(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5509412号
(P5509412)

(45)発行日　平成26年6月4日(2014.6.4)　(24)登録日　平成26年4月4日(2014.4.4)

(51)Int.Cl.		F I		
C40B 50/08	(2006.01)	C40B	50/08	
C07B 61/00	(2006.01)	C07B	61/00	A
B01J 19/00	(2006.01)	B01J	19/00	321
G01N 37/00	(2006.01)	G01N	37/00	101
C07F 9/42	(2006.01)	C07F	9/42	

請求項の数 14　(全 86 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2007-536257 (P2007-536257)
(86)(22)出願日　平成17年10月12日 (2005.10.12)
(65)公表番号　特表2008-518884 (P2008-518884A)
(43)公表日　平成20年6月5日 (2008.6.5)
(86)国際出願番号　PCT/GB2005/003927
(87)国際公開番号　WO2006/040554
(87)国際公開日　平成18年4月20日 (2006.4.20)
審査請求日　平成20年10月14日 (2008.10.14)
(31)優先権主張番号　10/962,952
(32)優先日　平成16年10月12日 (2004.10.12)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　597166578
メディカル　リサーチ　カウンシル
イギリス国　スウィンドン　ウィルトシャー　エスエヌ２　１エフエル、ノース　スター　アベニュー、ポラリスハウス、デビッド　フィリップス　ビルディング、２階
(73)特許権者　507044516
プレジデント　アンド　フェローズ　オブ　ハーバード　カレッジ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１３８，　ケンブリッジ，　クインシー　ストリート　１７
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄

最終頁に続く

(54)【発明の名称】マイクロ流体制御による区画化された組合せ化学

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の工程を含む、種々の二次化合物のレパートリを調製する方法であって、
（ａ）一次化合物の２以上の異なるセットを供する工程、ここで、各セットは水溶液中にあり、各セットは少なくとも１つの化合物を含み、少なくとも１つの前記セットは複数の異なる化合物を含む；
（ｂ）前記水溶液を非混和性流体の対抗伝搬する２つの流れで分配（partitioning）することにより複数のマイクロカプセルを作製する工程、ここで、少なくとも幾つかの前記マイクロカプセルはあるセット由来の少なくとも１つの化合物を含む；
（ｃ）異なる一次化合物を含む２以上のマイクロカプセルを融合させ、それにより融合したマイクロカプセルを形成させる工程；および
（ｄ）前記融合したマイクロカプセル内の一次化合物間の化学反応により、前記融合したマイクロカプセル内で二次化合物を形成させ、それにより、種々の二次化合物のレパートリを形成する工程、
ここで、少なくとも前記工程（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）がマイクロ流体制御下で実施される、方法。
【請求項２】
少なくとも１つの前記セットが、前記セットの化合物の単一タイプの化合物の多重コピーを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】

幾つかの前記マイクロカプセルが、前記セットの１つ由来の単一タイプの化合物の多重コピーを含む、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
一次化合物の第１のセットと一次化合物の第２のセットとの間でのみ行われる、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法であって、前記第１のセットが単一タイプの化合物の多重コピーを含み、前記第２のセットが複数の異なる化合物を含む、方法。
【請求項５】
少なくとも１つの前記セットの一次化合物が、ビーズに結合している、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記一次化合物が、遊離可能にビーズに結合している、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記二次化合物を同定する工程をさらに含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記マイクロカプセルが、非混和性流体で取り囲まれている水性液滴である、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
請求項８に記載の方法であって、前記の作製工程が、
各液滴が第１のセットの化合物由来の化合物のサブセットを含むように、液滴中に第１のセットの一次化合物をカプセル化すること；
各液滴が第２のセットの化合物由来の一次化合物のサブセットを含むように、液滴中に第２のセットの一次化合物をカプセル化すること；および、
第１のセット由来の少なくとも１つの一次化合物を含む液滴を、第２のセット由来の少なくとも１つの一次化合物を含む液滴と融合させ、それによって、前記第１のセット由来の少なくとも１つの一次化合物および前記第２のセット由来の少なくとも１つの一次化合物を含む液滴を作製すること、を含む方法。
【請求項１０】
前記２以上のセットの一次化合物が核酸である、請求項１～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記マイクロカプセルが、前記一次化合物の各セット由来の１つの化合物を含む、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記化学反応が、核酸伸長反応である、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記マイクロカプセルが、１つ以上のマイクロ流体チャネル内の油の流れにて輸送される、請求項１～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
前記油が、フッ化炭素またはペルフルオロカーボンである、請求項１３に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、生化学系の標的コンポーネントに対し結合するかまたは標的の活性を変調させる分子の合成および同定において使用するための方法に関する。
【０００２】
本出願は、その全体が本明細書に参照により援用されている２００４年３月３１日付けのＰＣＴ出願第ＧＢ２００４／００１３５２号に対する優先権を３５．Ｕ．Ｓ．Ｃ第１２０条に基づき請求するものである。
【背景技術】

【０００３】
過去１０年にわたり、化合物ライブラリの高速大量処理スクリーニング（ＨＴＳ）が、薬学研究の基軸技術となってきた。ＨＴＳに対しては、実質的な投資が行われている。現在の推定では、生物学的スクリーニングおよび臨床前薬理学試験だけで、薬学業界の合計研究開発（Ｒ＆Ｄ）支出の最高１４％を占めている（ハンデン（Ｈａｎｄｅｎ）、２００２年夏）。ＨＴＳは、近年、運転コストを削減しスクリーニングできる標的および化合物の数を増大させる必要性に迫られて、著しく改善されてきた。従来の９６ウェル平板は現在、３８４ウェル、１５３６ウェルさらには３４５６ウェルのフォーマットにより大幅に置き換えられてきている。これは、市販の平板操作ロボット工学と組合わさって、一日あたり１００，０００回以上の検定のスクリーニングを可能にし、検定の小型化に起因して検定一回あたりのコストを著しく削減する。

【０００４】
ＨＴＳは、複数の他の開発によって補足される。組合せ化学が、ＨＴＳのための構造的に関連する多数の化合物を作り出すための潜在的な技術である。現在、組合せ合成の大部分に空間的に分解された平行合成が関与している。合成可能な化合物の数は、数百または数千に制限されるが、化合物は数ミリグラムまたは数十ミリグラム規模で合成され得、完全な特徴づけさらには精製が可能となっている。１ビーズ－１化合物ライブラリを生成するべくビーズ上での分割合成を用いて、より大きなライブラリを合成することができる。この方法は、固相合成の必要性；最終生成物の特徴づけのむずかしさ（せん断数および規模が小さいことに起因する）；１つのビーズ上の化合物は少量で１回または数回の検定にしか充分でないこと；タグ付けまたはコード化方法に依存し合成および分析の両方共を複雑にするヒット化合物の構造の同定がむずかしいこと；を含めた一連の制約条件に起因して、広く採用されるには程遠いものである。これにも関わらず、分割合成および単一ビーズ分析はなおも有望である。近年、小型化スクリーニングおよび単一ビーズ分析において飛躍的な進歩が見られた。例えば、印刷技術のお陰で、各々体積が１ｎｌの１０，８００個の化合物スポットを含むスライド上で、タンパク質結合検定を実施することが可能になっている（ハーゲンローザー（Ｈｅｒｇｅｎｒｏｔｈｅｒ）ら、２０００年）。しかしながら、コンビーケムはこれまで、限られた数のリード化合物しか生成していない。２０００年４月現在、組合せ化学の履歴をもつ１０個の化合物のみが臨床開発に入り、これらのうち3つを除く全てが、（オリゴ）ヌクレオチドまたはペプチドである（アダン（Ａｄａｎｇ）およびハームケンズ（Ｈｅｒｍｋｅｎｓ）、２００１年）。実際、ＨＴＳおよび組合せ化学の両方における過去１０年間の莫大な投資にも関わらず、毎年導入される新薬の数は、せいぜい一定数にとどまっている程度であった。

【０００５】
一組の可逆的に互換性のあるコンポーネントから動的組合せライブラリ（ＤＣＬ）を作り出すためには、動的組合せ化学（ＤＣＣ）を使用することもできるが、これまでに作り出されスクリーニングされたライブラリのサイズは、なおもかなり制限されたものである（４０，０００以下）（ラムストーム（Ｒａｍｓｔｒｏｍ）およびレーン（Ｌｅｈｎ）、２００２年）。

【０００６】
試験用の候補分子サブセットを同定するために計算によるアプローチを用いて大型化合物ベースを検索する仮想スクリーニング（（ライン（Ｌｙｎｅ）、２００２年））も同様に、ＨＴＳと統合し場合きわめて有用であり得る。しかしながら、これまでのところ、ＶＳとＨＴＳの性能を直接比較する研究はわずかしかなく、さらなる検証が必要とされている。

【０００７】
マイクロ流体技術が高速大量処理スクリーニング方法に応用されてきた。例えば特許文献１は、マルチチャンネルシステム内の試薬の流れを制御するためにマイクロ流体流に依存する組合せ合成システムについて記述している。特許文献２およびその継続出願は、多重反応を同時に実施するべく複数のチャンネルを通してテスト化合物を流すことのできる

、高速大量処理スクリーニング検定の実施用マイクロ流体テストシステムについて記述している。

【０００８】

これら全ての開発にもかかわらず、現行のスクリーニング処理量はなおも適切とは言いがたいものである。ヒトゲノム内の個々の遺伝子の数（最高３０，０００）および既存の化学を用いて理論的に達成可能な独特の化学構造の数の最近の推定値は、潜在的な治療標的全てのための構造活性空間の完全な地図を作製するのに莫大な数の検定が必要となる、ということを示唆している（バーバウム（Ｂｕｒｂａｕｍ）、１９９８年）。

【特許文献１】米国特許第６，５０８，９８８号明細書

【特許文献２】米国特許第５，９４２，０５６号明細書

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００９】

従って、非常に低いコストでわずか数フェムトリットルのみの反応体積を用いて、急速に莫大な数（≧10^{10}）の化合物を作り出すと同時にスクリーニングする能力をもつ方法があれば、新規のリード薬物を生み出す上できわめて有益であるはずである。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本発明者らは、マイクロカプセルのマイクロ流体制御という強力な技術特にマイクロ流体の電子制御ベースの技術を、本明細書で参照により援用されているグリフィス（Ｇｒｉｆｆｉｔｈ）およびタウフィーク（Ｔａｗｆｉｋ）（１９９８年）で記載された区画化されたマイクロカプセルシステムに対して応用できるということを発見した。その結果が、迅速かつ効率良く莫大な数量の化合物を作り出しスクリーニングする能力をもつ新規の方法である。

【００１１】

かくして、本発明は第１の態様において、

（ａ）　２つ以上の一次化合物セットをマイクロカプセルに区画化し、かくしてマイクロカプセルの一定割合がセットの各々を代表する１つ以上の化合物の多重コピーを含むようになっており、前記１つ以上の化合物が一次化合物セットのサブセットを代表する工程；および

（ｂ）　異なるセットからの一次化合物間の化学反応により前記マイクロカプセル内で二次化合物を形成する工程、

を含み、工程（ａ）および（ｂ）の一方または両方が液体種のマイクロ流体制御下で実施される化合物レパートリを調製するための方法を提供している。

【００１２】

１つの化合物は、それが１セットの一成員である場合に、そのセットを「代表する」ものである。従って有利には、各々のマイクロカプセルは各セットからの化合物を含んでいる。１マイクロカプセルは各セットからの２つ以上の異なる化合物を含み得るが、前記セットの一定割合、つまり１サブセットのみを含む。１セットのサブセットには、有利には、セットの成員の１０％以下を代表する。好ましくは、この数字は９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％またはそれ未満である。

【００１３】

最も有利には、マイクロカプセルは、各一次化合物セットから単一の化合物のみを含んでいる。

【００１４】

本発明の方法において使用される一次化合物セットは、任意の数の異なる化合物で構成され得る。少なくとも第１のセットは２つ以上の化合物を含むが、他のセットは単一の化合物であってよい。好ましくは、第１のセットが単一の化合物である場合、少なくとも１つのさらなるセットが化合物レパートリを含んでいる。このレパートリが大きくなればなるほど、生成されることになる異なる二次化合物の数は多くなる。

【００１５】
好ましくは、少なくとも１つの化合物セットは、異なる化合物の１レパートリを含む。しかしながら少なくとも１つのセットは単一の化合物で構成されていてよく、かくして、二次化合物は全て１つのセット内で使用される単一の化合物に基づいて構築されるかまたはこの単一の化合物を含有することになる。セット数が多くなればなるほど、各セットの多様性は大きくなり、生成される二次化合物の最終的多様性も大きくなる。
【００１６】
有利には、工程（ａ）で、１区画あたりの異なる化合物の数は、工程（ｂ）で二次化合物を形成する一次化合物の数と等価となる。
【００１７】
第２の態様において、本発明は、標的に結合するかまたはその活性を変調させる能力をもつ二次化合物を形成するべく一緒に反応する一次化合物を同定するための方法であって、
（ａ）　マイクロカプセルの一定割合が２つ以上の化合物を含有するように、一次化合物の２つ以上のセットをマイクロカプセルに区画化する工程；
（ｂ）　異なるセットに由来する一次化合物間の化学反応により、マイクロカプセル内で二次化合物を形成する工程；および
（ｃ）　標的に結合するかまたは標的の活性を変調させる二次化合物を形成するべく反応する一次化合物サブセットを同定する工程、
を含み、工程（ａ）および（ｂ）および（ｃ）のうちの１つ以上のものが流体種のマイクロ流体制御下で実施される方法を提供する。
【００１８】
第３の態様において、本発明は、前記標的に結合するかまたはその活性を変調させる能力が増強されている化合物を合成する方法であって、
（ａ）　本発明の第２の態様の工程（ｃ）で同定された一次化合物のサブセットをマイクロカプセルに区画化し、任意には、一次化合物の付加的セットを区画化する工程；
（ｂ）　異なるセットに由来する一次化合物間の化学反応により、マイクロカプセル内で二次化合物を形成する工程；および
（ｃ）　標的に結合するかまたは標的の活性を変調させる二次化合物を形成するべく反応する一次化合物サブセットを同定する工程、
を含み、工程（ａ）および（ｂ）および（ｃ）のうちの１つ以上のものが流体種のマイクロ流体制御下で実施される方法を提供する。
【００１９】
有利には、工程（ａ）～（ｃ）をくり返すことができるが、最初のサイクルの後、工程（ａ）は、工程（ｃ）内で同定された一次化合物サブセットをマイクロカプセルに区画化し、任意には、付加的な化合物セットを区画化する工程を含む。
【００２０】
第４の態様において、本発明は、標的に結合するかまたはその活性を変調させる個々の化合物を同定するための方法であって、
（ａ）　本発明の第２または第３の態様の工程（ｃ）において同定された一次化合物および付加的な一次化合物セットをマイクロカプセルに区画化する工程；
（ｂ）　異なるセットに由来する一次化合物間の化学反応により、マイクロカプセル内で二次化合物を形成する工程；および
（ｃ）　標的に結合するかまたは標的の活性を変調させる二次化合物を形成するべく反応する一次化合物サブセットを同定する工程、
を含み、工程（ａ）および（ｂ）および（ｃ）のうちの１つ以上のものが、流体種のマイクロ流体制御下で実施される方法を提供する。
【００２１】
二次化合物が、３つ以上の一次化合物の間の化学反応によって形成される場合、それを工程（ａ）～（ｃ）を反復的にくり返すことにより同定できるが、最初のサイクルの後、

工程（ｃ）には、本発明の第２および第３の態様の工程（ｃ）で同定された一次化合物、（本発明の第４の態様の）先行サイクルの各々の工程（ｃ）で同定された一次化合物および付加的な一次分子セットを区画化する工程が含まれる。

【００２２】

好ましくは、所望の活性は、結合活性および標的の活性の変調からなる群から選択される。有利には、標的は化合物と共にマイクロカプセルに区画化される。

【００２３】

化合物セットは、マイクロカプセルへの２つ以上の化合物の多重コピーのカプセル化を達成するべく異なるやり方で区画化され得る。

【００２４】

例えば、各化合物の水溶液の小さいアリコートを、機械的エネルギーを加えながら、油相（有利には界面活性剤および／またはその他の安定化分子を含有するもの）へと被着させ、かくして各化合物を、各々単一の種類の化合物（ただしその多重コピー）を（大部分が）含有する多数の水性マイクロカプセルへと分散させることができる。有利には、化合物は、インクジェット印刷技術（カルヴァート（Ｃａｌｖｅｒｔ）、２００１年；ド・ガンス（ｄｅ　Ｇａｎｓ）ら、２００４年）そしてより有利には圧電ドロップ・オン・デマンド（ＤＯＤ）インクジェット印刷技術を用いて生成された液滴の形で油相へと被着され得る。エマルジョンを形成する直前に一次化合物そして任意にはその他の試薬（例えば標的と標的活性を検定するための試薬）を混合するために、インクジェット印刷技術を使用することができる。有利には、多数の化合物を、組合せ式に多数の標的と混合することができる。

【００２５】

かくして、２つ以上の化合物を含む別々のエマルジョン区画を形成する工程およびエマルジョン区画を混合して乳化した化合物レパートリを形成する工程を含み、レパートリの１サブセットが任意の１マイクロカプセル内で多数のコピー内に代表されているように、上述の工程（ａ）を修正することが可能である。

【００２６】

さらに、マイクロ流体技術を用いて生産された高単分散性のマイクロカプセルに化合物ライブラリを区画化させることが可能である。例えば、各化合物のアリコートを、油の同時フロー蒸気内での液滴中断により作り出された油中水型エマルジョン内の１つ以上の水性マイクロカプセル（１．５％未満の多分散性）に区画化することができる（アンバンハウアー（Ｕｍｂａｎｈｏｗａｒ）ら、２０００年）。有利には、水性マイクロカプセルは次に、マイクロ流体チャンネル内で油の流れの中の層流により輸送される（トールセン（Ｔｈｏｒｓｅｎ）ら、２００１年）。単一の化合物を含むこれらのマイクロカプセルは、任意にはマイクロ流体工学を用いて２つ以上のより小さいマイクロカプセルへと分割可能である（（リンク（Ｌｉｎｋ）ら、２００４年；ソング（Ｓｏｎｇ）ら、２００３年）。一次化合物を含むマイクロカプセルは、その他のマイクロカプセルと融合されて（ソングら、２００３年）二次化合物を形成することができる。

【００２７】

化合物を含むマイクロカプセルは同様に、任意には、標的を含むマイクロカプセルと融合され得る。標的を含む単一のマイクロカプセルは、任意には、その後異なる化合物または異なる濃度の化合物を含むマイクロカプセルと融合できる２つ以上のより小さいマイクロカプセルへと分割され得る。有利には、標的の活性を検定するのに必要な試薬（例えば標的が酵素である場合には標的のための基質）を送達する第２のマイクロカプセル融合に先立つマイクロカプセル融合により、化合物と標的を融合させることができる。こうして、化合物には標的に結合する時間的余裕ができることになる。マイクロカプセルはマイクロ流体デバイスを用いて分析できかつ任意には選別され得る。

【００２８】

さらなる態様においては、化合物レパートリを調製する方法であって、

（ａ）　マイクロビーズ上に２つ以上の一次化合物セットを付着させる工程、

（ｂ）　マイクロカプセルの一定割合が２つ以上のマイクロビーズを含むような形でマイクロカプセルにマイクロビーズを区画化する工程、
（ｃ）　マイクロビーズから一次化合物セットのうちの少なくとも１つを放出させる工程、
（ｄ）　異なるセットに由来する一次化合物の間の化学反応によりマイクロカプセル内に二次化合物を形成させる工程、
を含み、ここで工程（ａ）、（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）のうちの１つ以上が流体種のマイクロ流体制御下で実施される方法が提供されている。

【００２９】

有利には、化合物は、ビーズから開裂可能である。３つ以上の化合物セットが使用される場合、１つを除く全てのセットは開裂可能である；好ましくは、それら全てが開裂可能である。化合物は、光化学的に開裂可能なリンカーによりマイクロビーズに付着され得る。

【００３０】

さらなる態様においては、本発明は、標的に結合するかまたはその活性を変調する能力をもつ二次化合物を形成するように共に反応する一次化合物を同定するための方法であって
（ａ）　マイクロビーズ上に２つ以上の一次化合物セットを付着させる工程、
（ｂ）　数多くのマイクロカプセルが２つ以上のマイクロビーズを含むような形で標的と共にマイクロカプセルにマイクロビーズを区画化する工程、
（ｃ）　マイクロビーズから一次化合物を放出させる工程、
（ｄ）　異なるセットに由来する一次化合物の間の化学反応によりマイクロカプセル内に二次化合物を形成させる工程、および
（ｅ）　標的に結合するかまたはその活性を変調させる二次化合物を形成するべく反応する一次化合物のサブセットを同定する工程、
を含み、ここで工程（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）および（ｅ）のうちの１つ以上が流体種のマイクロ流体制御下で実施される方法を提供している。

【００３１】

有利には、工程（ｂ）で１区画あたりのマイクロビーズのモード数は、工程（ｄ）で二次化合物を形成する一次化合物の数と等価となる。

【００３２】

さらなる一態様においては、本発明は、標的に結合するかまたはその活性を変調する増強された能力をもつ化合物を合成するための方法であって、
（ａ）　本発明の第２の態様の工程（ｅ）で同定された一次化合物のサブセットをマイクロビーズ上に付着させ、任意には一次化合物の付加的セットを付着させる工程；
（ｂ）　数多くの区画が２つ以上のマイクロビーズを含むような形で標的と共にマイクロカプセルにマイクロビーズを区画化する工程、
（ｃ）　マイクロビーズから一次化合物を放出させる工程、
（ｄ）　異なるセットに由来する一次化合物の間の化学反応によりマイクロカプセル内に二次化合物を形成させる工程、および
（ｅ）　標的に結合するかまたはその活性を変調させる二次化合物を形成するべく反応する一次化合物のサブセットを同定する工程、
を含み、ここで工程（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）および（ｅ）のうちの１つ以上が流体種のマイクロ流体制御下で実施される方法を提供している。

【００３３】

有利には、工程（ａ）～（ｅ）をくり返すことができるが、最初のサイクルの後、工程（ａ）は、工程（ｅ）で同定された一次化合物サブセットのマイクロビーズ上に付着させる工程と、任意には付加的な化合物セットを付着させる工程を含む。

【００３４】

さらなる一態様においては、本発明は、標的に結合するかまたはその活性を変調する個

々の化合物を同定するための方法であって、
（ａ）　本発明の第２または第３の態様の工程（ｅ）で同定された一次化合物および一次化合物の付加的セットをマイクロビーズ上に付着させる工程；
（ｂ）　数多くの区画が２つ以上のマイクロビーズを含むような形で標的と共にマイクロカプセルにマイクロビーズを区画化する工程、
（ｃ）　マイクロビーズから一次化合物を放出させる工程、
（ｄ）　異なるセットに由来する一次化合物の間の化学反応によりマイクロカプセル内に二次化合物を形成させる工程、および
（ｅ）　標的に結合するかまたはその活性を変調させる二次化合物を形成するべく反応する一次化合物のサブセットを同定する工程、
を含み、ここで工程（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）および（ｅ）のうちの１つ以上が流体種のマイクロ流体制御下で実施される方法を提供している。

【００３５】

二次化合物が３つ以上の一次化合物の間の化学反応によって形成されている場合には、それは、工程（ａ）～（ｅ）を反復的にくり返すことによって同定され得るが、最初のサイクルの後、工程（ａ）は、本発明の第２または第３の態様の工程（ｅ）で同定された一次化合物、（本発明の第４の態様の）先行サイクルの各々の工程（ｅ）で同定された一次化合物および付加的な一次分子セットをマイクロビーズ上に付着させる工程を含む。

【００３６】

好ましくは、所望の活性は、結合活性および標的の活性の変調からなる群から選択される。標的は有利には、マイクロビーズと共にマイクロカプセルに区画化される。

【００３７】

本発明の好ましい実施形態に従うと、マイクロカプセルを全体として検出可能にする該化合物およびその誘導体の活性に従って、化合物をスクリーニングすることができる。従って、本発明は、所望の活性を有する化合物が、それを含むマイクロカプセル、および任意にはそれを担持するマイクロビーズの同定を可能にするマイクロカプセル内の変化またはそのマイクロカプセル内部の１つ以上の分子の修飾を誘発する方法を提供している。従ってこの実施形態においては、マイクロカプセルは（ａ）例えばマイクロカプセル上に電荷を加えることおよび電場を用いてマイクロカプセルを「操縦」することによって、中に含まれる化合物の活性に従って互いに物理的に選別され、選別されたマイクロカプセルの中味は、それが含む化合物の同一性を判定するべく分析されるか、または（ｂ）マイクロカプセルが含む化合物の同一性を判定するべく選別せずに直接分析される。

【００３８】

本発明の好ましい実施に従うと、化合物のスクリーニングは、例えば、以下のように実施可能である。

【００３９】

（Ｉ）　第１の実施形態においては、マイクロカプセルは、マイクロカプセルを全体として検出可能にする化合物またはその誘導体の活性に従ってスクリーニングされる。従って、本発明は、所望の活性をもつ化合物が、その化合物およびそれを担持するマイクロビーズを含むマイクロカプセルの同定を可能にするマイクロカプセル内の変化またはマイクロカプセル内部の１つ以上の分子の修飾を誘発している方法を提供している。従って、この実施形態では、マイクロカプセルは、（ａ）中に含まれている化合物の活性に従って互いに物理的に選別され、選別されたマイクロカプセルの中味が任意に１つ以上の共通区画内にプールされ、マイクロカプセルの中味が、化合物の同一性を判定するべく分析されるか；または（ｂ）マイクロカプセルに入っている化合物の同一性を判定するべく選別なしで直接分析されるかのいずれかである。マイクロカプセルがマイクロビーズを含有する場合、マイクロビーズを分析してそれらをコーティングしている化合物を判定することができる。

【００４０】

（ＩＩ）　第２の実施形態においては、１つ以上の共通区画内へのマイクロカプセルの

プールの後、マイクロビーズが分析される。この実施形態においては、所望の活性を有する化合物が、後続する工程でそれを同定できるようにする形で、それを担持していた（そして同じマイクロカプセル内に常在している）マイクロビーズを修飾する。反応は停止され、マイクロカプセルはこのとき、個々のマイクロカプセルの全ての中味がプールされるような形で破壊される。修飾されたマイクロビーズは同定され、（ａ）マイクロビーズ上にコーティングされた化合物の活性に従って物理的に選別され、選別されたマイクロビーズはそれらをコーティングしている（した）化合物の同一性を判定するために分析されるかまたは；（ｂ）マイクロビーズをコーティングしている（した）化合物の同一性を判定するべく選別なしで直接分析されるかのいずれかである。当然のことながら、マイクロビーズの修飾は、それが化合物の直接的作用によってひき起こされるという点で直接的なものであってもよいし、または、所望の活性をもつ化合物が関与するものを１つ以上含めた一連の反応がマイクロビーズの修飾を導く間接的なものであってもよいことを理解すべきである。有利には、標的はマイクロビーズに結合され、リガンドであり、マイクロカプセル内部の化合物は直接的または間接的に前記リガンドに結合してマイクロビーズの単離を可能にする。もう１つの構成においては、標的のための基質がマイクロビーズに結合され、マイクロカプセル内部の化合物の活性は結果として、前記基質を、マイクロビーズの一部であり続けその単離を可能にする１つの生成物へと直接的または間接的に転換することになる。代替的には、化合物の活性は、前記基質の生成物への転換を防止または阻害し得る。その上、マイクロカプセル内部の化合物の活性の生成物は結果として、その後マイクロビーズと複合体化しその同定を可能にする１つの生成物の生成を直接的または間接的にもたらすことができる。

【００４１】

（ＩＩＩ） 第３の実施形態においては、マイクロビーズは、１つ以上の共通区画内にマイクロカプセルをプールした後に分析される。この実施形態では、所望の活性を有する化合物は、化合物およびそれを担持するマイクロビーズを含むマイクロカプセル内の変化を誘発する。この変化は、検出された時点で、区画内のマイクロビーズの修飾を起こす。反応は停止され、その後マイクロカプセルは、個々のマイクロカプセルの全ての中味がプールされるように破壊される。修飾されたマイクロビーズは同定され、（ａ）マイクロビーズ上にコーティングされた化合物の活性に従って物理的に選別され、選別されたマイクロビーズはそれらをコーティングしている／した化合物の同一性を判定するために分析されるかまたは；（ｂ）マイクロビーズをコーティングしている／した化合物の同一性を判定するべく選別なしで直接分析されるかのいずれかである。

【００４２】

マイクロカプセルまたはマイクロビーズは、その光学特性および／または電荷特性を変えるべく化合物の作用により修飾され得る。例えば、マイクロビーズの修飾により、マイクロビーズをマイクロカプセルの外部でさらに修飾してその光学特性および／または電荷特性の変化を誘発することが可能となり得る。

【００４３】

もう１つの実施形態においては、マイクロカプセルまたはマイクロビーズの光学および／または電荷特性の変化は、それぞれに標的に対する、独特の光学および／または電荷特性をもつ化合物の結合に起因するものである。

【００４４】

その上、マイクロカプセルまたはマイクロビーズの光学および／または電荷特性の変化は、それぞれに化合物による、独特の光学および／または電荷特性をもつ標的の結合に起因するものであり得る。

【００４５】

マイクロカプセルの光学および／または電荷特性の変化は、化合物による標的の活性の変調に起因するものであり得る。化合物は標的の活性を活性化または阻害し得る。例えば、標的が酵素である場合、標的を触媒とする反応の生成物および基質は、異なる光学および／または電荷特性を有する可能性がある。有利には、基質および生成物は異なる蛍光特

性を有する。マイクロカプセルがマイクロビーズを含有する場合には、基質および生成物の両方共が類似の光学および／または電荷特性を有し得るが、基質ではなく反応の生成物のみがマイクロビーズに結合するかまたはこれと反応し、かくしてマイクロビーズの光学および／または電荷特性を変化させる。

【００４６】

マイクロカプセルまたはマイクロビーズの光学および／または電荷特性の変化は同様に、標的と選択中の反応の生成物の異なる光学および／または電荷特性に起因する可能性もある。標的および生成物の両方が類似の光学および／または電荷特性を有する場合、標的ではなく反応の生成物のみが選択され、マイクロビーズに結合するかこれと反応し、かくしてマイクロカプセルまたはマイクロビーズの光学および／または電荷特性を変化させる。

【００４７】

さらなる構成においては、さらなる試薬が、マイクロカプセルまたはマイクロビーズに付着されたまたはその中に入っている生成物（基質ではなく）に特異的に結合するかまたは特異的にそれと反応し、かくしてマイクロカプセルまたはマイクロビーズの光学および／または電荷特性を変化させる。

【００４８】

有利には、化合物の活性により直接的または間接的に修飾されたマイクロビーズはさらに、チラミドシグナル増幅（ＴＳＡ（商標）；ＭＥＮ）によってさらに修飾され、その結果前記マイクロカプセルまたはマイクロビーズの光学特性の変化を直接的または間接的にもたらし、かくしてそれらの分離を可能にする。

【００４９】

区画内の検出された変化は、化合物の直接的作用かまたは、所望の活性を有する化合物が関与するものを１つ以上含めた一連の反応が検出された変化を導く間接的作用によって、ひき起こされる可能性があることを理解すべきである。

【００５０】

化合物がビーズに付着される場合、化合物をマイクロビーズにコーティングする密度は、マイクロカプセルのサイズと組合わされてマイクロカプセル内の化合物の濃度を決定することになる。高い化合物コーティング密度および小さいマイクロカプセルが両方共、標的に対する親和力の低い分子の選択にとって有利であり得るさらに高い化合物濃度を提供する。喚言すると、低い化合物コーティング密度および大きいマイクロカプセルは両方共、標的に対する親和力の高い分子の選択にとって有利であり得るより低い化合物濃度を提供する。

【００５１】

好ましくは、マイクロカプセル化は、エマルジョンを形成することによって達成される。

【００５２】

マイクロビーズは、非磁性、磁性または常磁性であり得る。

【００５３】

化合物のレパートリは、異なる要領でマイクロカプセル内の単一の化合物の多重コピーを有するようにカプセル化され得る。例えば、所望の化合物を含むタンク内に、マイクロ流体デバイスに接続された薄い管を浸漬させることができ、タンクからマイクロ流体デバイス内に所望の化合物をひき込むように毛管作用を用いることができる。この方法は、デバイスの外部で調製された化合物をマイクロ流体デバイスに装填できるようにする。

【００５４】

さらに、マイクロ流体技術を用いて生産された高単分散性のマイクロカプセルに化合物ライブラリを区画化させることが可能である。例えば、各化合物のアリコートを、油の同時フロー蒸気内での液滴中断により作り出された油中水型エマルジョン内の１つ以上の水性マイクロカプセル（１．５％未満の多分散性）に区画化することができる（アンバンハウアー（Ｕｍｂａｎｈｏｗａｒ）ら、２０００年）。有利には、水性マイクロカプセルは

次に、マイクロ流体チャンネル内で油の流れの中の層流により輸送される（トールセンら、２００１年）。単一の化合物を含むこれらのマイクロカプセルは、任意にはマイクロ流体工学を用いて２つ以上のより小さいマイクロカプセルへと分割可能である（（リンク（Ｌｉｎｋ）ら、２００４年；ソング（Ｓｏｎｇ）ら、２００３年）。単一の化合物を含むマイクロカプセルは、標的を含むその他のマイクロカプセル（ソングら、２００３年）と融合され得る。標的を含む単一のマイクロカプセルは任意には、２つ以上のより小さいマイクロカプセルへと分割され得、これらの小さいマイクロカプセルはその後、異なる化合物または異なる濃度の化合物を含むマイクロカプセルと融合可能である。有利には、標的の活性を検定するのに必要なもの（例えば、標的が酵素である場合その標的のための基質）を送達する第２のマイクロカプセル融合に先立つ、マイクロカプセル融合により化合物と標的を混合させることができる。こうして化合物には標的に結合する時間的余裕ができることになる。マイクロカプセルはマイクロ流体デバイスを用いて分析でき、かつ任意には選別され得る（フー（Ｆｕ）ら、２００２年）。

【００５５】

流体種の制御および操作方法は同様に、例えば、各々本明細書に参照により援用されている（リンクらにより２００３年８月２７日付けで出願された米国仮特許出願第６０／４９８，０９１号明細書；ストーン（Ｓｔｏｎｅ）らにより２００２年６月２８日付けで出願された米国仮特許出願第６０／３９２，１９５号明細書；リンクらにより２００２年１１月５日付けで出願された米国仮特許出願第６０／４２４，０４２号明細書；１９９６年４月３０日付けでクマール（Ｋｕｍａｒ）らに対して発行された米国特許第５，５１２，１３１号明細書；ホワイトサイド（Ｗｈｉｔｅｓｉｄｅｓ）らにより１９９６年６月２６日付けで公開された国際公開第９６／２９６２９号パンフレット；キム（Ｋｉｍ）らに対して２００２年３月１２日付けで発行された米国特許第６，３５５，１９８号明細書；アンダーソン（Ａｎｄｅｒｓｏｎ）らにより２００１年５月２５日付けで出願され、２００１年１１月２９日付けで国際公開第０１／８９７８７号パンフレットとして公開された国際特許出願番号第ＰＣＴ／ＵＳＯｌ／１６９７３号明細書；ストーンらにより２００３年６月３０付けで出願され、２００４年１月８日付けで国際公開第２００４／００２６２７号として公開された国際特許出願番号第ＰＣＴ／ＵＳ０３／２０５４２号明細書；リンクらにより２００４年４月９日付けで出願された国際特許出願番号第ＰＣＴ／ＵＳ２００４／０１０９０３号明細書；およびリンクらにより２００３年４月１０日付けで出願された米国仮特許出願第６０／４６１，９５４号明細書；）の中で記述されている。

【００５６】

本発明のさまざまな態様では、本明細書で開示されている流体システムは、液滴形成システム、液滴融合システム、液滴分割システム、検知システム、コントローラおよび／または液滴選別および／または分離システムまたはこれらのシステムの任意の組合せを含み得る。かかるシステムおよび方法は、特定の利用分野に応じて任意の適切な順序に位置づけされていてよく、一部のケースでは、既定のタイプの多数のシステム、例えば２つ以上の液体形成システム、２つ以上の液滴分離システムなどを使用することができる。配置の例として、本発明のシステムを、液滴を形成するよう、流体を希釈するよう、液滴内部の種の濃度を制御するよう、種またはエンティティの所望の濃度を有するもの（例えば反応物質の１分子を各々含有する液滴）を選択するべく液滴を選別するよう、個々の液滴を融合させて個々の液滴中に含まれた種の間の反応をひき起こすよう、１つ以上の液滴内の反応および／または反応の速度を判定するように配置することが可能である。本発明に従って、その他の数多くの配置を実践することが可能である。

【００５７】

本発明の一態様は、第２の液体[2]に取り囲まれた第１の液体の液滴を生産するためのシステムおよび方法に関する。第１および第２の液体は基本的に数多くのケースで非混和性すなわち問題のタイムスケール（例えば、流体液滴を特定のシステムおよびデバイスを通して輸送するのにかかる時間）で非混和性であり得る。一部のケースでは、該液滴は、以下で詳述するように、各々実質的に同じ形状またはサイズであり得る。第１の液体は同様

にその他の種、例えばある種の分子種（例えば以下でさらに論述する通り）、細胞、粒子なども含有し得る。

【００５８】

１組の実施形態においては、第２の液体により取り囲まれた第１の液体上に電荷を作り出すことができ、これは第２の液体内部で第１の液体を個々の液滴へと分離させる可能性がある。一部の実施形態では、第２の液体との関係における第１の液体の動きを制限することによって、第１の液体および第２の液体は１本のチャンネル内、例えばマイクロ流体チャンネル内または第１の液体に対する電場（「ＡＣ」つまり交流、「ＤＣ」つまり直流などでありうる）の印加を容易にするその他の狭窄空間内に存在し得る。かくして第１の液体は、第２の液体内で一連の個別に荷電されたおよび／または電気的に誘発可能な液滴として存在することができる。一実施形態においては、流体液滴に対して及ぼされる電気力は、第２の液体内で液滴を移動させるのに充分大きいものであり得る。一部のケースでは、流体液滴に対して及ぼされる電気力を用いて、第２の液体内の液滴の所望の運動をチャンネルまたはマイクロ流体チャンネルへまたはその内部で導くこともできる。

【００５９】

適切なあらゆる技術を用い、例えば（ＡＣ、ＤＣなどであり得る）電場内部に第１の液体を置くことおよび／または第１の液体に１つの電荷をもたせるようにする反応例えば化学反応、イオン反応、光触媒反応などの反応を発生させることによって、第２の液体内部で第１の液体内に電荷を作り出すことが可能である。一実施形態においては、第１の液体は、導電体である。本明細書で使用する「導体」というのは、少なくとも約１８メガオーム（ＭＯｈｍまたはＭΩ）水の伝導率を有する材料である。第１の液体を取り囲む第２の液体は、第１の液体のものよりも小さい伝導率を有していてよい。例えば、第２の液体は、第１の液体に対し絶縁体であるかまたは少なくとも「漏洩しやすい絶縁体」であり得る、すなわち第２の液体は、少なくとも短かい時限、第１の液体を少なくとも部分的に電気的に絶縁することができる。当業者であれば、流体の伝導率を同定することができるだろう。１つの限定的意味のない実施形態においては、第１の液体は、実質的に親水性であり得、第１の液体を取り囲む第２の液体は実質的に疎水性であり得る。別の実施形態では、マイクロカプセルまたはマイクロビーズは、その蛍光の変化を検出することによって分析される。例えば、マイクロビーズは、フローサイトメトリーによって分析され得、任意には蛍光活性化細胞選別装置（ＦＡＣＳ）またはマイクロ流体流選別デバイスを用いて選別され得る。標的および生成物の異なる蛍光特性は、蛍光共鳴エネルギー転移（ＦＲＥＴ）に起因する可能性がある。

【００６０】

さらなる実施形態においては、マイクロカプセルの内部環境はエマルジョンの連続相に対する１つ以上の試薬の添加によって修飾可能である。こうして試薬は、必要とあらば反応中にマイクロカプセル内へと拡散され得ることになる。

【００６１】

本発明はその上、一次化合物の反応により生産された二次化合物を単離させる工程をさらに含みかつ任意には１つ以上の二次化合物を製造する工程をさらに含む、前述の態様に従った方法にも関する。

