

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-527735

(P2004-527735A)

(43) 公表日 平成16年9月9日(2004.9.9)

(51) Int. Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/53

D

2 GO 4 5

GO 1 N 33/48

GO 1 N 33/48

Z

GO 1 N 33/543

GO 1 N 33/543

5 2 1

GO 1 N 33/566

GO 1 N 33/543

5 2 5 W

GO 1 N 33/68

GO 1 N 33/566

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-564590 (P2002-564590)
 (86) (22) 出願日 平成14年2月13日 (2002.2.13)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年8月13日 (2003.8.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2002/000628
 (87) 国際公開番号 W02002/065123
 (87) 国際公開日 平成14年8月22日 (2002.8.22)
 (31) 優先権主張番号 0103464.4
 (32) 優先日 平成13年2月13日 (2001.2.13)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 0103473.5
 (32) 優先日 平成13年2月13日 (2001.2.13)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 0104125.0
 (32) 優先日 平成13年2月20日 (2001.2.20)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

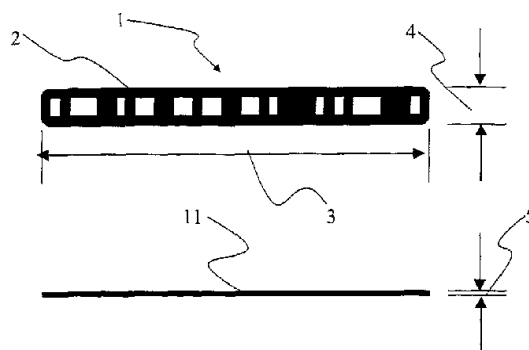
(71) 出願人 503293112
 スマートビード テクノロジーズ リミテ
 イド
 イギリス国, ケンブリッジ シービー2
 4 エーティー, バブラハム, バブラハム
 ホール
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質特性を検出するための生化学的方法及び装置

(57) 【要約】

1又は複数のタンパク質特性を検出するための生化学的方法を記載する。当該方法は、支持体(1)を利用し、ここで、各支持体(1)の最大寸法(3)は250µm未満であり、そして、各支持体(1)は連続同定手段(2)を組み込んでいる。当該方法は、検出されるべき少なくとも1つの前記1又は複数のタンパク質特性と相互作用することができる情報分子(7)を支持体(1)の主面(11)に接着させ；1又は複数の異なる連続同定手段(2)及び異なる情報分子(7)を含んで成る支持体(1)を流体中で懸濁し；解析されるべき試料(8)を前記流体に添加し；シグナル検出手段(40)を用いて流体中の支持体(1)に由来する相互作用シグナルを検出し；そして読取手段(3)を用いて相互作用シグナルを有する支持体(1)の連続同定手段(2)を読み取り、それによって少なくとも1つの前記1又は複数のタンパク質特性(8)を検出すること、を含むことで識別される。上記方法を実施する際に使用できる装置も記載する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 又は複数のタンパク質特性を検出する生化学的方法であって、各支持体 (1) の最大寸法 (3) が $250\text{ }\mu\text{m}$ 未満であり、そして、各支持体 (1) が連続同定手段 (2) を組み込んでいる、支持体 (1) を利用する方法であって

(a) 検出されるべき少なくとも 1 つの前記 1 又は複数のタンパク質特性と相互作用することができる情報分子 (7) を支持体 (1) の主面 (11) に接着させ；

(b) 1 又は複数の異なる連続同定手段 (2) 及び異なる情報分子 (7) を含んで成る支持体 (1) を流体中で懸濁し；

(c) 解析されるべき試料 (8) を前記流体に添加し；

(d) シグナル検出手段 (40) を用いて流体中の支持体 (1) に由来する相互作用シグナルを検出し；そして

(e) 読取手段 (3) を用いて相互作用シグナルを有する支持体 (1) の連続同定手段 (2) を読み取り、それによって少なくとも 1 つの前記 1 又は複数のタンパク質特性 (8) を検出する、

段階を含んで成ることを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

会合する情報分子 (7) の接着前に、支持体 (1) を酸化する段階を更に含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

段階 (c) が、段階 (b) の前、後又はそれと同時に、のいずれかに実施され、そして段階 (e) が段階 (d) の前又は後のいずれかに実施されることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

相互作用シグナルを検出し、そして連続同定手段 (2) を読み取るために測定ユニット (35) であって、相互作用シグナル及び連続同定手段 (2) を実質的に同時に検出するために配置され、支持体 (1) を問い合わせるための検出手段及び読取手段 (40, 37) を含んで成る測定ユニット (37) を用いる段階を更に含むことを特徴とする、請求項 1, 2, 又は 3 に記載の方法。

【請求項 5】

シグナル放射ラベル (9) が流体に添加され、このラベル (9) が、情報分子 (7) が検出されるタンパク質特性と結合する場合に相互作用シグナルを放射することを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 6】

支持体 (1) の連続同定手段 (2) の読取が支持体 (1) の配向に無関係であり、連続同定手段 (2) が、連続同定手段 (2) の読取の間に収集された情報をどのように解釈するかを示すために配置された 1 又は複数の特徴を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

支持体 (1) を含んで成る流体がその後の問い合わせのために基板 (49) 上に載せられることを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 8】

支持体 (1) の検出及び読取のために配置された測定ユニット (35) を用いて、基板 (49) に沿った、規定の経路 (60) に沿って流体を読み取る段階を更に含んで成り、前記経路 (60) が実質的に全ての流体を受けるために配置されていることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

個々の支持体 (1) をわずかに 1 回問い合わせる段階を更に含んで成ることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

50

接着情報分子(7)と会合した支持体(1)及び、少なくとも1つの潜在的なタンパク質特性(8)を含む試料を含んで成る流体が、問い合わせの前に支持体(1)を整列させ、そして分離するための集束手段を介して、測定ユニット(35)の問い合わせ領域(34)を通過されることを特徴とする、請求項1~6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

測定ユニット(35)が、特定の連続同定手段(2)を特定の情報分子(7)と結びつける、あらかじめ設定された情報を含むデータベースを用いて、支持体(1)由来の読取情報及び検出情報を確認することを特徴とする、請求項1~10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

支持体(1)が、それらに対する分子接着を容易にするために、1又は複数のそれらの主面(11)上を結合プロモーターでコーティングされることを特徴とする、請求項1~11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

結合プロモーターが少なくとも1つのシラン及びアビジン-ビオチンであることを特徴とする、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

流体が溶液を含むことを特徴とする、請求項1~13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

検出される1又は複数のタンパク質特性が薬物ターゲティングであり、そして支持体(1)に接着される特定の型の情報分子(7)が核酸、タンパク質及び/又はPNA分子であることを特徴とする、請求項1~14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

検出される1又は複数のタンパク質特性がプロテオミクスであり、そして支持体(1)に接着される特定の型の情報分子(7)が核酸、タンパク質及び/又はPNA分子であることを特徴とする、請求項1~14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

検出される1又は複数のタンパク質特性が解析物の解析であり、そして支持体(1)に接着される特定の型の情報分子(7)が酵素、タンパク質及び/又はPNA分子であることを特徴とする、請求項1~14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

支持体(1)を含んで成る流体を解析するためのタンパク質特性の検出装置であって、各支持体(1)の最大寸法(3)が250µm未満であり、そして各支持体(1)が連続同定手段を組み込んでおり、

当該装置内で問い合わせをした場合に各支持体(1)から生成する2つの独立したシグナルを検出するための検出手段(40)及び読取手段(37)を含み、少なくとも読取手段(37)が、支持体(1)の連続同定手段(2)の検出のために流体中で懸濁された支持体(1)と光通信するよう配置され、そして検出手段(40)が解析されるべき試料中の1又は複数のタンパク質特性と、相当する特定の連続同定手段(2)を含む支持体(1)の主面(11)に接着した情報分子(7)との間の相互作用の検出のための相互作用シグナルを検出するために配置されていることを特徴とする装置。

