_et_al_Clin_Chem_2011_v57_p372.pdf	368826 193f2063f798ce8fd4425afb38f6e0849ee4ecf9	no	3
Warnings:					
Information:					
19	Non Patent Literature	English_et_al_NatChemBiol_2006_v2_p87_QC.pdf	13410195 5d7309b83131abf6b6e2df2ba77098fbc04c1394	no	8
Warnings:					
Information:					

20	Non Patent Literature	Epstein_et_al_JAmChemSoc_2003_v125_p13753_QC.pdf	11763373 42d55dc4b610d0b127ec9b14837dc81ae2585d5f	no	7
Warnings:					
Information:					
21	Non Patent Literature	Epstein_et_al_AnalChimActa_2002_v469_p3_part_1_QC.pdf	23492637 00f4af2daec152f9976b02bb1b40ab5d9aed1f84	no	17
Warnings:					
Information:					
22	Non Patent Literature	Epstein_et_al_AnalChimActa_2002_v469_p3_part_2_QC.pdf	21723838 f09475606f8f81cff8f955d8ba17e9ce71fb0dd1	no	17
Warnings:					
Information:					
23	Non Patent Literature	Epstein_et_al_AnalChem_2002_v74_p1836_QC.pdf	7588733 55ee12750ed2778e060c2c75d9831b12807c3ca4	no	5
Warnings:					
Information:					
24	Non Patent Literature	Epstein_et_al_BiosensBioelectron_2003_v18_p541_QC.pdf	10452195 d3bae81679fa5f154d310ff7baed7519c8b953f5	no	6
Warnings:					
Information:					
25	Non Patent Literature	Epstein_et_al_ChemSocRev_2003_v32_p203_QC.pdf	24634390 d0198933865a85c006bbd24887692b257fa0ec0b	no	12
Warnings:					
Information:					
26	Non Patent Literature	Ferguson_et_al_NatBiotechnol_1996_v14_p1681_QC.pdf	6938764 4bb105ea3168ad514570e7dfd1bcf13f7b246a28	no	4
Warnings:					
Information:					
27	Non Patent Literature	Ferguson_et_al_AnalChem_2000_v72_p5618_QC.pdf	11004809 58912ff6bf0b09cb809e92c37008d93a16326b44	no	7
Warnings:					
Information:					
28	Non Patent Literature	Ferguson_et_al_AnalChimActa_1997_v340_p123_QC.pdf	9950715 2b3a1323c765a640f2c3b0d19f6197461683d373	no	9
Warnings:					
Information:					

29	Non Patent Literature	Fister_et_al_AnalChem_1998_v70_p431_QC.pdf	10983087 1524476a9bf94b8bf57e17a588db25227ac3d799	no	7
Warnings:					
Information:					
30	Non Patent Literature	Fulton_et_al_ClinChem_1997_v43_p1749_QC.pdf	11692934 c00d9556372d5c501d442db965a781c4049f8d05	no	8
Warnings:					
Information:					
31	Non Patent Literature	Furka_et_al_Int_J_Pept_Protein_Res_1991_v37_p487.pdf	10212408 78b9ee043c152a0810f6cda26de0d85d34933b85	no	7
Warnings:					
Information:					
32	Non Patent Literature	Gebel_AnalChem_2009_p7130_QC.pdf	2062441 75f133722b49988604d2937de612ed6bdcb18bef	no	2
Warnings:					
Information:					
33	Non Patent Literature	Giaever_et_al_PNAS_1991_v88_p7896.pdf	1152470 208242b518e3a9b5794d98543e3864e4a6af1505	no	6
Warnings:					
Information:					
34	Non Patent Literature	Gorris_et_al_AngewChemIntEd_2010_v49_p2_part_1_QC.pdf	23756850 92bc2da2f5a0be74058b526c8f35ce5e3ca53147	no	10
Warnings:					
Information:					
35	Non Patent Literature	Gorris_et_al_AngewChemIntEd_2010_v49_p2_part_2_QC.pdf	11656002 962c44bbc2b9dbfa97ae3c5717b2a88f1b165a2a	no	7
Warnings:					
Information:					
36	Non Patent Literature	Gorris_et_al_JAmchemSoc_2009_v131_p6277_QC.pdf	9983138 b8cb3a921900961a0ae2d68057151742052f4e98	no	6
Warnings:					
Information:					
37	Non Patent Literature	Gorris_et_al_FEBSJ_2007_v274_p5462_QC.pdf	13907266 c7d39268a40611b5523f71cf4714c803b28930d8	no	9
Warnings:					
Information:					