【００６２】

本発明は同様に、本発明に従って同定された場合、１つの生成物を提供する。この状況下で使用される「生成物」というのは、本発明に従って選択可能であるあらゆる化合物を意味し得る。

【００６３】

本発明のさらなる実施形態は、以下の詳細な説明および添付の特許請求の範囲の中で記述されている。

【発明を実施するための最良の形態】

【００６４】

定義

「マイクロカプセル」という用語は、本明細書では、当該技術分野において通常割当てられ以下で詳述される意味に従って使用されている。しかしながら基本的には、マイクロカプセルというのは、所望の活性を有する分子の同定を可能にする、本明細書で記述されている分子機序のコンポーネントの交換を制限する画定境界線をもつ人工的区画である。画定環境線は好ましくは、該マイクロカプセルの中味を完全に封じ込めている。好ましくは、本発明の方法において使用されるマイクロカプセルは、極めて大量に生産され、かくして化合物ライブラリを区画化する能力をもつことになる。任意には、化合物はマイクロビーズに付着され得る。本明細書で用いられるマイクロカプセルは、本発明の方法の高速処理能力を容易にするべく、カプセル上で行われる混合および選別を可能にする。本発明に従ったマイクロカプセルは、異なる流体の中の１つの流体の液滴であり得、ここで閉込められたコンポーネントは液滴内で可溶であるが担体流体中では可溶でなく、もう１つの実施形態においては、膜（例えば脂質小胞およびリポソームに関連する場合）または非イオン界面活性剤小胞といったような壁を構成するもう１つの材料または、剛性の非透過性膜または半透過性膜を伴うものが存在する。固体表面、マルチウェル平板およびマイクロ流体システム内の「プラグ」上の液滴すなわち本明細書で定義されている通りの第２の流体によって完全に取り囲まれていない流体液滴のアレイは、本明細書で定義づけされる通りのマイクロカプセルではない。

【００６５】

２つ以上の化合物または２つ以上のマイクロビーズを含むものとして定義づけされるマイクロカプセルの「一定割合」というのは、前記マイクロカプセルの全てをも含めた、問題のマイクロカプセルの任意の画分である。有利には、それは、その少なくとも２５％、好ましくは５０％、より好ましくは６０％、７０％、８０％、９０％または９５％である。

【００６６】

「マイクロビーズ」という用語は、ここでは、当該技術分野で通常それに割当てられる意味および以下でさらに詳述される意味に従って使用されている。マイクロビーズは当業者にマイクロスフェア、ラテックス粒子、ビーズまたはミニビーズとしても知られており、２０ｎｍ～１ｍｍの直径で入手可能であり、シリカおよびさまざまな重合体、共重合体および３元重合体を含めたさまざまな材料から作ることができる。数多くの供給源（例えば、シグマ（Ｓｉｇｍａ）、バングス・ラボラトリーズ（Ｂａｎｇｓ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）、ルミネックス（Ｌｕｍｉｎｅｘ）およびモレキュラー・プローブス（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ））（フォルヌセック（Ｆｏｒｎｕｓｅｋ）およびヴェトヴィツカ（Ｖｅｔｖｉｃｋａ）、１９８６年）から、高均質性の誘導体化および非誘導体化非磁性および常磁性微小粒子（ビーズ）が市販されている。

【００６７】

マイクロビーズは、マイクロカプセル内への分布により本発明に従って「区画化」され得る。例えば、好ましい一態様においては、マイクロビーズは水／油混合物内に入れられ乳化されて、本発明に従ったマイクロカプセルを含む油中水型エマルジョン形成することができる。マイクロビーズの濃度は、各マイクロカプセル内に平均して現われるマイクロビーズの数を制御するように調整可能である。有利には、マイクロビーズの濃度は、平均してマイクロカプセルのわずか１０～２０％の中にしか単一のマイクロビーズが出現しないような形で調整され、かくして２つ以上のマイクロビーズを伴うマイクロカプセルがきわめてわずかであることを保証することが可能である。

【００６８】

「化合物」という用語は、ここでは当該技術分野において通常それに割当てられている意味に従って使用される。化合物という用語は、その広い意味すなわち分子および超分子複合体を含めた、固定された割合で２つ以上の要素を含む物質として使用されている。この定義には、大部分の調合薬を構成する小分子（標準的に５００ダルトン未満）が含まれる。しかしながら、該定義には又重合体、例えばポリペプチド、核酸および炭水化物を含めたさらに大きい分子およびその超モル複合体（ｓｕｐｅｒｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｃｏｍ

ｐｌｅｘｅｓ）も含まれる。

【００６９】

「一次化合物」という用語は、ここでは、マイクロカプセルに区画化されているかまたはビーズにカップリングされている化合物を指すのに用いられている。

【００７０】

「二次化合物」という用語は、ここでは、任意にはマイクロビーズからの一次化合物のうちの少なくとも１つの放出の後に、マイクロカプセル内で２つ以上の一次化合物間の反応によって形成される化合物を指すのに用いられている。有利には、全ての一次分子はマイクロビーズから放出される。二次化合物は、一次化合物の間の共有結合または非共有結合反応の結果であり得る。

【００７１】

「骨組」という用語は、ここでは、当該技術分野において通常これに割当てられている意味に従って使用される。すなわち、組合せライブラリの全ての成員に共通の分子のコア部分である（マクリーン（Ｍａｃｌｅａｎ）ら、１９９９年）。二次化合物は任意には骨組を含み得る。

【００７２】

化合物の「レパートリ」というのは、化合物ライブラリとも呼ぶことのできるさまざまな化合物の一群である。化合物レパートリは、組合せ化学、化合物進化を含めた当該技術分野において既知のあらゆる手段によって生成可能であり、そうでなければ、シグマ・アルドリッチ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）、ディスカバリー・パートナーズ・インターナショナル（Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｐａｒｔｎｅｒｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）、メイブリッジ（Ｍａｙｂｒｉｄｇｅ）およびトリポス（Ｔｒｉｐｏｓ）といった市販の供給源から購入可能である。１レパートリには有利には、構造的または機能的に関係あるまたは無関係の少なくとも10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}個以上の異なる化合物を含む。

【００７３】

化合物「セット」は、単一の化合物種を含む、化合物レパートリまたはその任意の部分であり得る。本発明は、共に反応させられる２つ以上の化合物セットの使用を考慮している。セットは、単一のレパートリまたは複数の異なるレパートリから誘導され得る。

【００７４】

化合物は、マイクロビーズに対する該化合物の付着をもたらすリンカーの開裂によってマイクロビーズから「放出され」得る。マイクロビーズからの化合物の放出によって、該化合物はマイクロカプセルのその他の中味とより自由に相互作用しその中での反応に関与しかつ任意にはその他の試薬と組合わさった状態となって新しい化合物、複合体、分子または超分子複合体を形成することができる。リンカーの開裂は、任意の手段によって、例えばマイクロカプセルが好まれることなく、それからもたらされ得る光化学開裂といった手段を用いて実施可能である。光化学開裂可能なリンカーは当該技術分野において既知であり（例えば（ゴードン（Ｇｏｒｄｏｎ）およびバラスブラマニアン（Ｂａｌａｓｕｂｒａｍａｎｉａｎ）、１９９９年参照）、以下でさらに記述されている。

【００７５】

本明細書で使用される「標的」というのは、任意の化合物、分子および超分子複合体である。標準的な標的には、レセプタ例えばＧタンパク質カップリング型レセプタおよびホルモンレセプタといったような薬物標的を含めた医学的意義のある標的；シグナリング経路に関与する転写因子、タンパク質キナーゼおよびホスファターゼ；細胞壁コンポーネント、レプリカーゼおよびその他の酵素といったような微生物に特異的な遺伝子産物；食品業界で用いられている酵素、研究または生産目的で意図された試薬などといったような工業的に関連性ある標的が含まれる。

【００７６】

標的の活性の変調に関して本明細書で言及されている「活性」というのは、本明細書で検定される通り１つ以上の化合物によって直接的または間接的に変調可能である、標的の

任意の活性または該標的により影響される分子の活性の変調である。標的の活性は、結合活性、酵素活性、第３の酵素またはその他の分子に対する活性化または阻害活性、疾病をひき起こすまたは代謝またはその他の機能に影響を及ぼす能力などを含めた、任意の測定可能な生物学的または化学的活性であり得る。本明細書で言及されている活性化および阻害というのは、所望の活性の１．５、２、３、４、５、１０、１００倍以上の増加または減少を意味する。変調が不活性化である場合、不活性化は実質的に完全な不活性化であり得る。所望の活性はさらに、純粋に、結合された標的の活性の変調が関与してもしなくてもよい１つの結合活性でもあり得る。

【００７７】

本明細書で「低分子量」または「小分子」として定義されている化合物は、薬学技術において「小分子」として一般に言及されている分子である。かかる化合物はポリペプチドおよびその他の大きい分子複合体より小さく、患者およびその他の対象に対し容易に投与されこれらにより同化され得る。小分子薬物は有利にも、経口投与または筋肉注射用に処方可能である。例えば、小分子は、最高２０００ダルトン、好ましくは最高１０００ダルトン、有利には２５０～７５０ダルトンそしてより好ましくは５００ダルトン未満の分子量を有し得る。

【００７８】

「選択可能な変化」というのは、それをひき起こす化合物を同定または単離するべく測定しかつ作用を及ぼすことのできるあらゆる変化のことである。選択は、マイクロカプセル、マイクロビーズまたは化合物自体のレベルで、任意にはもう１つの試薬と複合体化された時点で行なわれる。特に有利な実施形態は、選択可能な変化が、所望の変化を示しているマイクロカプセルまたはマイクロビーズを分離するべくＦＡＣＳデバイス内などで検出し作用を及ぼすことのできる光学特性の変化である、光学的検出である。

【００７９】

本明細書で使用されているように、「光学特性の変化」は、吸収度、発光、リン光または蛍光の変化を含めた電磁放射線の吸収または発出のあらゆる変化を意味する。このような特性は全て、「光学的」という用語に含まれる。マイクロカプセルまたはマイクロビーズは例えば発光、蛍光またはリン光活性化選別により同定され、任意には選別され得る。好ましい実施形態においては、マイクロカプセルまたはマイクロビーズを同定しかつ任意には選別するためにフローサイトメトリーが利用される。分析のためそして選別を誘発するために、光散乱（ケルカー（Ｋｅｒｋｅｒ）、１９８３年）および蛍光分極（ローランド（Ｒｏｌｌａｎｄ）ら、１９８５年）を含めた、さまざまな光学特性を使用することができる。きわめて好ましい一実施形態では、マイクロカプセルまたはマイクロビーズは、蛍光活性化細胞選別装置（ＦＡＣＳ）（ノーマン（Ｎｏｒｍａｎ）、１９８０年；マッケンジー（Ｍａｃｋｅｎｚｉｅ）およびピンダー（Ｐｉｎｄｅｒ））を用いて分析され、任意には選別される。

【００８０】

マイクロカプセル内またはビーズ上の化合物は、質量分析法、化学的タグ付けまたは光学的タグ付けを含めた、当業者が精通しているさまざまな技術を用いて同定可能である。

【００８１】

本明細書で使用される「または」という用語は、「包含的にまたは」、すなわち、多くの要素の２つ以上または要素のリストの２つ以上を含めた少なくとも１つの包含を意味するものとして理解されるべきである。これとは対照的に、「排他的にまたは」という用語は、多くの要素の正確に１つの要素または要素のリストのうちの正確に１つの要素の包含を意味する。

【００８２】

本明細書および特許請求の範囲内で使用されている「ａ」および「ａｎ」という不定冠詞は、「少なくとも１つ」を意味するものとして理解すべきである。

【００８３】

数値的パラメータ（例えば物理的、化学的、電気的または生物学的特性）に関連して本

明細書で使用されている「約」という用語は、当業者には、１つの数値の近似であり、その正確な値はその数値パラメータの測定誤差の結果としてのものといったような誤差、数値パラメータの可変性および／または再現性（例えば別の実験における）の結果としての不正確さなどの対象となり得るものとして理解されることになる。

【００８４】

本明細書で使用される「細胞」という用語には、生物学において用いられる通りのその通常の意味が付与される。「細胞」はあらゆる細胞または細胞型であってよい。例えば、細胞は細菌またはその他の単細胞生物、植物細胞または動物細胞であり得る。細胞が単細胞生体である場合には、該細胞は例えば原生動物、トリパノソーマ、アメーバ、酵母細胞、藻類などであり得る。細胞が動物細胞である場合、その細胞は例えば、無脊椎動物細胞（例えばショウジョウバエ由来の細胞）、魚類細胞（例えばゼブラダニオの細胞）、両生類細胞（例えばカエル細胞）、は虫類細胞、鳥類細胞または哺乳動物細胞例えば霊長類細胞、ウシ細胞、ウマ細胞、ブタ細胞、ヤギ細胞、イヌ細胞、ネコ細胞またはラットまたはマウスといったゲッ歯類由来の細胞であり得る。細胞が多細胞生体由来のものである場合、該細胞は生体のいずれの部分に由来するものであり得る。例えば、細胞が動物由来である場合、該細胞は、心臓細胞、繊維芽細胞、角化細胞、肝細胞、軟骨細胞、神経系細胞、骨細胞、筋細胞、血液細胞、内皮細胞、免疫細胞（例えばＴ細胞、Ｂ細胞、マクロファージ、好中球、好塩基球、肥満細胞、好酸球）、基幹細胞などであり得る。一部のケースでは、細胞は、遺伝子工学処理された細胞であり得る。一部の実施形態では、細胞は、チャイニーズハムスタ卵巣（「ＣＨＯ」）細胞または３Ｔ３細胞であり得る

【００８５】

本明細書で使用されている「マイクロ流体の」という用語は、１ｍｍ未満の断面積および少なくとも３：１という長さ対最大断面寸法比を有する少なくとも１つの流体チャンネルを含むデバイス、器具またはシステムを意味する。本明細書で使用する「マイクロ流体チャンネル」というのは、これらの基準を満たすチャンネルである。

【００８６】

従って、本明細書で記載される（システム／方法の）「マイクロ流体制御」という用語は、１ｍｍ未満の断面寸法および少なくとも３：１という長さ対最大断面寸法の比をもつ少なくとも１つの流体チャンネルを含むデバイスまたは器具の使用を含む方法／システムを意味する。

【００８７】

本明細書で言及されている（システム／方法の）電子マイクロ流体制御という用語は、本方法／システムの１つ以上の工程に、マイクロ流体式方法／システムで用いられるマイクロカプセルの少なくとも一定割合の上での電荷の生成が関与している、マイクロ流体式方法／システムを意味する。

［マイクロ流体工学などのこれらの定義は２つのファイリング間でやや異なっている。一貫性をもたせるべきか？］

【００８８】

チャンネルの「断面寸法」は、流体流の方向に対し垂直に測定される。本発明のコンポーネント内の大部分の流体チャンネルは２ｍｍ未満、一部のケースでは、１ｍｍ未満の最大断面寸法を有する。１組の実施形態においては、本発明の実施形態を含む全ての流体チャンネルは、マイクロ流体チャンネルであるかまたは２ｍｍまたは１ｍｍ以下の最大断面寸法を有する。もう１つの実施形態においては、流体チャンネルは、一部分、単一のコンポーネント（例えばエッチングされた基板または成形ユニット）で形成されていてよい。当然のことながら、流体をバルクで貯蔵し、本発明のコンポーネントに流体を送達するためには、より大きなチャンネル、管、チャンバ、タンクなどを使用することができる。１組の実施形態においては、本発明の実施形態を含むチャンネルの最大断面寸法は５００マイクロン未満、２００マイクロン未満、１００マイクロン未満、５０マイクロン未満または２５マイクロン未満である。

【００８９】

本明細書で使用する「チャンネル」というのは、少なくとも部分的に流体の流れを方向づける製品（基質）の上または中のフィーチャ（ｆｅａｔｕｒｅ）を意味する。チャンネルは任意の断面形状（円形、卵形、三角形、異形、正方形など）を有することができ、カバーがあってもなくてもよい。完全にカバーされている実施形態においては、チャンネルの少なくとも一部分が、完全に封じ込められた断面を有している可能性があり、そうでなければ、チャンネル全体がその入口および出口を除いてその長さ全体にわたり、完全に封じ込められていてよい。チャンネルは、少なくとも２：１、より標準的には少なくとも３：１、５：１または１０：１以上のアスペクト比（平均断面寸法に対する長さ）を有することもできる。開放チャンネルは一般に、流体輸送の制御を容易にする特徴、例えば構造的特徴（細長い欠刻）および／または物理的または化学的特徴（疎水性対親水性）または流体に力（例えば含有力）を及ぼすことのできるその他の特徴を内含することになる。チャンネル内の流体は部分的または完全にチャンネルを充てんし得る。開放チャンネルが使用される一部のケースでは、流体は、例えば表面張力（すなわち凹または凸メニスカス）を用いて、該チャンネル内部に保持され得る。

【００９０】

該チャンネルは例えば約５ｍｍまたは２ｍｍ未満、または約１ｍｍ未満、または約５００マイクロン未満、約２００マイクロン未満、約１００マイクロン未満、約６０マイクロン未満、約５０マイクロン未満、約４０マイクロン未満、約３０マイクロン未満、約２５マイクロン未満、約１０マイクロン未満、約３マイクロン未満、約１マイクロン未満、約３００ｎｍ未満、約１００ｎｍ未満、約３０ｎｍ未満、または約１０ｎｍ未満の流体流に対して垂直な最大寸法を有する任意のサイズのものであり得る。一部のケースでは、チャンネルの寸法は、流体が該製品または基質を通して自由に流れることができるような形で選択され得る。チャンネルの寸法は同様に、その中の流体の一定の体積フローまたは線形フローを可能にするように選択することもできる。当然のことながら、チャンネルの数およびチャンネルの形状は、当業者にとって既知のあらゆる方法によって変動させることができる。一部のケースでは、２つ以上のチャンネルまたは毛細管を使用することができる。例えば、２本以上のチャンネルを使用することができ、この場合これらは互いに内側に位置づけされるか、互いに隣接して位置づけされるか、互いに交差するなどといったように位置づけされる。

【００９１】

本明細書で使用される「一体型（一体化した）」という語は、コンポーネントの複数の部分が、互いからコンポーネントを切断または破壊することなく互いから分離され得ないような形で接合されていることを意味する。

【００９２】

本明細書で使用する「液滴」という用語は、第２の流体により完全に取り囲まれている第１の流体の隔離された一部分である。ここで液滴は必ずしも球形でなく例えば外部環境などに応じてその他の形状をもとり得るという点に留意されたい。一実施形態においては、液滴は、それが内部にある流体流に対して垂直なチャンネルの最大寸法と実質的に等しい最小断面寸法を有する。

【００９３】

液滴集団の「平均直径」は液滴の直径の算術平均である。当業者であれば、例えばレーザー光散乱またはその他の既知の技術を用いて液滴集団の平均直径を判定することができるだろう。非球形液滴内の液滴の直径は、表面全体を横断して積分された該液滴の数学的に定義された平均直径である。限定的意味のない例として、液滴の平均直径は、約１ｍｍ未満、約５００マイクロメートル未満、約２００マイクロメートル未満、約１００マイクロメートル未満、約７５マイクロメートル未満、約５０マイクロメートル未満、約２５マイクロメートル未満、約１０マイクロメートル未満、または約５マイクロメートル未満であり得る。液滴の平均直径は同様に、一部のケースでは、少なくとも約１マイクロメートル、少なくとも約２マイクロメートル、少なくとも約３マイクロメートル、少なくとも約５マイクロメートル、少なくとも約１０マイクロメートル、少なくとも約１５マイクロメ

ートル、または一部のケースにおいて少なくとも約２０マイクロメートルでもあり得る。
【００９４】
本明細書で使用する「流体」にはその通常の意味すなわち液体または気体という意味が付与される。好ましくは、流体は液体である。流体は、流動を可能にする任意の適切な粘度を有し得る。２つ以上の流体が存在する場合、各々の流体は、流体間の関係を考慮することにより当業者によって基本的にあらゆる流体（液体、気体など）の中から独立して選択され得る。流体は各々混和性または非混和性であり得る。例えば２つの流体は、流体流の形成の時間枠内または反応または相互作用の時間枠内で非混和性であるように選択可能である。これらの部分が有意な時限中液体にとどまる場合には、流体は有意に非混和性であるべきである。接触および／または形成の後、分散された部分が重合などによって急速に硬化される場合、流体はさほど非混和性である必要はない。当業者であれば、本発明の技術を実施するべく、接触角測定などを用いて、適切な混和性または不混和性流体を選択することができる。
【００９５】
本明細書で使用されるように、第２のエンティティ（ｅｎｔｉｔｙ）のみを通って第１のエンティティの周りに閉ループを描くことができる場合、該第１のエンティティは第２のエンティティによって「取り囲まれて」いる。該第２のエンティティのみを通って進む閉ループが方向の如何に関わらず第１のエンティティの周りに描くことができる場合、第１のエンティティは「完全に取り囲まれている」。一態様では、第１のエンティティは粒子である。本発明のさらにもう１つの態様においては、エンティティは両方共流体であり得る。例えば、親水性液体が疎水性液体内で懸濁している可能性があり、疎水性液体が親水性液体中で懸濁している可能性もあり、又、気泡が液体中で懸濁しているなどの可能性もある。標準的には、疎水性液体および親水性液体は、互いに対し実質的に非混和性であり、ここで親水性液体は、疎水性液体よりも大きい水に対する親和性を有する。親水性液体の例としては、水および水を含むその他の水溶液、例えば細胞または生物学的媒質、エタノール、塩溶液などが含まれるが、これらに制限されるわけではない。疎水性液体の例には、油、例えば炭化水素、シリコン油、フッ化炭素油、有機溶媒などが含まれるが、これらに制限されるわけではない。
【００９６】
本明細書で使用される「判定（決定）する」という用語は、例えば定量的または定性的な、１つの種の分析または測定、または該種の存在および不在の検出を一般に意味する。「判定（決定）する」という用語は同様に、例えば定量的または定性的な、または該相互作用の存在または不在を検出することによる、２つ以上の種の間の相互作用の分析または測定をも意味する。技術例としては、分光学、例えば赤外光、吸光、蛍光、可視紫外光、ＦＴＩＲ（「フーリエ変換赤外分光」）、またはラマン；重量分析法；偏光解析法；圧電測定法；免疫学的検定法；電気化学測定法；光学測定、例えば光学密度測定法；円二色法；光散乱測定法、例えば、準電気（ｑｕａｓｉｅｌｅｃｔｒｉｃ）光散乱；偏光分析法；屈折計法；または濁度測定法が含まれるがこれらに制限されるわけではない。
【００９７】
一般的技術
別段の定義のないかぎり、本明細書で使用されている全ての技術的および科学的用語は、（例えば細胞培養、分子遺伝学、核酸化学、ハイブリダイゼーション技術および生化学などにおいて）当業者により一般に理解されるものと同じ意味を有する。分子、遺伝子および生化学的方法（一般に、本明細書に参照により援用されているサンブルック（Ｓａｍｂｒｏｏｋ）ら、「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ」、第２版（１９８９年）、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ．Ｙ．およびアウスベル（Ａｕｓｕｂｅｌ）ら、Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９９９年）第４版、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、Ｉｎｃ．を参照のこと）および化学的方法については、標準的方法が使用される。さ

らに、標準的な免疫学的技術のためには、ハーロウ（Ｈａｒｌｏｗ）およびレーン（Ｌａｎｅ）、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ．Ｙが参照される。

【００９８】

（Ａ） 一般的な説明

本発明のマイクロカプセルは、本発明の機能を可能にするべく適切な物理的特性を必要とする。

【００９９】

まず第１に、化合物および標的がマイクロカプセル間で拡散しないようにするためには、各々のマイクロカプセルの中味を周囲のマイクロカプセルの中味から隔離し、かくして、実験のタイムスケール全体にわたりマイクロカプセル間で化合物および標的の交換が全くまたはほとんど無いようにしなければならない。

【０１００】

第２に、本発明の方法は、マイクロカプセルあたり制限された数のビーズしか存在しないことを必要とする。化合物および標的が他のビーズから単離されるであろうことを確実にする。

【０１０１】

第３に、マイクロカプセルの形成および組成は、有利にも標的の活性を無効にする必要はがない。

【０１０２】

従って、使用されるあらゆるマイクロカプセル化システムが好ましくはこれら３つの必要条件を満たさなければならない。適切なシステムは、当業者には明らかであるように、本発明の各々の利用分野における必要条件の精確な性質に応じて、変動し得る。

【０１０３】

多種多様のマイクロカプセル手順が利用可能であり（ベニタ（Ｂｅｎｉｔａ）、１９９６年参照）、本発明に従って使用されるマイクロカプセルを作り出すのに使用できる。実際に、文献中で２００超のマイクロカプセル化方法が同定されている（フィンチ（Ｆｉｎｃｈ）、１９９３年）。

【０１０４】

これらには、脂質小胞（リポソーム）（ニュー（Ｎｅｗ）、１９９０年）および非イオン界面活性剤（ヴァンハル（ｖａｎ Ｈａｌ）ら、１９９６年）といったような膜被覆水性小胞が含まれる。これらは、各々の２重層が水性区画によりその近隣から分離されている状態で、非共有結合的に組立てられた分子の単一のまたは多数の２重層の閉鎖膜状カプセルである。リポソームの場合、膜は脂質分子で構成されている。これらは通常リン脂質であるが、コレステロールといったようなステロールも膜内に取込むことができる（ニュー、１９９０年）。ＲＮＡおよびＤＮＡ重合を含めた、さまざまな酵素触媒生化学反応を、リポソーム内部で実施することができる（チャクラバルティ（Ｃｈａｋｒａｂａｒｔｉ）ら、１９９４年；オーバーホルツァ（Ｏｂｅｒｈｏｌｚｅｒ）ら、１９９５年ａ；オーバーホルツァら、１９９５年ｂ；ヴァルデ（Ｗａｌｄｅ）ら、１９９４年；ウィック（Ｗｉｃｋ）およびルイジ（Ｌｕｉｓｉ）、１９９６年）。

【０１０５】

膜被覆された小胞システムの場合、水相の多くは小胞の外側にあり、従って、区画化されていない。反応がマイクロカプセルに制限されるように、この連続的水相を除去するかまたはその中の生体システムを阻害または破壊すべきである（ルイジら、１９８７年）。

【０１０６】

さまざまなその他の方法により生成されるマイクロカプセル内で、酵素を触媒とした生化学的方法も実証されてきた。数多くの酵素が逆ミセル溶液中（ブラウ（Ｂｒｕ）およびヴァルデ（Ｗａｌｄｅ）、１９９１年；ブラウおよびヴァルデ、１９９３年；クレイ（Ｃｒｅａｇｈ）ら、１９９３年；ハーバー（Ｈａｂｅｒ）ら、１９９３年；クマール（Ｋｕｍａｒ）ら、１９８９年；ルイジ（Ｌｕｉｓｉ）およびビー（Ｂ）、１９８７年；マオ（

Ｍａｏ）およびヴァルデ、１９９１年；マオら、１９９２年；ペレス（Ｐｅｒｅｚ）ら、１９９２年；ヴァルデら、１９９４年；ヴァルデら、１９９３年；ヴァルデら、１９８８年））、例えばＡＯＴ－イソオクタン－水システム（メンゲル（Ｍｅｎｇｅｒ）および山田、１９７９年）中で活性である。

【０１０７】

マイクロカプセルは同様に、界面重合および界面複合体化によっても生成可能である（ウェイトリィ（Ｗｈａｔｅｌｅｙ）、１９９６年）。この種のマイクロカプセルは、剛性で非透過性の膜または半透過性の膜を有することができる。硝酸セルロース膜、ポリアミド膜および脂質－ポリアミド膜により縁どりされた半透過性マイクロカプセル全てが、多酵素システムを含め、生化学反応を支援できる（チャン（Ｃｈａｎｇ）、１９８７年；チャン，１９９２年；リン（Ｌｉｍ）、１９８４年）。非常に穏やかな条件下で形成され得るアルギン酸塩／ポリリジンマイクロカプセル（リンおよびスン（Ｓｕｎ）、１９８０年）が非常に生体適合性の高いものであり、例えば生きた細胞および組織をカプセル化する有効な方法を提供することも証明されてきている（チャン、１９９２年；スンら、１９９２年）。

【０１０８】

エマルジョンといったようなコロイドシステムの中の水性環境の相分配に基づく非膜マイクロカプセル化システムも同様に使用できる。

【０１０９】

好ましくは、本発明のマイクロカプセルはエマルジョン、すなわち一方の相が微小またはコロイドサイズの液滴としてもう一方の相内に分散された状態の２つの非混和性液相の不均一システムから形成される（ベッヒャー（Ｂｅｃｈｅｒ）、１９５７年；シャーマン（Ｓｈｅｒｍａｎ）、１９６８年；リサン（Ｌｉｓｓａｎｔ）、１９７４年；リサン、１９８４年）。

【０１１０】

エマルジョンは、非混和性液体の任意の適切な組合せから生成可能である。好ましくは、本発明のエマルジョンは、細分された液滴（分散、内部または不連続相）の形で存在する相としての（生化学コンポーネントを含有する）水、およびこれらの液滴が懸濁しているマトリクス（非分散、連続または外部相）としての疎水性非混和性液（「油」）を有する。かかるエマルジョンは「油中水型」（Ｗ／Ｏ）と呼ばれる。これには、生化学コンポーネントを含有する水相全体が離散的な液滴（内部相）の中で区画化されているという利点がある。疎水性油である外部相は一般に生化学コンポーネントのいずれも含有せず、従って不活性である。

【０１１１】

エマルジョンは、１つ以上の表面活性作用物質（界面活性剤）の添加により安定化され得る。これらの界面活性剤は、乳化剤と呼ばれ、相の分離を防止するべく（または少なくとも遅延させる）水／油界面で作用する。数多くの油および数多くの乳化剤を油中水エマルジョンの生成のために使用できる。最近の資料には１６，０００を超える界面活性剤が列挙されており、その多くが乳化剤として用いられている（アッシュ（Ａｓｈ）およびアッシュ（Ａｓｈ）、１９９３年）。適切な油には、軽量白色鉱油およびデカンが含まれる。適切な界面活性剤には、非イオン性表面活性剤（シック（Ｓｃｈｉｃｋ）、１９６６年）、例えばモノオレイン酸ソルビタン（Ｓｐａｎ（商標）８０；ＩＣＩ）、モノステアリン酸ソルビタン（Ｓｐａｎ（商標）６０；ＩＣＩ）、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン（Ｔｗｅｅｎ（商標）８０；ＩＣＩ）、およびオクチルフェノキシエトキシエタノール（Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００）；イオン性表面活性剤、例えばコール酸ナトリウムおよびタウロコール酸ナトリウムおよびデオキシコール酸ナトリム；化学的に不活性なシリコーンベースの表面活性剤、例えばポリシロキサン－ポリセチル－ポリエチレングリコール共重合体（セチルジメチコンコポリオール）（例えばＡｂｉｌ（商標）ＥＭ９０；ゴールドシュミット（Ｇｏｌｄｓｃｈｍｉｄｔ））；およびコレステロールが含まれる。

【０１１２】

フッ化炭素（またはペルフルオロカーボン）連続相を伴うエマルジョン（（クラフト（Ｋｒａｆｆｔ）ら、２００３年；リース（Ｒｉｅｓｓ）、２００２年）が特に有利である。例えば、界面活性剤としてＦ－アルキルジモルホリノホスファートを用いて、安定した臭化ペルフルオロオクチル中水型およびペルフルオロオクチルエタン中水型エマルジョンを形成させることができる（サトラー（Ｓａｄｔｌｅｒ）ら、１９９６年）。非フッ素化化合物は基本的に、フッ化炭素およびペルフルオロカーボン中で不溶性であり（カラン（Ｃｕｒｒａｎ）、１９９８年；ヒルデブランド（Ｈｉｌｄｅｂｒａｎｄ）およびコクラン（Ｃｏｃｈｒａｎ）、１９４９年；ハッドリキー（Ｈｕｄｌｉｃｋｙ）、１９９２年；スコット（Ｓｃｏｔｔ）、１９４８年；スチューダー（Ｓｔｕｄｅｒ）ら、１９９７年）、小さい薬物様の分子（標準的に、＜５００ＤａおよびＬｏｇＰ＜５）（リピンスキー（Ｌｉｐｉｎｓｋｉ）ら、２００１年）が、マイクロカプセル間の交換がほとんどまたは全く無い状態で、フッ化炭素中水およびペルフルオロカーボン中水エマルジョンの水性マイクロカプセルにきわめて有効に区画化される。

【０１１３】

有利には、化合物を非水性（有機）溶媒を含むマイクロカプセルに区画化することができる。非フッ素化有機溶媒は、基本的に不溶性であり、フッ化炭素およびペルフルオロカーボンと非混和性であり（カラン（Ｃｕｒｒａｎ）、１９９８年；ヒルデブランド（Ｈｉｌｄｅｂｒａｎｄ）およびコクラン（Ｃｏｃｈｒａｎ）、１９４９年；ハッドリキー（Ｈｕｄｌｉｃｋｙ）、１９９２年；スコット（Ｓｃｏｔｔ）、１９４８年；スチューダー（Ｓｔｕｄｅｒ）ら、１９９７年）、かくして、フッ化炭素（またはペルフルオロカーボン）連続相およびジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、トルエン、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテルおよびエタノールといったような非水性溶媒から形成された不連続層でのエマルジョンの形成を可能にする。非水性溶媒を含むマイクロカプセル中で二次化合物を形成する能力は、実施可能な化学反応および中で合成できる二次化合物のレパートリを大幅に拡張する。合成有機化学の大部分が、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、トルエン、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテルおよびエタノールを含めた有機溶媒の中で行なわれる。有機分子は有機溶媒内により良く溶解する。静電相互作用は（低い誘電定数に起因して）有機溶媒内で増強され、一方それらは、水性溶媒内で溶媒和されて反応性が低くなる。例えば、現代の有機化学の大部分に、金属エノラートの使用を含めて、カルボニル化学に関係する反応が関与する。数が増大を続けているその他の有機金属相互作用についても同様である。これらの反応は往々にして、無水溶媒中の不活性雰囲気下で実施される（そうでなければ、試薬は水によりクエンチングされる）。同様に、スズキ反応およびHeck反応を含めた、パラジウム触媒を用いる多数の反応も存在する。

【０１１４】

エマルジョンを作り出すには、相を合わせて強制するために機械的エネルギーを加えることが一般に必要とされる。攪拌器（例えば磁気撹拌棒、プロペラおよびタービン撹拌器、パドルデバイスおよびホイスク）、ホモジナイザ（ロータ・スタータ・ホモジナイザ、高圧バルブ式ホモジナイザおよびジェットホモジナイザを含む）、コロイドミル、超音波および「膜乳化（ｍｅｍｂｒａｎｅ　ｅｍｕｌｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ）」デバイス（ベッヒャー、１９５７；ディキンソン（Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）、１９９４年）。

【０１１５】

複雑な生化学プロセス、特に遺伝子の転写および翻訳も同様に、油中水型エマルジョン中に形成された水性マイクロカプセルの中で活発である。これにより、エマルジョンマイクロカプセル内で転写され翻訳され、それらがコード化するタンパク質の結合または触媒活性により選択される遺伝子の選択のために、油中水型エマルジョンの区画化を用いることが可能となった（土井および柳川、１９９９年；グリフィスおよびタウフィーク、２００３年；リー（Ｌｅｅ）ら、２００２年；セップ（Ｓｅｐｐ）ら、２００２年；タウフィークおよびグリフィス、１９９８年）。これが可能となったのは、マイクロカプセル間の酵素触媒反応の生成物または核酸、タンパク質の交換がたとえあったとしてもごくわずかである状態で、エマルジョン内で形成された水性マイクロカプセルが一般に安定していた

からである。

【０１１６】

何千リットルもの工業規模に至るまでの体積でエマルジョンを作り出す技術が存在する（ベッヒャー、１９５７年；シャーマン、１９６８年；リサン、１９７４年；リサン、１９８４年）。

【０１１７】

好ましいマイクロカプセルサイズは、本発明に従って実施されるべき任意の個々のスクリーニングプロセスの精確な必要条件に応じて変動することになる。あらゆる場合において、化合物の同一性および標的活性を判定するべく、検定の感応性および化合物ライブラリのサイズの間には最適な均衡が存在することになる。

【０１１８】

エマルジョンマイクロカプセルのサイズは、単にスクリーニングシステムの必要条件に従って、エマルジョンを形成するのに用いられるエマルジョン条件を調整するだけで変動させることができる。究極的制限因子はマイクロカプセルのサイズひいては単位体積あたりに考えられるマイクロカプセル数であることから、マイクロカプセルのサイズが大きくなればなるほど、既定の化合物ライブラリをカプセル化するのに必要となる体積は大きくなる。

【０１１９】

油中水型エマルジョンは、外部（連続）水相で水中油中水２重エマルジョンを作り出すべく再乳化され得る。これらの２重エマルジョンをフローサイトメトリーを用いて分析し、任意には選別することができる（ベルナス（Ｂｅｒｎａｔｈ）ら、２００４年）。

【０１２０】

マイクロ流体技術を用いて、高い単分散性のマイクロカプセルを生産することができる。例えば、油の同時フロー蒸気内の液滴中断により、１．５％未満の多分散性をもつ油中水型エマルジョンを生成することができる（アンバンハウアーら、２０００年）。マイクロ流体システムは同様に、マイクロ流体チャンネル内の油流の中に分散した微水滴の層流のためにも使用可能である（トールセンら、２００１年）。こうして、マイクロ液滴のフロー分析そして任意にはフロー選別のためのマイクロ流体デバイスが構築できる（フーら、２００２年）。

【０１２１】

有利には、流体種の電子制御のためのシステムおよび方法を用いて、高い単分散性のマイクロカプセルを形成させることができる。本発明の一態様は、液体により取り囲まれた流体の液滴を生産するためのシステムおよび方法に関する。流体および液体は、基本的に数多くのケースにおいて非混和性、すなわち、問題のタイムスケール（例えば、流体液滴が特定のシステムまたはデバイスを通って輸送されるのにかかる時間）上で非混和性であり得る。ある種のケースでは、該液滴は、以下で詳述する通り、各々実質的に同じ形状またはサイズであり得る。流体は同様に、その他の種、例えばある種の分子種（例えば以下で詳述する通り）、細胞、粒子などをも含有し得る。

【０１２２】

１組の実施形態においては、流体を液体内部で個々の液滴へと分離させ得る、液体によって取り囲まれた流体の上に電荷を作り出すことができる。一部の実施形態においては、流体および液体は、例えば液体との関係における流体の運動を制限することにより、例えばマイクロ流体チャンネルといった１本のチャンネルの中、または流体に対する（「ＡＣ」つまり交流、「ＤＣ」つまり直流などであり得る）電場の印加を容易にするその他の狭窄された空間の中に、存在し得る。かくして、流体は、液体内で一連の個々の荷電されたかつ／または電気的に誘発可能な液滴として存在し得る。一実施形態においては、流体液滴に対し加えられる電気力は、該液滴が液体内を移動するのに充分なほど大きいものであり得る。一部のケースでは、流体液滴に加えられる電気力は、例えばチャンネルまたはマイクロ流体チャンネル（例えば以下で詳述するようなもの）などに対してまたはそれらの内部で、液体内部の液滴の所望の運動を導くために使用され得る。一例としては、図３Ａ

の器具５内では、流体供給源１０により作り出された液滴１５は、電場発生器２０により作り出された電場を用いて荷電され得る。

【０１２３】

電荷は、例えば（ＡＣ、ＤＣなどであり得る）電場内に流体を置くことおよび／または、流体に電荷をもたせる反応、例えば化学反応、イオン反応、光触媒反応などを発生させることによるものといった任意の適切な技術を用いて液体内部で流体内に作り出され得る。一実施形態では、流体は導電体である。本明細書で使用する「導電体」というのは、少なくとも１８メガオーム（ＭΩｈｍまたはＭΩ）水の伝導度をもつ材料である。流体を取り囲む液体は、流体のものよりも小さい伝導度を有し得る。例えば、液体は、流体との関係において絶縁体であるかまたは少なくとも「漏洩しやすい絶縁体」であり得る、すなわち液体は、少なくとも短時限の間流体を少なくとも部分的に電気的に絶縁することができる。当業者であれば、流体伝導度を同定することができるだろう。限定的意味のない一実施形態においては、流体は実質的に親水性であり、流体を取り囲む液体は実質的に疎水性であり得る。