【請求項19】

相互作用シグナルがシグナル放射ラベル(9)によって生成し、これが情報分子(7)と解析試料中の検出されるタンパク質特性(8)との間の相互作用を介して活性化され、又は不活化されることを特徴とする、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

支持体(1)の連続同定手段(2)が、連続同定手段(2)の読取の間に、支持体(1)から収集された情報をどのように解釈するかを示すために配置された1又は複数の特徴を有することを特徴とする、請求項18又は19に記載のタンパク質特性検出装置を用いる使用のための支持体。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

連続同定手段(2)がパリティビットチェックの特徴及び/又はフォワードエラーコレクションの特徴を含むことを特徴とする、請求項 2 0 に記載の支持体。

【請求項 2 2】

支持体(1)の連続同定手段(2)がその最大寸法(3)に沿って実質的に配置されていることを特徴とする、請求項 2 0 に記載の支持体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、請求項 1 の前段に記載の、タンパク質特性を検出するための生化学的方法、及び更には請求項 1 8 の前段に記載の、タンパク質特性を検出するための装置、に関する。 10

【背景技術】

【0 0 0 2】

近年、多くの型の生物、例えば酵母、細菌及び哺乳類並びに細胞系のタンパク質特性を検出するための技術及び関連するシステムに、かなりの注目が集まっている。現在、タンパク質特性を検出するための試験は、連続的に行われる多数の実験段階を必要とする。当該段階は、2次元ゲル電気泳動(2Dゲル)、電気泳動後のタンパク質抽出、それに続く質量解析、を含む。タンパク質の解析法は、より多くの検出処理量に関連して、より大掛かりな自動化への方向へと進化している。そのような技術の進歩は、例えばヒトゲノム計画、によって促されており、この計画は実にヒトゲノムにほぼ30,000~40,000の遺伝子が存在していることを示した。新規な遺伝的特徴の発見により、どのように/なぜ、異なるタンパク質が産生し、そして機能するかの理解における注目が増大している。何百万ものタンパク質特性及び何千もの解析される種により、タンパク質特性を解析する高処理量の方法が、タンパク質科学の継続している進展にとって非常に重要になってきている。例えば、現在では薬物の研究及び開発に関連するタンパク質の同定及び特徴づけ(プロテオミクス)のための大量に並列して行われる高処理量の技術についての必要性が存在している。 20

【0 0 0 3】

遺伝子とは反対に、タンパク質はin vitroで増幅されえず、そしてそれ故に解析には微量しか使えない。このように、より良い感度及び処理量を提供するタンパク質の解析法の進展は、タンパク質配列のデータベースを効果的に利用するのに最も重要なものである。新規な高処理量の技術のためのこの必要性にも関わらず、タンパク質特性を決定する方法はほとんど商業的に利用可能となっていない。現在の方法は、タンパク質特性に必要な処理量及び反応環境を達成することができない。 30

【0 0 0 4】

タンパク質特性を決定するために使用される技術は、個別に標識される多数の成分の実験を包含しており；当該実験が完了した場合、それらは、同定のためにそれらの関連ラベルを用いて読み取ることができる。現在使用されるラベルには：

(a)マイクロタイタープレート内、チューブ内、2Dゲル上での、又は質量解析計に注入される、各実験の位置； 40

(b)膜表面上での各実験の位置；

(c)「タンパク質アレイ」として知られる、試験用集積回路の表面上での各実験の位置；及び

(d)当該実験に結合する粒子を同定する蛍光スペクトル又は他の方法、が含まれる。

【0 0 0 5】

そのような既知の方法は、製造し、そして使用するには困難で且つ費用がかかり、その実行のための構成要素を利用するという欠点を有する。

【0 0 0 6】

上述のように、タンパク質特性を検出するための主なアプローチは、2次元(2D)ゲルであ 50

る。この方法は、解析するのが困難なこと、乏しい再現性、結果のばらつき、及び限定された試料の処理量というこれまでに論じられたような欠点を有する。2次元ゲルは、使用するのが非常に重労働であり、そしてしばしばタンパク質の特徴づけにおいて50%の成功しかもたらさない。2Dゲルの更なる欠点は、ごく少数の実験が同時に実施されうること、そして質量解析による追加の処理が実験結果に到達する前に必要であること、である。

【0007】

現在、タンパク質マイクロアレイの限定された商業的な利用可能性が存在しており、そして多くの研究者がタンパク質を解析するのに「自家製」の方法を使用しており、例えば多数のタンパク質を顕微鏡用スライドに接着させることによってアレイを作成している。2Dゲル及び質量解析のような方法と組み合わせたこのアプローチは、代りの方法が商業的に利用可能とならない限り普及しそうである。

10

【0008】

Zyomyx Inc.に譲渡された米国特許番号第6,329,209号はにおいて、タンパク質マイクロアレイが記載されている。当該マイクロアレイは、生物の細胞又は細胞群の発現産物、又はそれらのフラグメントである多数のタンパク質の同時検出に使用される。当該マイクロアレイは、表面がその中に多数のタンパク質捕捉因子を有する多数の相隔たる固定領域に区切られている基板に関する。各固定領域は、非特異的なタンパク質結合に耐えるしきりによって覆われている。各部位は、当該基板の表面上のその空間的な位置によって効果的に標識されている。Zyomyx Inc.のタンパク質プロファイリングバイオチップは、並列解析によっておよそ1200のタンパク質を解析することができる。タンパク質解析の処理段階が、この特定のアレイにより伝統的な方法と比較して合理化されているが、多くの2Dゲルが最大1000個のタンパク質を分離することができるので、それは必ずしも処理量の増大を提供しない。

20

【0009】

同一のマイクロアレイ上で試験される試料の数が増えるにつれ、関連する製造装置の縮小化及び専門的な材料の扱いについての要求が、そのようなマイクロアレイの製造をますます複雑にする。そのようなマイクロアレイ上でモニタリングされる試料のタンパク質特性はあらかじめ知られ、そして単離されなければならない、そのような事前の知識は、研究されるべき生物又は種のそれぞれの異なる型についての顧客の要求に対して特異的なマイクロアレイを製造するのを複雑且つ高価な方法にさせている。

30

【0010】

更に、同一の表面上に固定された大量のタンパク質又はペプチドフラグメント間の相互作用の程度は、よく理解されておらず、そして試験試料との適当な結合を妨害することがある。このことは、当該アッセイにおけるタンパク質試料量の増大をおそらく必要とするだけでなく、結果として実験の感度及び/又は特異性を低下させることがあるので問題である。この技術に関連する更なる欠点は、低いフレキシビリティ、乏しい反応速度、長い製造の所要時間、高度な読取技術、高コスト及び低いデータの品質、である。

【0011】

微粒子上で実施されるバイオアッセイは、大規模に並列して行われるアレイ技術の別の型を提供する。異なる試料を互いに分離する方法は、多数の試験が同時に実施されうるように、情報分子を小さい支持体に接着させることによって達成されている。当該支持体を互いに識別するために使用されるシステムは、通常蛍光又は反射を指標とするものである。

40

【0012】

Luminex Corporation及びUpstate Biotechnologyは、支持体の蛍光群に結合したミエリン塩基性タンパク質(MBP)を利用することによってセリン/スレオニンキナーゼを検出する方法を提供する。固形支持体は微粒子であり、そして会合反応を示すためにMBPと反応する光学的標識を使用する。先進の分類装置が反応した支持体を分類するために使用され、そのような分類は、異なる支持体と会合した、異なる光学的シグナル強度によって達成され；当該光学的標識は発光しており、そして当該微粒子支持体は、それらから発せられた光