38	Non Patent Literature	Gorris_et_al_PNAS_2007_v104_p17680_QC.pdf	11889963 ec4c47540dbb7f2ff3d8f3458fd69a9c4f0b98f8	no	6
Warnings:					
Information:					
39	Non Patent Literature	Guglielmotto_et_al_J_Neurochem_2009_v108_p1045_QC.pdf	835838 de67856e1e4d05b067d6ac627ecde23874ffbb738	no	12
Warnings:					
Information:					
40	Non Patent Literature	Goedert_et_al_Neuron_1989_v3_p519_QC.pdf	3261433 9f57dbfb80e002982d5f004282880c18edb1357b	no	8
Warnings:					
Information:					
41	Non Patent Literature	Harma_et_al_ClinChem_2001_v47_p561_QC.pdf	17833875 d6345288eed6e188c944282ef21b7f2556fadaae	no	8
Warnings:					
Information:					
42	Non Patent Literature	Harma_et_al_ClinChem_2000_v46_p1755_QC.pdf	10830965 1f048b1e2608a4939eba4fb2638128d02ea82265	no	7
Warnings:					
Information:					
43	Non Patent Literature	Harma_et_al_Luminescence_2000_v15_p351_QC.pdf	8286970 988e8f7d5f2194e6c739267cd38dd7821d641694	no	5
Warnings:					
Information:					
44	Non Patent Literature	Hashida_et_al_ClinDiagnLabImmunol_1995_v2_p535_QC.pdf	10767268 06294bf7166df4833a51788b55793b268e157d6c	no	8
Warnings:					
Information:					
45	Non Patent Literature	Haugland__TheHandbookAGuidetoFluorescentProbesandLabelingTechnologies_Chapter10_part_1_QC.pdf	22939237 f58bbf276518049c9175957a2da369cced923792	no	14
Warnings:					
Information:					
46	Non Patent Literature	Haugland__TheHandbookAGuidetoFluorescentProbesandLabelingTechnologies_Chapter10_part_2_QC.pdf	23382507 2c2a007418e7cd9b88d7453dfc8430475a24b13a	no	15
Warnings:					
Information:					

47	Non Patent Literature	Haugland__TheHandbookAGuidetoFluorescentProbesandLabelingTechnologies_Chapter10_part_3_QC.pdf	23889547 fd527d91055ff340c70bb2be8a8d71a170b4f342	no	15
Warnings:					
Information:					
48	Non Patent Literature	Haugland__TheHandbookAGuidetoFluorescentProbesandLabelingTechnologies_Chapter10_part_4_QC.pdf	22939529 22664c6b4a286a52cebf01dda8855334f3c5cc41	no	15
Warnings:					
Information:					
49	Non Patent Literature	Haugland__TheHandbookAGuidetoFluorescentProbesandLabelingTechnologies_Chapter10_part_5_QC.pdf	16699856 b4dd67cda1bfec8c78bdedcabf0917e80564dd32	no	9
Warnings:					
Information:					
50	Non Patent Literature	He_et_al_AnalChem_2005_v77_p1539_QC.pdf	826687 aa44b229f58400801e1b5e93daa19712f446c21d	no	7
Warnings:					
Information:					
51	Non Patent Literature	Healey_et_al_AnalBiochem_1997_v251_p270_QC.pdf	15589554 d115dab3e4029722250adc537161208eeb1b8672	no	10
Warnings:					
Information:					
52	Non Patent Literature	Healey_et_al_BiosensBioelectron_1997_v12_p521_QC.pdf	9603143 e66395934e54d861176a9177e93a3961a2d9a752	no	9
Warnings:					
Information:					
53	Non Patent Literature	Healey_et_al_Science_1995_v269_p1078_QC.pdf	6833074 bc1ea82d6a4fbd1e80bc66110e59ed91f43b0296	no	3
Warnings:					
Information:					
54	Non Patent Literature	Hindson_et_al_Anal_Chem_2011_v83_p8604_QC.pdf	2095297 1247ec7611fccfaebceaac2ab5226b167af89452	no	7
Warnings:					
Information:					
55	Non Patent Literature	Hirano_et_al_Nucl_Acids_Symp_2000_v44_p157_QC.pdf	1751238 c2abe47ddede22e3bb85db3b5f19e0a1759c0153	no	2
Warnings:					
Information:					