【０１２４】

一部の実施形態においては、流体上（例えば一連の流体液滴上）に作り出される電荷は少なくとも約10^{-22}Ｃ／立方マイクロメートルであり得る。一部のケースでは、該電荷は少なくとも約10^{-21}Ｃ／立方マイクロメートルであり得、かつその他のケースでは、該電荷は少なくとも約10^{-20}Ｃ／立方マイクロメートル、少なくとも約10^{-19}Ｃ／立方マイクロメートル、少なくとも約10^{-18}Ｃ／立方マイクロメートル、少なくとも約10^{-17}Ｃ／立方マイクロメートル、少なくとも約10^{-16}Ｃ／立方マイクロメートル、少なくとも約10^{-15}Ｃ／立方マイクロメートル、少なくとも約10^{-14}Ｃ／立方マイクロメートル、少なくとも約10^{-13}Ｃ／立方マイクロメートル、少なくとも約10^{-12}Ｃ／立方マイクロメートル、少なくとも約10^{-11}Ｃ／立方マイクロメートル、少なくとも約10^{-10}Ｃ／立方マイクロメートル、または少なくとも約10^{-9}Ｃ／立方マイクロメートル又それ以上であり得る。一部の実施形態では、流体上に作り出された該電荷は少なくとも約10^{-21}Ｃ／平方マイクロメートルであり得、かつ一部のケースでは、該電荷は少なくとも約10^{-20}Ｃ／平方マイクロメートル、少なくとも約10^{-19}Ｃ／平方マイクロメートル、少なくとも約10^{-18}Ｃ／平方マイクロメートル、少なくとも約10^{-17}Ｃ／平方マイクロメートル、少なくとも約10^{-16}Ｃ／平方マイクロメートル、少なくとも約10^{-15}Ｃ／平方マイクロメートル、少なくとも約10^{-14}Ｃ／平方マイクロメートル、または少なくとも約10^{-13}Ｃ／平方マイクロメートル又それ以上であり得る。その他の実施形態では、該電荷は少なくとも約10^{-14}Ｃ／液滴であり得、かつ一部のケースでは、少なくとも約10^{-13}Ｃ／液滴、その他のケースでは少なくとも約10^{-12}Ｃ／液滴、その他のケースでは少なくとも約10^{-11}Ｃ／液滴、その他のケースでは少なくとも約10^{-10}Ｃ／液滴、またはさらにその他のケースでは少なくとも約10^{-9}Ｃ／液滴であって良い。

【０１２５】

一部の実施形態においては、電場は、電場発生器すなわち流体に印刷され得る電場を作り出すことのできるデバイスまたはシステムから発生される。電場発生器は、交流電場（すなわち、例えば正弦、のこぎり歯、方形など、時間との関係において周期的に変動するもの）、直流電場（すなわち時間との関係において恒常であるもの）、パルス電場などを生成することができる。電場発生器は、チャンネルまたはマイクロ流体チャンネルの内部に含まれた流体内に電場を作り出すように構築され配置され得る。電場発生器は、一部の実施形態に従ってチャンネルまたはマイクロ流体チャンネルを含む流体システムに一体化されていてもよいしまたはそれとは分離されていてもよい。本明細書で使用される「一体化した」という用語は、互いに一体化したコンポーネントの部分が、該コンポーネントの少なくとも１つを切断または破壊することなく互いから手作業で分離され得ないような形で接合されていることを意味する。

【０１２６】

適切な電場（ＡＣ、ＤＣなどであり得る）を生成するための技術は、当業者にとっては既知である。例えば、一実施形態においては、流体システム（例えばチャンネルまたはマイクロ流体チャンネルを構成する基質）上に位置づけされているかまたはその内部に埋込まれているかつ／または電場の少なくとも一部分が流体と相互作用するように流体に近接して位置づけされている可能性のある一対の電極を横断して電圧を印加することにより、電場が生成される。該電極は、銀、金、銅、炭素、白金、銅、タングステン、錫、カドミウム、ニッケル、インジウム錫酸化物（「ＩＴＯ」）など、ならびにそれらの組合せを含む（ただしこれらに制限されるわけではない）、当業者にとって既知の任意の１つ以上の電極材料から作ることができる。一部のケースでは、透明または実質的に透明の電極を用いることができる。ある実施形態においては、少なくとも約０．０１Ｖ／マイクロメートル、かつ一部のケースでは、少なくとも約０．０３Ｖ／マイクロメートル、少なくとも約０．０５Ｖ／マイクロメートル、少なくとも約０．０８Ｖ／マイクロメートル、少なくとも約０．１Ｖ／マイクロメートル、少なくとも約０．３Ｖ／マイクロメートル、少なくとも約０．５Ｖ／マイクロメートル、少なくとも約０．７Ｖ／マイクロメートル、少なくとも約１Ｖ／マイクロメートル、少なくとも約１．２Ｖ／マイクロメートル、少なくとも約１．４Ｖ／マイクロメートル、少なくとも約１．６Ｖ／マイクロメートル、または少なくとも約２Ｖ／マイクロメートルという流体に印加可能な電場を作り出すように、電場発生器を構築し配置する（例えば位置づけする）ことができる。一部の実施形態においては、例えば少なくとも約２Ｖ／マイクロメートル、少なくとも約３Ｖ／マイクロメートル、少なくとも約５Ｖ／マイクロメートル、少なくとも約７Ｖ／マイクロメートル、または少なくとも約１０Ｖ／マイクロメートル又それ以上といったさらに高い電場強度を使用することができる。

【０１２７】

一部の実施形態においては、液滴に電気力を経験させるべく流体液滴に対し電場を加えることができる。流体液滴上に及ぼされる電気力は、一部のケースでは、少なくとも約10^{-16}Ｎ／ｍｉｃｏｒｏｍｅｔｅｒ^{3}であり得る。あるケースでは、流体液滴上に及ぼされる電気力はさらに大きく、例えば少なくとも約10^{-15}Ｎ／立方マイクロメートル、少なくとも約10^{-14}Ｎ／立方マイクロメートル、少なくとも約10^{-13}Ｎ／立方マイクロメートル、少なくとも約10^{-12}Ｎ／立方マイクロメートル、少なくとも約10^{-11}Ｎ／立方マイクロメートル、少なくとも約10^{-10}Ｎ／立方マイクロメートル、少なくとも約10^{-9}Ｎ／立方マイクロメートル、少なくとも約10^{-8}Ｎ／立方マイクロメートル、または少なくとも約10^{-7}Ｎ／立方マイクロメートル又それ以上であり得る。その他の実施形態においては、流体の表面積との関係における流体液滴上に及ぼされる電気力は、少なくとも約10^{-15}Ｎ／平方マイクロメートル、および一部のケースでは、少なくとも約10^{-14}Ｎ／平方マイクロメートル、少なくとも約10^{-13}Ｎ／平方マイクロメートル、少なくとも約10^{-12}Ｎ／平方マイクロメートル、少なくとも約10^{-11}Ｎ／平方マイクロメートル、少なくとも約10^{-10}Ｎ／平方マイクロメートル、少なくとも約10^{-9}Ｎ／平方マイクロメートル、少なくとも約10^{-8}Ｎ／平方マイクロメートル、少なくとも約10^{-7}Ｎ／平方マイクロメートル、または少なくとも約10^{-6}Ｎ／平方マイクロメートルまたはそれ以上であり得る。さらにその他の実施形態においては、流体液滴上に及ぼされる電気力は、少なくとも約10^{-9}Ｎ、少なくとも約10^{-8}Ｎ、少なくとも約10^{-7}Ｎ、少なくとも約10^{-6}Ｎ、少なくとも約10^{-5}Ｎ、または一部のケースでは少なくとも約10^{-4}Ｎ又それ以上であり得る。

【０１２８】

本発明の一部の実施形態においては、例えば上述の通りの電荷をもつ流体液滴といった流体液滴の上に存在する電荷を少なくとも部分的に中和するためのシステムおよび方法が提供されている。例えば、電荷を少なくとも部分的に中和するために、流体液滴を、例えば本明細書で記述されているようなものといった技術を用いて、電場内に通し、かつ／または電極に接近させることができる。（電場がもはや流体液滴に実質的な影響を及ぼすことのできる強度をもたないように）電場から流体液滴が退出した時点で、および／または

電場がその他の形で除去された時点で、流体液滴は電気的に中和された状態になりかつ／または削減された電荷を有する可能性がある。

【０１２９】

もう１組の実施形態においては、個々の液滴を形成するように流体を誘発することのできるような形でチャンネルの寸法を改変させることにより、チャンネルの内部で液体により取り囲まれた流体から、流体液滴を作り上げることができる。該チャンネルは例えば、流体がチャンネルの壁に付着せず、代りに個々の液滴を形成するような形で、フロー方向との関係において拡張するチャンネルであるか、または例えば流体が強制的に個々の液滴内に合体するような形でフロー方向との関係において狭くなるチャンネルであってよい。１つの例が図７Ａに示されており、ここでチャンネル５１０は、液体５０５により取り囲まれたフローする流体５００（下向きに流れる）を内含している。チャンネル５１０は、５０１の場所で狭くなり、流体５００に一連の個々の流体液滴５１５を形成させる。その他の実施形態においては、液滴形成を起こさせるように内部閉塞を使用することもできる。例えば、流体を流体液滴へと合体させるような形で液体流を分断するために、じゃま板、尾根、柱などを使用することができる。

【０１３０】

一部のケースでは、個々の流体液滴の形成を起こさせるような形で時間との関係において（例えば機械式または電気機械式、空気圧式などで）チャンネルの寸法を改変させることが可能である。例えば、液滴形成をひき起こすようにチャンネルを機械的に収縮（「圧搾」）することができ、そうでなければ、例えば移動式じゃま板、回転羽根などの使用を通して液滴形成をひき起こすべく流体流を機械的に分断することができる。限定的意味のない例として、図７Ｂでは、流体５００は下向き方向にチャンネル５１０を通って流れる。流体５００は、液体５０５によって取り囲まれている。チャンネル５１０の近くに位置づけされたまたはこのチャンネルに一体化された圧電デバイス５２０が、このときチャンネル５１０を機械的に締め付けるかまたは「圧搾」して、流体５００を個々の流体液滴５１５へと崩壊させることができる。

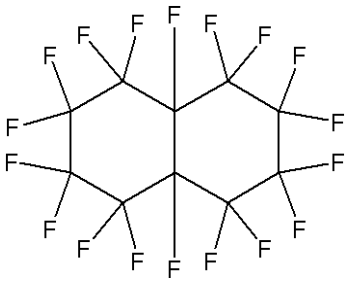
【０１３１】

さらにもう１組の実施形態においては、３つの基本的に相互に非混和性の流体（すなわち問題の１タイムスケール上で非混和性）を含むシステムの中で、個々の流体液滴を作り上げ維持することができる。このようなシステムにおいては、第２および第３の流体の流体液滴の分離を確保するために界面活性剤が必ずしも必要ではない。一例として、図１４Ａを参照すると、チャンネル７００の内部で、第１の流体７０１および第２の流体７０２は各々液体担体７０５内に担持されている。第１の流体７０１および第２の流体７０２は、各々チャンネル７００内部で液体担体７０５により担持されている一連の交番する個々の液滴として交番する。第１の流体と同様、第２の流体および液体担体は全て基本的に互いに非混和性であり、流体のうちのいずれか２つ（または３つの流体全て）が、液滴の合体を発生させることなく接触することができる。かかるシステムの一例の顕微鏡写真が図１４Ｂに示され、液体担体７０５内部に各々含まれた個々の交番する液滴として存在する第１の流体７０１および第２の流体７０２を例示している。

【０１３２】

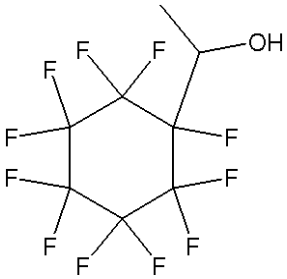
３つの基本的に相互に非混和性である流体が関与するシステムの１例としては、シリコーン油、鉱油そして水溶液（すなわち、水、または中に溶解および／または懸濁した１つ以上のその他の種を含有する水、例えば塩溶液、生理食塩溶液、粒子または細胞を含有する水の懸濁液など）がある。システムのもう１つの例は、シリコーン油、フッ化炭素油、および水溶液である。システムのさらにもう１つの例は、炭化水素油（例えばヘキサデカン）、フッ化炭素油、および水溶液である。これらの例においては、これらの流体のいずれかを液体担体として使用することができる。適切なフッ化炭素油の限定的意味のない例としては、オクタデカフルオロデカヒドロナフタレン：

【化１】



または１－（１，２，２，３，３，４，４，５，５，６，６－ウンデカフルオロシクロヘキシル）エタノール：

【化２】



が含まれる。

【０１３３】

かかるシステムの限定的意味のない例が、図１４Ｂに例示されている。この図では、流体ネットワーク７１０には、液体担体７０５を含むチャンネル、および第１の流体７０１および第２の流体７０２が含まれている。液体担体７０５は、入口７２５を通って流体ネットワーク７１０内に導入され、一方第１の流体７０１は入口７２１を通って導入され、第２の流体７０２は入口７２２を通って導入される。流体ネットワーク７１０内のチャンネル７１６は、入口７２５から導入された液体担体７１５を含む。当初、第１の流体７０１が液体担体７０５内に導入されて、内部で流体液滴を形成する。次に液体７０５の中に第２の流体７０２が導入され、第１の流体７０１を含む流体液滴が散在した流体液滴を中に形成する。かくして、チャンネル７１７に到達した時点で、液体担体７０５は、第２の流体７０２を含む第２の流体液滴セットが散在した、第１の流体７０１を含む第１の流体液滴セットを含む。例示された実施形態においては、チャンネル７０６は、任意には、以下で詳述する通り流体液滴の各々の中で混合が発生できるようにし得る一連の湾曲部を含んでいる。しかしながら、この実施形態においては、第１の流体７０１および第２の流体７０２は基本的に非混和性であることから、第２の流体７０２を含む液滴と第１の流体７０１を含む液滴の有意な融合および／または混合は一般に予期されない。

【０１３４】

液体により取り囲まれた流体液滴生産のその他の例は、その各々が本明細書に参照により本明細書により援用されている、リンクら、により２００４年４月９日付けで出願された国際特許出願番号第ＰＣＴ／ＵＳ２００４／０１０９０３号明細書およびストーンら、により出願され、２００４年１月８日付けで国際公開第２００４／００２６２７号パンフレットとして公開された２００３年６月３０日付けで国際特許出願番号第ＰＣＴ／ＵＳ０３／２０５４２号明細書の中で記述されている。

【０１３５】

一部の実施形態においては、流体液滴は、各々実質的に同じ形状および／またはサイズであり得る。形状および／またはサイズは、例えば液滴の平均直径またはその他の特徴的寸法を測定することによって判定可能である。本明細書で使用される「判定（決定）する」という用語は、例えば定量的または定性的な、１つの種の分析または測定、および／または該種の存在および不在の検出を一般に意味する。「判定（決定）する」という用語は

同様に、例えば定量的または定性的な、または該相互作用の存在または不在を検出することによる、２つ以上の種の間の相互作用の分析または測定をも意味する。限定的意味のない適切な技術例としては、分光学、例えば赤外光、吸光、蛍光、可視紫外光、ＦＴＩＲ（「フーリエ変換赤外分光」）、またはラマン；重量分析法；偏光解析法；圧電測定法；免疫学的検定法；電気化学測定法；光学測定、例えば光学密度測定法；円二色法；光散乱測定法、例えば、準電気光散乱；偏光分析法；屈折計法；または濁度測定法などが含まれる。

【０１３６】

複数のまたは一連の液滴の「平均直径」は、液滴の各々の平均直径の算術平均である。当業者であれば、例えばレーザー光散乱、顕微鏡検査またはその他の既知の技術を用いて、複数のまたは一連の液滴の平均直径（またはその他の特徴的寸法）を判定することができるだろう。非球形液滴においては、液滴の直径は、表面全体を横断して積分した該液滴の数学的に定義された平均直径である。１つの液滴（および／または複数のまたは一連の液滴の）平均直径は、例えば、約１ｍｍ未満、約５００マイクロメートル未満、約２００マイクロメートル未満、約１００マイクロメートル未満、約７５マイクロメートル未満、約５０マイクロメートル未満、約２５マイクロメートル未満、約１０マイクロメートル未満、または一部のケースでは約５マイクロメートル未満であり得る。平均直径は同様に、少なくとも約１マイクロメートル、少なくとも約２マイクロメートル、少なくとも約３マイクロメートル、少なくとも約５マイクロメートル、少なくとも約１０マイクロメートル、少なくとも約１５マイクロメートル、または一部のケースでは少なくとも約２０マイクロメートルでもあり得る。

【０１３７】

あるケースでは、本発明は、基本的に内部の種の実質的に均等な数のエンティティ（すなわち分子、化合物、細胞、粒子など）から成る液滴の生産を提供している。例えば約９０％、約９３％、約９５％、約９７％、約９８％または約９９％以上の複数のまたは一連の液滴が各々、同じ数の特定の種のエンティティを含み得る。例えば、上述した通りの実質的な数の生産された流体液滴は、１エンティティ、２エンティティ、３エンティティ、４ンティティ、５エンティティ、７エンティティ、１０エンティティ、１５エンティティ、２０エンティティ、２５エンティティ、３０エンティティ、４０エンティティ、５０エンティティ、６０エンティティ、７０エンティティ、８０エンティティ、９０エンティティ、１００エンティティなどを含むことができ、ここで該エンティティは分子または高分子、細胞、粒子などである。一部のケースでは、該液滴は各々個々に、一範囲のエンティティ、例えば、２０未満のエンティティ、１５未満のエンティティ、１０未満のエンティティ、７未満のエンティティ、５未満のエンティティ、または一部のケースでは３未満のエンティティを含み得る。１組の実施形態においては、一部は問題の種を含み一部はそれを含んでいない流体液滴を含む液体の中で、流体液滴は、以下で詳述するように（例えば以上で記述したような蛍光またはその他の技術を用いて）該種を含む流体液滴についてスクリーニングまたは選別され得、一部のケースでは、該液滴は、例えば前述した通り、問題の種の特定の数、または範囲のエンティティを含むような流体液滴についてスクリーニングまたは選別され得る。かくして、一部のケースでは、一部が該種を含み一部がこれを含んでいない複数のまたは一連の流体液滴を、例えば少なくとも約２、少なくとも約３、少なくとも約５、少なくとも約１０、少なくとも約１５、少なくとも約２０、少なくとも約５０、少なくとも約１００、少なくとも約１２５、少なくとも約１５０、少なくとも約２００、少なくとも約２５０、少なくとも約５００、少なくとも約７５０、少なくとも約１０００、少なくとも約２０００、または少なくとも約５０００または一部のケースではそれ以上の倍数だけ、該種をまさに含む液滴の比率について富化（または枯渇）させることができる。その他のケースでは、該富化（または枯渇）は少なくとも約10^{4}、少なくとも約10^{5}、少なくとも約10^{6}、少なくとも約10^{7}、少なくとも約10^{8}、少なくとも約10^{9}、少なくとも約10^{10}、少なくとも約10^{11}、少なくとも約10^{12}、少なくとも約10^{13}、少なくとも約10^{14}、少なくとも約10^{15}、又それ以上の比

率であり得る。例えば、特定の種を含む流体液滴を、さまざまな種を含む流体液滴ライブラリから選択することができ、ここでこのライブラリは、例えばＤＮＡライブラリ、ＲＮＡライブラリ、タンパク質ライブラリ、組合せ化学ライブラリなどといったように、約10^5、約10^6、約10^7、約10^8、約10^9、約10^{10}、約10^{11}、約10^{12}、約10^{13}、約10^{14}、約10^{15}以上の項目を有し得る。ある実施形態においては、該種を担持する液滴は次に、以下で詳述するように、例えば１つの反応を開始するかまたは判定するために融合、反応またはその他の形で使用または加工され得る。

【０１３８】

本発明に従ってマイクロカプセルを作り出すためのマイクロ流体ハンドリングの使用には次のような多数の利点がある。

ａ）　それらは、各々がほぼ同一の非常に小さい超小型反応器として機能する高単分散性のマイクロカプセル（＜１．５％未満の多分散性）の形成を可能する、ｂ）マイクロカプセルは約１フェムトリットルから約１ナノリットルの範囲の体積を有することが可能である、

ｃ）マイクロカプセルの区画化は放物線流に起因する拡散および分散を防止する。

ｄ）　ペルフルオロカーボン担体流体を用いることにより、マイクロカプセル間の分子交換を防止することが可能である。

ｅ）　マイクロカプセル内の化合物は、不活性ペルフルオロカーボン担体流体層により分離されるためマイクロチャンネルの構造と反応または相互作用できない。

ｆ）　マイクロカプセルを１０，０００秒$^{-1}$以下で作り出し、かつ同じ速度で光学的方法を用いてスクリーニングされ得る。これは一日あたり最高10^9の処理量である。

【０１３９】

マイクロカプセルは、有利にも融合または分割可能である。例えば、微水滴は、マイクロ流体システムを用いて併合および分割可能である（リンクら、２００４年；ソングら、２００３年）。マイクロカプセル融合は、試薬の混合を可能にする。例えば、該化合物を含むマイクロカプセルと標的を含むマイクロカプセルの融合が標的と化合物の間の反応を開始させることができる。マイクロカプセル分割は、単一のマイクロカプセルをより小さい２つ以上のマイクロカプセルに分割させることができる。例えば、化合物を含む単一のマイクロカプセルを多数のマイクロカプセルに分割することができ、これらを次に異なる標的を含む異なるマイクロカプセルと各々融合させることができる。標的を含む単一のマイクロカプセルも同様に多数のマイクロカプセルに分割でき、これらをその後、１つの異なる化合物または異なる濃度の複数の化合物を含む異なるマイクロカプセルと融合させることができる。

【０１４０】

一態様では、本発明は、流体液滴を２つ以上の液滴に分割するためのマイクロ流体システムおよび方法に関する。流体液滴は、例えば前述の通り、液体により取り囲まれていてよく、該流体および該液体は一部のケースにおいて基本的に非混和性である。当初の流体液滴を分割することによって作り出される２つ以上の液滴は各々実質的に同形状および／またはサイズであり得、そうでなければ２つ以上の液滴は、当初の流体液滴の分割に用いられる条件に応じて、異なる形状および／またはサイズを有し得る。数多くのケースにおいて、当初の流体液滴を分割するのに用いられる条件は、手動式または自動式に（例えば以下で論述するとおりプロセッサを用いて）、何らかの形で制御可能である。一部のケースでは、複数または一連の流体液滴中の各々の液滴を独立した形で制御することができる。例えば、いくつかの液滴を等部分または不等部分に分割する一方で他の液滴を分割しないことも可能である。

【０１４１】

１組の実施形態に従うと、印加された電場を用いて、１つの流体液滴を分割することが可能である。電場は、ＡＣ場、ＤＣ場などであり得る。この実施形態における流体液滴は、周囲の液体よりも高い導電率を有していてよく、一部のケースでは、流体液滴は中性に荷電され得る。一部の実施形態においては、もとの流体液滴から生産された液滴はほぼ等

しい形状および／またはサイズを有する。ある実施形態においては、印加された電場の中で、電荷を促して流体液滴の内部から分配対象表面まで移動させ、かくして、液滴の内部に見られる電場を相殺することが可能である。一部の実施形態においては、流体液滴の表面上の電荷は、印加された電場に起因する力を経験することもでき、こうして相対する極性をもつ電荷を反対方向に移動させることになる。電荷の移動は、一部のケースにおいて、滴が２つの分離した流体液滴へと引き離されるようにする。流体液滴に対し印加される電場は、例えば反応、電場発生器などの上述の技術を用いて作り出すことができる。

【０１４２】

いかなる電場も印加されない図１Ａ中の限定的意味のない例として、チャンネル２３０内に含まれた流体液滴２１５は、チャンネル２５０および２５５へと通じる交差部２４０に向かって流れる周囲の液体によって担持されている。この例では、周囲の液体は、等しい流速でチャンネル２５０および２５５を通って流れる。かくして交差部２４０では、流体液体２１５は好ましい配向性または方向をもたず、該周囲液体流に起因して等しい確率で出口チャンネル２５０および２５５内へと移行する。これとは対照的に、図１Ｂでは、周囲液体流が１．４Ｖ／マイクロメートルの印加電場の影響下で図１Ａと同じ要領で流れる一方で、流体液滴２１５は交差部２４０で２つの液滴へと分割されて、新しい液滴２１６および２１７を形成する。液滴２１６はチャンネル２５０内を左へと移動し、一方液滴２１７はチャンネル２５５内を右へと移動する。

【０１４３】

このプロセスの概略図は図５に見られ、ここでは、チャンネル５４０中の液体５３５により取り囲まれている中性流体液滴５３０が、電極５２６および５２７により作り出された印加電場５２５に付されている。電極５２６はチャンネル５４２近くに位置づけされ、一方電極５２７はチャンネル５４４の近くに位置づけされている。電場５２５の影響下で、電荷分離が流体液滴５３０内部で誘発される、すなわち該液滴の片端で正の電荷が誘発される一方で該液滴のもう一方の端部では負の電荷が誘発されるようになっている。液滴は次に、負の荷電された液滴５４５と正の荷電された液滴５４６へと分割され得、これらはその後それぞれチャンネル５４２および５４４内を走行することができる。一部のケースでは、結果として得られた荷電液滴上の電荷の一方または両方を、前述の通りに中和することも可能である。

【０１４４】

流体液滴を２つの液滴に分割するその他の例は、各々本明細書に参照により援用されているリンク、らにより２００４年４月９日付けで出願された国際特許出願番号第ＰＣＴ／ＵＳ２００４／０１０９０３号パンフレット；リンクら、により２００３年８月２７日付けで出願された米国仮特許出願第６０／４９８，０９１号明細書；およびストーンらにより２００３年６月３０日付けで出願され、２００４年１月８付けで国際公開第２００４／００２６２７号パンフレットとして公開された国際特許出願番号第ＰＣＴ／ＵＳ０３／２０５４２号明細書の中で記述されている。

【０１４５】

本発明は、さらにもう１つの態様において、２つ以上の流体液滴を１つの液滴に融合または合体させるためのシステムおよび方法に関する。例えば、１組の実施形態においては、例えば組成、表面張力、液滴サイズ、界面活性剤の有無などに起因して２つ以上の液滴が普通に融合または合体できない場合に、２つ以上の液滴（例えば流体の不連続流から生じたもの）を１つの液滴へと融合または合体させることのできるシステムおよび方法が提供される。あるマイクロ流体システムにおいては、液滴のサイズとの関係における液滴の表面張力も同様に、一部のケースで液滴の融合または合体が発生するのを妨げることができる。

【０１４６】

一実施形態においては、２つの流体液滴には、相対する電荷（すなわち正および負の電荷、絶対値が同じとは限らない）が与えられてよく、こうして２つの液滴の電気的相互作用は増大させられ、かくして例えば本明細書に記述されている技術を用いて液滴の相対す

る電荷に起因して液滴の融合または合体が発生し得るようにすることができる。例えば、液滴に電場を印加することができる、液滴をコンデンサに通すことができる、化学反応が液滴を荷電状態にさせることができる等々である。一例としては、図１３Ａに概略的に示されているように、マイクロ流体チャンネル６５３内部に含まれた液体６５４により担持された未荷電液滴６５１および６５２は、互いに接触させられるが、該液滴はそのサイズおよび／または表面張力などのため融合も合体もできない。液滴は、一部のケースでは、液滴の表面張力を低下させるべく界面活性剤が適用された場合でさえ融合できない可能性がある。しかしながら、流体液滴が、（同じ絶対値でありうるものの必ずしもそうとは限らない）反対の電荷で荷電されている場合、液滴は、融合または合体することができるかもしれない。例えば、図１３Ｂでは、正に荷電された液滴６５５および負に荷電された液滴６５６が一般的に互いに向かって導かれ、かくして、相対する荷電を受けた液滴の電気的相互作用が液滴を融合した液滴６５７へと融合させるようになっている。

【０１４７】

もう１つの実施形態においては、流体液滴は、必ずしも反対の電荷が与えられなくてもよく（一部のケースでは、電荷が全く与えられない可能性がある）、流体液滴を合体させる流体液滴内に誘発された双極子の使用を通して融合される。図１３Ｃに示されている例においては、チャンネル６７０内で液体６６５により取り囲まれている液滴６６０および６６１（これらは各々独立して荷電されているかまたは中性であり得る）は、印加された電場６７５による影響を受けるような形でチャンネルを通って移動する。電場６７５はＡＣ場、ＤＣ場などであり得、例えばここで示されているように電極６７６および６７７を用いて作り出すことができる。図１３Ｃに示されている通りの流体液滴の各々の中の誘発双極子は、流体液滴をその局所的な相対する電荷に起因して互いに向かって電気的に引きつけられた状態にし、かくして液滴６６０および６６１を融合させて液滴６６３を生成させることができる。図１３Ｄでは、液滴６５１および６５２は一緒に流れて融合し、第３のチャンネルを流れる液滴６５３を形成する。

【０１４８】

さまざまな実施形態において、合体できるようにされた２つ以上の液滴は必ずしも「真っ正面から」遭遇する必要がないということを指摘しておくべきである。液滴の少なくとも一部の融合が最初に発生するかぎり、任意の接触角で充分である。一例として、図１２Ｈにおいては、液滴７３および７４は各々実質的に同じ方向に（例えば異なる速度で）走行しており、遭遇して融合できる。もう１つの例として、図１２Ｉにおいては、液滴７３および７４は一定の角度で遭遇し、融合する。図１２Ｊにおいては、３つの流体液滴７３、７４および６８が遭遇し、融合して液滴７９を生成する。

【０１４９】

流体液滴の融合または合体のその他の例は、本明細書に参照により援用されているリンクら、により２００４年４月９日付けで出願された国際特許出願番号第ＰＣＴ／ＵＳ２００４／０１０９０３号パンフレットの中で記述されている。

【０１５０】

従ってマイクロカプセルの流体ハンドリングは結果として次のようなさらなる利点をもたらす：

ａ）　マイクロカプセルは２つ以上のより小さいマイクロ液滴に分割され得、かくして中に含まれた試薬を並行して一連の異なる分子と反応させるかまたは多系にて（ｉｎ　，ｕｌｔｉｐｌｉｃａｔｅ）検定することができるようにする。

ｂ）　マイクロカプセルを融合することができる。こうして、分子は（ａ）希釈され得、（ｂ）その他の分子と混合され得、かつ（ｃ）反応が精確に定義された時刻に開始、終結または変調され得ることになる。

ｃ）　カオス的移流を用いてマイクロカプセル内できわめて迅速に（２ｍｓ未満で）試薬を混合でき、かくして高速の反応速度測定および非常に高い処理量が可能となる。

ｄ）　試薬を組合せにより混合できる。例えば、テストすべき標的に対する、化合物ライブラリ内の化合物の考えられる全ての対様の組合せの効果を可能にする。

【０１５１】
マイクロ流体システム内のマイクロカプセルの創出および操作は、以下のことを意味する：
ａ）　マイクロカプセルの安定流をマイクロチャンネル内に形成し、その相対的位置により同定することができる。
ｂ）　反応に光シグナル（例えば蛍光変化）が随伴する場合、マイクロ流体ネットワークの空間的に分解された光学的画像が、各マイクロカプセル内の反応の時間分解測定を可能にする。
ｃ）　マイクロカプセルが含む分子の回収およびさらなる分析または操作を可能にするべくマイクロ流体フロー選別装置を用いてマイクロカプセルを分離することができる。
【０１５２】
マイクロカプセルのスクリーニング／選別
さらにもう１つの態様においては、本発明は、一部のケースでは液体中の流体液滴を比較的高い速度でスクリーニングまたは選別するためのシステムおよび方法を提供している。例えば、液滴の特性を検知しかつ／または何らかの形で（例えば以下で詳述する通り）判定することができ、その後該液滴を、例えば選別またはスクリーニングを目的としてデバイスの特定の領域に向かって導くことができる。
【０１５３】
一部の実施形態においては、流体液滴の特性を何らかの形で、例えば本明細書に記述されている通りに検知および／または判定することができ（例えば流体液滴の蛍光を判定することができる）、かつこれに応えて、特定の領域（例えばチャンネル）に、流体液滴を導くべく電場を印加するかまたは流体液滴から除去することができる。一部のケースでは、本発明のあるシステムおよび方法を用いて、高い選別速度を達成することができる。例えば、一部のケースでは少なくとも毎秒約１０液滴を判定し選別することができ、その他のケースでは、少なくとも毎秒約２０液滴、少なくとも毎秒約３０液滴、少なくとも毎秒約１００液滴、少なくとも毎秒約２００液滴、少なくとも毎秒約３００液滴、少なくとも毎秒約５００液滴、少なくとも毎秒約７５０液滴、少なくとも毎秒約１０００液滴、少なくとも毎秒約１５００液滴、少なくとも毎秒約２０００液滴、少なくとも毎秒約３０００液滴、少なくとも毎秒約５０００液滴、少なくとも毎秒約７５００液滴、少なくとも毎秒約１０，０００液滴、少なくとも毎秒約１５，０００液滴、少なくとも毎秒約２０，０００液滴、少なくとも毎秒約３０，０００液滴、少なくとも毎秒約５０，０００液滴、少なくとも毎秒約７５，０００液滴、少なくとも毎秒約１００，０００液滴、少なくとも毎秒約１５０，０００液滴、少なくとも毎秒約２００，０００液滴、少なくとも毎秒約３００，０００液滴、少なくとも毎秒約５００，０００液滴、少なくとも毎秒約７５０，０００液滴、少なくとも毎秒約１，０００，０００液滴、少なくとも毎秒約１，５００，０００液滴、少なくとも毎秒約２，０００，０００液滴またはそれ以上、或いは少なくとも毎秒約３，０００，０００液滴またはそれ以上をこのような形で判定および／または選別することができる。
【０１５４】
１組の実施形態においては、液滴上に電荷を作り出し（例えば前述の通り）、ＡＣ場、ＤＣ場などであり得る印加電場を用いて液滴を操縦することによって、流体液滴を導くことができる。一例として、図２－４を参照すると、特定の領域に流体液滴を導くために必要とされる通りに、電場を選択的に印加し除去することができる（或いは又例えば図４Ａに示されているように、逆電場といった異なる電場を印加してもよい）。一部の実施形態では、流体液滴を含有する液体のフローを実質的に改変させることなく、必要に応じて、電場を選択的に印加し除去することが可能である。例えば液体は、実質的に定常状態ベース（すなわち、流体液滴を含有する液体の平均流速は、定常状態流または時間との関係における液体のフローの予測値の２０％未満または１５％未満しか逸脱せず、一部のケースでは平均流速は１０％未満または５％未満しか逸脱し得ない）、または本発明の流体システムを通した（例えば１本のチャンネルまたはマイクロチャンネルを通した）その他の予

め定められたベースでフローでき、該液体内部に含まれた流体液滴は、流体システムを通った液体のフローを実質的に改変することなく例えば電場を用いてさまざまな領域に導かれ得る。特定の例として、図２Ａ、３Ａおよび４Ａでは、流体液滴１５を含有する液体は、流体供給源１０からチャンネル３０を通って交差部４０まで流れ、チャンネル５０および５５を通って退出する。図２Ａでは、流体液滴１５がチャンネル５０および５５の両方を通って導かれ、一方図３Ａでは、流体液滴１５はチャンネル５５のみに導かれ、図４Ａでは流体液滴１５はチャンネル５０のみに導かれる。

【０１５５】

もう１組の実施形態においては、（当初荷電されているかまたはされていないものであり得る）流体液滴内で双極子を誘発し、印加された電場を用いて液滴を選別または操縦することにより、流体液滴を選別または操縦することができる。電場は、ＡＣ場、ＤＣ場などであり得る。例えば、図９Ａを参照すると、流体液滴５３０および液体５３５を含むチャンネル５４０は、チャンネル５４２および５４４に分かれる。流体液滴５３０は電場を有していてもよいしまたは非荷電であってもよい。電極５２６はチャンネル５４２の近くに位置づけされ、一方電極５２７はチャンネル５４４の近くに位置づけされる。電極５２８は、チャンネル５４０、５４２および５４４の接合部近くに位置づけされる。図９Ｃおよび９Ｄでは、電極５２６、５２７および／または５２８を用いて、流体液滴の中に双極子が誘発される。図９Ｃでは、電極５２７および５２８を用いて電場５２５を液滴に印加することにより、液滴５３０内に双極子が誘発される。電場の強度に起因して、液滴の右へ、チャンネル５４４内へと強くひきつけられる。類似の要領で、図９Ｄでは、電極５２６および５２８を用いて液滴に電場５２５を印加することによって液滴５３０内に双極子が誘発され、液滴をチャンネル５４２内にひきつけさせる。かくして、適切な電場を印加することにより、所望のとおり、いずれかのチャンネル５４２または５４４に対し液滴５３０を導くことができる。

【０１５６】

しかしながらその他の実施形態においては、液滴を含む液体のフローを改変することにより、本発明の流体システム内部で流体液滴をスクリーニングまたは選別することができる。例えば、１組の実施形態においては、第１のチャンネル、第２のチャンネルなどの中に流体液滴を取り囲む液体を導くことによって、流体液滴を操縦または選別することができる。限定的意味のない例として、図１０Ａを参照すると、流体液滴５７０はチャンネル５８０内で液体５７５によって取り囲まれている。チャンネル５８０は３本のチャンネル５８１、５８２および５８３に分かれる。液体５７５のフローは、例えばバルブ、ポンプ、ピストンなどの当業者にとって既知のフロー制御デバイスを用いて、望まれる通り、いずれかのチャンネル５８１、５８２および５８３内に導かれ得る。かくして、図１０Ｂでは、流体液滴５７０は、（矢印５７４により表わされているように）チャンネル５８１内に流れ込むように液体５７５を導くことによりチャンネル５８１内に導かれ；図１０Ｃでは、流体液滴５７０は、（矢印５７４により表わされているように）チャンネル５８２内に流れ込むように液体５７５を導くことにより、チャンネル５８２内に導かれ；図１０Ｄでは、流体液滴５７０は、（矢印５７４により表わされているように）チャンネル５８３内に流れ込むように液体５７５を導くことにより、チャンネル５８３内に導かれる。

【０１５７】

しかしながら、流体液滴のフローを中に導くためにマイクロ流体システム内の液体のフロー制御は使用されず、代替的方法が使用されることが好ましい。従って、有利には、マイクロカプセルは、マイクロ流体システム内の担体流体のフローの方向を改変することによって選別されない。

【０１５８】

もう１組の実施形態においては、例えば異なるチャンネル内部または１本のチャンネルの異なる部分の内部といった流体システム内部の圧力が、流体液滴のフローを導くために制御可能である。例えば、液滴を、さらなるフロー方向についての多数のオプションを含めたチャンネル接合部に向かって導くことができる（例えば任意の下流側フローチャンネ

ルを構成するチャンネル内を分岐または二又に向かって導かれる）。該任意の下流側フローチャンネルのうちの１つ以上のものの内部圧力は、該チャンネルのうちの１本の中に選択的に液滴を導くように制御可能であり、接合部に連続的液滴が到達するのにおおよそ必要とされる時間で、圧力変化がもたらされ、かくして、各々の連続する液滴の下流側フロー経路は独立して制御できるようになっている。１つの配置においては、例えば流体液滴を含む液体の定方向運動をひき起こすことにより、流体液滴を１本のチャンネル内に操縦または選別するべく、液体タンクの膨張および／または収縮を使用することができる。液体タンクは、活動化された時点で、活動化されたタンクによりひき起こされる液体の運動が好ましい方向に液体を流れさせ、流体液滴をその好ましい方向に搬送するような形で、位置づけされ得る。例えば、液体タンクの膨張は、タンクに向かう液体のフローをひき起こすことができ、一方、液体タンクの収縮は、タンクから離れる液体のフローをひき起こすことができる。一部のケースでは、液体タンクの膨張および／または収縮を、例えば本明細書で記述するように、その他のフロー制御デバイスおよび方法と組合わせることが可能である。液体タンクの膨張および／または収縮をひき起こすことのできるデバイスの限定的意味のない例としては、ピストンおよび圧電コンポーネントが含まれる。一部のケースでは、例えば電気的シグナルに応えるその応答時間が比較的速いことから、圧電コンポーネントが特に有用であり得る。