50

の強度に依存して分類される。そのような分類法は、別個に負荷された微粒子の使用を介してタンパク質特性を検出するマイクロアレイよりも大きなフレキシビリティを可能にする。しかしながら、活性化した微粒子から発せられた光の異なる強度レベルを決定するのに必要な計測手段の複雑さに関して経験する更なる問題が存在する。この技術の処理量は現在100個の試料に限定されており、これは大量の実験に必要な多重化のレベルを提供するものではない。

【0013】

公開国際PCT出願番号W000/16893において、バイオアッセイにおける固形支持体の使用に関する方法、及びそのような支持体を製造する方法が記載されている。当該支持体は、陽極酸化された金属、好ましくはアルミニウムから製造される。当該支持体は、例えば、抗原に結合するために、それらに接着した抗体を有する。

10

【0014】

タンパク質の特徴づけ及び同定のための別の既知の利用は、疾患に関連した解析物の解析である。当該解析物の解析は、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、RIA(ラジオイムノアッセイ)、クロモジェニックアッセイ、HPLC(高性能液体クロマトグラフィー)、RIA(ラジオイムノアッセイ)、クロモジェニックアッセイ、HPLC(高性能液体クロマトグラフィー)、GCMS(ガスクロマトグラフィー-質量解析)、TLC(薄層クロマトグラフィー)、NIR(近赤外)解析、を含む様々な方法を用いて現在実施されている。これらの方法は、任意なある時間で検出されうる解析物の数が限定されていること、時間がかかること、そして高価な装置を必要とすること、という欠点を有している。

20

【0015】

現代のタンパク質の特徴づけの技術で経験する別の問題は、高度に訓練され、そしてタンパク質特性を決定するための実験の数を増やして行う場合に必要とされる複数の異なるシステムの設定を理解するスタッフが必要なことである。そのようなスタッフの必要性は、スタッフの訓練における比較的高い初期投資をもたらす。それはしばしば、解析結果の検証の必要性により、且つ解析結果の信頼性を増すために、科学者による監視を必要とする繰り返しの実験を行う必要があり、これは他の活動についてのこれらの科学者の利用可能性を低下させる。更に、多くの産業、例えば薬の研究及び開発においては、全てを検証しなければならない、かなりの時間の必要性及び費用をもたらす方法を通じて使用される広範な技術が存在している。

30

【発明の開示】

【0016】

本発明の第一の目的は、タンパク質特性を検出するのが向上した方法を提供することである。

【0017】

本発明の第二の目的は、タンパク質特性を検出するための実験を実施する、低コストで高処理量の方法を提供することである。

【0018】

本発明の更なる目的は、タンパク質特性を検出することが向上した装置を提供することである。

40

【0019】

本発明の第一の観点に従い、1又は複数の本発明の前述の目的及び以下の説明から明らかな他の目的を解決するために、請求項1に記載の方法が提供される。

【0020】

更に、本発明の第二の観点に従い、1又は複数の本発明の前述の目的及び以下の説明から明らかな他の目的を解決するために、請求項18に記載の装置が提供される。

【0021】

当該方法及び装置は、本発明の前述の目的を解決することができるという利点がある。

【0022】

このように、本発明の第一の観点は、タンパク質特性を検出するための方法に関し、ここ

50

で、特定の連続同定手段を有する支持体が、それらの主面に情報分子を接着させている。支持体上に当該分子を接着させ、そして流体中でそれらを懸濁することは、非常に良好な反応速度を可能にし、それによって反応液量及び時間を減少させるだけでなく、感度も向上させる。検出されるタンパク質特性を潜在的に含む試料が前記流体に添加される。一度に数十万の試験を行う多重化実験が可能であるのは、異なる連続同定手段を有し、且つ情報分子が接着した多数の支持体が、当該バイオアッセイ内に同時に存在しうるからである。支持体と組み合わせての、その様な分子の使用は、バッチ型で且つ繰り返し型の実験を実施する必要を減らす。異なる型の信号は、支持体の連続的な同定手段を示すために使用され、そして相互作用シグナルは1又は複数のタンパク質特性との相互作用を示す。そのようなアプローチは、その結果、あまり先進的でない読取装置及び検出器をアッセイの測定の実施に必要とし、それによって潜在的にコストを削減する。

10

【0023】

本発明の好ましい態様において、当該支持体は、それらに対する情報分子の接着の前に酸化される。そのような接着は、支持体の表面に向上した機械的且つ物理的接着特性を持たせる。あるいは、又は更に、当該支持体は、それらへの情報分子の接着を増強するために1又は複数の結合因子でコーティングされる。

【0024】

本発明の更に好ましい態様において、測定ユニットは、シグナル放射ラベルの検出と連続的な同定手段の読取を事実上同時に実施する。この同時の測定は、先進のソフトウェアが当該支持体のトラッキングに利用されない場合、不正確な読取の危険性を減らし、そして

20

【0025】

本発明の追加の態様において、連続同定手段の読取は、収集された情報をどのように解釈するかを示すために配置された1又は複数の特徴を設置することを含む。このことは、例えばフローサイトメーター読取システムを、位置又は流れ方向に関係なく支持体を同定することを可能にする。

【0026】

本発明の更なる態様は、基板上に乗せられ、そして次にその上に固定された、負荷された支持体を含む流体を有する。このことは既存の装置の設定に対するわずかな改変を必要とするだけで、標準的な平面を読み取る方法の処理量の能力の倍数的な増大を可能にする。

30

【0027】

本発明の特別の観点によると、測定ユニットの読取は、支持体と会合した基板を既定の経路に沿って運ぶことを包含する。経路に沿ったそのような動きは、好ましくは、測定ユニットを固定したまま、支持体が載った基板を動かすことによって達成される。あるいは、支持体を有する基板を固定したまま測定ユニットが動かされうることも明らかである。そのようなアプローチは、結果として、液体中の実質的に全ての支持体を解析させることができる。測定経路に沿って測定ユニットの焦点領域内に部分的にしか存在しないそれらの支持体は、それらが1回だけ解析されるように記録される、それらの相当する位置を有する。

【0028】

本発明の他の好ましい態様において、検出されるタンパク質特性は、薬物のターゲッティング、プロテオミクス又は解析物の解析のためのものである。本発明のこれらの態様は、低コストで、迅速で且つ簡便に、薬物ターゲッティング、プロテオミクス及び/又は解析物の解析のための大量に並列で行われる多重バイオアッセイ試験を実施するための系を含む。そのようなスキームは、何千もの異なる型の、例えば、ラベル又はマイクロラベルとも称される、マイクロマシンをコードした支持体、を含む懸濁液を生成することによって高処理量を達成する。これらの各支持体は、例えば核酸、ペプチド核酸(PNA)、酵素及び/又はタンパク質の情報分子を担持する。情報分子が接着した支持体は、シグナルを放射するラベル、すなわちレポーター系、例えば蛍光と一緒の試験のもと、タンパク質特性を潜在的に含む試料と混合される。研究されるタンパク質特性に結合する核酸、PNA、酵素

40

50

及び / 又はタンパク質のプロープを有する支持体のみが、シグナル、例えば蛍光を結果として放射するシグナル放射ラベルと結合する。

【 0 0 2 9 】

本発明の第二の観点において、活性化シグナル放射ラベルの検出と会合した第一シグナルと支持体の連続同定の読取と会合した第二シグナルの、2つの異なる型のシグナルを記録するために配置された検出手段及び同定手段を有する、タンパク質特性を検出する装置が提供される。そのような多数の異なる型のシグナルは、先進で、且つコストのかかる画像処理装置の潜在的な必要性を減少させる。