56	Non Patent Literature	Hirschfeld_FreseniusZAnalChem_1986_v324_p618_QC.pdf	10161280 551d4614c449a98dcc70c2ce3e3fb311ea228fc6	no	7
Warnings:					
Information:					
57	Non Patent Literature	Hunsaker_et_al_AnalBiochem_1989_v181_p360_QC.pdf	21444704 dc60546abc0d9796cf8427aa70064a39525c369d	no	11
Warnings:					
Information:					
58	Non Patent Literature	Jendroska_et_al_Acta_Neuropathol_1995_v90_p461_QC.pdf	1636153 8f67f2194edb12db0029e8342125be2f2d4ee602	no	6
Warnings:					
Information:					
59	Non Patent Literature	Jeromin_et_al_Abstract_Poster_AAIC_Mtg_2014_2_pgs_pdf.pdf	669205 ee37155c9b2708049cabebd44fe1e513ab867122	no	2
Warnings:					
Information:					
60	Non Patent Literature	Jeromin_et_al_Abstract_Poster_Traumatic_Brain_Injury_Conf_2014_2pgs_pdf.pdf	676056 06b9df7f032d8289aabf90f0fa158b428f131084	no	2
Warnings:					
Information:					
		Total Files Size (in bytes):	594162801		

This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.

<u>New Applications Under 35 U.S.C. 111</u>
If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.

<u>National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371</u>
If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.

<u>New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office</u>
If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.

Electronic Acknowledgement Receipt

EFS ID:	22144865
Application Number:	14111326
International Application Number:	
Confirmation Number:	3274
Title of Invention:	METHODS OF DETERMINING A TREATMENT PROTOCOL FOR AND/OR A PROGNOSIS OF A PATIENT'S RECOVERY FROM A BRAIN INJURY
First Named Inventor/Applicant Name:	David Wilson
Customer Number:	23628
Filer:	Michael Pomianek/Eileen MacKenzie
Filer Authorized By:	Michael Pomianek
Attorney Docket Number:	Q0052.70018US01
Receipt Date:	28-APR-2015
Filing Date:	24-JUN-2014
Time Stamp:	19:51:59
Application Type:	U.S. National Stage under 35 USC 371

Payment information:

Submitted with Payment	no

File Listing:

Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Foreign Reference	WO03073817_part_1_QC.pdf	23952759 9140fb0cf56c8f49b423ffbe41e96b672f093ee5	no	88

Warnings:

Information:

2	Foreign Reference	WO03073817_part_2_QC.pdf	16986094 b833eed754ca6e06a34b3f565302da97a0e7dc63	no	86
Warnings:					
Information:					
3	Foreign Reference	WO2004065000_part_1_QC.pdf	23734256 05f183ee26e909ca52632829e06b9c910b9c677d	no	31
Warnings:					
Information:					
4	Foreign Reference	WO2004065000_part_2_QC.pdf	18664994 812f87373c1c3a46b337aae278bda6b828c32713	no	24
Warnings:					
Information:					
5	Foreign Reference	WO2004083443_part_1_QC.pdf	23091429 e6e756e8b6b770d86d600c4435c487384e0e9b67	no	19
Warnings:					
Information:					
6	Foreign Reference	WO2004083443_part_2_QC.pdf	23786481 864a7f75e4345008f6812ef9420a6dd3782d65bd	no	20
Warnings:					
Information:					
7	Foreign Reference	WO2004083443_part_3_QC.pdf	23806661 81a6931dba59fc90edeae77bdba78e565afedb25	no	24
Warnings:					
Information:					
8	Foreign Reference	WO2004083443_part_4_QC.pdf	12601837 1240e787f32aa8ce26752ac5d8a3535a8d3706c0	no	23
Warnings:					
Information:					
9	Foreign Reference	WO2005019419_part_1_QC.pdf	23923427 05f2b79148c22a9ba900a2858f52a1e7092d810f	no	25
Warnings:					
Information:					
10	Foreign Reference	WO2005019419_part_2_QC.pdf	23650992 2997eb5d744f7313f2507a36738ecbf1d95621ac	no	26
Warnings:					
Information:					

11	Foreign Reference	WO2005019419_part_3_QC.pdf	5874813 40d62d47fca9ace8ec7c900b743a7827a968f822	no	11
Warnings:					
Information:					
12	Foreign Reference	WO2005023414_part_1_QC.pdf	24037896 11df16d50f8e5ea829e0a8c4c383ad584f199db2	no	30
Warnings:					
Information:					
13	Foreign Reference	WO2005023414_part_2_QC.pdf	7390304 3d10013f199f0ce5b6ce0ecb4edf193451bad3ca	no	12
Warnings:					
Information:					
14	Foreign Reference	WO2005033283_part_1_QC.pdf	23439206 179103f85d9ee4e89d3812c0fbb874974891ff73	no	24
Warnings:					
Information:					
15	Foreign Reference	WO2005033283_part_2_QC.pdf	16252287 b7f4f849aa62120456c5685c649cf4a4ef5b62d3	no	23
Warnings:					
Information:					
16	Foreign Reference	WO2005054431_part_1_QC.pdf	23454265 fb309bbbd97794e061849eb1e192d4431b03651f	no	24
Warnings:					
Information:					
17	Foreign Reference	WO2005054431_part_2_QC.pdf	23751819 f3f9d965f89e4bfa63d4ba625ef991aeef04b653	no	34
Warnings:					
Information:					
18	Foreign Reference	WO06007726_QC.pdf	794037 88f18166fe17608b1066b838e7aca39e03a9de78	no	21
Warnings:					
Information:					
19	Foreign Reference	WO2006055739A2_QC.pdf	4251940 d749dcf692cabad39b1afb4be71f1550912e5350	no	74
Warnings:					
Information:					

20	Foreign Reference	WO2006078289_QC.pdf	7453789 e99a350f2df15ae43dda2f937b02095167d3b23b	no	151
Warnings:					
Information:					
21	Foreign Reference	WO2006102297A1_part_1_QC.pdf	23986057 ab780e9ef7e1769a9182ce3cf4558e2068be5e1b	no	155
Warnings:					
Information:					
22	Foreign Reference	WO2006102297A1_part_2_QC.pdf	21268211 b640403a8c3b4159aba273313f3b9e74bc3b534a	no	186
Warnings:					
Information:					
23	Foreign Reference	WO2006108180_part_1_QC.pdf	23234878 22094e2bdcb28686077edd14eb5aa6345a4abe76	no	23
Warnings:					
Information:					
24	Foreign Reference	WO2006108180_part_2_QC.pdf	23906352 4eb0bb36320dcba64bcd0372e092d880c43b3e87	no	24
Warnings:					
Information:					
25	Foreign Reference	WO2006108180_part_3_QC.pdf	23543341 7729dd1448b8b54c71a2f4a8cec2c6419971bcb4	no	23
Warnings:					
Information:					
26	Foreign Reference	WO2006108180_part_4_QC.pdf	24025589 ef9f0302676d2e29e5bef055b81b9aea570b316c	no	36
Warnings:					
Information:					
27	Foreign Reference	WO2006108180_part_5_QC.pdf	8771190 de11cf3ad6122687962a3f9f94a1bbe6992baa0c	no	12
Warnings:					
Information:					
28	Foreign Reference	WO2007044091_part_1_QC.pdf	23651429 88d042a26fdd9103ccd9f4669bcc04b4176a2e37	no	24
Warnings:					
Information:					