【０１５９】

限定的意味のない例としては、図１１Ａにおいて、流体液滴６００がチャンネル６１０内で液体６０５により取り囲まれている。チャンネル６１０はチャンネル６１１、６１２に分かれる。チャンネル６１１および６１２と流体連絡状態に位置づけされているのは、例えば圧電コンポーネント６１５および６１６、ピストン（図示せず）などにより膨張および／または収縮され得る液体タンク６１７および６１８である。図１１Ｂにおいては、液体タンク６１７は、膨張され、一方液体タンク６１８は収縮されている。タンクの膨張／収縮の効果は、矢印６０３により表わされているように、チャンネル６１１に向かっての液体の正味フローをひき起こすことにある。かくして流体液滴６００は、チャンネル間の接合部に達した時点で、液体６０５の運動によりチャンネル６１１に導かれる。逆の状況は図１１Ｃに示されており、ここでは液体タンク６１７が収縮され、一方液体タンク６１８は膨張されている。（矢印６０３により表わされている）チャンネル６１２に向かっての液体の正味フローが発生し、流体液滴６００をチャンネル６１２内に移動させる。ただし、チャンネル６１１または６１２内に流体液滴６００を導くためにタンク６１７および６１８の両方を活動化させる必要はない、という点を指摘しておくべきである。例えば、一実施形態においては、（タンク６１８のいかなる改変もなく）液体タンク６１７の膨張により、流体液滴６００をチャンネル６１１に導くことができ、一方、もう１つの実施形態では、（タンク６１７のいかなる改変もなく）液体タンク６１８の収縮によりチャンネル６１１に流体液滴６００を導くことができる。一部のケースでは、２つ以上の液体タンクを使用することができる。

【０１６０】

一部の実施形態においては、流体液滴を２本以上のチャンネル内に選別することができる。液滴の送達のために流体システム内部に多数の領域をもつ本発明の実施形態の限定的意味のない例が、図６Ａおよび６Ｂに示されている。その他の配置が、図１０Ａ－１０Ｄに示されている。図６Ａにおいては、それぞれに電極３２１／３２２、３２３／３２４および３２５／３２６を用いて交差部３４０、３４１および３４２において液滴の運動を制御するべく電場を印加することにより、出口チャンネル３５０、３５２、３５４または３５６のいずれか１本に対し、望まれる通り、チャンネル３３０内に荷電液滴３１５を導くことができる。図６Ａでは、上述のものと類似の原理を用いて、印加電場３００および３０１を用いてチャンネル３５４に液滴３１５が導かれる。類似の要領で、図６Ｂでは、それぞれに電極４２１／４２２、４２３／４２４、４２５／４２６および４２７／４２８を用いて交差部４４０、４４１、４４２および４４３において液滴の運動を制御するべく電場を印加することにより、チャンネル４３０内の荷電液滴４１５を出口チャンネル４５０

、４５２、４５４または４５６のいずれか１本に導くことができる。この図では、液滴４１５はチャンネル４５４に導かれ、当然のことながら、望まれる場合、荷電液滴を任意のその他の出口チャンネルに導くことができる。

【０１６１】

もう１つの例においては、器具５において、図２Ａに概略的に例示されるように、流体供給源１０により作り出された流体液滴１５は、２つの電極２２、２４を含む電場発生器２０を用いて作り出された印加電場に起因して、正に荷電されている。流体液滴１５は、液滴を含む液体によりチャンネル３０を通して導かれ、交差部４０に向かって導かれる。交差部４０では、流体液滴は好ましい配向性または方向をもたず、同等の確率で出口チャンネル５０および５５内へと移動する（この実施形態では、液体は、実質的に等しい速度で、両方の出口チャンネル５０および５５を通って排出する）。類似の要領で、電極１２２および１２４を含む電場発生器１２０を用いて作られた印加電場に起因して、流体供給源１１０により作り出された流体液滴１１５は負に荷電される。交差部１４０に向かってチャンネル１３０を通って走行した後、流体液滴は、好ましい配向性または方向を有しておらず、液体が実質的に等しい速度で出口チャンネル１５０および１５５を通って退出するにつれて、同等の確率で出口チャンネル１５０および１５０内に移動する。交差部１４０の代表的な顕微鏡写真が図２Ｂに示されている。

【０１６２】

図３Ａの概略図においては、器具５の右に向かう方向で、図２Ａの器具５に対し、１．４Ｖ／マイクロメートルの電場１００が印加されている。チャンネル３０内の正に荷電された流体液滴１５は、交差部４０に到達した時点で、印加電場１００に起因してチャンネル５５内を右に導かれ、一方液滴を含む液体は実質的に等しい速度で出口チャンネル５０および５５を通って退出し続ける。類似の要領で、チャンネル１３０内の負に荷電された流体液滴１１５は、交差部１４０に到達した時点で、印加電場１００に起因してチャンネル１５０内を左に導かれ、一方液体流体は、実質的に等しい速度で出口チャンネル１５０および１５５を通って退出し続ける。かくして望まれる通り特定のチャンネル内に流体液滴を導くために電場１００を使用することができる。交差部１４０の代表的顕微鏡写真が図３Ｂに示されている。

【０１６３】

図４Ａは、同じく１．４Ｖ／マイクロメートルのただし反対方向である（すなわち－１．４Ｖ／マイクロメートル）印加電場１００を伴う、図２Ａの器具５の概略図である。この図では、チャンネル３０内の正に荷電された流体液滴１５は、交差部４０に到達した時点で、印加電場１００に起因してチャンネル５０内へと左に導かれ、一方、チャンネル１３０内の負に荷電された流体液滴１１５は、交差部１４０に到達した時点で、印加電場１００に起因してチャンネル１５５内へと右に導かれる。液滴を含む液体は、実質的に等しい速度で出口チャンネル５０および５５および１５０および１５５を通って退出する。交差部１４０の代表的顕微鏡写真が図４Ｂに示されている。

【０１６４】

本発明の一部の実施形態においては、例えば特定の利用分野に応じて、２つ以上の別々の液滴へと選別および／または分割され得る。液滴を分割および／または選別するために、上述の技術のいずれかを用いることができる。限定的意味のない例として、例えばデバイス（またはその一部分）に第１の電場を印加（または除去）することにより、第１の領域またはチャンネルに対し流体液滴を導くことができる；デバイス（またはその一部分）に第２の電場を印加（または除去）することにより、第２の領域またはチャンネルに対し液滴を導くことができる；デバイス（またはその一部分）に第３の電場を印加（または除去）することにより第３の領域またはチャンネルに対して液滴を導くことができる。ここで、電場は、何らかの形で、例えば、強度、方向、周波数、持続時間などにおいて異なる可能性がある。一連の液滴において、各々の液滴は独立して選別および／または分割され得る。例えば一部の液滴を一つの場所またはもう１つの場所に導くことができ、一方その他の液滴は、２つ以上の場所に導かれる多数の液滴へと分割可能である。

【０１６５】
１つの特定の例として、図８Ａでは、チャンネル５６０内の流体液滴５５０、周囲の液体５５５は、チャンネル５５６、チャンネル５５７に導かれるかまたは、何らかの形でチャンネル５６２と５６４の間で分割され得る。図８Ｂでは、周囲液体５５５をチャンネル５６２に向かって導くことにより、流体液滴５５０はチャンネル５６２へと左に向かって導かれ得る。図８Ｃでは、周囲液体５５５をチャンネル５６４に向かって導くことにより、流体液滴５５０はチャンネル５６４へと右に向かって導かれ得る。図８Ｄでは、液滴に接合部５６１を攻撃させて該液滴が２つの別々の流体液滴５６５、５６６に分割させ得る電場が、流体液滴５５０を取り囲む液体５５５のフローの制御と組合わせて印加され得る。流体液滴５６５はチャンネル５６２に導かれ、一方流体液滴５６６はチャンネル５６６に導かれる。液滴形成を制御するため、印加電極の高度の制御が達成可能である。かくして例えば、流体液滴５６５が液滴５６５および５６６に分割された後、液滴５６５および５６６は実質的に等しいサイズのものであり得、そうでなければ、それぞれ図８Ｅおよび８Ｆに示されているように、液滴５６５および５６６のいずれかが大きい可能性もある。
【０１６６】
もう１つの例として、図９Ａでは、流体液滴５３０および液体５３５を担持するチャンネル５４０は、チャンネル５４２および５４４に分かれる。流体液滴５３０は、荷電されていてもよいし、又非荷電であってもよい。電極５２６はチャンネル５４２近くに位置づけされ、一方電極５２７はチャンネル５４４の近くに位置づけされている。電極５２８は、電極５４０、５４２および５４４の接合部の近くに位置づけされている。流体液滴５３０が接合部に到達した時点で、それは電場を受けかつ／または、例えば周囲液体をチャンネル内に導くことによりチャンネルまたはその他の領域へと導かれ得る。図９Ｂに示されているように、電極５２６および５２７を用いて液滴に電場５２５を印加することにより、流体液滴５３０は、２つの別々の液滴５６５および５６６に分割可能である。図９Ｃでは、電極５２７および５２８を用いて液滴に電場５２５を印加することにより、液滴５３０内に双極子を誘発することができる。印加された電場の強さに起因して、液滴は右に、チャンネル５４４内へと強くひきつけられ得る。類似の要領で図９Ｄでは、電極５２６および５２８を用いて液滴に電場５２５を印加することによって液滴５３０内に双極子が誘発されて、液滴をチャンネル５４２内にひきつけさせることができる。液滴５３０を横断する電場を誘発するのにどの電極を用いるかおよび／または印加電場の強さを制御することにより、チャンネル５４０内部の１つ以上の流体液滴を選別しかつ／または２つの液滴へと分割し、かつ各液滴を個別に餞別しかつ／または分割することができる。
【０１６７】
例えば、各々化合物ライブラリからの異なる化合物を含む高単分散性のマイクロカプセルと、標的酵素を含む高単分散性のマイクロカプセルを融合させることができる。融合されたマイクロカプセルはマイクロ流体チャンネルに沿って流れ、化合物が標的酵素に結合する時間を与える。各々のマイクロカプセルはその後、蛍光発生酵素基質を含むもう１つのマイクロ液滴と融合される。酵素反応速度は、理想的には（異なる時刻に対応する）多数の点で各マイクロ液滴の蛍光を測定することにより判定される。
【０１６８】
マイクロカプセルは、例えば蛍光色素を取込むことによって光学的にタグ付けされ得る。好ましい構成では、該マイクロカプセルは量子ドットを取込むことによって光学的にタグ付けされる。すなわち、１０個の濃度での６色の量子ドットによって10^6個のマイクロカプセルのコード化が可能になる（ハン（Ｈａｎ）ら、２００１年）。マイクロ流体チャンネルを整然とした順序で流れるマイクロカプセルを、マイクロカプセルの流れの中でそのシーケンスにより（全体的または部分的に）コード化することができる（位置的コード化）。
【０１６９】
当業者によりマイクロスフェア、ラテックス粒子、ビーズまたはミニビーズとしても知られているマイクロビーズは、２０ｎｍ～１ｍｍの直径で入手可能であり、シリカを含め

たさまざまな材料およびポリスチレン（ＰＳ）、ポリメチルメタクリラート（ＰＭＭＡ）、ポリビニルトルエン（ＰＶＴ）、スチレン／ブタジエン（Ｓ／Ｂ）共重合体、およびスチレン／ビニルトルエン（Ｓ／ＶＴ）共重合体（ｗｗｗ．ｂａｎｇｓｌａｂｓ．ｃｏｍ）を含めたさまざまな重合体、共重合体および三元重合体から作ることができる。これらは、疎水性表面（例えばプレーンポリスチレン）から多種多様な官能的表面基すなわちアルデヒド、脂肪族アミン、アミド、芳香族アミン、カルボン酸、クロロメチル、エポキシ、ヒドラジド、ヒドロキシル、スルホナートおよびトシルにより付与される非常に親水性の高い表面に至るまで、さまざまな表面の化学的性質を伴って入手可能である。官能基は、マイクロビーズの表面に対する化合物の安定したまたは可逆的な付着のための広範囲の共有結合によるカップリング反応を可能にする。

【０１７０】

マイクロビーズは、例えば蛍光色素を取込むことによって光学的にタグ付け可能である。例えば、赤色（＞６５０ｎｍ）およびオレンジ色（５８５ｎｍ）蛍光色素の精確な比率での標識に起因して各々独自のスペクトルアドレスをもつ１００の異なるビーズセットが作り出されてきており（（フルトン（Ｆｕｌｔｏｎ）ら、１９９７年）（ｗｗｗ．ｌｕｍｉｎｅｘ．ｃｏｍ））、１０強度と６色の量子ドットを取込むことによって、最高10^6個のビーズセットをコード化することができる（ハンら、２００１年）。

【０１７１】

当業者が精通することになるさまざまな手段により共有結合的または非共有結合的に、マイクロビーズに対し化合物を連結させることができる（例えば、（ハーマンソン（Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ）、１９９６年）を参照のこと）。有利には、化合物は、開裂可能なリンカーを介して付着される。当業者にとっては、光化学的に開裂され得るリンカーおよび、ｐＨを変えること（例えばイミンおよびアシルヒドラゾン）、酸化還元特性を調整すること（例えばジスルフィド）または外部触媒を使用すること（例えばクロス・メタセシスおよびアミノ基転移）によって制御可能である可逆的共有結合などを含めたさまざまなかかるリンカーがなじみのあるものである（例えば（ゴルドン（Ｇｏｒｄｏｎ）およびバラシュブラマニアン（Ｂａｌａｓｕｂｒａｍａｎｉａｎ）、１９９９年））を参照のこと）。

【０１７２】

本発明の方法は、化合物のプール（ライブラリまたはレパートリ）内で所望の要領で標的の活性を変調させる化合物の同定を可能にする。

【０１７３】

極めて好ましい用途において、本発明の方法は、化合物のレパートリまたはライブラリをスクリーニングするために有用である。従って本発明は、化合物が化合物ライブラリから同定される、本発明の以上の態様に従った方法を提供する。

【０１７４】

本発明に従って同定された化合物は、有利には、診断および治療的利用分野に適した細胞間情報伝達機序といったような生体系の活性化剤または阻害物質を含めた、薬理学的または工業的に有利なものである。さらに、本発明に従って同定される化合物は、非生物学的な性質のものであり得る。従って、好ましい態様においては、本発明は臨床的または工業的に有用な生成物の同定を可能にする。本発明のさらなる態様においては、本発明の方法によって単離された場合の生成物が提供されている。

【０１７５】

適切なカプセル化条件の選択が望まれる。スクリーニングすべき化合物ライブラリの複雑性およびサイズに応じて、１マイクロカプセルあたり１個以下の二次化合物が形成されるような形で、カプセル化手順を調整することが有益であり得る。こうして、最大の分解力が得られる。しかしながら、ライブラリがさらに大きくかつ／またはより複雑である場合、これは実践不可能であり得る。いくつかの二次化合物を合わせて形成し、所望の化合物を同定するのに本発明の方法の反復的適用に依存することが好ましいかもしれない。所望の化合物を同定するために、カプセル化手順の組合せを使用することができる。

【０１７６】

理論的研究によると、作り出された化合物の数が多くなればなるほど、所望の特性をもつ化合物が作り出される確率がより高くなることがわかっている（これがどのようにして抗体レパートリにもあてはまるかの説明については、（ペレルソン（Ｐｅｒｅｌｓｏｎ）およびオステル（Ｏｓｔｅｒ）、１９７９年）を参照のこと）。大きいファージ－抗体レパートリの方が実際に、小さいレパートリに比べより優れた結合親和力をもつより多くの抗体を生み出すということも実践的に確認されてきた（グリフィスら、１９９４年）。希少な変異体が生成されかくして同定され得ることを保証するためには、大きいライブラリサイズが望ましい。かくして最適な程に小さいマイクロカプセルの使用が有益である。

【０１７７】

これまで体積１ｎｌのスポットの２次元マイクロアレイを用いて単一の実験でスクリーニングされ得る最大のレパートリは、最高10^3である（ハーゲンローザーら、２０００年）。本発明を用いると、２．６ｍｍのマイクロカプセル直径で（タウフィークおよびグリフィス、１９９８年）、３次元分散を形成することにより、２０ｍｌのエマルジョン中の１ｍｌの水相を用いて少なくとも10^{11}のレパートリサイズをスクリーニングすることができる。

【０１７８】

以上で記述した化合物、または化合物でコーティングされたマイクロビーズに加えて、本発明に従ったマイクロカプセルは、スクリーニングプロセスを行なうのに必要とされるさらなるコンポーネントを含むことになる。これらは、標的および適切な緩衝液を含むことになる。適切な緩衝液は、生体システムの所望のコンポーネントの全てが活性である緩衝液であり、従って、各々の特定的反応システムの必要条件によって左右されることになる。生物学的および／または化学的反応に適した緩衝液は、当該技術分野において既知であり、製法は（（サンブルックおよびラッセル（Ｒｕｓｓｅｌｌ）、２００１年））といったようなさまざまな実験室教本の中で提供されている。

【０１７９】

該システムのその他のコンポーネントは、標的の活性を検定するのに必要なものを含んでいる。これらは、例えば、標的を触媒とする反応のための基質および共同因子および標的により結合されたリガンドを含み得る。これらは又、検出すべき標的の活性を許容する標的の活性にカップリングされた反応のためのその他の触媒（酵素を含む）、基質および補因子をも含み得る。

【０１８０】

（Ｂ）　スクリーニング手順

標的に結合するかまたはその活性を変調させる化合物をスクリーニングするために、１つ以上の化合物または化合物でコーティングされたマイクロビーズと共にマイクロカプセルに標的を区画化する。有利には、各々のマイクロカプセルは単一種の二次化合物のみ、ただしその数多くのコピーを含んでいる。有利には、各々のマイクロビーズは単一種の化合物のみ、ただしその数多くのコピーでコーティングされている。有利には、化合物は、開裂可能なリンカーを介してマイクロビーズに連結され、それらが区画内でマイクロビーズから放出され得るようにしている。有利には、各々のマイクロカプセルまたはマイクロビーズは、マイクロカプセル内の含まれたまたはマイクロビーズに付着した化合物の同定を可能にするべく、光学的にタグ付けされている。

【０１８１】

（ｉ）　結合についてのスクリーニング

標的に対する結合について、直接化合物をスクリーニングすることができる。この実施形態においては、該化合物がマイクロビーズに付着されかつ標的に対する親和性を有する場合、それは標的による結合を受けることになる。反応の終りで、全てのマイクロカプセルは組合わされ、全てのマイクロビーズは１つの環境内で一緒にプールされる。標的に特異的に結合するかまたは標的と特異的に反応する分子を用いた親和性精製により、所望の結合を示す化合物を担持するマイクロビーズを選択することができる。

【０１８２】

一変形実施形態においては、当業者にとってなじみ深いさまざまな手段により、マイクロビーズに標的を付着させることができる（例えば（ハーマンソン、１９９６年）を参照のこと）。スクリーニングすべき化合物は、共通の特徴つまり１つのタグを含有する。化合物はマイクロビーズから放出され、該化合物が標的に対する親和性を有する場合、それはその標的に結合することになる。反応の終りで、全てのマイクロカプセルは組合わされ、全てのマイクロビーズは１つの環境内で一緒にプールされる。「タグ」に特異的に結合するかまたは「タグ」と特異的に反応する分子を用いた親和性精製により、所望の結合を示す化合物を担持するマイクロビーズを、選択することができる。

【０１８３】

一変形実施形態においては、標的に結合する該化合物が例えばさらなる結合パートナーからのリガンドを隠しているにすぎないということを基礎として、マイクロビーズをスクリーニングし得る。このような場合には、マイクロビーズは、親和性精製段階中保持されるのではなくむしろ、その他のマイクロビーズが結合されている間に選択的に溶出され得る。

【０１８４】

親和性による選別は、結合が発生し得るような条件下での結合対の２つの成員の存在により左右される。この目的で、任意の結合対を使用することができる。本明細書に使用されている結合対という用語は、互いに対し結合する能力をもつ任意の分子対を意味する。本発明において使用可能な結合対の例としては、抗原およびそれと結合する能力をもつ抗体またはそのフラグメント、ビオチン－アビジン／ストレプトアビジン対（サヴェージ（Ｓａｖａｇｅ）ら、１９９４年）、カルシウム依存性結合ポリペプチドとそのリガンド（例えばカルモジュリンおよびカルモジュリン結合ペプチド（モンティジアーニ（Ｍｏｎｔｉｇｉａｎｉ）ら、１９９６年；ストフコ（Ｓｔｏｆｋｏ）ら、１９９２年）、結果としてロイシンジッパーを形成するポリペプチド対（トリペット（Ｔｒｉｐｅｔ）ら、１９９６年）、ヒスチジン（標準的にはヘキサヒスチジンペプチド）とキレート化されたCu^{2+}、Zn^{2+}およびNi^{2+}（例えばＮｉ－ＮＴＡ；（ホフーリ（Ｈｏｃｈｕｌｉ）ら、１９８７年）、ジンクフィンガーモチーフを含むもの（クリュッグ（Ｋｌｕｇ）およびシュワブ（Ｓｃｈｗａｂｅ）、１９９５年）およびＤＮＡメチルトランスフェラーゼ（アンダーソン、１９９３年）を含めたＲＮＡ結合およびＤＮＡ結合タンパク質（クリュグ、１９９５年）、およびそれらの核酸結合部位、が含まれる。

【０１８５】

一変形実施形態においては、マイクロカプセルまたはマイクロビーズの光学特性の変化を用いて標的に対する結合について化合物をスクリーニングすることができる。

【０１８６】

その標的に対する化合物の結合の後のマイクロカプセルまたはマイクロビーズの光学特性の変化は、次のものを含めたさまざまな方法で誘発可能である：

（１）　化合物自体は、例えば蛍光性であるといった独特の光学特性を有する可能性がある。

（２）　例えば化合物の蛍光を結合時点で消光または増強させるといったように、標的に対する結合時点で化合物の光学特性を修飾させることができる（ヴォス（Ｖｏｓｓ）、１９９３年；増井および倉光、１９９８年）。

（３）　例えば標的の蛍光を結合時点で消光または増強させるといったように、化合物の結合時点で、標的の光学特性を修飾させることができる（ギシェ（Ｇｕｉｘｅ）ら、１９９８年；キー（Ｑｉ）およびグラボウスキー（Ｇｒａｂｏｗｓｋｉ）、１９９８年）。

（４）　例えば標的から化合物（またはその逆）への蛍光共鳴エネルギー転移（ＦＲＥＴ）が存在する可能性があり、その結果として励起が「ドナー」吸収波長にある場合「アクセプタ」発光波長での発光をもたらすといったように、結合時点で標的および化合物の両方の光学特性を修飾させる（ハイム（Ｈｅｉｍ）およびツィン（Ｔｓｉｅｎ）、１９９６年；マハヤン（Ｍａｈａｊａｎ）ら、１９９８年；宮脇ら、１９９７年）。

【０１８７】

本発明は、所望の活性をもつ化合物がマイクロカプセルの光学特性の変化を誘発し、化合物を含むマイクロカプセルおよびその中に含まれているマイクロビーズを同定し任意には選別できるようにする方法を提供している。

【０１８８】

一変形実施形態においては、本発明は、１つ以上の共通の区画内へのマイクロカプセルのプールの後にマイクロビーズが分析される方法を提供している。この実施形態においては、所望の活性を有する化合物は、それを担持した（そして同じマイクロカプセル内に常在する）マイクロビーズの光学特性を修飾して、それを同定しかつ任意には選別できるようにする。

【０１８９】

この実施形態においては、標的に対する化合物の結合が、光学特性の変化を直接誘発することは必要ではない。

【０１９０】

この実施形態においては、マイクロビーズに付着された化合物が標的に対する親和性を有する場合、それは標的による結合を受けることになる。反応の終りで、全てのマイクロカプセルは組合わされ、全てのマイクロビーズは１つの環境内で一緒にプールされる。標的に対し特異的に結合するかまたは標的と特異的に反応しかくしてマイクロビーズの光学特性の変化を誘発してその同定を可能にする試薬を添加することによって、所望の結合を示す化合物を担持するマイクロビーズを同定することができる。例えば、蛍光標識された抗標的抗体、または抗標的抗体とそれに続く第２の蛍光標識された抗体、のうち最初に結合するものを使用することができる。

【０１９１】

一変形実施形態においては、当業者にとってなじみ深いさまざまな手段により、マイクロビーズに標的を付着させることができる（例えば（ハーマンソン、１９９６年）を参照のこと）。スクリーニングすべき化合物は、共通の特徴つまり１つのタグを含有する。化合物はマイクロビーズから放出され、該化合物が標的に対する親和性を有する場合、それはその標的に結合することになる。反応の終りで、全てのマイクロカプセルは組合わされ、全てのマイクロビーズは１つの環境内で一緒にプールされる。「タグ」に対し特異的に結合するかまたは「タグ」と特異的に反応しかくしてマイクロビーズの光学特性の変化を誘発してその同定を可能にする試薬を添加することによって、所望の結合を示す化合物を担持するマイクロビーズを同定することができる。例えば、蛍光標識された抗「タグ」抗体、または抗「タグ」抗体とそれに続く第２の蛍光標識された抗体、のうち最初に結合するものを使用することができる。

【０１９２】

一変形実施形態においては、リガンドに結合する遺伝子産物が、そうでなければマイクロビーズの光学特性を修飾すると思われるさらなる結合パートナーなどからリガンドを単に隠しているにすぎないということに基づいて、マイクロビーズを同定することができる。この場合、未修飾の光学特性を伴うマイクロビーズが選択されると思われる。

【０１９３】

マイクロビーズを蛍光性にするため、チラミドシグナル増幅（ＴＳＡ(商標)）を用いることにより蛍光を増強することができる（（セップら、２００２年）。これには、マイクロビーズに結合しかつフルオレセインから後にマイクロビーズと（局所的に）反応する遊離ラジカル形態への転換の触媒として作用する（もう１つの化合物に連結された）ペルオキシダーゼが関与する。ＴＳＡを実施するための方法は、当該技術分野において既知であり、キットはＮＥＮから市販されている。

【０１９４】

ＴＳＡは、それが結果としてマイクロビーズの蛍光の直接的増加をもたらすような形で、または第２の蛍光分子または蛍光性である１つ以上の一連の分子により結合されるマイクロビーズにリガンドが付着されるような形で、構成され得る。

【０１９５】

（ｉｉ）　結合調節についてのスクリーニング

一変形実施形態においては、生化学プロセスを調節するように作用する化合物をスクリーニングするために本発明を使用することができる。化合物が標的の結合活性を活性化する場合、活性化される標的についてのリガンドを、当業者にとってなじみの深いさまざまな手段によりマイクロビーズに付着させることができる（例えば（ハーマンソン、１９９６年）を参照のこと）。反応の終りで、全てのマイクロカプセルは組合わされ、全てのマイクロビーズは１つの環境内で一緒にプールされる。所望の結合を示す化合物を担持するマイクロビーズを、標的に対し特異的に結合するかまたは標的と特異的に反応する分子を用いて親和性精製により選択することができる。

【０１９６】

一変形実施形態においては、マイクロビーズは、化合物が標的の結合活性を阻害するということに基づいてスクリーニングされ得る。このような考えられる事態において、マイクロビーズは、親和性精製段階中保持されるのではなくむしろ、その他のマイクロビーズが結合されている間に選択的に溶出され得る。

【０１９７】

一変形実施形態においては、マイクロカプセルまたはマイクロビーズの光学特性の変化を用いて標的の結合活性を変調させる能力についてスクリーニングされ得る。

【０１９８】

そのリガンドに対する標的の結合の後のマイクロカプセルまたはマイクロビーズの光学特性の変化は、次のものを含めたさまざまな方法で誘発可能である：

（１）　リガンド自体は、独特の光学特性を有する可能性がある、例えば蛍光性である。

（２）　標的に対する結合時点でリガンドの光学特性を修飾させることができる、例えばリガンドの蛍光を結合時点で消光または増強させる（ヴォス（Ｖｏｓｓ）、１９９３年；増井（Ｍａｓｕｉ）および倉光、１９９８年）。

（３）　リガンドの結合時点で、標的の光学特性を修飾させることができる、例えば標的の蛍光を結合時点で消光または増強させる（ギシェ（Ｇｕｉｘｅ）ら、１９９８年；キー（Ｑｉ）およびグラボウスキー（Ｇｒａｂｏｗｓｋｉ）、１９９８年）。

（４）　結合時点で標的およびリガンドの両方の光学特性を修飾させる、例えば標的からリガンド（またはその逆）への蛍光共鳴エネルギー転移（ＦＲＥＴ）が存在し得、その結果として励起が「ドナー」吸収波長にある場合「アクセプタ」発光波長での発光をもたらす（ハイム（Ｈｅｉｍ）およびツィン（Ｔｓｉｅｎ）、１９９６年；マハヤン（Ｍａｈａｊａｎ）ら、１９９８年；宮脇ら、１９９７年）。

【０１９９】

本発明は、所望の活性をもつ化合物がマイクロカプセルの光学特性の変化を誘発し、化合物を含むマイクロカプセルおよびその中に含まれているマイクロビーズを同定し任意には選別できるようにする方法を提供している。

【０２００】

一変形実施形態においては、本発明は、１つ以上の共通の区画内へのマイクロカプセルのプールの後にマイクロビーズが分析される方法を提供している。この実施形態においては、所望の活性を有する化合物は、それを担持する（そして同じマイクロカプセル内に常在する）マイクロビーズの光学特性を修飾して、それを同定しかつ任意には選別できるようにする。

【０２０１】

この実施形態においては、リガンドに対する標的の結合が、光学特性の変化を直接誘発することは必要ではない。

【０２０２】

この実施形態においては、マイクロビーズに付着されたリガンドが標的に対する親和性を有する場合、それは標的による結合を受けることになる。反応の終りで、全てのマイクロカプセルは組合わされ、全てのマイクロビーズは１つの環境内で一緒にプールされる。標的に対し特異的に結合するかまたは標的と特異的に反応し、かくしてマイクロビーズの

光学特性の変化を誘発してその同定を可能にする試薬を添加することによって、結合活性を変調させる化合物を担持するマイクロビーズを同定することができる。例えば、蛍光標識された抗標的抗体、または抗標的抗体とそれに続く第２の蛍光標識された抗体、のうち最初に結合するものを使用することができる。

【０２０３】

一変形実施形態においては、当業者にとってなじみ深いさまざまな手段により、マイクロビーズに標的を付着させることができる（例えば（（ハーマンソン、１９９６年））を参照のこと）。スクリーニングすべきリガンドは、１つのフィーチャつまり１つのタグを含有する。反応の終りで、全てのマイクロカプセルは組合わされ、全てのマイクロビーズは１つの環境内で一緒にプールされる。「タグ」に対し特異的に結合するかまたは「タグ」と特異的に反応しかくしてマイクロビーズの光学特性の変化を誘発してその同定を可能にする試薬を添加することによって、結合を変調させる化合物を担持するマイクロビーズを同定することができる。例えば、蛍光標識された抗「タグ」抗体、または抗「タグ」抗体とそれに続く第２の蛍光標識された抗体、のうち最初に結合するものを使用することができる。

【０２０４】

上述の通りマイクロビーズを蛍光性にするため、チラミドシグナル増幅（ＴＳＡ(商標)）を用いることにより蛍光を増強することができる（（セップら、２００２年）。

【０２０５】

（ｉｉｉ）　触媒作用の調節についてのスクリーニング

一変形実施形態においては、本発明は所望の活性を有する化合物がマイクロカプセルの光学特性の変化を誘発し、かくして該化合物そして任意にはその中に含まれているマイクロビーズを同定し任意には選別できるようにする方法を提供している。マイクロカプセルの光学特性は、次のいずれかにより修飾可能である：

（ａ）　グリコシダーゼ、ホスファターゼ、ペプチターゼおよびプロテアーゼのための基質を内含する、異なる光学特性をもつ調節された反応の生成物および基質（数多くの蛍光発生酵素基質が市販されている、例えば（ホーグランド（Ｈａｕｇｌａｎｄ）、１９９６年およびｗｗｗ．ｐｒｏｂｅｓ．ｃｏｍ）を参照のこと）、または

（ｂ）　マイクロカプセル内の調節された反応の生成物（または基質）に対し特異的に結合するかまたはそれと特異的に反応し、かくしてマイクロカプセルの光学特性の変化を誘発しその同定を可能にする試薬の存在。

【０２０６】

標的の活性を変調させる化合物について化合物ライブラリをスクリーニングするための広範囲の検定が、光学特性の変化の検出に基づいており、本発明に従って化合物をスクリーニングするために使用可能である。かかる検定は、当業者にとって周知のものである（例えばホーグランド、１９９６年およびｗｗｗ．ｐｒｏｂｅｓ．ｃｏｍを参照のこと）。

【０２０７】

代替的には、同じマイクロカプセル内で発生する後続する反応に対し第１の反応をカップリングさせることによって、選択を間接的に実施することができる。これを実施し得る一般的に２つある。まず最初に、第１の反応の生成物を、第１の反応の基質と反応しない分子と反応させるかまたはこれにより結合させることができる。第２のカップリング反応は、第１の反応の生成物の存在下でのみ進行することになる。このとき、第２の反応の該生成物または基質の特性によって調節化合物を同定することができる。

【０２０８】

代替的には、選択対象の反応の生成物は、第２の酵素触媒反応のための基質または補因子であり得る。第２の反応を触媒するための酵素は、マイクロカプセル化に先立ち反応混合物の中に取り込まれ得る。第１の反応が進行している場合にのみ、カップリングされた酵素は同定可能な生成物を生成することになる。

【０２０９】

このカップリングの概念を練り上げて、各々以前の反応の生成物を基質として使用する

多数の酵素を取込むことができる。こうして、固定化された基質と反応しない酵素の調節因子の選択が可能になる。１つの反応の生成物が選択可能な生成物を導く第２の反応または一連の反応のための触媒または補因子である場合、シグナル増幅により増大した感応性を与えるように、それを設計することも又可能である（例えば、（ヨハンソン（Ｊｏｈａｎｎｓｓｏｎ）、１９９１年；ヨハンソンおよびベイツ（Ｂａｔｅｓ）、１９８８年）を参照のこと）。さらに、酵素カスケードシステムは、１酵素のための活性化物質の産生または酵素阻害物質の破壊に基づくものであり得る（（マイズ（Ｍｉｚｅ）ら、１９８９年）参照）。カップリングは同様に、同じ生成物を生成する酵素の一群全体について共通の１つのスクリーニングシステムを使用することができるという利点も有しており、複雑な多段階化学変換および経路の調節選択を可能にする。

【０２１０】

一変形実施形態においては、標的自体が酵素であるか、または酵素的である生化学プロセスを調節する場合、各々のマイクロカプセル内のマイクロビーズは、酵素反応のための基質でコーティングされてもよい。調節化合物は、基質が生成物へと転換される程度を判定することになる。反応の終りで、マイクロビーズは物理的に触媒反応の生成物に連結される。マイクロカプセルが組合わされ、反応物質がプールされた時点で、活性化剤化合物のコーティングを受けたマイクロビーズは、生成物に特異的ないずれかの特性によって同定され得る。阻害物質が望まれる場合、選択は、１つの化学的特性について、調節対象反応の基質に特異的であり得る。

【０２１１】

一部のケースでは、基質がマイクロビーズに付着されないことも望ましい可能性がある。この場合、基質は、（例えば「ケージド（ｃａｇｅｄ）」ビオチン類似体の（ピアラング（Ｐｉｒｒｕｎｇ）およびホアン（Ｈｕａｎｇ）、１９９６年；サンドバーグ（Ｓｕｎｄｂｅｒｇ）ら、１９９５年）光活性化などのようなそれを活性化するさらなる工程を必要とする不活性「タグ」を含有すると思われる。基質が生成物に転換した後、「タグ」は活性化され、タグ結合分子（例えばアビシンまたはストレプトアビジン）により結合された「タグ付けされた」基質および／または生成物はマイクロビーズに付着される。従って「タグ」を介して核酸に付着された生成物に対する基質の比は、溶解状態の基質および生成物の比を反映することになる。「ケージド」ビオチンでタグ付けされた基質が、マイクロカプセル内の区画化に基づく手順を用いてホスホトリエステラーゼ活性をもつ酵素をコード化する遺伝子について選択を行なうために使用されてきた（グリフィスおよびタウフィーク、２００３年）。ホスホトリエステラーゼ基質は活性酵素分子を含むマイクロカプセル内で溶解状態で加水分解され、反応が完了した時点で、その酵素をコード化する遺伝子が付着したマイクロビーズに対しビオチン部分を介して生成物が結合できるようにするため、ケージング基を照射により放出させた。

【０２１２】

マイクロカプセルの中味およびマイクロビーズが組合せられた後、調節因子でコーティングされたこれらのマイクロビーズは、適宜生成物または基質に対し特異的に結合する分子（例えば抗体）を用いて親和性精製により選択可能である。

【０２１３】

一変形実施形態において、本発明は、１つ以上の共通区画内にマイクロカプセルをプールした後マイクロビーズが分析される方法を提供している。調節因子化合物でコーティングされたマイクロビーズは、マイクロビーズの光学特性の変化を用いて同定可能である。生成物（または基質）が付着した状態でのマイクロビーズの光学特性は、以下のいずれかにより修飾可能である：

（１）　例えば

（ａ）　グリコシダーゼ、ホスファターゼ、ペプチターゼおよびプロテアーゼのための基質を含む異なる光学特性をもつ基質および生成物（数多くの蛍光発生酵素基質が市販されている（例えばホーグランド、１９９６年およびｗｗｗ．ｐｒｏｂｅｓ．ｃｏｍ参照）または

（ｂ）　類似の光学特性を有するものの、基質ではなく生成物のみがマイクロビーズに結合するかまたはこれと反応する、基質および生成物、
に起因して、基質－マイクロビーズ複合体の中には見られない特徴的光学特性を有する生成物－マイクロビーズ複合体、かまたは
（２）　生成物（基質）に対し特異的に結合するかまたはそれと特異的に反応しかくしてその同定を可能にするマイクロビーズの光学特性の変化を誘発する試薬を添加すること（マイクロカプセルの破壊およびマイクロビーズのプールの前後に、これらの試薬を添加できる）。試薬は、
（ａ）　基質および生成物の両方がマイクロビーズに付着している場合、生成物に対し特異的に結合するかまたはそれと特異的に反応するが、基質とはしない（またはその逆）
（ｂ）　生成分のみがマイクロビーズに結合するかまたはこれと反応する場合、任意には基質と生成物の両方に結合する（またはその逆）。
【０２１４】
この筋書きでは、基質（または複数の基質の１つ）は、マイクロビーズに連結されていない各々のマイクロカプセル内に存在し得るものの、分子「タグ」（例えばビオチン、ＤＩＧまたはＤＮＰまたは蛍光基）を有する。調節された酵素が基質を生成物に転換させた場合、該生成物は「タグ」を保持し、次に生成物特異的抗体によりマイクロカプセル内に捕捉される。全ての反応が停止されマイクロカプセルが組合せられた時点で、これらのマイクロビーズは「タグ付け」されることになり、かつ、「タグ」が蛍光基であった場合には、すでに光学特性を変化させているかもしれない。代替的には、「タグ付けされた」マイクロビーズの光学特性の変化は、「タグ」を結合させる蛍光標識されたリガンドを添加することによって誘発可能である（例えば、蛍光標識されたアビジン／ストレプトアビジン、蛍光性である抗「タグ」抗体、または第２の蛍光標識された抗体により検出され得る非蛍光性抗「タグ」抗体）。
【０２１５】
（ｉｖ）　化合物特異性／選択性についてのスクリーニング
ある種の標的について特異性および選択性を有するもののその他については有していない化合物は、１つの基質を用いた反応の調節のための正のスクリーンおよびもう１つの基質との反応の調節のための負のスクリーンを実施することにより、特異的に同定可能である。例えば、２つの異なる標的酵素に特異的な２つの基質が、各々異なる蛍光発生部分で標識される。各々の標的酵素は、２つの標的のための化合物の特異性に応じてマイクロカプセルの異なる光学特性を結果としてもたらす異なる蛍光スペクトルをもつ生成物の生成の触媒として作用する。
【０２１６】
（ｖ）　細胞を用いたスクリーニング
現行の薬物発見パラダイムにおいては、有効な組換え型標的がインビトロの高速大量処理スクリーニング（ＨＴＳ）検定の基礎を成している。しかしながら単離されたタンパク質を、複雑な生体系を代表するものとみなすことはできない。従って、細胞ベースの系は、無傷の生体系の中での化合物活性に対する信頼性を高くすることができる。リード薬物のための広範囲の細胞ベースの検定が当業者にとって既知である。油中水型エマルジョンの微水滴といったようなマイクロカプセルに、細胞を区画化することができる（ガデシー（Ｇｈａｄｅｓｓｙ）、２００１年）。標的に対する化合物の効果は、化合物と共にマイクロカプセルに細胞を区画化し、細胞に対する所望の効果をもつ化合物を含むこれらの区画を同定するために適切な細胞ベースの検定を用いることにより、判定可能である。フッ化炭素中水型エマルジョンの使用が特に有用であり得る。フッ化炭素の高いガス溶解能力は、呼吸ガスの交換を支援することができ、又、細胞培養系にとって有益であることが報告されている（ルーヴ（Ｌｏｗｅ）、２００２年）。
【０２１７】
（ｖｉ）　フローサイトメトリー
（ｖｉ）　フロー分析および選別