【 0 0 3 0 】

薬物ターゲティング、プロテオミクス、又は解析物の生化学的アッセイの解析において当該装置と一緒に適切に使用される固形支持体の態様は、形状が実質的に線形又は平面であり、そして陽極酸化金属表面層を有する。当該支持体の最大寸法は、好ましくは、およそ250 μm 未満、更に好ましくは150 μm 未満、そして最も好ましくはおよそ100 μm 未満の長さであり、それによって水性の懸濁液が多数の支持体から形成可能である。このことは、同一の型のバイオアッセイを、複数の異なる実験の型に使用することを可能にする。

10

【 0 0 3 1 】

更なる態様において、支持体の表面層は、当該表面層の平面に垂直な、陽極酸化層の細胞の増殖方向を有する細胞構造の陽極酸化層を有する。適切には、当該支持体は、表面層に結合した、核酸、PNA、酵素及び / 又はタンパク質の情報分子 (プロープ) を有する。支持体の表面層はアルミニウム製であってもよく、そして多孔性であってもよい。更に、表面層の孔径は、適切には、結合する核酸、PNA、酵素及び / 又はタンパク質分子のサイズにおおよそ適合される。このことは、情報分子の接着のために、優れた機械的且つ化学的な結合特性を有する支持体を提供する。

20

【 0 0 3 2 】

別の態様において、当該支持体は、同定目的のために、空間が変化するパターンを組み込む。このパターン、すなわち連続同定は、好ましくはバーコードである。適切には、測定ユニット、例えば光学式読取装置は、当該パターンを読み取り、そして当該支持体を同定するために使用される。

【 0 0 3 3 】

前述の本発明の特徴が、本発明の範囲を逸脱することなく、任意な組み合わせで組み合されうことは理解されるだろう。

30

【 0 0 3 4 】

本発明の詳細な説明

図1において、本発明の好ましい態様の例示を示す。そこには単一の支持体1を示し; そのような支持体は後文において「マイクロラベル」とも言及される。当該支持体1は、ポリマー、ガラスから合金に及ぶ広範な材料から加工されるが、好ましくは金属から加工され、そして最も好ましくはアルミニウムから加工される。当該支持体1は、溝、ノッチ、くぼみ、突起 (protrusion)、突起 (projection)、そして最も好ましくは穴のうちの少なくとも1つ (又は任意なそれらの組み合わせ) の形状でもありうる連続同定手段2を組み込んでいる。連続同定手段2は、適切には、透過型光学式バーコードである。バーコード2は、支持体1から伸びる、空間的に連続的な一連の穴として導入される。そのような穴は、変化した形状及びサイズのものであってもよい。それらはまた、支持体1の固体の領域が光に対して実質的に非透過性であるが、バーコード2の穴がその時受ける光に対して高度に透過性である場合に最良の光学的コントラストを提供することができる。

40

【 0 0 3 5 】

支持体1は、多数の異なる型の形状のものでよいが、好ましくは、少なくとも主面11を持つ実質的に平面の形状を有する。この型の各支持体1は、およそ250 μm 未満、更に好ましくは150 μm 未満、そして最も好ましくはおよそ100 μm 未満の長さの最大寸法3を有する。当該支持体1は、適切には、およそ1:2 ~ およそ1:20の範囲の幅

50

4対長さ3の比率を有するが、およそ1:5~およそ1:15の比率の範囲が特に好ましい。更に、当該支持体1は、好ましくは3 μ m未満、そして更に好ましくはおよそ1 μ m未満の厚さ5を有する。およそ1 μ m未満の厚さは、当該支持体1をバイオアッセイにおいて有用なものとするための十分な機械的な支持体の強度を提供することが示されている。本発明の好ましい態様は、およそ100 μ mの長さ3、およそ10 μ mの幅4及びおよそ1 μ mの厚さ5を有する支持体1に関し；そのような支持体は、最大100,000個の異なる同定順序のバーコード2を保存することができる。タンパク質の特徴づけの実験のためのバイオアッセイにおける使用のための最大100,000個の異なる支持体の変形物の実験的な証明が行われてきた。連続同定手段2内の2~5の10進数字のデータを担持する、40~100 μ mの範囲内の異なる長さ3の支持体1が、タンパク質の特徴づけの検出のための異なる実験における使用のために加工されている。

【0036】

およそ1000万のそのような支持体1、すなわちマイクロラベルが、単一の6インチ(152.4ミリ)の直径の基板、例えばシリコンウェハー上で、今日確立されている製造技術を用いて加工されうる。常用のフォトリソグラフィ及びドライエッチングの工程が、陽極酸化アルミニウム層を製造し、そしてパターニングして、別々の固形支持体1を生成するために使用される。

【0037】

支持体1に類似の多数の支持体を製造するための加工方法は、以下の：

- (1) 可溶性の放出層を平面の基板に蒸着し；
- (2) アルミニウム材料の層を、基板から離れた放出層上に蒸着し；
- (3) フォトリソグラフィ工程及びエッチング工程によってアルミニウム材料層内に支持体の特徴を限定させ；
- (4) 任意にアルミニウム材料層を陽極酸化し；そして
- (5) 適切な溶媒を用いて放出層を除き、平面基板から放出された支持体を生成する、段階を包含する。

【0038】

段階(3)及び(4)がいずれの順序でも実施されうることは理解されるだろう。更に、必要に応じて、段階(4)は省略されることがある。任意に、段階(2)の間のアルミニウム材料の気体による陽極酸化が利用されることもあり；そのような気体による陽極酸化は、支持体1に、支持体1内に深く広がる陽極酸化領域を与えることができる。放出層は、好ましくは、ポリメチルメタクリレート(PMMA)又は他の適当な型の材料、例えば常用の半導体微細加工において利用されるような光学的耐蝕膜(optical resist)であり；当該放出層は、段階(3)及び(4)の間に、平面基板に対して処置の位置にアルミニウム材料層を維持させる特性を示すために選択される。PMMAが利用される場合、適当な溶媒は、アセトン及び/又はメチルイソブチルケトン(MIBK)を含んで成る。

【0039】

図2を参照すると、6で大まかに示したバイオアッセイの形態でタンパク質特性を検出する方法が示されている。バイオアッセイ6は、例示の通り、相互に異なる曝露された分子の分類によって表された2つの結合事象の実験を含んで成る。当該アッセイ6は、各支持体が支持体1に類似する、多数の支持体を含んで成る。更に、当該アッセイ6は、活性(active)支持体1の選択されたセットの懸濁液と一緒に混合することによって生成する。相当する特定の連続同定コード2を有する各活性支持体1は、その後のタンパク質の特徴づけ解析の間に検出される特定の型の試料分子8と結合しそして/あるいは相互作用する、独特な情報分子7、例えばそれらと会合する核酸又はPNAプローブと会合している。情報分子7は、その物理的又は化学的意味での分子の意味に限定するというよりも、一般的な意味で使用される。当該情報分子7は、支持体1が、それらの加工の間に利用される、対応する平面基板から放出される前又は後のいずれかに支持体1に接着されうる。支持体1上への情報分子7のコーティングの増強は、当該分子7を、それらが会合する平面の製造基板からそれらが放出された後に支持体1に接着することによって達成される。シグナル

放射ラベル、例えばラベル 9 は、好ましくは蛍光ラベルである。検出されるタンパク質特性の試料分子 8 に結合した情報分子 7 を有する支持体のみが蛍光を発する。検出される試料分子 8 と結合する蛍光ラベル 9 及び、間接的に、情報分子 7 がこの蛍光をもたらす、これは 10 によって表される。試料分子 8 は、好ましくは、タンパク質特性の検出のための物質を含んで成る。試料分子 8 は、好ましくは、バイオアッセイ 6、すなわち液体、好ましくは溶液、そして最も好ましくは水を含む溶液内に導入される前に、シグナル放射ラベル 9 で標識される。あるいは、シグナル放射ラベル 9 は、タンパク質に関して特徴づけられる試料を添加する前に、溶液中に導入されうる。当該試験結果は、異なる型の支持体 1 の蛍光の程度によって測定される。シグナル放射ラベル 9 の蛍光強度は、バイオアッセイ 6 に存在するタンパク質特性を用いて、検出された試料分子 8 のレベルを定量する。2 進のイエス/ノー反応の表示が好ましい実験だけが、バイオアッセイ 6 の支持体 1 が蛍光であるか否かの決定を必要とする。