29	Foreign Reference	WO2007044091_part_2_QC.pdf	23723572 0cdebee5f575c6a3014cf4a23487215a5d2154ef	no	23
Warnings:					
Information:					
30	Foreign Reference	WO2007044091_part_3_QC.pdf	14373472 068db8011cb41a9771f5609c8d79ed43cf474771	no	21
Warnings:					
Information:					
31	Foreign Reference	WO2007044974_QC.pdf	3868366 c5ba9e82173acaf2b0470a4e5843a7f8bf8bb485	no	63
Warnings:					
Information:					
32	Foreign Reference	WO2007081385_part_1_QC.pdf	23511251 b024c154bbde03a23b9f74060c637b6071501b98	no	19
Warnings:					
Information:					
33	Foreign Reference	WO2007081385_part_2_QC.pdf	23826173 7b6d7c6ed3e8741b8ad5d2d77c4f200e1909e69d	no	20
Warnings:					
Information:					
34	Foreign Reference	WO2007081385_part_3_QC.pdf	23320463 0254a144a0a946253f6f6ba39b1b9c55843cf37b	no	19
Warnings:					
Information:					
35	Foreign Reference	WO2007081385_part_4_QC.pdf	22898657 6d6942c2d3b49e883c44f284c189c764f9f23654	no	20
Warnings:					
Information:					
36	Foreign Reference	WO2007081385_part_5_QC.pdf	23771896 72ba29e3fd65a3e1314ca3eb7928686d402262f8	no	25
Warnings:					
Information:					
37	Foreign Reference	WO2007081385_part_6_QC.pdf	16365507 eb6a153b1bfe8496e0fcb7c12ff432c40bd70343	no	20
Warnings:					
Information:					

38	Foreign Reference	WO2007081386_part_1_QC.pdf	23868829 3b446d562b983c5169e058725f8c894dff42c96f	no	24
Warnings:					
Information:					
39	Foreign Reference	WO2007081386_part_2_QC.pdf	23214954 de854960fa226d6797c635fe7f5a2e08f56723a5	no	25
Warnings:					
Information:					
40	Foreign Reference	WO2007081386_part_3_QC.pdf	23926059 cf81c95f5479c5b887a20a83bc2dd29a34acb802	no	24
Warnings:					
Information:					
41	Foreign Reference	WO2007081386_part_4_QC.pdf	23728283 1addeb153c0d4aa58e94796ba73806189e91e183	no	33
Warnings:					
Information:					
42	Foreign Reference	WO2007081386_part_5_QC.pdf	4233959 bf6d506b12862cb249928b9d1486b29bf26d4c40	no	10
Warnings:					
Information:					
43	Foreign Reference	WO2007081387_part_1_QC.pdf	23639950 f62f9e0d2257dd3242ebdcb273b6a95af3d9102d	no	21
Warnings:					
Information:					
44	Foreign Reference	WO2007081387_part_2_QC.pdf	23488850 76994da2a3e9f01d994ee059f92309b3420470f6	no	20
Warnings:					
Information:					
45	Foreign Reference	WO2007081387_part_3_QC.pdf	23599791 9f5e998a4856d048010127e816a2edcc2cb22103	no	18
Warnings:					
Information:					
46	Foreign Reference	WO2007081387_part_4_QC.pdf	23715219 f9844a1dfec61e641a90f725de94b95b6d0047ef	no	18
Warnings:					
Information:					