本発明の好ましい実施形態においては、マイクロカプセルまたはマイクロビーズは、フローサイトメトリーにより分析され、任意には選別される。マイクロカプセルの数多くのフォーマットがフローサイトメトリーを用いて分析され、任意には直接選別される。

【０２１８】

きわめて好ましい実施形態においては、マイクロ液滴およびマイクロビーズのフロー分析および任意にはフロー選別（フー、２００２年）のためのマイクロ流体選別装置が使用されることになる。

【０２１９】

分析のために、および選別を始動させるために、光散乱（ケルカー、１９８３年）および蛍光偏光（ローランドら、１９８５年）を含めたさまざまな光学特性を使用することができる。きわめて好ましい実施形態においては、マイクロカプセルまたはマイクロビーズの光学特性の差異は蛍光の差異となり、必要な場合には、マイクロ流体または従来の蛍光活性化細胞選別装置（ノーマン（Ｎｏｒｍａｎ）、１９８０年；マッケンジー（Ｍａｃｋｅｎｚｉｅ）およびピンダー（Ｐｉｎｄｅｒ）、１９８６年）または類似のデバイスを用いて、マイクロカプセルまたはマイクロビーズが選別されることになる。フローサイトメトリーには以下のような一連の利点がある：

（１）　定評のあるメーカー（例えばベクトン・ディッキンソン（Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）、カルター（Ｃｏｕｌｔｅｒ）、サイトメーション（Ｃｙｔｏｍａｔｉｏｎ））製の蛍光活性化細胞選別装置は、毎秒最高１００，０００個のマイクロカプセルまたはマイクロビーズの速度での分析および選別を可能にする。

（２）　各々のマイクロカプセルまたはマイクロビーズからの蛍光シグナルは、存在する蛍光分子の数に密に対応する。マイクロカプセルまたはマイクロビーズ１個あたり数百個の蛍光分子という少量の分子を定量的に検出することができる。

（３）　蛍光検出器の広いダイナミックレンジ（標準的に４ｌｏｇ単位）は、選別手順のストリンジェンシーを容易に設定できるようにし、かくして出発プールからの最適な数のマイクロカプセルまたはマイクロビーズの回収が可能となる（実施中の選択に応じて小さい蛍光差をもつマイクロカプセルまたはマイクロビーズを分離するかまたは大きな蛍光差をもつマイクロカプセルまたはマイクロビーズのみを分離するようにゲートを設定できる）。

（４）　蛍光活性化細胞選別装置は、多数の波長で同時励起および検出を実施することができ（シャピロ（Ｓｈａｐｉｒｏ）、１９９５年）、２～１３個（またはそれ以上）の蛍光マーカーでのマイクロカプセルまたはマイクロビーズの標識を監視することにより正および負の選択を実施できるようにする。例えば、２つの交番標的のための基質が異なる蛍光タグで標識される場合、マイクロカプセルまたはマイクロビーズを、調節対象標的に応じて異なる蛍光プローブで標識することができる。

【０２２０】

マイクロカプセルまたはマイクロビーズが光学的にタグ付けされている場合、フローサイトメトリーを使用してマイクロカプセル内のまたはマイクロビーズ上にコーティングされた化合物を同定することができる（以下参照）。光学タグ付けは同様に、マイクロカプセル内の化合物の濃度（複数の濃度が単一の実験内で使用されている場合）またはマイクロビーズ上にコーティングされた化合物分子の数（２つ以上のコーティング密度が単一の実験内で使用される場合）を同定するためにも使用可能である。さらに、光学タグ付けを使用してマイクロカプセル内の標的を同定することもできる（２つ以上の標的が単一の実験内で使用される場合）。この分析は、測定活動と同時に、マイクロビーズを含むマイクロカプセルの選別の後、またはマイクロビーズの選別の後に実施可能である。

【０２２１】

（ｖｉｉ）　マイクロカプセルの同定および選別

本発明は、利用中の選別技術によりそれが可能となっている場合には、無傷のマイクロカプセルの同定そして任意にはその選別を提供する。所望の化合物によって誘発された変化がマイクロカプセルの表面で発生するかまたは現われるかまたはマイクロカプセルの外

側から検出可能である場合、マイクロカプセルを同定し、任意にそのように選別することができる。変化は、化合物の直接的作用によってひき起こされてもよいし、または、所望の活性をもつ化合物がそのうちの１つに関与している一連の反応がその変化を導く間接的作用によってひき起こされてもよい。例えば、マイクロカプセルが膜形成性マイクロカプセルである場合、そのマイクロカプセルは、標的を含む生化学系のコンポーネントがその表面で表示され、かくしてマイクロカプセル内部のマイクロビーズ上の化合物によって調節される生化学系の中の変化を検出し得る試薬にアクセス可能であるような形で構成され得る。

【０２２２】

しかしながら、本発明の好ましい態様においては、マイクロカプセルの同定そして任意には選別は、該マイクロカプセルの光学特性の変化、例えばその吸収または発光特性、例えば該マイクロカプセルに付随する吸収、発光、リン光または蛍光の変化を導く反応の結果もたらされるマイクロカプセルの光学特性の改変に依存している。かかる特性は全て、「光学特性」という用語の中に含まれている。このような場合、マイクロカプセルを、発光、蛍光またはリン光活性化選別により同定しかつ任意には選別することができる。きわめて好ましい実施形態においては、マイクロカプセル内の蛍光分子の産生を結果としてもたらす所望の活性を有する化合物を含むマイクロカプセルを分析しかつ任意には選別するために、フローサイトメトリーを利用することができる。

【０２２３】

本発明の方法は、試薬を迅速に混合させることができ（２ｍｓ未満で）、従ってマイクロ流体ネットワーク内のマイクロカプセルの空間的に分解された光学画像が、各マイクロカプセル内の反応の時間分解測定を可能にする。マイクロカプセルは任意には、それが含む分子の回収およびさらなる分析または操作を可能にするため、マイクロ流体フロー選別装置を用いて分離可能である。有利には、フロー選別装置は電子的フロー選別デバイスであると思われる。かかる選別装置デバイスは、マイクロ流体デバイス上に直接一体化され得、かつ、マイクロカプセルを選別するために電子手段を使用することができる。同様にマイクロ流体デバイス上に直接組込まれた光学検出を用いてマイクロカプセルをスクリーニングし、選別を始動させることができる。電荷に加えて、マイクロカプセルを制御するその他の手段も同様に、マイクロ流体デバイス上に内蔵することができる。

【０２２４】

一変形実施形態においては、マイクロカプセル蛍光中の電荷が同定された場合、それは区画内部のマイクロビーズの修飾をひき起こすために使用される。本発明の好ましい態様においては、マイクロカプセルの同定は、マイクロカプセル内部の発光、リン光または蛍光を導く反応の結果としてもたらされるマイクロカプセルの光学特性の変化に依存している。マイクロカプセル内部のマイクロビーズの修飾は、発光、リン光または蛍光の同定によりひき起こされるものと思われる。例えば、発光、リン光および蛍光の同定が、光子（またはその他の粒子または波動）での区画のボンバードをひき起こし、これが、マイクロビーズまたはそれに付着した分子の修飾を導く。細胞の高速選別のための類似の手順が以前に記述されている（ケイジ（Ｋｅｉｊ）ら、１９９４年）。マイクロビーズの修飾は例えば、マイクロビーズに対し感光性保護基によりケージングされた分子「タグ」をカップリングさせることによってもたらされ得る。適当な波長の光子でのボンバードは、ケージの除去を導く。その後、全てのマイクロカプセルは組合わされ、マイクロビーズは１つの環境の中に一緒にプールされる。所望の活性を示す化合物でコーティングされたマイクロビーズを、「タグ」に対し特異的に結合するかまたはそれと特異的に反応する分子を用いて親和性精製により選択することができる。

【０２２５】

（Ｃ）　化合物ライブラリ

（ｉ）　一次化合物ライブラリ

一次化合物ライブラリをさまざまな商業的供給源から得ることができる。ライブラリ内の化合物は、当業者にとって周知のさまざまな手段により作ることができる。任意には、

１ビーズ－１化合物ライブラリを生成するべく、空間分解された並行合成または分割合成を用いて、組合せ合成により化合物ライブラリを作ることができる。該化合物は任意にはビーズ上で合成可能である。これらのビーズは、マイクロカプセルに直接区画化され得、そうでなければ化合物は区画化の前に放出される。

【０２２６】

有利には、単一タイプの化合物のみ（ただしその多重コピー）が各々のマイクロカプセル内に存在する。

【０２２７】

化合物は、任意には、当業者にとってなじみの深いものとなるさまざまな手段によって共有結合的または非共有結合的のいずれの形ででもマイクロビーズに連結され得る（例えば（ハーマンソン、１９９６年）を参照のこと）。

【０２２８】

マイクロビーズは、疎水性表面（例えばプレーンポリスチレン）から、アルデヒド、脂肪族アミン、アミド、芳香族アミン、カルボン酸、クロロメチル、エポキシ、ヒドラジド、ヒドロキシル、スルホナートおよびトシルといった多種多様な表面官能基により付与される非常に親水性の高い表面に至るまで、さまざまな表面化学を伴って入手可能である。官能基は、マイクロビーズ表面に対する化合物の安定したまたは可逆的な付着のため、当業者にとって周知である広範囲の共有結合によるカップリング反応を可能にする。

【０２２９】

有利には、化合物は、開裂可能なリンカーを介してマイクロビーズに付着される。ｐＨを変えることにより（例えばイミンおよびアシルヒドラゾン）、酸化－還元特性を調整することにより（例えばジスルフィド）または外部触媒を使用して（例えばクロス・メタセシスおよびアミノ基転移）制御可能である可逆的共有結合および光化学的に開裂され得るリンカーを含め、さまざまなこのようなリンカーが当業者にとってなじみの深いものである（例えばゴルドンおよびバラシュブラマニアン、１９９９年参照）。

【０２３０】

有利には、単一のタイプの化合物のみ（ただしその多重コピー）が各ビーズに付着される。

【０２３１】

（ｉｉ）二次化合物ライブラリ

二次化合物ライブラリは、マイクロカプセル内での一次化合物間の反応によって作り上げられる。さまざまな２つの化合物および当業者にとって周知の多成分反応により、二次化合物を作り上げることができる（アームストロング（Ａｒｍｓｔｒｏｎｇ）ら、１９９６年；デームリング（Ｄｏｍｌｉｎｇ）、２００２年；デームリングおよびウギ（Ｕｇｉ）、２０００年；ラムストーム（Ｒａｍｓｔｒｏｍ）およびレーン（Ｌｅｈｎ）、２００２年）。

【０２３２】

２成分反応により二次化合物ライブラリを形成するためには、多くの区画が２つ以上の化合物を含むような形で、マイクロカプセルに２つの化合物セットが区画化される。有利には、１マイクロカプセルあたりの化合物モード数は２である。有利には、マイクロカプセルは、各々の化合物セットからの少なくとも１つのタイプの化合物を含む。有利には、マイクロカプセルは、各々の化合物セットからの１つのタイプの化合物を含む。二次化合物は、異なるセットからの一次化合物間の化学反応によって形成される。二次化合物は、一次化合物間の共有結合または非共有結合反応の結果であり得る。

【０２３３】

当業者にとってなじみの深いさまざまな化学反応が、２成分反応において二次化合物を形成するのに適している。例えば、ｐＨを変更することによって（例えばイミンおよびアシルヒドラゾン）、酸化－還元特性を調整することによって（例えばジスルフィド）または外部触媒を使用することによって（例えばクロスメタセシスおよびアミノ基転移）制御可能な可逆的共有結合を使用することができる（ラムストームおよびレーン、２００２年

）。

【０２３４】

さらなる実施形態においては、３成分、４成分およびより高次の多成分反応を用いて、二次化合物ライブラリを作るために本方法を使用することもできる。３、４またはそれ以上の化合物セット（該当する場合）がマイクロカプセルに区画化される。化合物は、数多くの区画が多数の化合物を含むような形で、マイクロカプセルに区画化される。有利には、１マイクロカプセルあたりの化合物のモード数は、反応中の成分の数に等しい。有利には、マイクロカプセルは、各々の化合物セットからの１つのタイプの化合物を含む。有利には、マイクロカプセルは、各々の化合物セットからの１つのタイプの化合物を含む。二次化合物は、異なるセットからの一次化合物間の化学反応によって形成される。二次化合物は、一次化合物間の共有結合または非共有結合反応の結果であり得る。

【０２３５】

適切な多成分反応の例は、ストレッカー（Ｓｔｒｅｃｋｅｒ）、ハンツシュ（Ｈａｎｔｚｓｃｈ）、ビジネリ（Ｂｉｇｉｎｅｌｌｉ）、マニッヒ（Ｍａｎｎｉｃｈ）、パセリニ（Ｐａｓｓｅｒｉｎｉ）、ブヒャラー・ベルグ（Ｂｕｃｈｅｒｅｒ－Ｂｅｒｇｓ）およびポーソン・カンド（Ｐａｕｓｏｎ－Ｋｈａｎｄ）の３成分反応およびウギの４成分反応（アームストロングら、１９９６年；デームリング、２００２年；デームリングおよびウギ、２０００年）である。

【０２３６】

全ての二次化合物に共通の骨格分子を用いて二次化合物ライブラリを構築することもできる（ラムストームおよびレーン、２００２年）。この骨格分子は、その他の一次化合物と共にマイクロカプセルに区画化され得る。

【０２３７】

さらなる実施形態においては、２成分反応により二次化合物ライブラリを形成するために、有利には１マイクロビーズ毎に単一タイプの分子のみを提供するべく、マイクロビーズに２つの化合物セットが付着させられる。マイクロビーズは、多くの区画が２つ以上の化合物を含むような形でマイクロカプセルに区画化される。有利には１マイクロカプセルあたりのビーズモード数は２である。２つのセットのうちの少なくとも１つを含む化合物がマイクロビーズから放出される。二次化合物は、異なるセットからの一次化合物間の化学反応によって形成される。二次化合物は、一次化合物間の共有結合または非共有結合反応の結果であり得る。

【０２３８】

さらなる実施形態においては、３成分、４成分およびより高次の多成分反応を用いて、二次化合物ライブラリを作るために本方法を使用することもできる。有利には、１マイクロビーズ毎に単一タイプの分子のみを提供するように、３、４またはそれ以上の化合物セット（該当する場合）がマイクロビーズに付着させられる。マイクロビーズは、数多くの区画が多数のマイクロビーズを含むような形で、マイクロカプセルに区画化される。有利には、１マイクロカプセルあたりのビーズのモード数は、反応中の成分の数に等しい。全てまたは１つを除く全てのセットを含む化合物は、マイクロビーズから放出される。二次化合物は、異なるセットからの一次化合物間の化学反応によって形成される。二次化合物は、一次化合物間の共有結合または非共有結合反応の結果であり得る。

【０２３９】

有利には、二次化合物を形成するために使用されるのと同じ可逆的共有結合をマイクロビーズに対し一次化合物をカップリングするために使用することができる。

【０２４０】

全ての二次化合物に共通である骨格分子を用いて、二次化合物ライブラリを構築することもできる（ラムストームおよびレーン、２００２年）。この骨格分子は、マイクロビーズと共にマイクロカプセルに区画化され得る。

【０２４１】

（Ｄ）　化合物の同定

マイクロカプセル内またはマイクロビーズ上の化合物をさまざまな方法で同定することができる。同定されたマイクロカプセルが（例えば蛍光活性化細胞選別装置－ＦＡＣＳを使用することにより）選別される場合、化合物は例えば質量分析などの直接的分析によって同定可能である。化合物が（例えば親和性精製による）選択または（例えばＦＡＣＳを用いた）選別の結果として単離されたビーズに付着した状態にとどまっている場合、それらは、同様に直接的分析例えば質量分析によっても同定され得る。マイクロカプセルまたはビーズは、当業者にとって周知のさまざまな手段および、ビーズに付着した化合物を同定するのに用いられるタグにより、タグ付けすることもできる（セザルニク（Ｃｚａｒｎｉｋ）、１９９７年）。化合物をコード化するための化学的、分光的、電子的および物理的方法が全て使用可能である。好ましい実施形態においては、マイクロカプセルまたはビーズは異なる光学特性を有し、従って光学的にコード化される。好ましい実施形態においては、コード化は、異なる蛍光特性をもつマイクロカプセルまたはビーズに基づいている。きわめて好ましい実施形態においては、マイクロカプセルまたはビーズはその中に異なる濃度で存在する蛍光量子ドットを用いてコード化される（ハン、２００１年）。マイクロ流体チャンネル内を整然とした順序で流れるマイクロカプセルは同様に、マイクロカプセル流内のそれらのシーケンスによっても（全体的にまたは部分的に）コード化され得る（位置的コード化）。

【０２４２】

有利には、各化合物は、異なる濃度（標準的にはｍＭからｎＭまで変動する濃度）で異なるマイクロカプセル内に存在し、用量－応答曲線の生成を可能にする。複数の異なる基質濃度および化合物濃度の考えられる全ての順列を提供するためにマイクロカプセルを融合することにより、阻害様式（例えば競合的、非競合的、未競合的または混合型阻害）および阻害化合物の阻害定数（K_i）の判定が可能になると思われる。マイクロカプセル内の化合物（または基質）の濃度は、例えば、上述の通りのマイクロカプセルまたはマイクロビーズの光学的コード化または位置的コード化によって判定され得る。

【０２４３】

（Ｅ）　標的の同定

有利には、各々のマイクロカプセルが同じ標的の多重コピーを含むような形でマイクロカプセルに多数の異なる標的を区画化することができる。例えば、化合物の特異性を判定できるようにするため、多数のタンパク質キナーゼまたは単独の標的の多数の多型変異体を区画化することができる。マイクロカプセル内の標的の同一性は、例えば上述の通りのマイクロカプセルまたはマイクロビーズの光学的コード化または位置的コード化によって判定され得る。

【０２４４】

代替的な形で表現すると、生化学システムの標的成分に結合するかまたは標的の活性を変調させる化合物の合成および同定方法であって、

（ａ）　数多くの区画が２つ以上の一次化合物を含むように標的と共にマイクロカプセルに２つ以上の一次化合物セットを区画化する工程、

（ｂ）　異なるセットからの一次化合物間の化学反応により、マイクロカプセル内で二次化合物を形成する工程；および

（ｃ）　標的に結合するかまたは標的の活性を変調させる二次化合物を形成するべく反応する一次化合物サブセットを同定する工程、

を含む方法が提供されている。

【０２４５】

同様に、生化学システムの標的成分に結合するかまたは標的の活性を変調させる化合物の合成および同定のための方法であって、

（１）　２つ以上の一次化合物セットをマイクロビーズ上に付着させる工程；

（２）　数多くの区画が２つ以上のマイクロビーズを含むような形で標的と共にマイクロカプセルにマイクロビーズを区画化する工程；

（３）　マイクロビーズから一次化合物を放出する工程；

（４）　異なるセットからの一次化合物間の化学反応によりマイクロカプセル内で二次化合物を形成する工程；および
（５）　標的に結合するかまたは標的の活性を変調させる二次化合物を形成するべく反応する一次化合物のサブセットを同定する工程、
を含む方法も提供されている。

【０２４６】

一次化合物が同じ区画内のその他の一次化合物のみならずその区画内のその他のマイクロビーズとも反応する場合、二次化合物を形成するべく共に反応する一次化合物は、選択または選別の結果として単離されたマイクロビーズ上に存在する化合物の直接的分析により同定可能である。例えば、一次化合物が区画内で放出された時点でジスルフィド結合を介してビーズに連結されている場合、一次化合物は、互いに反応して二次化合物を形成すると同時にビーズ上のスルフィドリル基とも反応することになる。従って、２つのビーズが同時区画化された場合、各ビーズは最終的に両方の一次化合物を担持することになる。これらのビーズの単離後、二次化合物を形成するために反応した両方の一次化合物を同定することができる。

【０２４７】

（Ｆ）　マイクロカプセル内の試薬の高速混合

有利には、マイクロカプセルの融合後、融合されたマイクロカプセルの中に含まれた試薬は、カオス的移流を用いて急速に混合可能である。液滴内部の流体の層流線を分断するチャンネルの中に液滴を通過させることにより、その中味を迅速に混合し、あらゆる化学的反応を完全に開始させることができる。

【０２４８】

（Ｇ）　マイクロカプセル特性の検知

本発明のある態様においては、流体液滴の１つ以上の特性を判定できるようにする形で、流体液滴の１つ以上の特性および／または該流体液滴を含む流体システム（例えば該流体液滴を取り囲む液体）の一部分の１特性を検知および／または判定できるセンサーが提供されている。液滴に関して判定可能でありかつ本発明において使用可能である特性は、当業者が同定可能である。かかる特性の制限的意味の無い例としては、蛍光、質量分析（例えば光学、赤外線、紫外線など）、放射能、質量、体積、密度、温度、粘度、ｐＨ生物学的物質（例えばタンパク質、核酸など）といった均質の濃度、などが含まれる。

【０２４９】

一部のケースでは、該センサーは、プロセッサに接続でき、このプロセッサが今度は、例えば前述の通りに、液滴を選別すること、該液滴に電荷を印加または除去すること、該液滴にもう１つの液滴を融合すること、液滴を分割すること、該液滴内で混合を起こさせることなどにより、流体液滴に対する作業を実施させることができる。例えば、流体液滴のセンサー測定値に応えて、プロセッサは流体液滴を分割させ、第２の流体液滴と併合させ、選別させることなどができる。

【０２５０】

１つ以上のセンサーおよび／またはプロセッサを流体液滴とセンシング通信状態になるよう位置づけすることができる。本明細書で使用する「センシング通信」というのは、流体システム内（例えば１本のチャンネル内）の流体液滴および／または該流体液滴を含む流体システムの一部分が何らかの形で検知および／または判定され得るように、センサーをどこかに位置づけすることができることを意味する。例えば、センサーは、流体液滴および／または流体液滴を含む流体システムの一部分と、流動的に、光学的にまたは視覚的、熱的、空気圧的、電子的といった形でセンシング通信状態にあり得る。センサーは、流体システムの近くに位置づけされる、例えばチャンネルの壁の内部に埋込まれるかまたはこの壁に一体化して連結される、または流体システムと物理的、電気的および／または光学的に連絡しながら流体システムから分離して位置づけされ、かくして流体液滴および／または流体液滴を含む流体システム（例えばチャンネルまたはマイクロチャンネル、流体液滴を含む液体）の一部分を検知および／または判定することができるようになっている

可能性がある。例えば、センサーは、液滴を含むチャンネルとのいかなる物理的連結も有していなくてよいが、赤外線、紫外線または可視光線といったような液滴または流体システムから生じる電磁放射線を検出するように位置づけされ得る。電磁放射線は、液滴により生成され得、かつ／または流体システムのその他の部分から（または流体システムの外部で）発生し、例えば吸光、反射、回折、屈折、蛍光、リン光、極性変更、位相変化、時間に関する変化などを通して、流体液滴および／または流体液滴を含む流体システムの一部分と相互作用することができる。一例として、流体液滴および／または該流体液滴を取り囲む液体に向かってレーザーを導くことができ、該流体液滴および／または周囲の液体の蛍光を判定することができる。本明細書で使用する「センシング通信」は、直接的でも間接的でもあり得る。一例としては、流体液滴からの光をセンサーに導くこともできるし、または最初に光ファイバシステム、導波管などを通って導き、その後センサーへと導くこともできる。

【０２５１】

本発明において有用であるセンサーの限定的意味のない例としては、光学または電磁ベースのシステムが含まれる。例えば、センサーは、蛍光センサ（例えばレーザーにより刺激されるもの）、顕微鏡システム（これはカメラまたはその他の記録デバイスを内含し得る）などであり得る。もう１つの例としては、センサーは、電子センサー、例えば電場またはその他の電気的特性を判定できるセンサーであり得る。例えばセンサーは、流体液滴および／または流体液滴を含む流体システムの一部分のキャパシタンス、インダクタンスなどを検出することができる。

【０２５２】

本明細書で使用される、「プロセッサ」または「マイクロプロセッサ」は、例えば数式または電子または計算回路を使用することによって（例えば上述の通りに）１つ以上のセンサーからシグナルを受信し、シグナルを記憶しかつ／または１つ以上の応答を導くことのできるあらゆるコンポーネントまたはデバイスである。シグナルは、例えば空気圧シグナル、電子シグナル、光シグナル、機械的シグナルなどといった、センサーが判定する環境因子を表わす適切なあらゆるシグナルであり得る。

【０２５３】

（Ｈ）　材料

本発明のマイクロ流体システムおよびデバイスの上述のコンポーネントのいずれかを形成するためには、本発明のある態様に従ってさまざまな材料および方法を使用することができる。一部のケースでは、選択されたさまざまな材料が、さまざまな方法に役立つ。例えば、本発明のさまざまなコンポーネントを固体材料で形成させることができ、ここでは、マイクロマシニング、スピンコーティングおよび化学蒸着といったような膜蒸着プロセス、レーザー製造、フォトリソグラフィ技術、湿式化学またはプラズマプロセスを含めたエッチング方法などを介してチャンネルを形成させることができる。例えばＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ａｍｅｒｉｃａｎ、第２４８号４４～５５頁、１９８３年（エンジェル（Ａｎｇｅｌｌ）、ら）を参照のこと。一実施形態においては、シリコンチップ内にフィーチャをエッチングすることにより、流体システムの少なくとも一部分がシリコンで形成される。シリコンを用いた本発明のさまざまな流体システムおよびデバイスの精確で効率の良い製造のための技術が知られている。もう１つの実施形態においては、本発明のシステムおよびデバイスのさまざまなコンポーネントが、例えばポリジメチルシロキサン（「ＰＤＭＳ」）、ポリテトラフルオロエチレン（「ＰＴＦＥ」またはＴｅｆｌｏｎ（登録商標））などといったようなエラストマ重合体などの重合体で形成され得る。

【０２５４】

異なるコンポーネントを異なる材料で製造することができる。例えば、シリコンまたはＰＤＭＳといった不透明な材料から、底壁および側壁を含めた基底部分を製造し、流体プロセスの観察および／または制御のため、ガラスまたは透明な重合体といったような透明なまたは少なくとも部分的に透明な材料で上部部分を製造することができる。基底支持材料が精確な所望の官能基を有していない場合、内部チャンネル壁に接触する流体に所望の

化学的官能基を曝露するべくコンポーネントをコーティングすることができる。例えば、内部チャンネル壁がもう１つの材料でコーティングされている状態で、例示されている通りにコンポーネントを製造することができる。本発明のシステムおよびデバイスのさまざまなコンポーネントを製造するために用いられる材料、例えば流体チャンネルの内部壁をコーティングするために用いられる材料は、望ましくは、流体システムを通って流れる流体に不利な影響を与えたりまたはそれによる影響を受けることのない材料、例えばデバイス内部で使用されるべき流体の存在下で化学的に不活性である材料の中から選択され得る。

【０２５５】

一実施形態においては、重合体および／または可とう性および／またはエラストマ材料から、本発明のさまざまなコンポーネントが製造され、成形（例えばレプリカ成形、射出成形、注型など）を介しての製造を容易にする硬化可能な流体で都合良く形成され得る。硬化可能な流体は、基本的に、流体ネットワーク内でおよびそれと共に使用するように考慮されている流体を含みかつ／または輸送する能力をもつ固体へと凝固するように誘発され得るか、または自然に凝固することのできるあらゆる流体であり得る。一実施形態においては、硬化可能な流体には、重合体液体または液体重合体前駆物質（すなわちプレポリマー）が含まれる。適切な重合体液体には、例えば熱可塑性重合体、熱硬化性重合体、またはその融点を超えて加熱されるかかる重合体の混合物が含まれ得る。もう１つの例としては、適切な重合体液体には、適切な溶媒中の１つ以上の重合体の溶液が含まれていてよく、かかる溶液は例えば蒸発などにより溶媒を除去した時点で固体重合体材料を形成する。例えば溶融状態からまたは溶媒蒸発により凝固され得るかかる重合体材料は、当業者にとっては周知のものである。その数多くがエラストマであるさまざまな重合体材料が適切であり、同様に、モールドマスターの一方または両方がエラストマ材料で構成されている実施形態について、モールドまたはモールドマスターを形成するためにも適している。かかる重合体の限定的意味のない例のリストには、一般的クラスのシリコーン重合体、エポキシ重合体、およびアクリラート重合体といった重合体が含まれる。エポキシ重合体は、一般にエポキシ基、１，２－エポキシドまたはオキシランと呼ばれる３員の環式エーテル基の存在を特徴としている。例えば、芳香族アミン、トリアジン、および脂環式主鎖に基づく化合物に加えて、ビスフェノールＡのジグリシジルエーテルを使用することができる。もう１つの例には、周知のノボラック重合体が含まれる。本発明に従って使用するのに適したシリコーンエラストマの限定的意味のない例としては、メチルクロロシラン、エチルクロロシラン、フェニルクロロシランなどといったクロロシランを含む前駆物質から形成されたものが含まれる。

【０２５６】

１組の実施形態においては、例えばシリコーンエラストマポリジメチルシロキサンといったシリコーン重合体が好ましい。ＰＤＭＳ重合体の限定的意味のない例としては、ミシガン州Ｍｉｄｌａｎｄのダウケミカル（Ｄｏｗ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．）により、Ｓｙｌｇａｒｄの商標名、特にＳｙｌｇａｒｄ１８２、Ｓｙｌｇａｒｄ１８４およびＳｙｌｇａｒｄ１８６として販売されているものが含まれる。ＰＤＭＳを含めたシリコーン重合体は、本発明のマイクロ流体構造の製造を簡略化するいくつかの有益な特性を有する。例えば、かかる材料は廉価であり、容易に入手でき、熱による硬化を介してプレポリマー液体から凝固され得る。例えば、ＰＤＭＳは、約１時間といった曝露時間、約６５℃～約７５℃の温度にプレポリマー液体を曝露することにより、標準的に硬化可能である。同様に、ＰＤＭＳといったようなシリコーン重合体は、エラストマであり得、かくして本発明のある実施形態において必要である比較的高いアスペクト比をもつ非常に小さいフィーチャを形成するために有用であり得る。この点において、可とう性（例えばエラストマ）モールドまたはマスターが有利であり得る。

【０２５７】

本発明のマイクロ流体構造といったような構造をＰＤＭＳといったシリコーン重合体から形成することの１つの利点は、かかる重合体が例えば空気プラズマといったような酸素

含有プラズマに対する曝露により酸化され得、かくして酸化された構造はその表面その他の酸化されたシリコーン重合体表面またはその他のさまざまな重合体および非重合体材料の酸化された表面に対し架橋できる化学基を含有することになる、という点にある。かくして、コンポーネントを製造し、その後酸化させ、別の接着剤またはその他の封止（ｓｅａｌｉｎｇ）手段の必要なく、その他のシリコーン重合体表面または酸化されたシリコーン重合体表面と反応性をもつその他の基板の表面に対し基本的に不可逆的に封止させることができる。大部分のケースにおいて、封止は、シールを形成するのに補助的圧力を加える必要なく、酸化したシリコーン表面をもう１つの表面に接触させるだけで完成させることができる。すなわち、予備酸化されたシリコーン表面は、適切なあわせ面に対する接触接着剤として作用する。特定的には、自らに不可逆的に封止可能であることに加えて、酸化ＰＤＭＳといったような酸化シリコーンは、（例えば酸素含有プラズマに対する曝露を介して）ＰＤＭＳ表面に対し類似の要領で酸化された、例えばガラス、ケイ素、酸化ケイ素、石英、窒化ケイ素、ポリエチレン、ポリスチレン、ガラス状炭素およびエポキシ重合体を含めた、それ自体以外の一範囲の酸化材料に対しても、不可逆的に封止され得る。本発明に関連して有用である酸化および封止方法は、全体的成形技術と同様、例えば本明細書に参照により援用されている「Ｒａｐｉｄ　Ｐｒｏｔｏｔｙｐｉｎｇ　ｏｆ　Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　ａｎｄ　Ｐｏｌｙｄｉｍｅｔｈｙｌｓｉｌｏｘａｎｅ」、Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．、第７０号、４７４～４８０頁、１９９８年（Ｄｕｆｆｙら）という表題の論文中という題の論文の中で記述されている。

【０２５８】

酸化シリコーン重合体から本発明のマイクロ流体構造（または内部流体接触表面）を形成することのもつもう１つの利点は、これらの表面が、（親水性内部表面が望まれる）標準的なエラストマ重合体の表面よりもはるかに親水性が高いものであり得るという点にある。かかる親水性チャンネル表面はかくして、標準的な未酸化エラストマ重合体またはその他の疎水性材料から成る構造が可能であるよりもさらに容易に水溶液で充てんされ加湿され得る。

【０２５９】

一実施形態においては、底面壁は、１つ以上の側壁または１つの上面壁またはその他のコンポーネントとは異なる材料で形成される。例えば、底面壁の内部表面は、シリコンウェーハまたはマイクロチップまたはその他の基板の表面を含み得る。その他のコンポーネントは、上述の通り、かかる代替的基板に封止され得る。異なる材料の基板（底面壁）にシリコーン重合体（例えばＰＤＭＳ）を含むコンポーネントを封止することが望まれる場合、基板を、酸化シリコーン重合体が不可逆的に封止できる材料の一群（例えば酸化されたガラス、ケイ素、酸化ケイ素、石英、窒化ケイ素、ポリエチレン、ポリスチレン、エポキシ重合体、およびガラス状炭素の表面）の中から選択することができる。代替的には、別の接着剤、熱ボンディング、溶媒ボンディング、超音波溶接などの使用を含めた（ただしこれらに制限されるわけではない）当業者にとって明らかであると思われるその他の封止技術を使用することができる。）

【０２６０】

本発明のさまざまな態様および実施形態が以下の実施例で例示されている。本発明の範囲から逸脱することなく細部の修正を行なうことができるということがわかるだろう。

【実施例】

【０２６１】

実施例１：インビトロ区画化を用いたコンビナトリアルケミストリーおよびスクリーニングのためのマイクロ流体デバイス

マイクロ流体デバイスの概略的表示が、図１５に示されている。マイクロチャンネルを、ポリ（ジメチルシロキサン）（ＰＤＭＳ）（マクドナルド（ＭｃＤｏｎａｌｄ）およびホワイトサイズ、２００２年）での高速プロトタイプ製造を用いて矩形断面を伴って製造し、（ソングおよびイスマギロフ（Ｉｓｍａｇｉｌｏｖ）、２００３年）の通りに疎水性にした。フローを駆動するには、シリンジポンプを使用した（ハーバード・アパレイタス

（Ｈａｒｖａｒｄ　Ａｐｐａｒａｔｕｓ）ＰＨＤ、２０００還流ポンプ）。水溶液のためには、２７ゲージの取外し可能な針のついた２５０μｌ入りのハミルトン・ガスタイト（Ｈａｍｉｌｔｏｎ　Ｇａｓｔｉｇｈｔ）シリンジ（１７００シリーズ、ＴＬＬ）を、３０ゲージのテフロン管類（ウェイコ・ワイヤー・アンド・ケーブル（Ｗｅｉｃｏ　Ｗｉｒｅ　ａｎｄ　Ｃａｂｌｅ））と共に使用する。担体流体のためには、ハミルトン製の１つのハブ付き３０ゲージのテフロン針（ソングおよびイスマギロフ、２００３年）と共に、１ｍｌ入りのハミルトン・ガスタイトシリンジ（１７００シリーズ、ＴＬＬ）を使用する。担体流体は、ペルフルオロデカリン（ＰＦＤ）中の９％（ｖ／ｖ）の$C_6F_{11}C_2H_4OH$である（ソングら、２００３年）。マイクロ流体デバイスは、一連の相互接続されたモジュールから成る。各モジュールは、特定の機能を有する。これらのモジュールには、液滴を生成する、液滴を融合する、液滴を混合する、液滴を反応させる、液滴を検出するおよび液滴を選別するモジュールが含まれる（図１６参照）。１つの実施例においては、異なる分子または異なる濃度の分子から成る液滴が作られる。液滴は最高10^4秒$^{-1}$の速度で作られ、１．５％未満の多分散性および１μｍ～１００μｍの範囲内のサイズで作られる。各々の液滴は第２組の反応物質を含む第２の液滴と融合され、急速に混合されて化学反応を開始する。この化学反応は、各液滴を遅延チャンネルの中で通過させることによって各液滴内で進行できるようになっている。次に各々の液滴は第２の組の反応物質を含むもう１つの液滴と融合され、その後第２の化学反応を開始させるべく急速に混合される。第２の反応が遅延モジュール内で進行した後、反応の結果は、光センサーまたはその他の形態の検出モジュールを用いて判定される。最終的に、所望の液滴は、光学検出モジュールからのシグナルに基づいて２つの集団内に選別され、一方の集団はさらなる処理のために保たれ、もう一方は廃棄される。これらのおよびその他のモジュールを、この組合せまたはその他の組合せで使用することができる。

【０２６２】

液滴発生モジュール：我々は、液滴を形成するためにフロー集束幾何形状を使用する。水流が１本のチャンネルから狭い狭窄を通して注入され、対抗伝搬する油流が、水流を流体力学的に集束させ、それが図２３Ａに示されている通りの狭窄を通過するにつれてそのサイズを削減する。この液滴発生器は、油中の水の均質な液滴の定常流を生成するフロー様式で作動させることができる。水滴のサイズは、油および水の相対的流速により制御され、粘性力が表面張力に打ち克って均質な液滴を作り出す。水の流速が速すぎる場合、オリフィスの中をより長い流体噴流が通過し、さらに下流側で液滴の形に崩壊する。これらの液滴はサイズがさほど均等でない。水の流速が低すぎる場合、オリフィス内の液滴崩壊は再び不規則になり、より広範囲の液滴サイズを生成する。この乳化技術は堅牢であるものの、それは、任意の既定の流速での１つのサイズの液滴の生成に制限され、この液滴サイズは概してチャンネルの寸法により決定される。その上、液滴生産のタイミングを制御することができない。

【０２６３】

我々は、電気的に対処可能な乳化システムを作り出すために電場を内蔵することによりこれらの制限を克服している。これを達成するために、我々は、図２３Ａに概略的に示されているように、水流に高圧を印加し、油水界面に荷電する。水流は導体として挙動し、一方油は絶縁体である。電気化学反応が、コンデンサのように流体界面に荷電する。スナップオフの時点で、界面上の電荷は、液滴上にとどまる。さらに、油または水の注入速度を変えることなく、液滴体積V_dおよび周波数ｆをほぼ3ケタにわたり調整することができる。液滴サイズおよび周波数は、独立しておらず、むしろそれらの積は分散相の注入速度により決定される$Q_d = fV_d$。液滴サイズは、図２３、Ｂ～Ｅに示されているように、電場の強さの増大に従って減少する。３つの異なる流速についての印加電圧に対する液滴サイズの依存性は、図２３Ｆにまとめられている。低い印加電圧では、電場は無視できるほどの効果しかなく、液滴の形成は専ら表面張力と粘性流の間の競合によって駆動される。これとは対照的に、高い電場強度では、成長する滴に対する有意な付加的力が存在する、Ｆ＝ｑＥ（なお式中ｑは液滴上の電荷である）。液滴の界面はコンデンサとして挙動

することから、ｑは印加電圧Ｖに正比例している。こうして力のＶ^{2}依存性が導かれ、このことが、図２３Ｆに示されている印加電場の増大に伴う液滴サイズの減少を説明している。電場が過度に大きくなった場合、水流の荷電界面は強く荷電された滴によってはじかれる。これにより、生産は不安定になり液滴サイズの変動が増大する。