10

【0040】

支持体 1 に接着した情報分子 7 は、好ましくは、本発明の異なる態様で、特定のタンパク質特性を用いて試料分子を検出するための実験に使用され、例えば、分子 7 は、

- (a) 解析物の解析の場合、酵素、タンパク質及び/又は PNA 分子；
 - (b) 薬物ターゲティングの場合、核酸、タンパク質及び/又は PNA 分子；あるいは
 - (c) プロテオミクスの場合、核酸、タンパク質及び/又は PNA 分子、
- であってもよい。

20

【0041】

情報分子 7 が上文の (a) ~ (c) に限定されず、そして独自に識別され且つ同定されうる広範な分子を含んで成ることがあることも理解されるだろう。適当な化合物の例は、特定の標的に結合するよう仕立てられたペプチドフラグメントである。この広範な全ての分子及び/又はプローブは、フォトリソグラフィック作業を実施し、又は平面基板から支持体 1 を放出する前又は後のいずれかに上記段階 (1) ~ (5) によって加工された支持体に接着されうる。情報分子 7 は、好ましくは、支持体 1 の一方の側のみに接着され；あるいは、当該分子 7 は、好ましくは支持体 1 を全部又は部分的に覆う。

【0042】

分子 7 は、支持体 1 にごく微弱に結合するよう配置されることがあり；そのような微弱な結合は、アルミニウム表面 11 が、溶液、例えば水溶液中でインキュベートされた場合に未処理状態にあるように配置することによって達成される。支持体 1 の表面 11 又は情報分子 7 を修飾することによって、そのような結合は、選択的に増強されうる。支持体 1 の接着表面 11 の陽極酸化は、そのような増強を提供する 1 つの方法である。アルミニウム上の多孔性の表面を増大する方法は、当業界で知られている。同様に、そのような多孔性表面を塞ぐ方法も知られている。出願人は、多孔性及び深さを正確に制御して吸収する表面を増大させるための比較的単純な方法を開発するために、その様な知識を活用した。そのような多孔性の表面は、好ましい核酸、PNA、酵素又はタンパク質分子によく結合することができる。アビジン-ビオチン系の使用は、支持体 1 とそれらが会合する情報分子 7 との間の結合を向上させるための別のアプローチである。支持体 1 の表面 11 はまた、接着特性を更に増強するために、ポリマー材料、例えばシラン及び/又はビオチンで処理されることもある。支持体 1 は、好ましくは、それらの表面 11 にシランを焼き付けている。連結分子、例えばアビジン-ビオチンサンドウィッチ系の情報分子 7 に対する接着は、それらの分子接着特性を更に増強させる。

30

40

【0043】

そのような増強された接着が重要であるのは、製造の間にそれがプローブ分子 7 を支持体表面 11 に強力に結合させ、一方で、試験の間に蛍光標的分子 8 の弱い非特異的結合を維持するためである。更に、そのような増強された接着は、好ましくは、支持体 1 の接着面 11 と情報分子 7 との間に共有結合を有することによって達成される。共有結合は情報分子 7 が支持体 1 から取り除かれ、そして解析の間にバイオアッセイ 6 中のバックグラウンドノイズの混乱を招くことを防ぐ。さもなければ解析の間にバイオアッセイ 6 中のノイズ

50

を増大させることがある、あらゆる過剰な情報分子 7 を除去するために、接着の後、自身に情報分子 7 が接着している活性な支持体 1 を洗浄することが重要であると思われる。それによって、当該試験の判別は、よりよいシグナル対ノイズ比を介して増強される。

【0044】

前述の通り、支持体 1 上で加工されたそれぞれの異なる連続同定コード 2 は、独特な対応する情報分子 7 と会合している。連続同定コード 2 は、好ましくは、常用のバーコードシステム上で見られるものと類似の読取スキーム、例えば商業的な小売店で商品にラベリングに利用されているものを用いて、一連の穴として支持体 1 上に保存されている。そのようなコードは、既存の読取技術を使用することで支持体 1 のバーコード 2 を同定させ、それによって、本発明に従う技術を採用する場合に初期投資額を減少させる。

10

【0045】

バイオアッセイ 6 及び関連の支持体を用いる使用のための読取システムは、これから説明する。

【0046】

本出願人は、2つのクラスの読取システムを開発した。これらは支持体 1 を操作するためのフローセル、及びプレートアウトした支持体 1 の平面画像化に基づいている。

【0047】

構造がフローサイトメトリーと類似のフローベースの読取システムは、1秒当たり何千もの支持体 1 を引き寄せ、それによって各支持体 1 のバーコード 2 及びその関連する試験結果の結果を同時に読み取るために使用されうる。当該試験結果は、イエス/ノーの二進の結果として、又は蛍光 10 の値によって測定される。あるいは、平面の読取システムであって、

20

(a)支持体 1 が平面基板上にプレートアウトされ；そして

(b)蛍光顕微鏡及び関連する画像処理が当該支持体のバーコード及びそれらの関連する試験結果を読み取るために利用されている、システムが利用されることもある。

【0048】

フローベースの読取システム及び平面読取システムの態様は、図 3, 4, 5 及び 6 を参照して、以下で更に詳細に説明する。

【0049】

図 3 を参照すると、30 で大まかに示したフローセルの読取装置が示されている。当該読取装置 30 は、上流の末端及び下流の末端を有するフローチューブ 31 を含んで成る。上流の末端において、関連する集束領域 32 あって、チューブ 31 外に位置する領域 32 と流体が通じている噴射ノズル 33 がチューブ 31 内に含まれる。当該領域 32 は先細になっており、ここでノズル 33 と結びついている。更に、ノズル 33 は、チューブ 31 内の離れた末端に出射孔 43 を含んで成る。

30

【0050】

下流の末端にある読取装置 30 は、上流の末端にあるノズル 33 から下流の末端にある測定装置 35 へと、運転中に液体の流れで運ばれる支持体 1 を読み取るために、35 で示した測定ユニットを含んで成る。装置 35 は、読取領域 34、読み取りユニット 37、光源 38、検出ユニット 40、シグナル放射ユニット 39 及び処理ユニット 36 を含む。シグナル放射ユニット 39 は、好ましくは蛍光源である。

40

【0051】

読取装置 30 の運転は、概要を最初に説明する。

【0052】

バイオアッセイ 6、例えば自身の中に分散した多数の支持体 1 を含んで成る液体は、集束領域 32 へと誘導される。更に、流体 45、例えば濾水の流れは、上流末端から下流末端へ方向で、チューブ 31 に沿って生じる。集束領域 32 内の支持体 1 は、領域 32 の先細の外形によって、例示したように列の様の構成に並ぶよう働きかけられる。支持体 1 は出射孔 43 から排出され、そしてチューブ 31 に沿った流れ 45 で読取領域 34 内にさつ

50

と通り、そして最終的にはそこを通過する。1又は複数の支持体1が読取領域34に新入する際、光源38からの光は1又は複数の支持体1を照らし、その結果、それらは読取ユニット37においてシルエット図で現れる。読取ユニット37は、支持体1の連続同定2を決定するためのその後の画像処理のために、処理ユニット36と通じている、対応するシルエットシグナルを生成する。シグナル放射ユニット39はまた、1又は複数の活性化支持体1の蛍光を誘導するために選択された波長を有する放射線で領域34を照射する。検出ユニット39は、領域34で生じるあらゆる蛍光を検出し、そして、処理ユニット36によってその後受け入れられる、対応する蛍光シグナルを生成する。領域34を通過して輸送される各支持体1のために、処理ユニット36は、その対応する程度の蛍光を有する支持体1の連続同定2を決定するためにプログラム化される。更に、処理ユニット36はまた、その会合する情報分子7によって提供される試験により、連続同定2に関する関連のデータベースと繋がっている。