【０２６４】

電場により誘発された液滴形成によって提供される電子的制御は、さらなる貴重な利益をもたらす。すなわち、これにより、液滴中断の段階を生産サイクル内部で調整することが可能となるのである。これは、液滴が必要とされる瞬間においてのみ臨界的中断電場より高く電場を増大させることによって達成される。こうして、特定の場所への個々の液滴の到着と生産を精確に同期化するための便利な手段が得られる。

【０２６５】

液滴合体モジュール：あらゆる液滴ベースの反応－閉込めシステム内に不可欠な１つのコンポーネントは、化学反応を開始させるために２つ以上の試薬を組合せる液滴合体モジュールである。表面張力、界面活性剤安定化および排液力の全てが液滴の合体を妨害することから、これをマイクロ流体デバイス内で達成するのは著しく困難である。その上、液滴は、そのそれぞれのフローを規定する流線を横断しなくてはならず、合体のために精確な場所にたどりつくように完全に同期化されなくてはならない。

【０２６６】

静電電荷の使用は、これらの問題点を克服する。各液滴上に反対の正負符号の電荷を置き、電場を印加すると、それらを強制的に合体させることになる。一例として我々は、図２４Ａに素描されている、異なる組成と反対の電荷をもつ液滴を生成する２つの別々のノズルから成るデバイスを示している。液滴は２つの流れの合流点で統合される。形成時点で液滴に荷電するのに用いられる電極も同様に、液滴を強制して流線を横断させ、合体を導くために、電場を提供する。２本のノズルの構造におけるわずかな変動が結果として、電場の不在下でのその液滴生成の周波数と相にわずかな差異をもたらす。かくして、注入速度が同一でも、液滴のサイズは異なる。その上、液滴は正確に同時に合流点に到着しない。その結果、液滴は、図２４Ｂに示されているように合体しない。これとは対照的に、電場の印加時点で、液滴形成は正確に同期化された状態となり、同一サイズの液滴の対が各々合流点に確実に同時に到達するようにする。その上、液滴は、反対に荷電されており、これらを強制的に流線を横断させ互いに接触させ、かくして、図２４Ｃに示されている通り、これらを合体させる。液滴形成の驚くべき同期化は、電場により媒介されるような液滴の各々の中断をカップリングさせる結果もたらされる。電場の絶対値は２つの液滴の前縁間の離隔距離が変わるにつれて変動し、液滴中断の周波数は、電場にモードロックされる。おそらくは界面活性剤コーティングの安定化効果を理由として、液滴を合体させるためには最小の電荷が必要とされる。このことは、実際に合体する互いに接触した滴の百分率の電圧依存性を示す図２４Ｄから明らかである。

【０２６７】

液滴ミキサーモジュール：並進運動と回転の連続的反復を通して（図２５）かまたはフロー方向に平行な方向に沿って滴を合体させることによって（図２６）、高速混合が達成される。

【０２６８】

液滴反応器／時間遅延モジュール：反応のための定時間を提供するために使用される。いかにしてこれが達成できるかの２つの限定的意味のない例は「単一ファイル」と「大断面」チャンネルである。「単一ファイル」遅延ラインは、定められた反応時間を達成するために長さを用いる。これによると例外的に長いチャンネルが結果としてもたらされることが多いことから、担体油と水滴の両方と非混和性である第３の流体のスペーサ液滴を水滴対の間に置くことが望ましい。このとき担体油内の水性と非水性液滴の間に交番が存在する。このことは図２７Ａに示されている。長い時間的遅延を達成するための第２の可能性は、液滴の平均速度を低くするため「大きな断面積」をもつ広く深いチャンネルを使用することである。この例は図２７Ｂに示されている。

【０２６９】
再荷電モジュール：試薬を組合わせ混合するための反対に荷電された液滴および電場の使用はきわめて堅実なことであり、１００％の液滴が反対の流れからのそのパートナーと合体する。しかしながら、これらが合体した後、結果としての液滴はいかなる静電電荷も担持していない。形成中に液滴に荷電するのは便利であるが、さらなる処理のために必要とされる場合、混合した液滴に再荷電するため、いずれかの堅牢な液滴ベースのマイクロ流体システムの中でその他の方法を利用しなければならない。これは、中性液滴を分極する電場の存在下で中性液滴を分割しその結果２つの相対する電荷をもつ娘液滴をもたらすために伸長流を使用することによって容易に達成される。これは、図２８Ａに素描されている。図２８Ｂの中の顕微鏡写真は、分岐に入り荷電娘液滴へと分割する中性液滴を示す。図２８Ｂの破線領域は、電場内の荷電液滴の非対称素描を示すため、図２８Ｃで拡大されている。垂直破線は、液滴がその対称な球形形状に戻る電極の縁部を表わしている。電場は同様に、液滴分割の精密制御をも可能にし、同一試薬の２つ以上のアリコートへの中味の分割を可能にして同じマイクロ反応器の中味についての多数の検定を容易にする堅牢な液滴分裂モジュールのための基礎を提供している。
【０２７０】
検出モジュール：検出モジュールは、図２９に素描されているように、光ファイバ、１つ以上のレーザー、１つ以上の二色性ビームスプリッタ、帯域通過フィルター、および１つ以上の光電子増倍管（ＰＭＴ）で構成されている。
【０２７１】
選別モジュール：個々の液滴の中味は、プローブ探査されなくてはならず、選択された液滴は個々の流れに選別されなくてはならない。液滴の静電荷電の使用は、精確に制御され得、高周波数で切替えされ得かつ可動部分を全く必要としない選別用手段を提供する。液滴上の静電電荷は、外部電場への電荷の線形カップリングに基づく滴毎の選別を可能にする。一例としては、担体流体の流れを等分割するＴ字形接合分岐が同様に、図３０Ａに示される通り、２つの流れへと液滴集団を無作為に等分割する。しかしながら、分岐点に印加される小さな電場は、どのチャンネルにその液滴が入るかを精確に指図する。電極構成の概略図が図３０Ｂに示されている。電場の方向を変動させることになり、図３０Ｃおよび３０Ｄに示されている通り、選別された液滴の方向が変動する。液滴に付与され得る大きな力、および高い切替え周波数がこれを、可動部分の全く無い高速かつ堅牢な選別エンジンにしている。かくして処理速度は、液滴発生速度によってのみ制限される。
【０２７２】
実施例２
マイクロ流体システム内のマイクロカプセルを用いたタンパク質チロシンホスファターゼ１Ｂ（ＰＴＰ１Ｂ）阻害物質についてのスクリーニング
ＰＴＰ１Ｂは、インシュリンおよびレプチンシグナル形質導入の負の調節因子である。インシュリンおよびレプチンに対する耐性は、２型真性糖尿病および肥満の特質であり、従ってＰＴＰ１Ｂは、糖尿病および肥満療法のための魅力的な薬物標的である（ジョンソン（Ｊｏｈｎｓｏｎ）ら、２００２年）。実施例１で記述されている通りのマイクロ流体デバイスを使用して、マイクロ流体システムの中でマイクロカプセルを用いていかにＰＴＰ１Ｂ阻害物質をスクリーニングできるかを記述する。
【０２７３】
全ての水溶性試薬を、ＰＴＰ１Ｂ活性と相容性ある緩衝液である（２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１２５ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ）の中で溶解させる。５０ｍＵ／ｍｌの標的酵素（ヒト組換え型ＰＴＰ１Ｂ、残渣１～３２２；バイオモル・リサーチ・ラボラトリーズ（Ｂｉｏｍｏｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）、Ｉｎｃ）の溶液およびａ）ビスジフルオロメチレンホスホナートを有し既知のＰＴＰ１Ｂ阻害物質である１００μＭの化合物２（図１７）（ジョンソンら、２００２年）または、ｂ）ＰＴＰ１Ｂ阻害物質でない化合物である１００μＭのヒドロ桂皮酸（アルドリッチ）のいずれかの溶液を、該デバイスを用いてマイクロカプセルに区画化する。標的酵素を含む

各々のマイクロカプセルを、化合物２を含むマイクロカプセルまたはヒドロ桂皮酸を含むマイクロカプセルと融合させる。化合物２またはヒドロ桂皮酸のいずれかを含むマイクロカプセルは、化合物２およびヒドロ桂皮酸の入ったシリンジでの注射間の切換えによって形成させることができる。

【０２７４】

マイクロカプセルの融合の後、中味を急速に混合させる。この時点の後、マイクロカプセルを、長さ６０ｃｍのマイクロチャンネルを通して最高１分間走らせる（阻害物質の結合を可能にするため）。このマイクロチャンネルを次に、２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１２５ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ中の蛍光発生ＰＴＰ１Ｂ基質６，８－ジフルオロ－４－メチルウンベリフェリルホスファート（ＤｉＦＭＵＰ）（モレキュラー・プローブス（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ））を含有する水性マイクロカプセルを含む第２のマイクロチャンネルと併合させ、該マイクロカプセルを対様に融合させる。次に融合したマイクロカプセルを長さ６０ｃｍのマイクロチャンネルを通して最高２分間走らせる。ＤｉＦＭＵの産生に起因するマイクロカプセルの蛍光（励起／発光極大３５８／４５２ｎｍ；青色蛍光）を測定する。主に、青色蛍光を示すマイクロカプセルは、ヒドロ桂皮酸を含むものであり、一方、化合物２を含むマイクロカプセルは、ＰＴＰ１Ｂの阻害に起因する低い蛍光を示す。

【０２７５】

実施例３．　化合物ライブラリからのＰＴＰ１Ｂ阻害物質のスクリーニング

９６の水性混合物を、（反応を防ぐため）氷上で作る。第１の混合物は、ビス－ジフルオロメチレンホスホナートを有しかつ既知のＰＴＰ１Ｂ阻害物質（ジョンソンら、２００２年）である１００μＭの化合物２（図１７）、および５８５ｎｍ、６５５ｎｍおよび７０５ｎｍの発光極大をもつ予め定義された比率のＱｄｏｔ（商標）ストレプトアビジンコンジュゲート（カンタム・ドット・コーポレーション（Ｑｕａｎｔｕｍ　Ｄｏｔ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）、Ｈａｙｗａｒｄ、カリフォルニア州）を、ＰＴＰ１Ｂ活性と相容性ある緩衝液（２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１２５ｍＭのＮａＣｌ、１０％のグリセロール、１ｍＭのＥＤＴＡ）（ドマン（Ｄｏｍａｎ）ら、２００２年）中で含有している。９５のその他の水性混合物は上述のものと同一であるが、各々化合物２の代りにカルボン酸有機ビルディングブロックライブラリ（アルドリッチ）からの９５のカルボン酸のうちの１つおよび５８５ｎｍ、６５５ｎｍおよび７０５ｎｍの発光極大をもつ異なる比率のＱｄｏｔ（商標）ストレプトアビジンコンジュゲートを含有している。全ての混合物において、７０５ｎｍＱｄｏｔ（商標）ストレプトアビジンコンジュゲートの濃度は１００ｎＭであり、５８５ｎｍおよび６５５ｎｍのＱｄｏｔ（商標）ストレプトアビジンコンジュゲートの濃度は、０、１１、２２、３３、４４、５５、６６、７７、８８または１００ｎＭのいずれかである。従って、Ｑｄｏｔ（商標）ストレプトアビジンコンジュゲート濃度の１００（１０×１０）個の順列が存在し、これが、各化合物を含有するマイクロカプセルに、７０５ｎｍ、５８５ｎｍおよび６５５ｎｍでの蛍光の蛍光比を判定することによって読取られる独特の蛍光サインをもたせることを可能にしている。

【０２７６】

９６の混合物を、マイクロタイター平板の９６のウェル内に分配させる。平板の各ウェルからのアリコートを、所望の化合物を含むタンク内に浸漬されるマイクロ流体デバイスに連結された薄い管を用いて実施例１に記述されたマイクロ流体デバイスの中に順次装填し、毛管現象を使用してタンクからマイクロ流体デバイス内に所望の化合物を引き込む。混合物をデバイス内のマイクロカプセルに区画化する。各々のマイクロカプセルを、５ｍＵ／ｍｌで標的酵素（ヒト組換え型ＰＴＰ１Ｂ、残渣１－３２２；バイオモル・リサーチ・ラボラトリーズ、Ｉｎｃ）を含有するもう１つのマイクロカプセルと融合させ、急速に混合する。１０分間３７℃で遅延ライン内でインキュベートした後、該マイクロカプセルを、蛍光発生ＰＴＰ１Ｂ基質、６，８－ジフルオロ－４－メチルウンベリフェリルホスファート（ＤｉＦＭＵＰ）（モレキュラー・プローブス）を含むさらなるマイクロカプセルと融合させ、遅延ライン内で３０分間３７℃でインキュベートする。阻害物質は、脱リン

酸生成物（ＤｉＦＭＵ；励起／発光極大３５８／４５２ｎｍ；青色蛍光）に変換された非蛍光基質（ＤｉＦＭＵＰ）の量を削減する。次にマイクロカプセルの蛍光を分析する。主に、化合物２を含有するマイクロカプセルのＱｄｏｔ蛍光サインを伴うものを除いて、ＰＴＰ１ＢによるＤｉＦＭＵＰの脱リン酸に起因して、全てのマイクロカプセルが青色蛍光を示した。

【０２７７】

実施例４．　マイクロビーズに対する化合物ライブラリの付着

オレンジ色（５８５ｎｍ）および赤色（＞６５０ｎｍ）の蛍光色素（フルトンら、１９９７年）を精確な比率で取込んだ結果として、表面上にカルボキシラート官能基を担持する直径５．５μｍのポリスチレンマイクロビーズが光学タグ付けされた形で市販されている（ｗｗｗ．ｌｕｍｉｎｅｘｃｏｒｐ．ｃｏｍ）。各々独特の光学サイン（ｗｗｗ．ｌｕｍｉｎｅｘｃｏｒｐ．ｃｏｍ）をもつこのような１００個のビーズのセットを余剰のエチレンジアミンおよびＥＤＣ（１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドヒドロクロリド（ピアース（Ｐｉｅｒｃｅ）を用いて（ハーマンソン、１９９６年）の通りに修飾し、表面上に一級アミン基を作り上げる。該光開裂可能リンカー、４－（４－ヒドロキシメチル－２－メトキシ－５－ニトロフェノキシ）ブタン酸（ノバビオケム（ＮｏｖａＢｉｏｃｈｅｍ））（ホームズ（Ｈｏｌｍｅｓ）およびジョーンズ（Ｊｏｎｅｓ）、１９９５年）を次に、上述のとおりＥＤＣを用いてアミド結合を形成することによってビーズに付着させる。カルボン酸有機ビルディングブロックライブラリ（ブロック・ライブラリ（Ｂｌｏｃｋ　Ｌｉｂｒａｒｙ）（アルドリッチ））からの１００個の異なるカルボン酸を次に、リンカーアルコールと反応させることによりビーズにカップリングさせて、カルボキシラートエステルを形成するが、ここで１００個の異なる光学タグ付けされたビーズが異なるカルボン酸にカップリングされており、各ビーズは最高10^6個のカルボン酸分子で誘導体化されている。最高５ｃｍの距離からＢ１００ＡＰ３５４ｎｍのＵＶ灯（ＵＶＰ）を用いて氷上で４分間照射した結果、カルボン酸としてビーズから化合物が放出される。

【０２７８】

実施例５．　マイクロビーズに付着した化合物を用いた、酵素タンパク質チロシンホスファターゼ１Ｂ（ＰＴＰ１Ｂ）の阻害物質についてのスクリーニング

オレンジ色（５８５ｎｍ）および赤色（＞６５０ｎｍ）の蛍光色素（フルトンら、１９９７年）を精確な比率で取込んだ結果として、表面上にカルボキシラート官能基を担持する直径５．５μｍのポリスチレンマイクロビーズが光学タグ付けされた形で市販されている（ｗｗｗ．ｌｕｍｉｎｅｘｃｏｒｐ．ｃｏｍ）。まず最初に、マイクロビーズ上のカルボキシラート官能基を、実施例６にある通り、エチレンジアミンおよびＥＤＣを用いて一級アミンに転換させる。その後、ＰＴＰ１Ｂのためのホスホペプチド基質、ウンデカペプチド（$EGFR_{988-998}$（ＤＡＤＥｐＹＬＩＰＱＱＧ）（チャン（Ｚｈａｎｇ）ら、１９９３年））を、ＥＤＣを用いて表面アミノ基を介してマイクロビーズの両方のセットにカップリングさせる。このペプチドは、カルボキシラート－Ｏ－アリルエステルを用いた側鎖カルボキシラート基上の直交保護を伴うＳｉｅｂｅｒアミド樹脂（（９－Ｆｍｏｃ－アミノ－キサンテン－３－イルオキシ－Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ樹脂）（ノバビオケム））上の固相合成によって作られる。テトラデカン二酸から成るリンカーをＮ－末端にカップリングし、１％のＴＦＡを用いてビーズからペプチドを開裂させて、Ｃ末端アミドを伴うペプチドを生成する。リンカーを介して該ペプチドをビーズにカップリングし（ＥＤＣを用いて）、１ビードあたり最高10^5個のペプチドを得る。その後残った表面アミノ基を、実施例６にあるように光化学的に開裂可能なリンカー、４－（４－ヒドロキシメチル－２－メトキシ－５－ニトロフェノキシ）ブタン酸を付着させることによって修飾する。その後$Pd(Ph_3)_4$／$CHCl_3$／ＨＯＡｃ／Ｎ－メチルモルホリンを用いて、ペプチドの側鎖カルボキシラート上の保護基を除去する。最初のマイクロビーズセットを、既知のＰＴＰ１Ｂ阻害物質である化合物３－（４－ジフルオロホスホノメチルフェニル）プロパン酸（化合物１、図１７）、で誘導体化する（ジョンソンら、２００２年）。第１

のビーズセットとは相異なる光学タグを伴う第２のビーズセットを、ＰＴＰ１Ｂ阻害物質でない化合物であるヒドロ桂皮酸（アルドリッチ）で誘導体化する。各々のケースにおいて、リンカーアルコールと反応させることによって化合物をカップリングして、実施例６にあるように、カルボキシラートエステルを形成させる。各々のマイクロビーズを、最高10^6個の分子（フルトンら、１９９７年）で誘導体化させる。

【０２７９】

その後、図１５に概略的に記されたマイクロ流体システムを用いてマイクロビーズをスクリーニングする。１：１０００から１：１（化合物１ビーズ；ヒドロ桂皮酸ビーズ）まで変動する比率で２セットのマイクロビーズを混合し、ＰＴＰ１Ｂ活性と相容性ある緩衝液（２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１２５ｍＭのＮａＣｌ、１０％グリセロール、１ｍＭのＥＤＴＡ）（ドマンら、２００２年）の中で（反対を防ぐため）氷上で、１０ｎＭの濃度で標的酵素（ヒト組換え型ＰＴＰ１Ｂ、残渣１－３２２；バイオモル・リサーチ・ラボラトリーズ、Ｉｎｃ．）と10^8個の合計マイクロビーズを混合する。次に、実施例１に記述されたマイクロ流体システムを用いてマイクロカプセルを形成することにより、マイクロカプセル内で単一ビーズおよび標的酵素（ＰＴＰ１Ｂ）を同時局在化する。ビーズの濃度は、大部分のマイクロビーズが１つのビーズを含むかまたは全くビーズを含まないようなものである。各マイクロビーズを、５ｍＵ／ｍｌで標的酵素（ヒト組換え型ＰＴＰ１Ｂ、残渣１－３２２；バイオモル・リサーチ・ラボラトリーズ、Ｉｎｃ．）を含有するもう１つのマイクロカプセルと融合させ、高速混合する。該化合物を光化学的に（実施例４にあるように）放出させる。遅延ライン内で３７℃で１０分間インキュベートした後、蛍光発生ＰＴＰ１Ｂ基質（６，８－ジフルオロ－４－メチルウンベリフェリルホスファート（ＤｉＦＭＵＰ）（モレキュラー・プローブス））を含むさらなるマイクロカプセルと該マイクロカプセルを融合させ、遅延ライン内で３０分間３７℃でインキュベートする。阻害物質は、生成物（脱リン酸ペプチド）に転換された基質の量を削減する。マイクロカプセルを収集し、４℃まで冷却し、（グリフィスおよびタウフィーク、２００３年）の通りに１００μＭのバナジウム酸塩へと破壊して反応を停止させる（ハーダー（Ｈａｒｄｅｒ）ら、１９９４年）。緑色（５３０ｎｍ）蛍光色素フルオレセインイソチオジアナート（マウスモノクローナルIgG_{2b}重合体２０（サンタ・クルス（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ））で標識された抗－基質（抗－ホスホチロシン）抗体を用いてメーカーの指示事項に従って標識した後、ＦＡＣＳｃａｎ（ベクトン・ディッキンソン（Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ））、ＦＡＣＳｃａｌｉｂｕｒ（ベクトン・ディッキンソン）またはＭｏＦＩｏ（サイトメーション）フローサイトメータを用いて３色フローサイトメトリーによりビーズを分析して、阻害の程度およびビーズ上の化合物を同時に判定する。主に、ＰＴＰ１Ｂでコーティングされたマイクロビーズ上でのみペプチドの脱リン酸化が見られ、その他のマイクロビーズ上には見られない。

【０２８０】

実施例６．　マイクロビーズに付着した化合物ライブラリからのＰＴＰ１Ｂ阻害物質のスクリーニング

オレンジ色（５８５ｎｍ）および赤色（＞６５０ｎｍ）の蛍光色素（フルトンら、１９９７年）を精確な比率で取込んだ結果として、各々独特の光学シグニチャーを伴う、表面上にカルボキシラート官能基を担持する直径５．５μｍのポリスチレンマイクロビーズ１００個のセット（ｗｗｗ．ｌｕｍｉｎｅｘｃｏｒｐ．ｃｏｍ）を、ＰＴＰ１Ｂのためのホスホペプチド基質、ウンデカペプチド$EGFR_{988-998}$（ＤＡＤＥｐＹＬＩＰＱＱＧ）（チャンら、１９９３年）、および実施例４にあるように各々光化学的に開裂可能なリンカーを介して付着されている１００個の異なるカルボン酸を用いて誘導体化する。これらのカルボン酸のうちの１つは、既知のＰＴＰ１Ｂ阻害物質である化合物（ジョンソンら、２００２年）、３－（４－ジフルオロホスホノメチルフェニル）プロパン酸（化合物１、図１７）である。その他の９９のカルボン酸は、実施例４の通り、カルボン酸有機ビルディングブロックライブラリ（Ｃａｒｂｏｘｙｌｉｃ Ａｃｉｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｂｕｉｌｄｉｎｇ Ｂｌｏｃｋ Ｌｉｂｒａｒｙ）（アルドリッチ）からのものである。次

に、１００ビーズセットの各々同数を、実施例５と同様に、混合し、スクリーニングする。主に、ＰＴＰＩＢ阻害物質、３－（４－ジフルオロホスホノメチルフェニル）プロパン酸（化合物１、図１７）でコーティングされたマイクロビーズ上でのみペプチドの脱リン酸化が見られ、その他の化合物でコーティングされたマイクロビーズ上には見られない。

【０２８１】

実施例７．　フッ化炭素中水型エマルジョン内の小分子の区画化

基本的に（サトラーら、１９９６年）の通りに、１４μｍのフィルター（オスモニックス（Ｏｓｍｏｎｉｃｓ）を通した押出し（１５回）によってかまたは５ｍｍの分散工具と共にＵｌｔｒａ－Ｔｕｒｒａｘ　Ｔ８ホモジナイザー（ＩＫＡ）を用いた２５，０００ｒ．ｐ．ｍ．で５分間の均質化によって、９５％（ｖ／ｖ）のペルフルオロオクチルプロミド、溶解状態の問題の分子を含む５％（ｖ／ｖ）のリン酸緩衝生理食塩水そして界面活性剤としての２％（ｗ／ｖ）の$C_8F_{17}C_{11}H_{22}OP(O)[N(CH_2CH_2)_2O]_2$（Ｆ８Ｈ１１ＤＭＰ）を含有するフッ化炭素中水エマルジョンを形成させた。１００μｍから２ｍＭの濃度で水相中に溶解した一連の小さい蛍光分子を含有するエマルジョンを作った。カルセイン、テキサスレッド、フルオレセイン、クマリン１０２、７－ヒドロキシクマリン－３－カルボン酸および７－ジエチルアミノ－４－メチルクマリン（クマリン１）を含むこれらの分子は、ＳＲＣのＬｏｇＫｏｗ／ＫｏｗＷｉｎプログラム（メイラン（Ｍｅｙｌａｎ）およびハワード（Ｈｏｗａｒｄ）、１９９５年）を用いて計算された－０．４９～４．０９の範囲内のＬｏｇＰ値と２０３～６２５Ｄａの分子量を有していた。ボルテックス処理により、異なる色の蛍光色素を含むエマルジョンを混合した。混合型エマルジョンの落射蛍光顕微鏡法により区画化を観察した。混合後２４時間、区画間に交換が全くないことを観察した（図１９参照）。

【０２８２】

実施例８．　マイクロ流体システムを用いて作られたフッ化炭素中水型エマルジョン内の小分子の区画化

基本的に、実施例１に記述されている通りに、多重液滴発生モジュールを用いて、９５％（ｖ／ｖ）のペルフルオロオクチルプロミド、溶解状態の問題の分子を含む５％（ｖ／ｖ）のリン酸緩衝生理食塩水そして界面活性剤としての２％（ｗ／ｖ）の$C_8F_{17}C_{11}H_{22}OP(O)[N(CH_2CH_2)_2O]_2$（Ｆ８Ｈ１１ＤＭＰ）を含有するフッ化炭素中水エマルジョンを形成させた。各ノズルにおいて水相は、１００μｍから２ｍＭの濃度で溶解した異なる小さな蛍光分子を含有していた。カルセイン、テキサスレッド、フルオレセイン、クマリン１０２、７－ヒドロキシクマリン－３－カルボン酸および７－ジエチルアミノ－４－メチルクマリン（クマリン１）を含むこれらの分子は、ＳＲＣのＬｏｇＫｏｗ／ＫｏｗＷｉｎプログラム（メイラン（Ｍｅｙｌａｎ）およびハワード（Ｈｏｗａｒｄ）、１９９５年）を用いて計算された－０．４９～４．０９の範囲内のＬｏｇＰ値と２０３～６２５Ｄａの分子量を有していた。全てのタイプの液滴を含有する単一の流れの中に異なるフルオロファーを有する液滴を担持する流れを組合わせることにより、異なる色の蛍光色素を含有するエマルジョンを混合した。液滴収集物を担持する流れはこのとき、デバイス上の深いウェル内に出され、ここで液滴は近接して保管され最高２４時間にわたり監視可能である。液滴間の交差汚染は全く観察されない。

【０２８３】

実施例９．　β－ガラクトシダーゼ上のＰＥＴＧのK_iおよび阻害様式の判定

実施例１に記述されているとおりのマイクロ流体デバイスを用いて、我々は、フェニルエチルβ－Ｄ－チオガラクトピラノシド（ＰＥＴＧ）による酵素、大腸菌β－ガラクトシダーゼ（ＬａｃＺ）の阻害様式が競合的であることを実証し、いかにして、ＰＥＴＧの阻害定数（K_i）を得ることができるかを示している。酵素阻害検定においては、触媒作用速度は、ＬａｃＺについての非蛍光性基質、フルオレセインモノ－β－Ｄ－ガラクトシド（ＦＭＧ）を使用し、蛍光性生成物フルオレセインの外観（励起４８８ｎｍ、発光５１４ｎｍ）を測定することによって決定される。ＬａｃＺ阻害検定の全てのコンポーネントは、検定緩衝液（１０ｍＭの$MgCl_2$、５０ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＤＴＴ、１００μ

ｇ／ｍｌのＢＳＡ、１０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．９）の中で溶解させられる。

【０２８４】

各々の液滴形成モジュール（図１５）へと導いているのは、シリンジポンプから通じる２本のテフロン管である。各管から通じるチャンネルは併合して、単一流を作り上げてから、液滴形成モジュールに入る。第１の液滴形成モジュール内に供給する２つのシリンジは（ａ）検定緩衝液中の５０μＭのＰＥＴＧ、および（ｂ）検定緩衝液を含む。第２の液滴形成モジュールに流れ込む２つのシリンジは、（ｃ）検定緩衝液中の１００ｍＭのＬａｃＺおよび（ｄ）検定緩衝液を含む。第３の液滴形成モジュールに流れ込む２つのシリンジは、（ｅ）検定緩衝液中の５ｍＭのＦＭＧおよび（ｆ）検定緩衝液を含む。各液滴中の各コンポーネントの最終濃度は、両方のシリンジからの一定の組合せ流速を維持しながら、各コンポーネントと緩衝溶液の相対的流速を調整することによって、独立した形で制御可能である。

【０２８５】

第１の液滴融合により酵素（ＬａｃＺ）と阻害物質（ＰＥＴＧ）が混合される。組合さった液滴は、２分間を遅延ラインで経過した後、蛍光発生酵素基質（ＦＭＧ）を含有する第３の液滴と融合させられる。最終的に、全てのコンポーネントが混合された後、個々の液滴の蛍光を測定することによって、または、第２の長さ１０分間の遅延ライン内の多数の箇所において１０秒の曝露時間中同じ濃度の各々のコンポーネントと液滴からの蛍光光を積分することによって、反応を観察する。異なる位置における各々の蛍光強度値は、異なる反応時間における生成物の量に正比例する。生成物形成速度は、初期反応時間中線形であり、初期速度（ｖ）は、線形フィッティングから判定され得る。ＦＭＧおよびＰＥＴＧの異なる濃度での反復的測定に由来するデータが、ラインウィーバ・バークブロットの形で表現される（１／ｖ対１／［Ｓ］；なお式中［Ｓ］＝基質の濃度）。ＰＥＴＧの異なる濃度での同じｙ－切片値は、ＰＥＴＧ阻害様式が競合的であることを示している。競合的阻害においては、ｙ－切片により分けられる各勾配は、阻害物質の濃度の一次関数である見かけのミカエリス・メンテン定数を表わしている。見かけのミカエリス・メンテン定数対競合的阻害物質濃度のグラフの中のｙ－切片は、メカエリス－メンテン定数を与え、その勾配にｙ－切片を乗じたものの逆数がK_iである。以下の条件（最終融合マイクロカプセル内）、すなわち３０ｎＭＬａｃＺ、０～１３μＭのＰＥＴＧおよび１０～７００μＭのＦＭＧを用いると、ＬａｃＺのＦＭＧのK_Mを、以前に発表された値（１１８μＭ：ホアン（Ｈｕａｎｇ）、１９９１年）の２０％以内まで決定することができ、又ＬａｃＺについてのＰＥＴＧのK_iを、以前に発表された値（０．９８μＭ：ホアン、１９９１年）の範囲内にあるものとして決定できる。

【０２８６】

実施例１０

エマルジョンマイクロカプセル内の二次化合物の合成およびマイクロ流体システム内でのＰＴＰ１Ｂの阻害についてのスクリーニング

実施例１に記載されているマイクロ流体デバイスを使用して、マイクロ流体システム内でマイクロカプセルを用いていかにしてＰＴＰ１Ｂ阻害物質を合成しスクリーニングできるかについて記載する。

【０２８７】

全ての水溶性試薬を、ＰＴＰ１Ｂ活性と相容性ある緩衝液である１２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１２５ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ中に溶解させる。一級アミンである化合物を、デバイスを用いてマイクロカプセルに区画化させる。アルデヒドである化合物の第２の溶液も、デバイスを用いてマイクロカプセルに区画化させる。アミンおよびアルデヒドは、ａ）ジフルオロメチレンホスホナート部分を含有している（図２２、化合物ＡおよびＢ）かまたはｂ）いかなるジフルオロメチレンホスホナート部分も含有していないかのいずれかであり得る。１級アミンを含む各々のマイクロカプセルは、アルデヒドを含むマイクロカプセルと融合される。ジフルオロメチレンホスホナート部分を伴うおよび伴わない化合物を含むマイクロカプセルは、ジフルオロメチレンホスホナート部分を

伴うまたは伴わないアミンまたはアルデヒドを含むシリンジでの注入の間で切替えを行なうことによって、形成可能である。

【０２８８】

マイクロカプセル融合の後、中味を高速で混合させ、マイクロカプセルは遅延ラインを下降する。こうしてアミンおよびアルデヒドはシッフ塩基の形成により共に反応して二次化合物を作り上げることが可能となり、阻害物質はＰＴＰ１Ｂに結合できるようになる。各々のマイクロカプセルを次に、５０ｍＵ／ｍｌの標的酵素溶液（ヒト組換え型ＰＴＰ１Ｂ、残渣１～３２２；バイオモル・リサーチ・ラボラトリーズ（Ｂｉｏｍｏｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）、Ｉｎｃ）および蛍光発生ＰＴＰ１Ｂ基質６，８－ジフルオロ－４－メチルウンベリフェリルホスファート（ＤｉＦＭＵＰ）（モレキュラー・プローブス（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）を含むさらなるマイクロカプセルと融合させる。融合したマイクロカプセルは次に、さらなる遅延ラインに沿って走行する。ＤｉＦＭＵ（励起／発光極大３５８／４５２ｎｍ；青色蛍光）の生成に起因するマイクロカプセルの蛍光を測定する。

【０２８９】

主に、アミンおよびアルデヒド濃度が低い場合（＜１００μＭ）、ジフルオロメチレンホスホナート部分を伴うアミン（化合物Ａ）およびジフルオロメチレンホスホナート部分を伴うアルデヒド（化合物Ｂ）の両方を含むマイクロカプセル内でのみ、ＰＴＰ１Ｂ活性の阻害が観察される。これは、これらのマイクロカプセルに形成されたシッフ塩基（化合物Ｃ）がビス－ジフルオロメチレンホスホナートを含有し、単一のジフルオロメチレンホスホナート部分を伴う分子に比べてはるかに有効なＰＴＰ１Ｂ阻害物質であるからである。

【０２９０】

主に、アミンおよびアルデヒド濃度が高い場合（＞１００μＭ）、ジフルオロメチレンホスホナート部分を伴うアミン（化合物Ａ）またはジフルオロメチレンホスホナート部分を伴うアルデヒド（化合物Ｂ）のいずれかまたはその両方を含むマイクロカプセル内でＰＴＰ１Ｂ活性の阻害が観察されるが、その他のマイクロカプセル内では観察されない。これは、単一のジフルオロメチレンホスホナート部分またはビス－ジフルオロメチレンホスホナート（化合物Ｃ、図２２）のいずれかを伴う分子がＰＴＰ１Ｂを阻害できるからである。

【０２９１】

実施例１１．　エマルジョンマイクロカプセル内での２３０４個の二次化合物のライブラリの合成およびマイクロ流体システム内でのＰＴＰ１Ｂ阻害のスクリーニング

５ｍＵ／ｍｌの濃度の標的酵素（ヒト組換え型ＰＴＰ１Ｂ、残渣１～３２２；バイオモル・リサーチ・ラボラトリーズＩｎｃ）を含有しＰＴＰ１Ｂ活性と相容性ある緩衝液（２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１２５ｍＭのＮａＣｌ、１０％のグリセロール、１ｍＭのＥＤＴＡ）（ドマン（Ｄｏｍａｎ）ら、２００２年）の中で９６の水性混合物を作る。最初の４８の混合物は各々、一級アミンを含有する独特の化合物を含有する。これらの化合物の１つ（化合物Ａ、図２２）は、ジフルオロメチレンホスホナート部分を含有する。第２の４８のマイクロビーズ混合物は、各々アルデヒドを含有する独特の化合物を含有する。これらの化合物の１つ（化合物Ｂ、図２２）は、ジフルオロメチレンホスホナート部分を含有する。

【０２９２】

９６の混合物をマイクロタイター平板の９６のウェル内に分配する。平板の各ウェルからのアリコートを、所望の化合物の入ったタンク内に浸漬されるマイクロ流体デバイスに連結された細い管を用いて実施例１で記載されたマイクロ流体デバイスの中に順次装填し、毛管現象を用いてタンクからマイクロ流体デバイスまで所望の化合物を引き込む。デバイス内で混合物をマイクロカプセルに区画化する。

【０２９３】

アミンを含む各マイクロカプセルを、アルデヒドを含むマイクロ液滴と融合させ、遅延

ライン内で３７℃で１０分間インキュベートする。アミンとアルデヒドはシッフ塩基を形成することにより共に反応し、結果として溶解状態の新しい分子（イミン）を作り上げる。このとき、マイクロカプセルは、蛍光発生ＰＴＰ１Ｂ基質６，８－ジフルオロ－４－メチルウンベリフェリルホスファート（ＤｉＦＭＵＰ）（モレキュラー・プローブス）を含むさらなるマイクロカプセルと融合され、遅延ライン内で３０分間３７℃でインキュベートされる。阻害物質は、脱リン酸化された生成物（ＤｉＦＭＵ；励起／発光極大３５８／４５２ｎｍ；青色蛍光）へと転換された非蛍光基質（ＤｉＦＭＵＰ）の量を削減する。次にマイクロカプセルの蛍光を分析する。

【０２９４】

それ自体ＰＴＰ１Ｂ阻害物質であるかまたはもう１つの一次化合物と反応して第２の阻害物質を形成する一次化合物を含むマイクロカプセルは、基質がほとんど生成物に転換されなかったものとして同定される。化合物がマイクロカプセルに高い濃度で存在する場合、基質がほとんど生成物に転換されなかった同定済みマイクロカプセルには、ジフルオロメチレンホスホナート部分を含有する化合物を担持するものが含まれる。化合物が低濃度でマイクロカプセルに存在する場合、マイクロカプセル内にジフルオロメチレンホスホナート部分を含有する化合物の濃度は、効率良くＰＴＰ１Ｂを阻害するには不充分なものである（実施例１０参照）。しかしながら、２つの一次化合物が反応して、効率の高いＰＴＰ１Ｂ阻害物質であるビス－ジフルオロメチレンホスホナート部分を含有するイミン（化合物Ｃ、図２２）を形成しているマイクロカプセル内では、これはＰＴＰ１Ｂ基質から生成物への転換を阻害し、蛍光はほとんど見られない。

【０２９５】

実施例１２

エマルジョンマイクロカプセル内の二次化合物の合成およびマイクロ流体システムに付着した化合物を用いたＰＴＰ１Ｂ阻害についてのスクリーニング

オレンジ色（５８５ｎｍ）および赤色（＞６５０ｎｍ）の蛍光色素を精確な比率で取込んだ結果として（フルトン（Ｆｕｌｔｏｎ）ら、１９９７年）、表面上にカルボキシラート官能基を担持する直径５．５μｍのマイクロビーズが光学タグ付けされた形で市販されている（ｗｗｗ．ｌｕｍｉｎｅｘｃｏｒｐ．ｃｏｍ）。まず最初に、マイクロビーズ上のカルボキシラート官能基を、実施例４にある通り、エチレンジアミンおよびＥＤＣを用いて一級アミンに転換させる。その後、ＰＴＰ１Ｂのためのホスホペプチド基質、ウンデカペプチド（$EGFR_{988-998}$（ＤＡＤＥｐＹＬＩＰＱＱＧ）（チャン（Ｚｈａｎｇ）ら、１９９３年））を、ＥＤＣを用いて表面アミノ基を介してマイクロビーズの両方のセットにカップリングさせ、実施例５にあるようにペプチドの側鎖カルボキシラート上の保護基を除去する。表面アミノ基をアルデヒドに転換させるためには、第１のマイクロビーズセット（セット１）とスクシニミジルｐ－ホルミルベンゾアートを反応させる。第１のマイクロビーズセットとは全く異なる光学タグを伴う第２のマイクロビーズセット（セット２)は未反応のまま（すなわち表面に一級アミンがある状態で）放置する。

【０２９６】

その後、シッフ塩基を形成するための表面アルデヒド基との反応を介して、一級アミンとジフルオロメチレンホスホナート部分を含有する化合物（化合物Ａ、図２２）と、第１のマイクロビーズセット（セット１）を反応させる。第１のビーズセットからの全く異なる光学タグを伴う第２のマイクロビーズセット（セット２）を、シッフ塩基を形成するための表面アミノ基とアルデヒドの反応を介して、アルデヒドとジフルオロメチレンホスホナート部分を含有する化合物（化合物Ｂ、図２２）と反応させる。シッフ塩基の形成は、アルカリ性ｐＨ（すなわちｐＨ９－１０）での反応により増強される。さまざまな密度の化合物でコーティングされたマイクロビーズが生成される。

【０２９７】

ＰＴＰ１Ｂ活性と相容性ある緩衝液（２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１２５ｍＭのＮａＣｌ、１０％のグリセロール、１ｍＭのＥＤＴＡ）（ドマン（Ｄｏｍａｎ）ら、２００２年））の中で２つのマイクロビーズセットを別々に懸濁させる。各マイクロビーズ

セットを実施例１内で記載されているデバイス内のマイクロカプセルに区画化する。一方の極端で大部分のマイクロカプセルがビーズを１つ含むかまたは全く含んでおらずもう一方の極端で大部分のマイクロカプセルが２つ以上のマイクロビーズを含むような形で、マイクロビーズの数を変動させる。セット１のマイクロビーズを含む各々のマイクロカプセルを、セット２のマイクロビーズを含むマイクロカプセルと融合させ、遅延ライン内で３７℃で１０分間インキュベートする。シッフ塩基は比較的不安定な可逆的相互作用であり、中性ｐＨで容易に加水分解を受け、結果としてビーズから化合物が放出されることになる。セット１およびセット２の両方からのマイクロビーズを含むマイクロカプセルにおいては、マイクロビーズから放出された化合物は互いに反応でき、シッフ塩基を形成し、溶解状態の新しい分子を作り出す。この新しい分子（図２２、化合物Ｃ）は、ビスジフルオロメチレンホスホナート部分を含有し、単一のジフルオロメチレンホスホナート部分を伴う化合物よりもＰＴＰ１Ｂとしてはるかに効能が高い（図２２参照）。このとき、マイクロカプセルを、２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１２５ｍＭのＮａＣｌ、１０％のグリセロール、１ｍＭのＥＤＴＡ中５ｍＵ／ｍｌの濃度で標的酵素（ヒト組換え型ＰＴＰ１Ｂ、残渣１～３２２；バイオモル・リサーチ・ラボラトリーズＩｎｃ）を含むさらなるマイクロカプセルと融合させ、遅延ライン内で３０分間３７℃でインキュベートする。阻害物質は、生成物（脱リン酸化ペプチド）に転換される基質の量を削減する。マイクロカプセルを収集し、４℃まで冷却し、１００μＭのバナジウム酸塩へと崩壊させて反応を停止させる（ハーダー（Ｈａｒｄｅｒ）ら、１９９４年）。メーカーの指示事項に従って、緑色（５３０ｎｍ）蛍光色素フルオロセイン・イソチオシアナートで標識された抗基質（抗－ホスホチロシン）抗体（マウスモノクローナルＩｇＧ$_{2b}$ＰＹ２０、サンタ・クルス（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ））での標識の後、阻害の範囲とビーズ上の化合物を同時に判定するためＦＡＣＳｃａｎ（ベクトン・ディッキンソン（Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ））、ＦＡＣＳｃａｌｉｂｕｒ（ベクトン・ディッキンソン）またはＭｏＦｌｏ（サイトメーション（Ｃｙｔｏｍａｔｉｏｎ））フローサイトメータを用いた３色フローサイトメトリーによりビーズを分析する。少ないマイクロビーズ数では、大部分のマイクロカプセルが単一のマイクロビーズしか含まないかまたはマイクロビーズを含まず、ＰＴＰ１Ｂ阻害は、各マイクロカプセル内の溶液中に放出された阻害物質の濃度が効果的な阻害のために充分高い場合、高密度の阻害物質でコーティングされたビーズの上にのみ検出される。これとは対照的に、ビーズ数がより多い場合、たとえマイクロビーズが低密度の阻害物質でコーティングされている場合でさえ、生成物に転換された基質がほとんどない数多くのマイクロビーズが検出される。これは、各々セット１およびセット２からのマイクロビーズを含むマイクロカプセル内でビスジフルオロメチレンホスホナート部分を含有するきわめて効能の高いＰＴＰ１Ｂ阻害物質が形成されることに起因している（図２２、化合物Ｃ）。

【０２９８】

実施例１３

エマルジョンマイクロカプセル内の２５００二次化合物ライブラリの合成およびマイクロ流体システム内のマイクロビーズに付着した化合物を用いたＰＴＰ１Ｂ阻害についてのスクリーニング

オレンジ色（５８５ｎｍ）および赤色（＞６５０ｎｍ）の蛍光色素を精確な比率で取込んだ結果として（フルトンら、１９９７年）各々独特な光学サインを（ｗｗｗ．ｌｕｍｉｎｅｘｃｏｒｐ．ｃｏｍ）伴い表面上にカルボキシラート官能基を担持する直径５．５μｍのポリスチレンマイクロビーズ１００個のセットを修飾して、実施例４にある通りカルボキシラート官能基を一級アミンに転換させ、次にＰＴＰ１Ｂのためのホスホペプチド基質、ウンデカペプチドＥＧＦＲ$_{988-998}$（ＤＡＤＥｐＹＬＩＰＱＱＧ）（チャンら、１９９３年）で実施例５にあるように誘導体化させる。最初の５０のマイクロビーズセットを反応させて、実施例１０にあるように表面カルボキシ基の一定割合をアルデヒドに転換させる。第２の５０のマイクロビーズセットは未反応のままで放置する（すなわち表面上に一級アミンを伴った状態）。

【０２９９】
化合物をビーズに連結するシッフ塩基を形成させるための表面アルデヒド基との反応を介して、一級アミンを含有する独自の化合物と、最初の５０のマイクロビーズセットを各々反応させる。これらの化合物（化合物Ａ、図２２）のうちの１つはジフルオロメチレンホスホナート部分を含有する。化合物をビーズに連結するシッフ塩基を形成させるための表面アミン基との反応を介して、アルデヒドを含有する独自の化合物と、第２の５０のマイクロビーズセットを各々反応させる。これらの化合物の１つ（化合物Ｂ、図２２）は、ジフルオロメチレンホスホナート部分を含有する。シッフ塩基の形成は、アルカリ性ｐＨ（すなわちｐＨ９－１０）での反応により増強される。

【０３００】
一級アミン（アミンマイクロビーズ）と反応させた５０のマイクロビーズセットをＰＴＰ１Ｂ活性と相容性ある緩衝液２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１２５ｍＭのＮａＣｌ、１０％のグリセロール、１ｍＭのＥＤＴＡ（ドマンら、２００２年）の中にプールし懸濁させる。アルデヒドと反応させた５０のマイクロビーズセット（アルデヒドマイクロビーズ）を同じ緩衝液内にプールし懸濁させる。実施例１に記載されたデバイスの中でマイクロカプセルにアミンマイクロビーズおよびアルデヒドマイクロビーズを区画化させる。マイクロビーズの数は、大部分のマイクロ液滴が単一のマイクロビーズを含むように設定される。アミンマイクロビーズを含む各々のマイクロカプセルを、アルデヒドマイクロビーズを含むマイクロカプセルと融合させ、遅延ライン内で３７℃で１０分間インキュベートする。その後、マイクロカプセルを、２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１２５ｍＭのＮａＣｌ、１０％のグリセロール、１ｍＭのＥＤＴＡ中５ｍＵ／ｍｌの濃度で標的酵素（ヒト組換え型ＰＴＰ１Ｂ、残渣１～３２２；バイオモル・リサーチ・ラボラトリーズＩｎｃ）を含むさらなるマイクロカプセルと融合させ、遅延ライン内で３０分間３７℃でインキュベートする。シッフ塩基は比較的不安定な可逆的相互作用であり、中性ｐＨで容易に加水分解を受け、結果としてビーズから化合物が放出されることになる。最初の５０セットからのマイクロビーズおよび第２の５０セットからのマイクロビーズを含むマイクロカプセルにおいては、マイクロビーズから放出された化合物は互いに反応でき、シッフ塩基を形成し、溶解状態の新しい分子を作り出す。阻害物質は、生成物（脱リン酸化ペプチド）に転換される基質の量を削減する。マイクロカプセルを収集し、４℃まで冷却し、１００μＭのバナジウム酸塩へと崩壊させて反応を停止させる（ハーダー(Ｈａｒｄｅｒ)ら、１９９４年）。メーカーの指示事項に従って、緑色（５３０ｎｍ）蛍光色素フルオロセイン・イソチオシアナートで標識された抗基質（抗－ホスホチロシン）抗体（マウスモノクローナルＩｇＧ$_{2b}$ＰＹ２０（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）での標識の後、阻害の範囲とビーズ上の化合物を同時に判定するためＦＡＣＳｃａｎ（ベクトン・ディッキンソン）、ＦＡＣＳｃａｌｉｂｕｒ（ベクトン・ディッキンソン）またはＭｏＦＩｏ（サイトメーション）フローサイトメータを用いて３色フローサイトメトリーによりビーズを分析する。

【０３０１】
それ自体ＰＴＰ１Ｂ阻害物質であるかまたは第２の阻害物質を形成するべくもう１つの同時区画化されたビーズから放出されたもう１つの一次化合物と反応する一次化合物でコーティングされたビーズが、基質がほとんど生成物に転換されなかったものとして同定される。基質がほとんど生成物に転換されなかった同定されたビーズには、ジフルオロメチレンホスホナート部分を含有する化合物を担持するものが含まれる。マイクロビーズが低密度でコーティングされる場合、マイクロカプセル内のジフルオロメチレンホスホナート部分を含有する放出された化合物の濃度は、ＰＴＰ１Ｂを効率良く阻害するには不充分なものである（実施例１２を参照）。しかしながら、最初の５０ビーズのセットからのものと第２の５０ビーズセットからのものの２つのマイクロビーズを含み、各々のマイクロビーズかジフルオロメチレンホスホナート部分を伴う１つの分子を担持しているマイクロカプセル内では、放出された分子は、生成物へのＰＴＰ１Ｂ基質の転換を阻害するマイクロカプセル内のビスジフルオロメチレンホスホナート部分を含有するきわめて効能の高いＰＴＰ１Ｂ阻害物質（化合物Ｃ、図２２）を形成することができる。

【０３０２】
参考文献
Adang, A. E., and Hermkens, P. H. (2001). The contribution of combinatorial chemistry to lead generation: an interim analysis. Curr Med Chem 8, 985-998.
Anderson, J. E. (1993). Restriction endonucleases and modification methylases. Curr Op Struct Biol 3, 24-30.
Becher, P. (1957) Emulsions: theory and practice. Reinhold, New York.
Benita, S. (ed.). (1996) Microencapsulation: methods and industrial applications. Marcel Dekker, New York.
Bernath, K., Hai, M., Mastrobattista, E., Griffiths, A.D., Magdassi, S. and Tawfik, D.S. (2004) In vitro compartmentalization by double emulsions: sorting and gene enrichment by fluorescence activated cell sorting. Anal Biochem, 325, 151-157.
Bru, R. and Walde, P. (1991) Product inhibition of alpha-chymotrypsin in reverse micelles. Eur J Biochem, 199, 95-103.
Bru, R. and Walde, P. (1993) Catalytic activity of elastase in reverse micelles. Biochem Mol Biol Int, 31, 685-692.
Burbaum, J. (1998). Miniaturization technologies in HTS: how fast, how small, how soon? Drug Discov Today 3, 313-322.
Calvert, P. (2001) Inkjet printing for materials and devices. Chem. Mater., 13, 3299-3305.
Chakrabarti, A.C., Breaker, R.R., Joyce, G.F. and Deamer, D.W. (1994) Production of RNA by a polymerase protein encapsulated within phospholipid vesicles. J Mol Evol, 39, 555-559.
Chang, T.M. (1987) Recycling of NAD(P) by multienzyme systems immobilized by microencapsulation in artificial cells. Methods Enzymol, 136, 67-82.
Chang, T.M.S. (1992) Recent advances in artificial cells based on microencapsulation. In Donbrow, M. (ed.), Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 323-339.
Creagh, A.L., Prausnitz, J.M. and Blanch, H.W. (1993) Structural and catalytic properties of enzymes in reverse micelles. Enzyme Microb Technol, 15, 383-392.
Curran, D.P. (1998) Strategy-level separations in organic synthesis: from planning to practice. Angew Chem Int Ed, 37, 1174-1196.
Czarnik, A. W. (1997). Encoding methods for combinatorial chemistry. Curr Opin Chem Biol 1, 60-66.
Davis, S. S., and Walker, I. M. (1987). Multiple emulsions as targetable delivery systems. Methods in Enzymology 149, 51-64.
de Gans, B.-J., Duineveld, P.C. and Schubert, U.S. (2004) Inkjet printing of polymers: state of the art and future developments. Advanced materials, 16, 203-213.
Dickinson, E. (1994) Emulsions and droplet size control. In Wedlock, D.J. (ed.), Controlled particle, droplet and bubble formation. Butterworth-Heinemann, Oxford, pp. 191-257.
Doi, N., and Yanagawa, H. (1999). STABLE: protein-DNA fusion system for screening of combinatorial protein libraries in vitro. FEBS Lett 457, 227-230.
Doman, T.N., McGovern, S.L., Witherbee, B.J., Kasten, T.P., Kurumbail, R., Stallings, W.C., Connolly, D.T. and Shoichet, B.K. (2002) Molecular docking and high-throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B. J Med Chem, 45, 2213-2221.
Finch, C.A. (1993) Encapsulation and controlled release. Spec. Publ.-R. Soc. Che

m., 138, 35.
Fornusek & Vetvicka, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1986;2(2):137-74
Fu, A.Y., Chou, H.P., Spence, C., Arnold, F.H. and Quake, S.R. (2002) An integrated microfabricated cell sorter. Anal Chem, 74, 2451-2457.
Fulton, R.J., McDade, R.L., Smith, P.L., Kienker, L.J. and Kettman, J.R., Jr. (1997) Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. Clin Chem, 43, 1749-1756.
Ghadessy, F.J., Ong, J.L. and Holliger, P. (2001) Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self- replication. Proc Natl Acad Sci U S A, 98, 4552-4557.
Gordon, K., and Balasubramanian, S. (1999). Solid phase chemistry - designer linkers for combinatorial chemistry. J Chem Technol Biotechnol 74, 835-851.
Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, I. M., Waterhouse, P., Crosby, W. L., Kontermann, R. E., Jones, P. T., Low, N. M., Allison, T. J., and et al. (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. Embo J 13, 3245-3260.
Griffiths, A.D. and Tawfik, D.S. (2003) Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by in vitro compartmentalization. Embo J, 22, 24-35.
Guixe et al., Ligand-induced conformational transitions in Escherichia coli phosphofructokinase 2: evidence for an allosteric site for MgATP2-.
Biochemistry. 1998 Sep 22;37(38):13269-75.
Haber, J., Maslakiewicz, P., Rodakiewicz, N.J. and Walde, P. (1993) Activity and spectroscopic properties of bovine liver catalase in sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate/isooctane reverse micelles. Eur J Biochem, 217, 567-573.
Han, M., Gao, X., Su, J. Z., and Nie, S. (2001). Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. Nat Biotechnol 19, 631-635.
Han, M., Gao, X., Su, J.Z. and Nie, S. (2001) Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. Nat Biotechnol, 19, 631-635.
Handen, J. S. (Summer 2002). High-throughput screening - challenges for the future. Drug Discov World, 47-50.
Harder, K. W., Owen, P., Wong, L. K., Aebersold, R., Clark-Lewis, I., and Jirik, F. R. (1994). Characterization and kinetic analysis of the intracellular domain of human protein tyrosine phosphatase beta (HPTP beta) using synthetic phosphopeptides. Biochem J 298 (Pt 2), 395-401.
Heim R, Tsien RY. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. Curr Biol. 1996 Feb 1;6(2):178-82.
Hergenrother, P. J., Depew, K. P., and Schreiber, S. L. (2000). Small-molecule microarrays: covalent attachment and screening of alcohol-containing small molecules on glass slides. J Am Chem Soc 122, 7849-7850.
Hermanson, G.T. (1996) Bioconjugate techniques. Academic Press, San Diego.
Hildebrand, J.H. and Cochran, D.F.R. (1949) J. Am. Chem. Soc., 71, 22.
Hochuli, E., Dobeli, H., and Schacher, A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. J Chromatogr 411, 177-184.
Holmes, C. P., and Jones, D. G. (1995). Reagents for combinatorial crganic synthesis: development of a new o-nitrobenzyl photolabile linker for solid phase synthesis. J Org Chem 60, 2318-2319.

Huang, Z.J., Kinetic assay of fluorescein mono-beta-D-galactoside hydrolysis by

beta-galactosidase: a front-face measurement for strongly absorbing fluorogenic substrates (1991). Biochemistry. 30, 8530-4.
Hudlicky, M. (1992) Chemistry of Organic Fluorine Compounds. Ellis Horwood, New York.
Johannsson, A. (1991). Heterogeneous enzyme immunoassays. In Principles and practice of immunoassays, C. P. Price, and D. J. Newman, eds. (New York, Stockton Press), pp. 295-325.
Johannsson, A., and Bates, D. L. (1988). Amplification by second enzymes. In ELISA and other solid phase immunoassays, D. M. Kemeny, and S. J. Challacombe, eds. (Chichester, John Wiley), pp. 85-106.
Johnson, T. O., Ermolieff, J., and Jirousek, M. R. (2002). Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. Nature Reviews Drug Discovery 1, 696 -709.
Keij et al., Cytometry. 1995 Mar 1;19(3):209-16
Kerker, Cytometry. 1983 Jul;4(1):1-10
Klug, A. (1995). Gene regulatory proteins and their interaction with DNA. Ann N Y Acad Sci 758, 143-160.
Klug, A., and Schwabe, J. W. (1995). Protein motifs 5. Zinc fingers. Faseb J 9, 597-604.
Krafft, M.P., Chittofrati, A. and Riess, J.G. (2003) Emulsions and microemulsions with a fluorocarbon phase. Curr. Op. Colloid Interface Sci., 8, 251-258.
Kumar, A., Kumar, A. and Katiyar, S.S. (1989) Activity and kinetic characteristics of glutathione reductase in vitro in reverse micellar waterpool. Biochim Biophys Acta, 996, 1-6.
Lee, Y.-F., Tawfik, D. S., and Griffiths, A. D. (2002). Investigating the target recognition of DNA cytosine-5 methyltransferase HhaI by library selection using in vitro compartmentalisation (IVC). Nucleic Acids Res 30, 4937-4944.
Lim, F. (ed.). (1984) Biomedical applications of microencapsulation. CRC Press, Boca Raton, Florida.
Lim, F. and Sun, A.M. (1980) Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. Science, 210, 908-910.
Link, D.R., Anna, S.L., Weitz, D.A. and Stone, H.A. (2004) Geometrically mediated breakup of drops in microfluidic devices. Phys. Rev. Letts., 92, 054503.
Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. and Feeney, P.J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv Drug Deliv Rev, 46, 3-26.
Lissant, K.J. (ed.). (1974) Emulsions and emulsion technology. Marcel Dekker, New York.
Lissant, K.J. (ed.). (1984) Emulsions and emulsion technology. Marcel Dekker, New York.

Lowe, K.C. (2002) Perfluorochemical respiratory gas carriers: benefits to cell culture systems. J. Fluorine Chem., 118, 19-26.
Luisi, P.L. and B., S.-H. (1987) Activity and conformation of enzymes in reverse micellar solutions. Methods Enzymol, 136, 188-216.
Lyne, P. D. (2002). Structure-based virtual screening: an overview. Drug Discov Today 7, 1047-1055.
Mackenzie and Pinder, Dev Biol Stand. 1986;64:181-93.
Mahajan NP, Linder K, Berry G, Gordon GW, Heim R, Herman B. Bcl-2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer. Nat Biotechnol. 1998 Jun;16(6):547-52.

Mao, Q. and Walde, P. (1991) Substrate effects on the enzymatic activity of alpha-chymotrypsin in reverse micelles. Biochem Biophys Res Commun, 178, 1105-1112.
Mao, Q., Walde, P. and Luisi, P.L. (1992) Kinetic behaviour of alpha-chymotrypsin in reverse micelles. A stopped-flow study. Eur J Biochem, 208, 165-170.
Masui and Kuramitsu, Probing of DNA-binding sites of Escherichia coli RecA protein utilizing 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid. Biochemistry. 1998 Sep 1;37 (35): 12133 43
McDonald, J.C. and Whitesides, G.M. (2002) Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. Acc Chem Res, 35, 491-499.
Menger, F.M. and Yamada, K. (1979) J. Am. Chem. Soc., 101, 6731-6734.
Meylan, W.M. and Howard, P.H. (1995) Atom/fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients. J Pharm Sci, 84, 83-92.
Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY. Fluorescent indicators for Ca2+ based on green fluorescent proteins and calmodulin. Nature. 1997 Aug 28;388(6645):882-7.
Mize, P. D., Hoke, R. A., Linn, C. P., Reardon, J. E., and Schulte, T. H. (1989). Dual-enzyme cascade--an amplified method for the detection of alkaline phosphatase. Anal Biochem 179, 229-235.
Montigiani, S., Neri, G., Neri, P., and Neri, D. (1996). Alanine substitutions in calmodulin-binding peptides result in unexpected affinity enhancement. J Mol Biol 258, 6-13.
New, R.R.C. (ed.). (1990) Liposomes: a practical approach. Oxford University Press, Oxford.
Norman, Med Phys. 1980 Nov-Dec;7(6):609-15.
Oberholzer, T., Albrizio, M. and Luisi, P.L. (1995) Polymerase chain reaction in liposomes. Chem Biol, 2, 677-682.
Oberholzer, T., Wick, R., Luisi, P.L. and Biebricher, C.K. (1995) Enzymatic RNA replication in self-reproducing vesicles: an approach to a minimal cell. Biochem Biophys Res Commun, 207, 250-257.
Obukowicz, M.G., Turner, M.A., Wong, E.Y. and Tacon, W.C. (1988) Secretion and export of IGF-1 in Escherichia coli strain JM101. Mol Gen Genet, 215, 19-25.
Perelson, A. S., and Oster, G. F. (1979). Theoretical studies of clonal selection: minimal antibody repertoire size and reliability of self-non-self discrimination. J Theor Biol 81, 645-670.
Perez, G.M., Sanchez, F.A. and Garcia, C.F. (1992) Application of active-phase plot to the kinetic analysis of lipoxygenase in reverse micelles. Biochem J.
Pirrung, M. C., and Huang, C. Y. (1996). A general method for the spatially defined immobilization of biomolecules on glass surfaces using "caged" biotin. Bioconjug Chem 7, 317-321.
Qi and Grabowski, Acid beta-glucosidase: intrinsic fluorescence and conformational changes induced by phospholipids and saposin C. Biochemistry. 1998 Aug 18;37(33):11544-54
Ramstrom, O., and Lehn, J. M. (2002). Drug discovery by dynamic combinatorial libraries. Nat Rev Drug Discov 1, 26-36.
Riess, J.G. (2002) Fluorous micro- and nanophases with a biomedical perspective. Tetrahedron, 58, 4113-4131.
Rolland, J Immunol Methods. 1985 Jan 21;76(1):1-10
Sadtler, V.M., Krafft, M.P. and Riess, J.G. (1996) Achieving stable, reverse water-in-fluorocarbon emulsions. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 35, 1976-1978.
Sambrook, J., and Russell, D. W., eds. (2001). Molecular cloning: a laboratory m

anual (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
Savage, M. D., Mattson, G., Desai, S., Nielander, G. W., Morgensen, S., and Conk lin, E. J. (1994). Avidin-biotin chemistry: a handbook, 2 edn (Rockford, Pierce Chemical Company).
Schick, M.J. (1966) Nonionic surfactants. Marcel Dekker, New York.
Scott, R.L. (1948) J. Am. Chem. Soc., 70, 4090.
Sepp, A., Tawfik, D. S., and Griffiths, A. D. (2002). Microbead display by in vi tro compartmentalisation: selection for binding using flow cytometry. FEBS Lette rs 532, 455-458.
Shapiro, H. M. (1995). Practical Flow Cytometry, 3 edn (New York, Wiley-Liss).

Sherman, P. (1968) Emulsion science. Academic Press, London.

Song, H. and Ismagilov, R.F. (2003) Millisecond kinetics on a microfluidic chip using nanoliters of reagents. J Am Chem Soc, 125, 14613-14619.
Song, H., Tice, J.D. and Ismagilov, R.F. (2003) A microfluidic system for contro lling reaction networks in time. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 42, 767-772.
Stofko, H. R., Carr, D. W., and Scott, J. D. (1992). A single step purification for recombinant proteins. Characterization of a microtubule associated protein (MAP 2) fragment which associates with the type II cAMP-dependent protein kinase. Febs Lett 302, 274-278.
Studer, A., Hadida, S., Ferritto, R., Kim, S.Y., Jeger, P., Wipf, P. and Curran, D.P. (1997) Fluorous synthesis: a fluorous-phase strategy for improving separat ion efficiency in organic synthesis. Science, 275, 823-826.
Sun, A.M., Vasek, I. and Tai, I. (1992) Microencapsulation of living cells and t issues. In Donbrow, M. (ed.), Microencapsulation and nanoparticles in medicine a nd pharmacy. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 315-322.
Sundberg, S. A., Barrett, R. W., Pirrung, M., Lu, A. L., Kiangsoontra, B., and H olmes, C. P. (1995). Spatially-addressable immobilisation of macromolecules on s olid supports. J Am Chem Soc 117, 12050-12057.
Tawfik, D. S., and Griffiths, A. D. (1998). Man-made cell-like compartments for molecular evolution. Nat Biotechnol 16, 652-656.
Thorsen, T., R.W., R., Arnold, F.H. and Quake, S.R. (2001) Dynamic pattern forma tion in a vesicle-generating microfluidic device. Phys. Rev. Letts., 86, 4163-41 66.
Tripet, B., Yu, L., Bautista, D. L., Wong, W. Y., Irvin, R. T., and Hodges, R. S . (1996). Engineering a de novo-designed coiled-coil heterodimerization domain o ff the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expre ssed peptides and proteins. Protein Eng 9, 1029-1042.
Umbanhowar, P.B., Prasad, V. and Weitz, D.A. (2000) Monodisperse emulsions gener ated via drop break off in a coflowing steam. Langmuir, 16, 347-351.
van Hal, D.A., Bouwstra, J.A. and Junginger, H.E. (1996) Nonionic surfactant ves icles containing estradiol for topical application. In Benita, S. (ed.), Microen capsulation: methods and industrial applications. Marcel Dekker, New York, pp. 3 29-347.
Voss EW Jr. Kinetic measurements of molecular interactions by spectrofluorometry . J Mol Recognit. 1993 Jun;6(2):51-8
Walde, P., Goto, A., Monnard, P.-A., Wessicken, M. and Luisi, P.L. (1994) Oparin 's reactions revisited: enzymatic synthesis of poly(adenylic acid) in micelles a nd self-reproducing vesicles. J. Am. Chem. Soc., 116, 7541-7547.

Walde, P., Han, D. and Luisi, P.L. (1993) Spectroscopic and kinetic studies of lipases solubilized in reverse micelles. Biochemistry, 32, 4029-4034.
Walde, P., Peng, Q., Fadnavis, N.W., Battistel, E. and Luisi, P.L. (1988) Structure and activity of trypsin in reverse micelles. Eur J Biochem, 173, 401-409.
Whateley, T.L. (1996) Microcapsules: preparation by interfacial polymerisation and interfacial complexation and their applications. In Benita, S. (ed.), Microencapsulation: methods and industrial applications. Marcel Dekker, New York, pp. 349-375.
Wick, R. and Luisi, P.L. (1996) Enzyme-containing liposomes can endogenously produce membrane-constituting lipids. Chem Biol, 3, 277-285.
Zhang, Z. Y., Thieme-Sefler, A. M., Maclean, D., McNamara, D. J., Dobrusin, E. M., Sawyer, T. K., and Dixon, J. E. (1993). Substrate specificity of the protein tyrosine phosphatases. Proc Natl Acad Sci U S A 90, 4446-4450.

【０３０３】

以上の明細書中で言及されている全ての刊行物および前記刊行物中で引用されている参考文献は、本明細書に参照により援用されるものである。本発明の記述された方法およびシステムのさまざまな修正および変形形態が、本発明の範囲および精神から逸脱することなく当業者には明らかになることであろう。本発明は、特定の好ましい実施形態に関連して記述されてきたが、請求されている通りの本発明がかかる特定の実施形態に不当に制限されるべきものではないということを理解すべきである。実際、分子生物学またはそれに関係する分野の当業者にとって明白である本発明を実施するための記載された様式の様々な修正は上記特許請求の範囲の範囲内にあることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【０３０４】

【図１Ａ】本発明の一実施形態に従った液滴の分割を例示する。
【図１Ｂ】本発明の一実施形態に従った液滴の分割を例示する。
【図２Ａ】電場を印加する前の、本発明の一実施形態に従った器具を例示している。
【図２Ｂ】電場を印加する前の、本発明の一実施形態に従った器具を例示している。
【図３Ａ】電場を印加した後の、図２Ａの器具を例示する。
【図３Ｂ】電場を印加した後の、図２Ｂの器具を例示する。
【図４Ａ】逆電場の印加後の図２Ａの器具を例示する。
【図４Ｂ】逆電場の印加後の図２Ｂの器具を例示する。
【図５】本発明の一実施形態に従った液滴分割の概略図である。
【図６Ａ】本発明の付加的な実施形態の概略図である。
【図６Ｂ】本発明の付加的な実施形態の概略図である。
【図７ａ】本発明に従ったマイクロ流体液滴の形成の概略図である。
【図７ｂ】本発明に従ったマイクロ流体液滴の形成の概略図である。
【図８ａ】本発明に従った液滴の分割を例示する。
【図８ｂ】本発明に従った液滴の分割を例示する。
【図８ｃ】本発明に従った液滴の分割を例示する。
【図８ｄ】本発明に従った液滴の分割を例示する。
【図８ｅ】本発明に従った液滴の分割を例示する。
【図８ｆ】本発明に従った液滴の分割を例示する。
【図９ａ】本発明に従った液滴内への双極子の誘導を例示する。
【図９ｂ】本発明に従った液滴内への双極子の誘導を例示する。
【図９ｃ】本発明に従った液滴内への双極子の誘導を例示する。
【図９ｄ】本発明に従った液滴内への双極子の誘導を例示する。
【図１０ａ】マイクロ流体システム内の担体流体のフローを改変することによるマイクロカプセルの選別を例示する。
【図１０ｂ】マイクロ流体システム内の担体流体のフローを改変することによるマイクロ

カプセルの選別を例示する。
【図１０ｃ】マイクロ流体システム内の担体流体のフローを改変することによるマイクロカプセルの選別を例示する。
【図１０ｄ】マイクロ流体システム内の担体流体のフローを改変することによるマイクロカプセルの選別を例示する。
【図１１ａ】液滴フローの方向を制御するためのマイクロ流体システム内の圧力変化の使用を例示している。
【図１１ｂ】液滴フローの方向を制御するためのマイクロ流体システム内の圧力変化の使用を例示している。
【図１１ｃ】液滴フローの方向を制御するためのマイクロ流体システム内の圧力変化の使用を例示している。
【図１２ａ】本発明に従ったマイクロ流体システム内の液滴についてのフローパターンを例示する。
【図１２ｂ】本発明に従ったマイクロ流体システム内の液滴についてのフローパターンを例示する。
【図１２ｃ】本発明に従ったマイクロ流体システム内の液滴についてのフローパターンを例示する。
【図１２ｅ】本発明に従ったマイクロ流体システム内の液滴についてのフローパターンを例示する。
【図１２ｆ】本発明に従ったマイクロ流体システム内の液滴についてのフローパターンを例示する。
【図１２ｇ】本発明に従ったマイクロ流体システム内の液滴についてのフローパターンを例示する。
【図１２ｈ】本発明に従ったマイクロ流体システム内の液滴についてのフローパターンを例示する。
【図１２ｉ】本発明に従ったマイクロ流体システム内の液滴についてのフローパターンを例示する。
【図１２ｊ】本発明に従ったマイクロ流体システム内の液滴についてのフローパターンを例示する。
【図１３ａ】本発明における反対に荷電された液滴の使用を例示する。
【図１３ｂ】本発明における反対に荷電された液滴の使用を例示する。
【図１３ｃ】本発明における反対に荷電された液滴の使用を例示する。
【図１３ｄ】本発明における反対に荷電された液滴の使用を例示する。
【図１４ａ】非混和性液体を用いたマイクロ流体液体の形成および維持の例示である。
【図１４ｂ】非混和性液体を用いたマイクロ流体液体の形成および維持の例示である。
【図１４ｃ】非混和性液体を用いたマイクロ流体液体の形成および維持の例示である。
【図１５】マイクロ流体システム内のマイクロ液滴を用いた化合物スクリーニング。図版Ａ：コアシステムの概略図。図版Ｂ：コアシステム内のモジュールを示すプロセスブロック図である。標的酵素を含むマイクロカプセルが、各々化合物ライブラリからの異なる化合物を含有するマイクロ液滴と融合させられる。化合物が標的酵素に結合できる時間を与えた後、各マイクロ液滴が、蛍光性酵素基質を含有するもう１つのマイクロ液滴と融合させられる。酵素反応の速度は、理想的には多数の点（異なる時刻に対応する）で各マイクロ液滴の蛍光を測定することによって決定される。所望の活性をもつ化合物を含むマイクロ液滴が、必要とあらば選別され収集される。
【図１６】マイクロ流体を用いたマイクロ液滴の形成および操作の例。図版Ａ：流体力学的集束（上部の２つの図版）により最高10^4 sec^{-1}でマイクロ液滴を作り出すことができ、それらは１．５％未満の多分散性（下図版）を示す。図版Ｂ：マイクロ液滴は対称または非対称に分割可能である。図版Ｃ：正（＋ｑ）および負（－ｑ）の電荷を担持するマイクロ液滴が自発的に融合する。図版Ｄ：荷電マイクロ液滴は同様に、印加された電場（Ｅ）を用いても操縦可能である。

【図１７】ＰＴＰ１Ｂ阻害物質の例。ビス－ビフルオロメチレンホスホナート部分を伴う化合物（例２）は、単一部分（例１）を伴うものに比べ著しく効能が高い。
【図１８】マイクロカプセル化を用いたＰＴＰ１Ｂ阻害物質のスクリーニング。オレンジ色または赤色の蛍光色素で染色した表面カルボキシラート基を伴うポリスチレンビーズ（フルトン（Ｆｕｌｔｏｎ）ら、１９９７年）が、ホスホペプチドＰＴＰ１Ｂで誘導体化され、開裂可能リンカーを介してＰＴＰ１Ｂ阻害物質または非阻害性化合物のいずれかが付着される（１）。ビーズを混合した後、マイクロ流体デバイスを用いて油中水型エマルジョンを形成することによってマイクロ区画内に単一ビーズおよび標的酵素（ＰＴＰ１Ｂ）が同時にある（２）。化合物は（光化学的に）放出される（３）。阻害物質は、生成物（デホスホリル化ペプチド）に転換された基質の量を低減させる（４）。酵素反応は停止され、エマルジョンは破壊される（５）。緑色蛍光抗基質抗体での標識の後、ビーズ上の化合物および阻害の程度を同時に判定するため３色のフローサイトメトリーによりビーズが分析される（６）。化合物ライブラリは、光学的にタグ付けされたビーズ（以下参照）にカップリングされ、フローサイトメトリー（最高１００，０００ビーズS^{-1}）により急速に復号される（ｄｅｃｏｄｅｄ）ことが可能である。さらなる特徴づけのためヒット化合物を再合成（７）され、または合成進化プロセスにおいてこれを念入りに仕上げ、再度スクリーニングされる（８）。
【図１９】エマルジョン中でのＰＴＰ１Ｂ阻害物質の合成。２つのタイプのビーズが作り上げられ、オレンジ色と赤色の蛍光色素で区別して標識され、可逆的結合（シッフ塩基）を介して付着させられた２つのタイプの分子ＡおよびＢ（このうちのいずれもジフルオロメチレンホスホナート部分を含有していないかまたはその１つまたは両方がこれを含有している）と誘導体化される。ビーズはマイクロ流体デバイスを用いて乳化され、１区画につき平均２つのビーズを提供する。分子ＡおよびＢは、区画内のビーズから放出され、反応して新しい分子Ａ－Ｂ（溶解状態）を形成する。Ａ－ＢがＰＴＰ１Ｂ阻害物質である場合、同じくビーズ上にあるＰＴＰ１Ｂ基質は脱リン酸されず、これらのビーズは図１８の通り、フローサイトメトリーによって同定される。
【図２０】４成分反応を用いた小分子の進化。２５個のビーズからなる４セットが作られ、分子Ａ、Ｂ、ＣまたはＤの２５の変異体のうちの１つで各々誘導体化され、乳化されて１区画あたり平均４個のビーズを提供し、化合物は、インサイチュで大きい組合せレパートリ（4×10^{5}）を合成するべく放出され、図１８の通りにスクリーニングされる。阻害物質内で同定された分子を担持するビーズの混合物を再度スクリーニングすることによって、低親和性阻害物質が「組換えられる」ことになる。阻害物質内で発見された部分（例えばA_{10}）を担持するビーズを同様に、Ｂ、ＣおよびＤでコーティングされたビーズの完全なセットと混合し、スクリーニングすることもできる。このとき阻害物質の１成分として１つの部分（例えばB_{8}）が同定された場合、A_{10}およびB_{8}でコーティングされたビーズを、ビーズＣおよびＤの完全なセットと混合し、プロセスをくり返すことができる。この「突然変異」プロセスは同様に、デコンボリューションを結果としてもたらす。活性化合物中の４つの部分のうちの３つを固定した後、上述の通り、多重ビーズ分析を用いてデコンボリューションを完成することができる。当初のライブラリの中で使用された分子の展開されたセットである変異体を担持するビーズセットを用いて化合物を再度多様化または「突然変異」させることができる。
【図２１】フッ化炭素中水型エマルジョン内の小分子の区画化。テキサスレッド（１ｍＭ）およびカルセイン（１ｍＭ）を含有する臭化ペルフルオロオクチル中水型エマルジョンを、実施例６で記述されている通りに均質化により水相中で作った。ボルテックス処理により２つのエマルジョンを混合し、２４時間後に落射蛍光顕微鏡法により画像形成させた。テキサスレッド（赤色蛍光）およびカルセイン（緑色蛍光）のマイクロ液滴間交換は全く観察できなかった。
【図２２】ＰＴＰ１Ｂ阻害物質の合成のための一次化合物。ジフルオロメチレンホスホナート部分を伴うアミン（Ａ）およびアルデヒド（Ｂ）。アミンＡは、油中水型エマルジョンの水性マイクロカプセル中でアルデヒドＢと反応して、潜在的ＰＴＰ１Ｂ阻害物質であ