10

【0053】

好ましくは、運転中にチューブ31に沿って流れる流体45は液体である。あるいは、流体45は、支持体1を出射孔43へ運ぶ液体が出射孔43で蒸発し、それによって支持体1をチューブ31内に送り出すのを補助するような、ノズル33に対して減圧の気体であってもよい。チューブ31から流れる流体が液体である場合に、チューブ31内の層流様式を確立しやすい一方、チューブ31からのガス流は潜在的に、領域34において、極度に迅速な支持体1の処理量及び関連する問い合わせ(interrogation)を提供する。

【0054】

読取装置30の設計及び運転を更に詳細に説明する。

20

【0055】

読取装置30は、支持体1、すなわちマイクロラベルが確定済みの問い合わせ(interrogation)領域34を介してチューブ31の中心領域に沿って流れるように誘導するために設計される。加速されたシース液41の構成及び噴射ノズル33を利用することによって、チューブ31の中心領域内に噴射される支持体1は、流体力学的な集束効果42にかけられ、全ての支持体1を縦に、すなわち軸方向に並ばせ、そして出射孔43から下流に位置する問い合わせ領域34内の明確な焦点を通過させる。チューブ31において、噴射ノズル33を介してチューブ31に進入するバイオアッセイ液6と混合する読取流体45の層流が存在する。出射孔43と問い合わせ領域34との間の距離は、噴射ノズル33によって生じるあらゆる乱流を分散させるのに十分長いものでなければならない。この十分な長さは、読取の流体45の実質的に層状の流れを可能にし、そしてその結果、支持体1を、非振動の運動で焦点44を通過させる。必要に応じて、ノズル33は、チューブ31内で更に対称な速度プロファイルを得られるように、集束領域32からフィールドチューブの放射状に対称的な提供されることもある。図3に含まれる速度プロファイル61は、チューブ31内の実質的に層状の流体の流れの速度の例示を提供し、流体の速度は、チューブ31の中心領域からチューブ31の内側の周辺面に向かって増大する。チューブ31の周辺面に極めて接近した境界面領域において、流体の速度は、チューブ31の内面で、実質的にゼロにまで漸進的に減少する。

30

【0056】

チューブ31に進入する前に、支持体1は、チューブ31内への噴射のために支持体1を配置することができる集束領域32を通過する。支持体1は、チューブ31を介して、焦点44にある場合に、それらが測定ユニット35によって問い合わせられる問い合わせ領域34へと輸送される。好ましくは、フローベースの読取システム30において使用される支持体1は、情報分子7を支持体1の少なくとも2つの反対の主面11上に接着させている。

40

【0057】

光源38は、読取領域34を通過し光を、そして焦点44で支持体1を照射する光を放射する。好ましくは、光源38は、バイオアッセイの流れ45の方向と実質的に垂直な面A-Aで、且つ2つの異なるラジアル方向から光を放射し、ここで、ラジアル方向は、好まし

50

くは、相互角分離 (mutual angle separation)、例えばおよそ 45° の分離の相互角分離 (mutual angular separation) を有する。焦点 44 内の支持体 1 の照射のそのような配置は、支持体 1 が、それらの回転位置に関係なく、それらの縦軸に沿って同定されることを可能にする。光源 38 に対して、問い合わせ領域 34 の反対側に実質的に位置する読取ユニット 37 は、焦点 44 にある 1 又は複数の支持体 1 を通過する光を読み取る。当該読取ユニット 37 は、それらが問い合わせ領域 34 を通過する際に、支持体 1 と光通信する。各支持体 1 の一方の末端におけるマーキングの形態の特徴は、読取情報をどのように解釈するかを読取ユニット 37 に示すために使用される。このことは、支持体 1 を、その縦軸に沿っていずれかの方向から読ませることを可能にする。マーキングはまた、可能性のある連続同定コードの数を 100, 000 を遥に超えて増大させるために使用することも可能である。例えば、別々の支持体 1 のセット上で 4 つの異なるマーキングを利用することは、支持体の同定の組み合わせの数を約 400, 000 に増大させることができる。情報コードがどのように読み取られるかを示す代りの特徴は、各ブロックを 0 秒で開始し、そして当該ブロックを 1 秒で終了することであり、逆もまた同様である。これらの特徴の更なる代替物、好ましくはパリティビットチェック及び / 又はフォワードエラーコレクションのためのエラーチェックングデータによって、試験の信頼性が向上する。

10

【0058】

運転中、シグナル放射ユニット 39 は、放射線、例えば蛍光を放射させ、これは、試料分子 8 及びシグナル放射ラベル 9 と反応した支持体 1 に相当する蛍光放射 10 を放出させる。検出ユニット 40 は、支持体 1 上の活性化したシグナルラベル 9 によって発せられる蛍光放射 10 の強度を測定する。この強度は、タンパク質特性のバイオアッセイ 6 試料に存在する反応性の試料分子 8 の量を決定するために推定されうる。続いて、処理ユニット 36 は、読取ユニット 37 によって測定された支持体 1 の検出された連続同定手段 2 からの情報及びそれらの支持体 1 が検出ユニット 40 によって検出されたシグナル 10 をどの程度発したかを評価する。続いて、当該情報は、特定の連続同定手段 2 と特定の情報分子 7 を結びつける、事前に設定した情報を含んで成るデータベース内の相当する情報によって確認される。

20

【0059】

一度十分な数の支持体 1 が読み取られると、測定ユニット 35 の処理ユニット 36 が、支持体 1 に関連する試験結果を計算する。この十分な数は、好ましくは 10 ~ 100 コピーの各型の支持体 1 であり；この数は、好ましくは、統計的解析を試験結果に対して実施できるようなものである。例えば、統計的解析、例えば、平均の計算及び標準偏差の計算が、存在する各型の情報分子 8 と会合する蛍光 10 について実施されうる。処置ユニット 36 はまた、読取装置及び検出ユニット 37、40 を制御し、その結果、個々の支持体 1 が 1 回に限り解析される。フロー読取装置 30 を通過する支持体 1 の蛍光 10 だけを解析して処理する情報量を減らすことも可能である。

30

【0060】

図 4 において、

(a) 支持体 1 を平面基板 49、例えばチップ、スライドガラス又はマイクロアレイに載せ、相当する支持体が負荷された基板 48 を提供し、そして

40

(b) 図 3 において例示され、且つ前文に記載のように、平面測定ユニット 35 を用いて支持体が負荷された基板 48 を問い合わせる、

段階を含んで成るインキュベーション過程 46 を示す。

【0061】

インキュベーション過程 46 は、支持体 1 を混合し、接着した情報分子 7 に液体のバイオアッセイ溶液 6 中のタンパク質特性分子 8 を含んで成る試料を担持させること、を包含する。続いて、支持体 1 は、平面基板 49 上に蒸着され、そしてその後支持体が負荷された基板 48 を生成するために乾燥されることもある。次に、測定ユニット 35 は、蛍光 10 のレベルを測定し、そして更に支持体が負荷された基板 48 の異なる支持体 1 の連続同定手段 2 のレベルを測定する。通常、負荷された基板 48 上の全ての支持体 1 が、当該実験