るイミンＣを生成する。Ｃをインサイチュでシアノボロヒドリドを用いて還元して、安定したアミンＤを生成することができる。
【図２３】荷電液滴の生成。（Ａ）、油および水の流れが、３０マイクロンのオリフィスで収束する。ガラス上のインジウム－錫－酸化物（ＩＴＯ）電極に印加された電圧Ｖが、電場Ｅを生成して、水－油界面を容量荷電する。滴径は低い電場強度では電荷と無関係であるが、高電場での顕微鏡写真［（Ｂ）Ｖ＝０、（Ｃ）Ｖ＝４００、（Ｄ）Ｖ＝６００および（Ｅ）Ｖ＝８００］の中で示されている通り、より高い電場では減少する。（Ｆ）連続相油の３つの異なる流速（Ｑｃ＝８０ｎＬ／秒、１１０ｎＬ／秒および１４０ｎＬ／秒）についてのフロー優位および電場優位のスナップオフの間の交差を示す電圧の関数としての液滴サイズ。水の注水速度は恒常である。Ｑｄ＝２０ｎＬ／秒}
【図２４】合体する滴。（Ａ）２つの水流を横断して１つの電圧を印加することにより、静電電荷の相対する正負符号をもつ滴を生成することができる。（Ｂ）電場が無い場合、２つのノズルにおける滴形成の頻度およびタイミングは独立しており、各ノズルは異なる頻度で異なるサイズの滴を生産する；注入速度は両方のノズルにおいて同じである。２つの流れの合流の後、上部および下部ノズルからの滴は、流れのそれぞれの半分の中にとどまり、界面活性剤に起因して、チャンネル幅を満たす大きなスラグがある場合でさえ、いかなる合流事象も存在しない。（Ｃ）ノズルの５００マイクロンの離隔距離を横断して２００Ｖという電圧が印加される場合、滴は、２本のノズルから同時に中断し、同一である。同時滴形成は、体積差の２倍という水流の不等な注入速度についてさえ達成可能である。（Ｄ）互いに遭遇し合流する滴の画分は、界面活性剤ソルビトンモノオレアート３％が存在する場合、臨界電場より上で線形的に増大する。
【図２５】ｐＨ感応性染料を担持する液滴は、異なるｐＨの流体の液滴と合流する。液滴がコーナーのまわりを透過するにつれて、並進運動と回転の組合せを通し、カオス的移流が２つの流体を急速に混合する。
【図２６】拡散制限および急速混合戦略。（Ａ）滴はＥの方向に沿って遭遇し合流し、次に、垂直方向に運び去られる。素描されているとおり、各渦流は単一の材料を含むため、対抗回転する渦流は、合流点の後２つの流体部分を混合させない。（Ｂ）滴が互いに接近するにつれて、増大する電場がその界面を変形させ、（Ｃ）ブリッジが飛び出て滴を連結させて、（Ｄ）２０ｎｍのシリカ粒子およびＭｇＣｌ＿２の場合、粒子がゲル化し始める鮮明な界面を作り出す。（Ｅ）１半球内に粒子を伴う標準的な未混合液滴。（Ｆ）高速混合を達成するためには、液滴は、電場に対して垂直方向に集められ、それらが併合した方向に対し平行な方向に運び去られる。このとき、対抗回転する渦流が作り出され、ここで各々の渦流は併合前の滴の各々に由来する中味の半分で構成されている。（Ｇ）下部滴中のｐＨ感応性染料および上部液滴中の異なるｐＨの流体を示す。（Ｈ）併合の後、液滴は鮮明な線により分割される。（Ｉ）混合が発生したことを表わす均等な強度が、液滴中で、それが１直径分並進運動した後に達成され、標準的にこれには１～２ｍｓかかる。
【図２７】時間的遅延反応モジュール。（Ａ）ペルフルオロデカリンの液滴が、ヘキサデカン担体流体内で水滴と交番する。液滴の「一列縦隊」順序づけは、水滴の精確な間隔どりまたは液滴順序に基本的に全く逸脱がない状態で長い遅延を提供する。（Ｂ）「広い断面積」のチャンネルを作り出すためにチャンネルの幅および高さを増大させることにより、分単位乃至時間単位のきわめて長い時間的遅延が提供される。液滴間の正確な順序づけおよび間隔どりは、このタイプの遅延ラインにおいては維持されない。
【図２８】中性滴の再荷電。（Ａ）電場の存在下で破壊することにより中性滴を再荷電するための概略図。未荷電滴（ｑ＝０）が電場内で分極され（Ｅｓ≠０）、Ｅｓが（Ｂ）の顕微鏡写真内で示されている通り、充分大きいことを条件として、これらの滴は、分岐点での伸長流内で２つの反対に荷電された娘滴へと分かれる。（Ｃ）に示されている破線矩形の拡大は、荷電滴が電場Ｅｓ内で引き延ばされるが、破線垂直線によって表わされた電極との接触時点で球形に戻る、ということを明らかにしている。
【図２９】検出モジュール。各液滴がファイバ上を通過するにつれてその中の蛍光を励起させるために使用される光ファイバに対し、１つ以上のレーザーが結合される。該蛍光は

同じファイバにより収集され、２色性ビームスプリッタが蛍光の特異的波長を分離し、蛍光の強度は、光が帯域通過フィルターを通過した後、光電子増倍管（ＰＭＴ）を用いて測定される。

【図３０】荷電滴の操作。（Ａ）では、全く電場が印加されない場合（$E_s = 0$）、荷電滴は左右のチャンネルに交互に入る。（Ｂ）の素描は、荷電滴が分岐点で進入することになるチャンネルを選択するために電場E_sを使用するためのレイアウトを示す。右に電場が印加された時点で（Ｃ）、滴は、分岐点で右の分岐に入る；電場が逆転した時点で、これらは左の分岐に入る（Ｄ）。分岐点の後、滴間の距離は、油流が均等に分けられていることを標示する前の距離の半分まで削減される。（Ｄ）の差し込み図は、電場内のきわめて高い荷電を受けた滴の形状の変形を示している。

【図１Ａ】

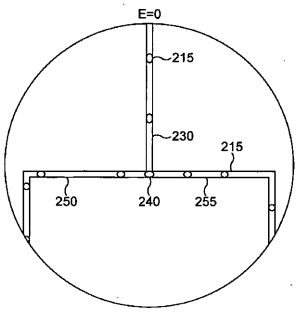


FIG. 1A

【図２Ａ】

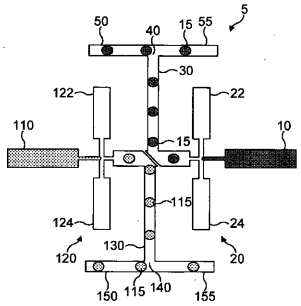


FIG. 2A

【図１Ｂ】

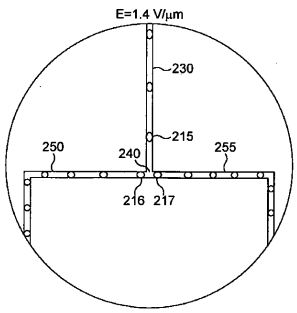


FIG. 1B

【図２Ｂ】

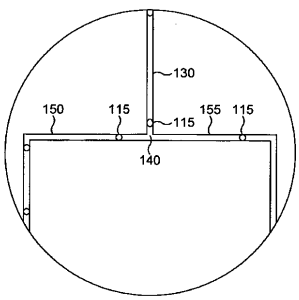


FIG. 2B

【図３Ａ】

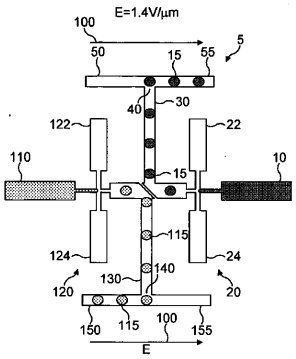


FIG. 3A

【図４Ａ】

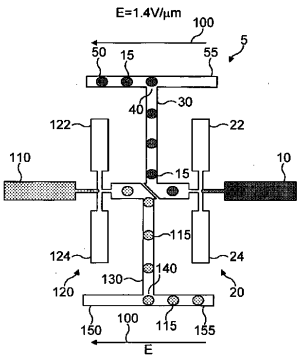


FIG. 4A

【図３Ｂ】

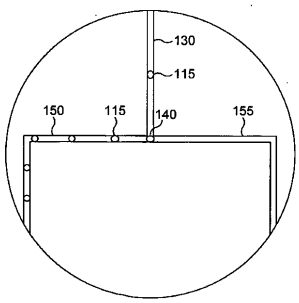


FIG. 3B

【図４Ｂ】

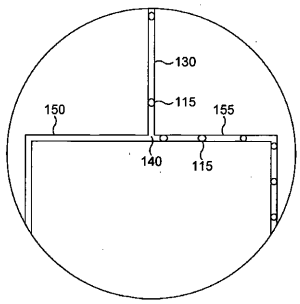


FIG. 4B

【図５】

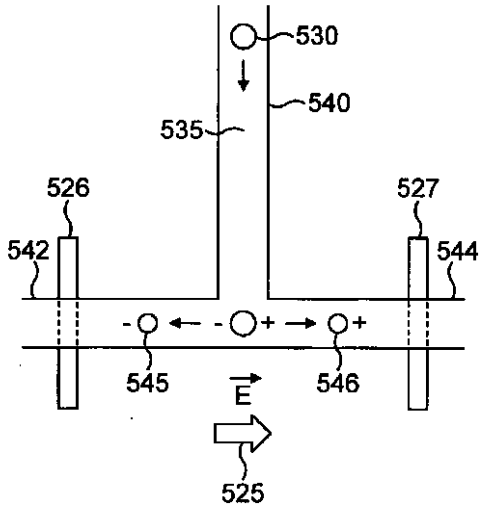


FIG. 5

【図６Ｂ】

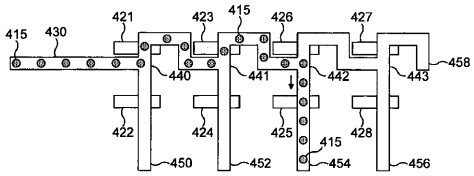


FIG. 6B

【図７Ａ】

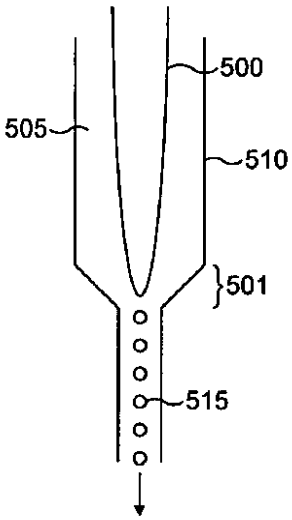


FIG. 7A

【図６Ａ】

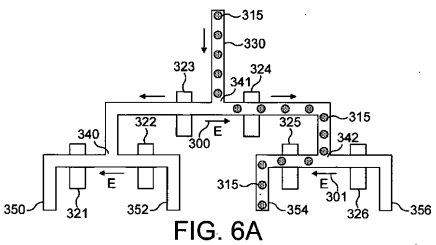


FIG. 6A

【図７Ｂ】

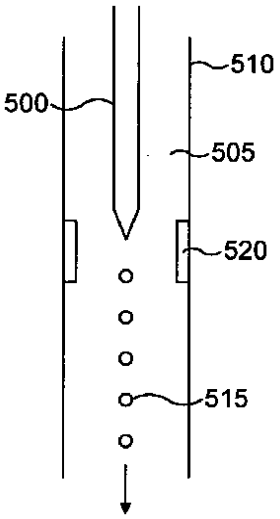


FIG. 7B

【図８Ａ】

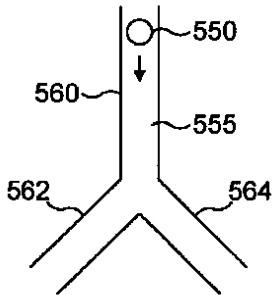


FIG. 8A

【図８Ｂ】

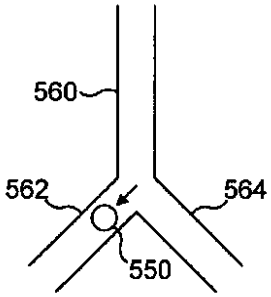


FIG. 8B

【図８Ｃ】

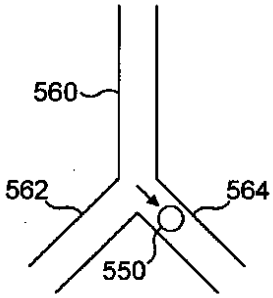


FIG. 8C

【図８Ｄ】

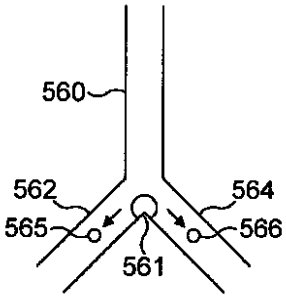


FIG. 8D

【図８Ｅ】

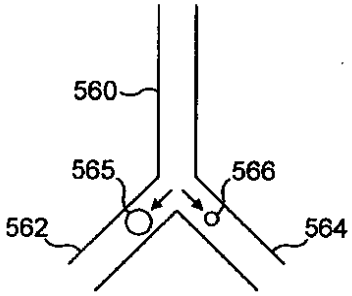


FIG. 8E

【図８Ｆ】

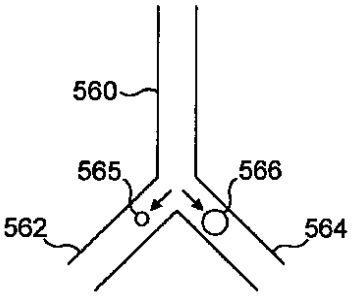


FIG. 8F

【図９Ａ】

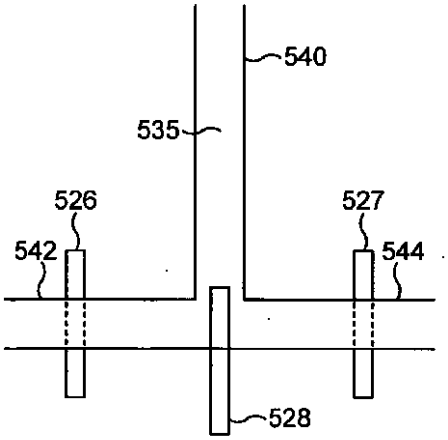


FIG. 9A

【図９Ｂ】

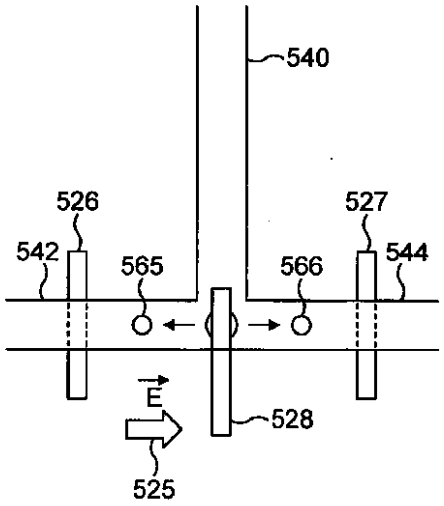


FIG. 9B

【図９Ｃ】

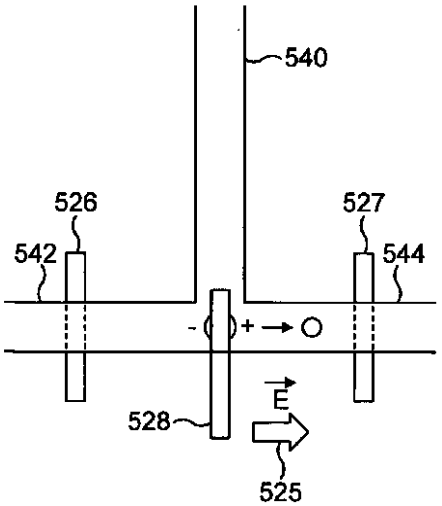


FIG. 9C

【図９Ｄ】

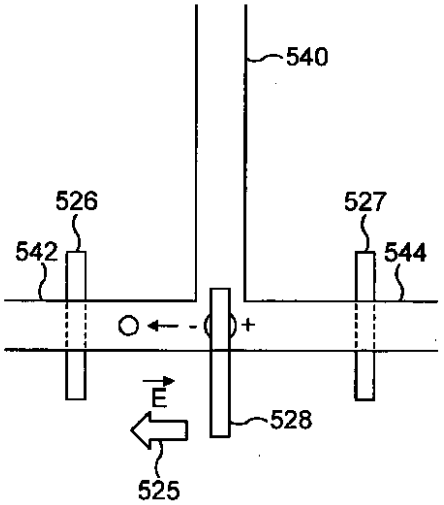


FIG. 9D

【図１０Ａ】

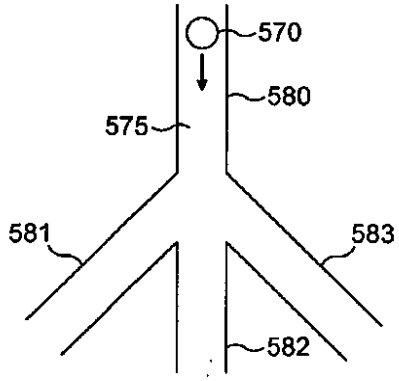


FIG. 10A

【図１０Ｂ】

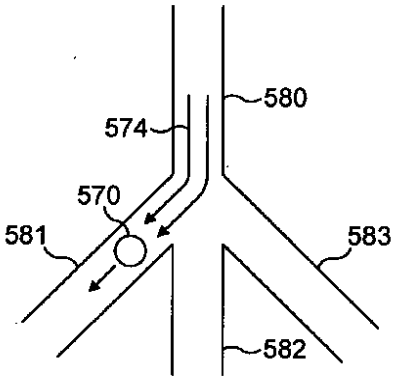


FIG. 10B

【図１０Ｃ】

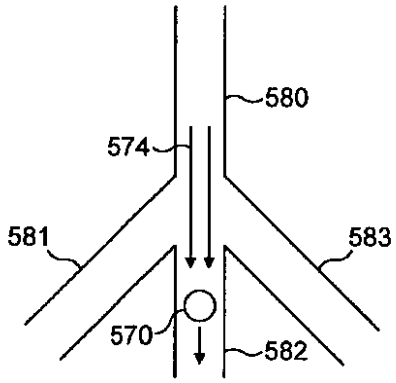


FIG. 10C

【図１０Ｄ】

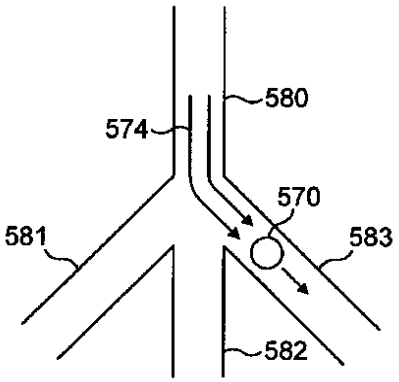


FIG. 10D

【図１１Ａ】

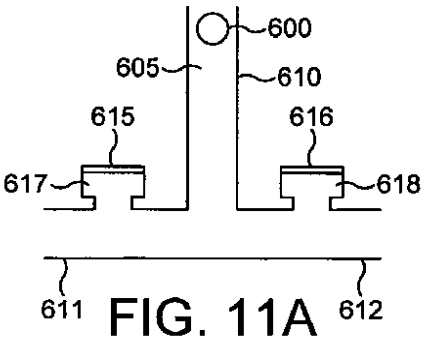


FIG. 11A

【図１１Ｂ】

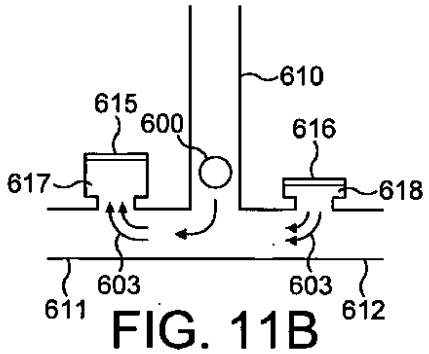


FIG. 11B

【図１１Ｃ】

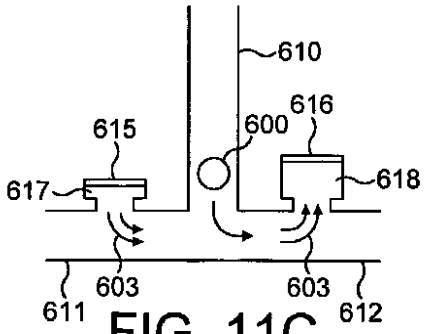


FIG. 11C

【図１２Ａ】

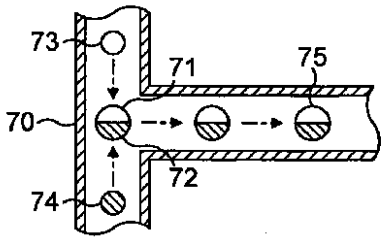


FIG. 12A

【図１２Ｂ】

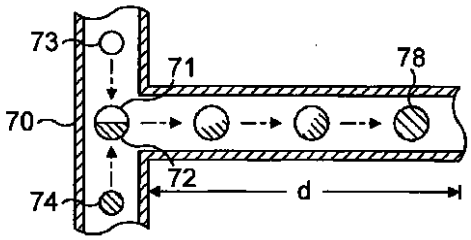


FIG. 12B

【図１２Ｃ】

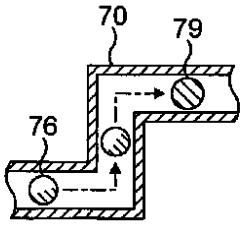


FIG. 12C

【図１２Ｄ】

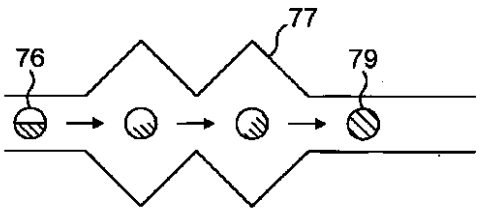


FIG. 12D

【図１２Ｅ】

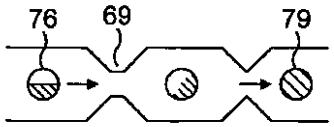


FIG. 12E

【図１２Ｆ】

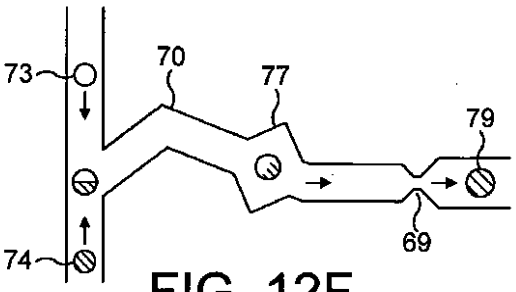


FIG. 12F

【図１２Ｇ】

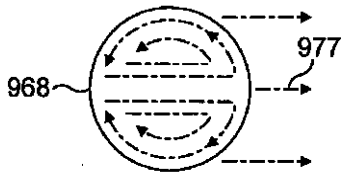


FIG. 12G

【図１２Ｈ】

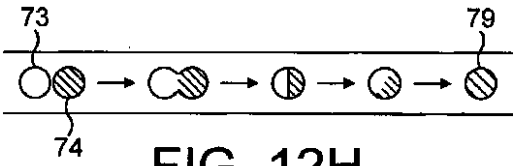


FIG. 12H

【図１２Ｉ】

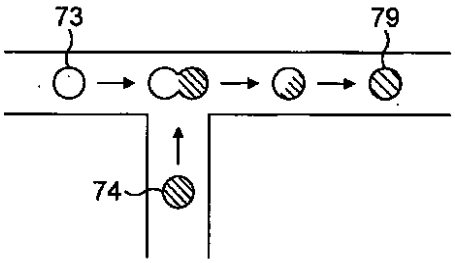


FIG. 12I

【図１２Ｊ】

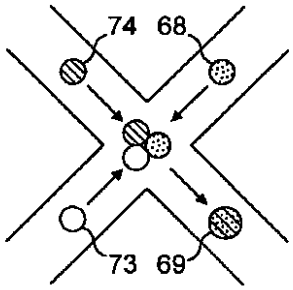


FIG. 12J

【図１３Ａ】

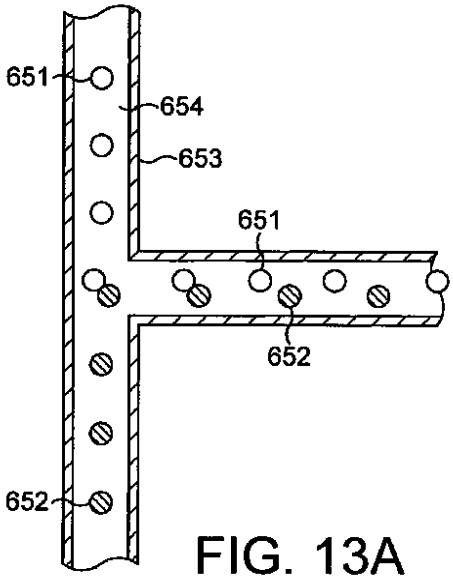


FIG. 13A

【図１３Ｂ】

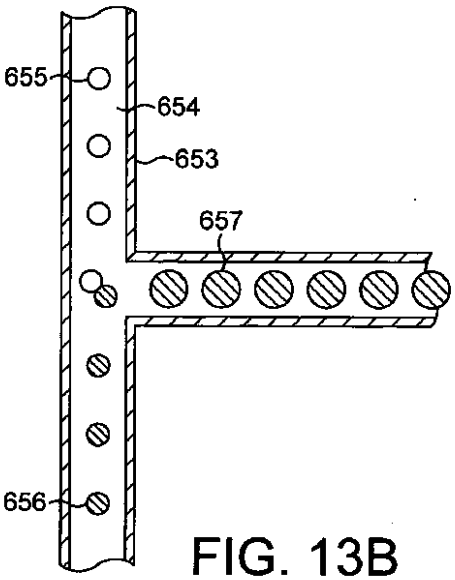


FIG. 13B

【図１３Ｃ】

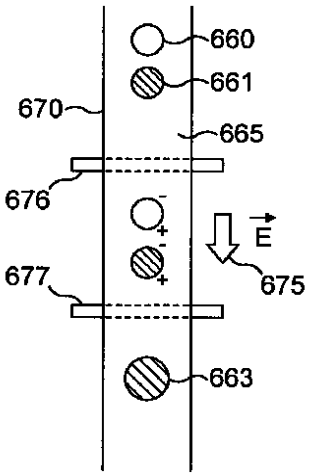


FIG. 13C

【図１３Ｄ】

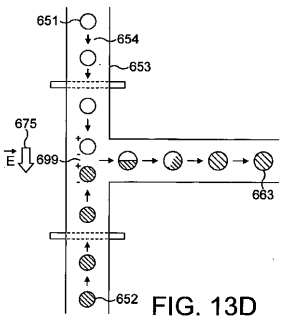


FIG. 13D

【図１４Ａ】

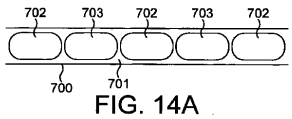


FIG. 14A

【図１４Ｂ】

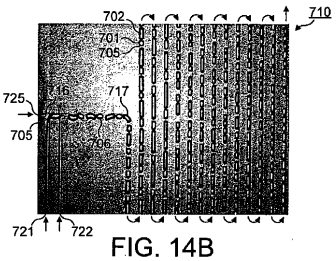


FIG. 14B

【図１４Ｃ】

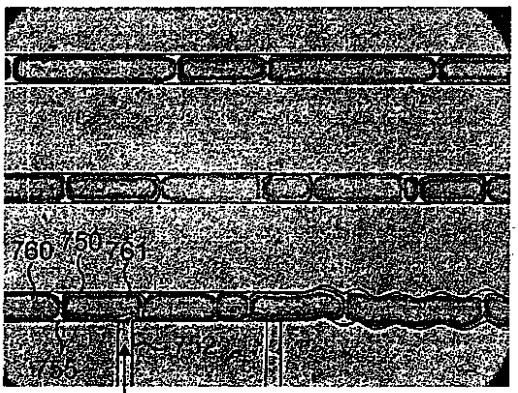


FIG. 14C

【図１５】

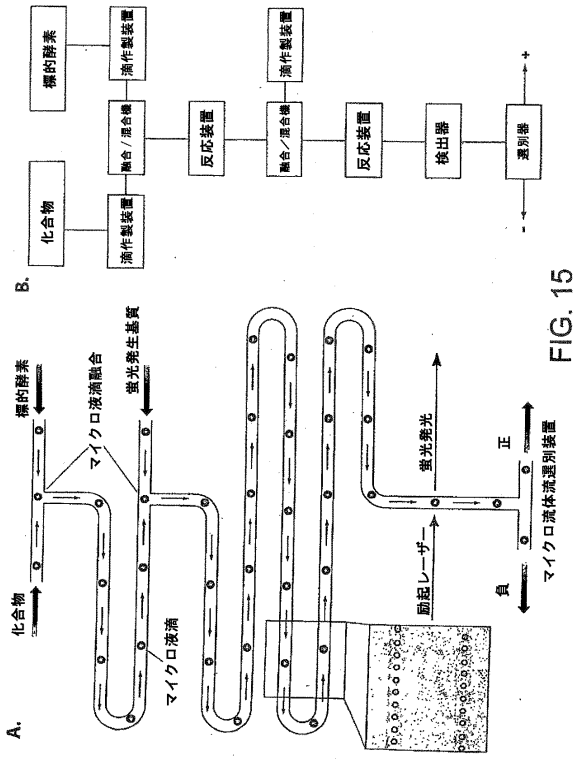


FIG. 15

【図１６】

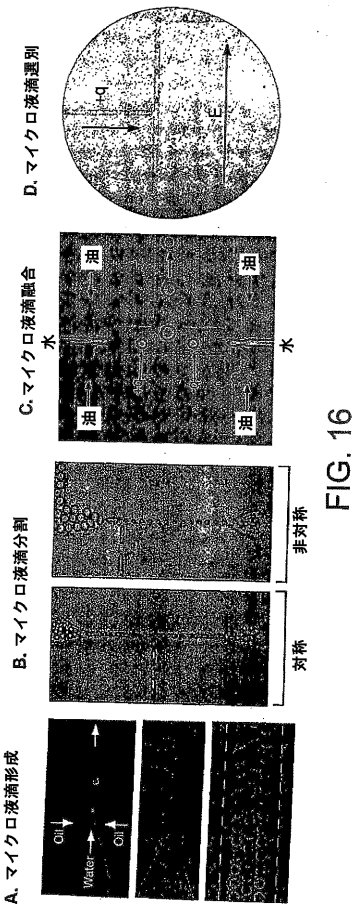


FIG. 16

【図１７】

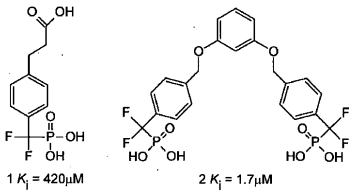


FIG. 17

【図１８】

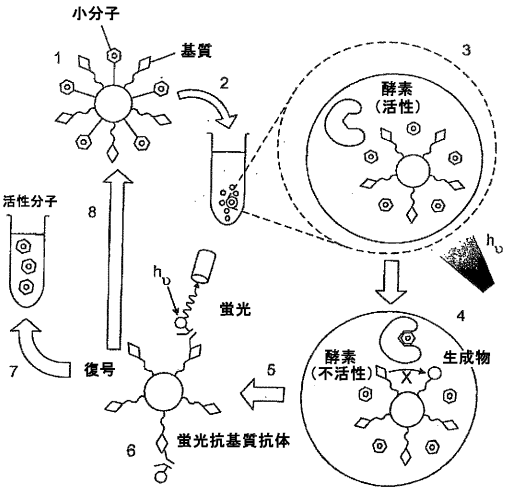


FIG. 18

【図１９】

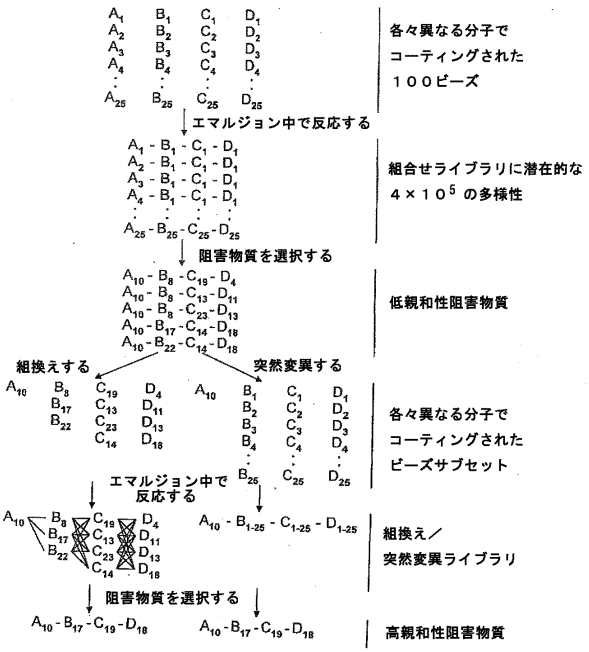


FIG. 19

【図２０】

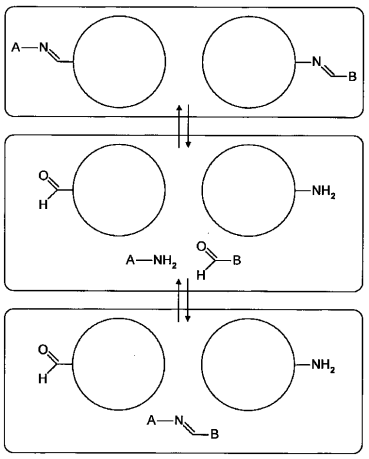


FIG. 20

【図２１】

FIG. 21

【図２２】

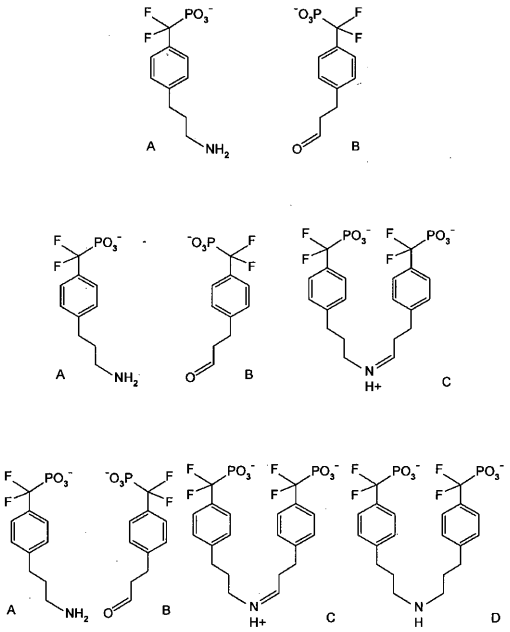


FIG. 22

【図２３】

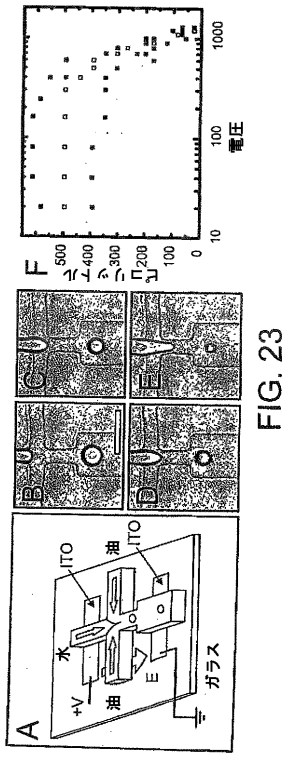


FIG. 23

【図２４】

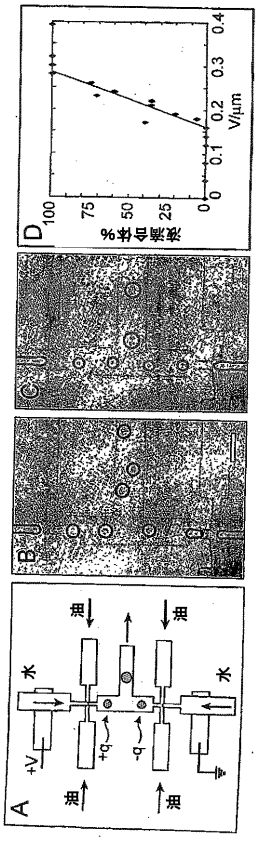


FIG. 24

【図２５】

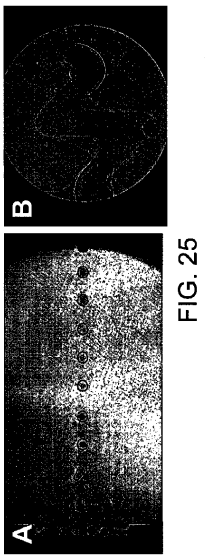


FIG. 25

【図２６】

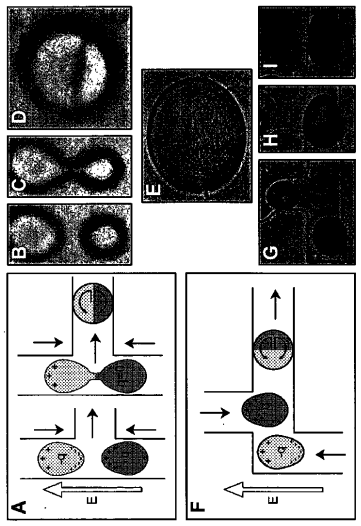


FIG. 26

【図２７】

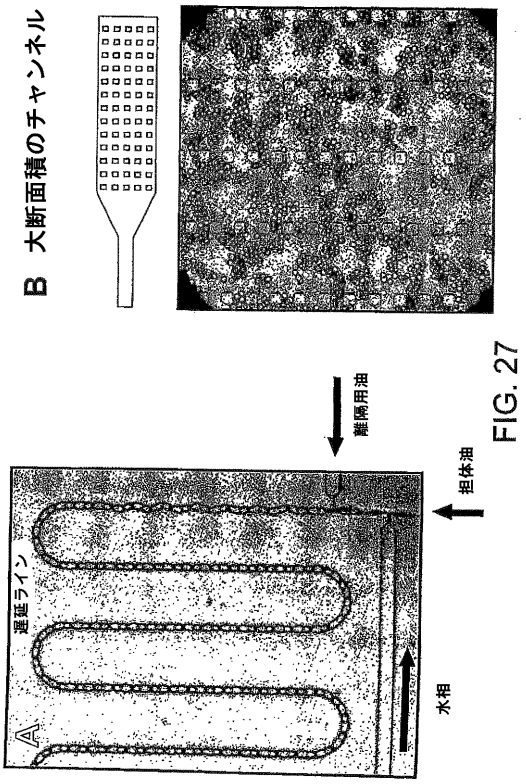


FIG. 27

【図２８】

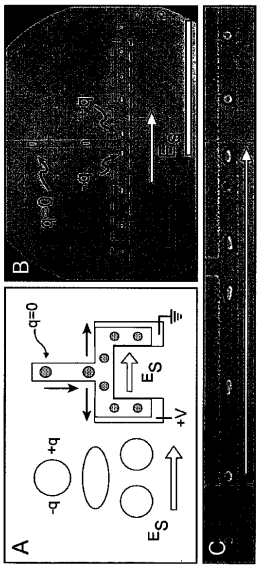


FIG. 28

【図２９】

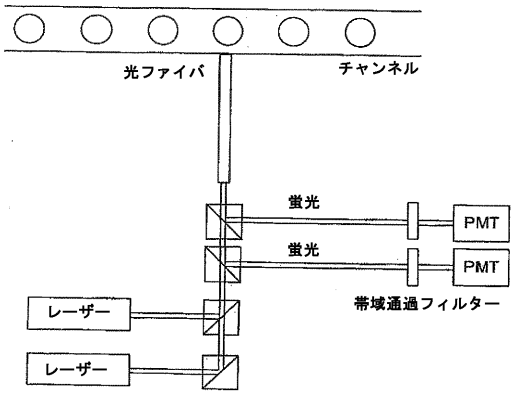


FIG. 29

【図３０】

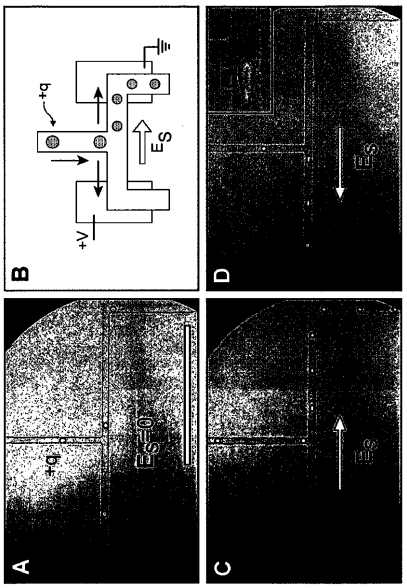


FIG. 30

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C07C 251/06 (2006.01) C07C 251/06

(74)代理人 100084146
弁理士 山崎 宏
(74)代理人 100122301
弁理士 冨田 憲史
(72)発明者 アンドリュー・グリフィス
英国シービー２・２キューエイチ、ケンブリッジ、ヒルズ・ロード、エムアールシー・ケンブリッジ・センター・フォー・プロテイン・エンジニアリング
(72)発明者 デイビッド・ウェイツ
アメリカ合衆国０２１３８マサチューセッツ州ケンブリッジ、オックスフォード・ストリート２９番、ピアース２３１
(72)発明者 ダーレン・リンク
アメリカ合衆国０６４３７コネチカット州ギルフォード、ホイットフィールド・ストリート５３０番、レインダンス・テクノロジーズ・インコーポレイテッド
(72)発明者 アン・クンホ
アメリカ合衆国０２１６３マサチューセッツ州ボストン、アパートメント８１３、ウエスタン・アベニュー１番
(72)発明者 ジェローム・ビベット
フランス、エフ－７５００５パリ、リュ・マールブランシュ４番

審査官 水島 英一郎

(56)参考文献 国際公開第２００５／０２１１５１（WO，Ａ１）
国際公開第２００２／０６８１０４（WO，Ａ１）
Angewandte Chemie. International Edition , ２００３年, Vol. 42, 767-772
Nature Biotechnology, １９９８年, Vol. 16, July, 652-656

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ４０Ｂ ５０／０８
Ｂ０１Ｊ １９／００
Ｂ０１Ｊ １３／００
Ｃ０７Ｂ ６１／００
ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）