50

の総合的品質を証明するために解析される。時間の節約及び／又は処理能力に関心があるであろう場合において、処理ユニット36のソフトウェアは、好ましくは、例えば蛍光シグナルラベル9を介して、タンパク質特性分子8との相互作用が生じたことを示す、シグナル10を発する支持体1のみを解析するよう設定されうる。平面測定ユニット35を用いる、負荷された基板48の解析は、非常に費用有効性があり、実施が容易であり、且つ、例えば各支持体49上の一桁から数千の支持体の範囲内にある、少数から中程度の試料の数のために解析能を増大させるのに適した方法である。

【0062】

平面読取システムを図5に例示し、そして62で大まかに示す。読取装置62において、支持体1が、平面の光透過性基板49上にプレーティングアウト、すなわち、固定して蒸着され、又は液体中で蒸着される。好ましくは、平面基板49はポリマー、ガラス又はシリコンを基にした材料、例えば顕微鏡スライドから加工され、そして最も好ましくは、それはマイクロアレイの形態である。その後、常用の蛍光顕微鏡を実施するために配置された測定ユニット35は、支持体を載せた基板49を体系的に解析するために使用される。基板49を体系的に問い合わせるのに好ましい経路60を図6a及び図6bに示す。図6aは、蛇行型の問い合わせ様式の図であり、一方、図6bは、らせん型の問い合わせ様式である。当然のことながら、当業者に自明の、多数のほかの可能性のある経路60が存在しており、例えば、基板49を反対方向で経路60に移動させ、又は基板を蛇行しながら斜めに進む経路で移動させる。しかしながら、図6a、6bの様式は、増大した支持体1の読取速度を達成するのに効果的である。好ましくは、支持体49を支え、そして担持するステッパーモーター作動型のベースプレート50は、基板49を周囲に移動させるために使用され、一方で、測定ユニット35は静置される。支持体1の位置は、それらが1回だけ解析されるように追跡される。

【0063】

画像処理のための、平面測定ユニット35の読取ユニット37は、支持体1が固定されるようになった基板49の各領域のデジタル画像を捕らえるのに使用される。その結果得られたデジタル画像は、基板49及びベースプレート50を介して、そして次に支持体1を介して透過される光に相当し、これは支持体1をシルエット図で与え；そのような支持体1のシルエット画像は、処理ユニット55と組み合わせて、読取ユニット37によって解析される。従って、各支持体1と会合する、連続同定手段2、例えばバーコードは、読取ユニット37によってその透過された光のプロファイルから同定される。シグナル放射ユニット39は蛍光シグナルを生成し、このシグナルは、タンパク質特性分子8と相互作用した支持体1上のラベル9を蛍光10にする。検出ユニット40は、反応の程度を同定するために、活性化した支持体1に由来する蛍光10の程度を検出する。活性化した支持体1の表面11全体に取り込まれた蛍光シグナル10は、統計的解析しやすいデータセットを構築するために、同定バーコード2と関連して記録される。

【0064】

処理ユニット55は、光源38、シグナルユニット39、読取ユニット37、及び検出ユニット40、並びにディスプレイ56と連結される。更に、処理ユニット55は、光源38及びシグナルユニット39を制御するためのコントロールユニットを含んで成る。支持体1に由来する光のシルエット及び蛍光シグナル10は、1又は複数のレンズ及び／又は1又は複数の鏡を含んで成る光学的な組み立て部品を介して検出ユニット40及び読取ユニット37へと進む。鏡52は、光学シグナルを2つの経路に進めるために使用され、そして光学フィルター53、54は、それらの波長に基づく不所望の光学シグナルをフィルターにかけるために使用される。あるいは、光源38及び及びシグナルユニット39は、時々オンオフに、例えば相互に交代して切り換えられうる。シグナルは、読取ユニット37及び検出ユニット40から受け取られ、これは処理され、そして対応する統計的解析結果はディスプレイ56上に提示される。各型の支持体1の類似のメンバーは、実験の光学的な統計的解析を与えるために必要とされる。そのような統計的解析は当業界で周知である。

【0065】

1又は複数のタンパク質特性を検出する生化学的方法の好ましい態様は、上述の連続同定手段2と一緒に、支持体1を利用する。当該方法は、複数の異なる順番で実施されうる複数の段階を含んで成り、そして更に詳細に下文で説明する。

【0066】

情報分子7は、試料中の潜在的なタンパク質特性物質8の検出を可能にするために、支持体1の少なくとも主面11に接着される。続いて、少なくとも1つの型の連続同定手段2を有する支持体1は、3次元アレイを許容するために流体6中で懸濁され、個の中で、支持体1は流体6中に沈められる。3次元アレイは、最良の反応速度を可能にする。流体6中で懸濁される、異なる型の支持体1の数は、必要とされる試験の処理量に依存するが、何百、何千であってもよく、又はたとえ何万であってもよい。流体6中で懸濁される同一の型の支持体1の数は、中でも、統計的解析も質及び解析の容易さに依存する。

10

【0067】

解析されるべき、潜在的にタンパク質特性物質8を含む試料は、支持体1が流体6中で懸濁される前又は後に、流体に添加される。シグナル放射ラベル9も流体6に添加される。これらのシグナル放射ラベル9は、支持体1上の情報分子7と解析試料中で求められるタンパク質特性物質8との間の相互作用、例えば結合を示すために使用される。シグナル放射ラベル9を流体6に添加する多数の異なる方法が存在している。それらは、例えば、別々に流体6に添加され、試料を流体6に添加する前に解析されるべきタンパク質特性物質8と接着され、支持体へのそれらの接着前又は後に情報分子と接着されることがある。情報分子7と解析試料中のタンパク質特性物質8との間の相互作用を示すための、シグナル放射ラベル9のための多数の異なる方法が存在する。

20

【0068】

1つのそのような方法は、情報分子7と、適合するタンパク質特性物質8と、シグナル放射ラベル9との間に相互作用が存在する場合、シグナル放射ラベル9によって活性化される、シグナル、例えば蛍光又は他の波長の光(色)である。あるいは、シグナル放射ラベル9は、タンパク質特性物質8との何らかの相互作用の前に活性化される。情報分子7とタンパク質特性物質8との間に相互作用が存在する場合、活性なシグナル放射ラベル9は、そのシグナルを失活させるほかの分子から放出される。このことは、上文で論じたものと対照的な検出をもたらす、すなわち、シグナルの不在は、反応が、例えばイエス/ノー実験で支持体上で起こったことを示す。同様に、蛍光シグナル10の減少は、流体6中に導入される解析試料中に存在するタンパク質特性物質8の量の指標であることもある。

30

【0069】

情報分子7と一緒に支持体1、解析されるべき試料8及びシグナル放射ラベル9を含む流体は、検出ユニット40及び読取ユニット37を用いて解析される。読取ユニット37は、解析試料中のタンパク質特性物質と反応した情報分子7と一緒に少なくともそれらの支持体1の連続同定手段2を読み取る。多重実験の品質管理として全ての支持体1の連続同定手段2を読み取ることが好ましいこともある。検出ユニット40は、シグナル放射ラベル9の相互作用シグナル10の不在又は存在を検出する。別の型の生化学的アッセイ法において、1個以上のシグナルが、解析試料中の2又はそれ以上のタンパク質特性8の存在を示す各支持体上で使用されることもある。このことは、2又はそれ以上の異なる情報分子7が同一の支持体1上に接着したことを意味するだろう。タンパク質特性の検出に使用するために使用される別の好ましい方法論は、タンパク質特性の存在を示すために、異なる連続同定手段2を有する2又はそれ以上の支持体1に由来する複合シグナルを使用することである。このシグナルの複合は、活性化(active)支持体A及び不活性化(passive)支持体B、活性化支持体A及びB、又は不活性化支持体B及び活性化支持体A、であってもよく、支持体のそれぞれの異なる組み合わせは、どの型のタンパク質特性が流体中で検出されるかを示している。

40

【0070】

1又は複数のタンパク質特性を検出するための生化学的アッセイの使用目的には、薬物タ

50

ーゲッティング、プロテオミクス又は解析物の解析が含まれる。これらのバイオアッセイ法の使用はまた、スクリーニング及び診断の分野での使用に適している。

【 0 0 7 1 】

特許請求の範囲に記載の本発明の範囲から逸脱することなく、前述の発明の態様に変更がなされることもあることは理解されるだろう。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 2 】

【図 1】図 1 は、連続同定手段を含んで成る単一の支持体の平面図及び側面図である。

【図 2】図 2 は、支持体、情報分子及びシグナル放射ラベルを含んで成るバイオアッセイの概略図である。

10

【図 3】図 3 は、フローベースの読取装置の流れ方向の断面図である。

【図 4】図 4 は、平面に基づいた読取装置のインキュベーション及び読取過程の図解のフローダイアグラムである。

【図 5】図 5 は、平面基板上で支持体を問い合わせるための平面を基にした読取装置を例示する概略図である。

【図 6 a】図 6 a は、平面を基にした読取装置によって採用される測定経路の例を例示する平面基板の図解の上面図である。

【図 6 b】図 6 b は、平面を基にした読取装置によって採用される測定経路の例を例示する平面基板の図解の上面図である。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
22 August 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/065123 A2

(51) International Patent Classification: G01N 33/53

(21) International Application Number: PCT/GB02/00628

(22) International Filing Date: 13 February 2002 (13.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

0103464.4	13 February 2001 (13.02.2001)	GB
0103473.5	13 February 2001 (13.02.2001)	GB
0104125.0	20 February 2001 (20.02.2001)	GB

(71) Applicant (for all designated States except US): SMART-BEAD TECHNOLOGIES LIMITED [GB/GB]; Babraham Hall, Babraham, Cambridge CB2 4AT (GB).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

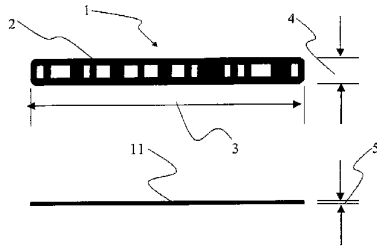
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i)) for the following designations: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ.

[Continued on next page]

(54) Title: BIOCHEMICAL METHOD AND APPARATUS FOR DETECTING PROTEIN CHARACTERISTICS



(57) Abstract: There is described a biochemical method for detecting one or more protein characteristics. The method utilizes supports (1), wherein the largest dimension (3) of each support (1) is less than 250 μm and wherein each support (1) incorporates sequential identification means (2). The method is distinguished in that it includes the steps of: attaching an information molecule (7), which is capable of interacting with at least one of said one or more protein characteristic to be detected, to a main surface (11) of a support (1); suspending supports (1) comprising one or more different sequential identifications means (2) and one or more different information molecules (7) in a fluid; adding a sample (8) to be analysed to the fluid; detecting interaction signals from supports (1) in the fluid using signal detecting means (40); and reading the sequential identification means (2) of the supports (1) which have an interaction signal using reading means (3), thereby detecting at least one of said one or more protein characteristic (8). There is also described apparatus susceptible for use in executing the above method.

WO 02/065123 A2

WO 02/065123 A2



- OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(iii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

Published:

without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

BIOCHEMICAL METHOD AND APPARATUS FOR DETECTING PROTEIN CHARACTERISTICS**Field of the Invention**

- 5 This invention relates to a biochemical method of detecting protein characteristics according to the preamble of appended Claim 1, and also to an apparatus for detecting protein characteristics according to the preamble of appended Claim 18.

Background to the Invention

- 10 During recent years, there has arisen a considerable interest in techniques and associated systems for determining protein characteristics of numerous types of organisms, for example, yeast, bacteria and mammals as well as cell lines. Currently, tests for detecting protein characteristics require a large number of experimental steps done in a sequential manner. The steps include two-dimensional gel electrophoresis (2D gels), post-
- 15 electrophoresis extraction of the proteins followed by mass spectrophotometry. The methods for protein analysis are evolving towards greater automation with associated higher detection throughput. Such technological developments have been prompted by, for example, the human genome project; this project has indicated that there are actually in the order of 30, 000 to 40, 000 genes in the human genome. With the discovery of new
- 20 genetic characteristics there has also been an increased interest in understanding how/why different proteins are produced and function. With millions of protein characteristics and thousands of different specimens to be analysed, high throughput methods of analysing protein characteristics have become very important for the continued progress of protein science. There is, for example, currently a need for
- 25 massively parallel high throughput technologies for identification and characterisation of proteins (proteomics) relating to drug research and development.

- In contrast to genes, proteins cannot be amplified in vitro and therefore only tiny amounts are available for analysis. Thus, the development of protein analysis methods providing
- 30 better sensitivity and throughput is of utmost significance in making efficient use of protein sequence databases. Despite this need for new high throughput technologies few

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

methods of determining protein characteristics have become commercially available. Current methods are not capable of achieving the throughput and reaction environment required for the detection of protein characteristics.

- 5 The techniques used for determining protein characteristics involve a plurality of constituent experiments which are individually labelled; when the experiments have been completed, they can be read using their associated labels for identification. Labels used at present include:
- 10 (a) the position of each experiment in a microtitre plate, in a tube, on a 2D gel or injected into a mass spectrophotometer;
- (b) the position of each experiment on the surface of a membrane;
- (c) the position of each experiment on the surface of a test integrated circuit, known as a "protein array"; and
- 15 (d) fluorescent spectrum or other methods of identifying particles to which the experiments are bound.

Such known methods have the disadvantage of employing components for their execution which are difficult and expensive to manufacture and use.

- 20 As mentioned above, the main approach for detecting protein characteristics is two-dimensional (2D) gels. This method has the disadvantage as discussed previously of being difficult to analyse, poor reproducibility, variability of results, and limited sample throughput. The two-dimensional gels are very labour intensive to use and often result in
- 25 only a 50% success rate in protein characterisation. Additional disadvantages for 2D gels are that only a few simultaneous experiments can be performed and additional processing by mass-spectrometry is required before attaining experimental results.

- Currently there is limited commercial availability of protein microarrays and most
- 30 researchers use a 'homebrew' method of analysing proteins, e.g. making an array by attaching a number of proteins to a microscope slide. This approach, combined with

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

methods such as 2D gels and mass spectrophotometry, are likely to prevail unless an alternative method becomes commercially available.

5 In a United States patent no. US 6, 329, 209 assigned to Zymomyx Inc., a protein
microarray is described. The microarray is used for the simultaneous detection of a
plurality of proteins which are the expression products, or fragments thereof, of a cell or
population of cells in an organism. The microarray concerns a substrate whose surface is
partitioned into a plurality of spaced apart immobilisation regions having a plurality of
protein-capture agents therein. Each immobilisation region is surrounded by borders
10 which resist non-specific protein binding. Each site is effectively labelled by virtue of its
spatial position on the surface of the substrate. The protein profiling biochip from
Zymomyx Inc. is capable of analysing in the order of 1200 proteins by parallel analysis.
While the processing steps of protein analysis may be streamlined with this particular
array compared to traditional methods, it does not necessarily offer an increase in
15 throughput as many 2D gels can separate up to a thousand proteins.

As the number of samples tested on the same microarray increases, the demand for
associated manufacturing equipment miniaturization and specialized materials handling
will render the fabrication of such microarrays increasingly complex. The protein
20 characteristics of samples being monitored on such microarrays must be known and
isolated beforehand; such prior knowledge makes it a complicated and costly process to
manufacture specific microarrays to customer requirements for each different type of
organism or species to be studied.

25 In addition, the amount of interaction between a large volume of proteins or peptide
fragments immobilised on the same surface is not well understood and may prevent
adequate binding with the test sample. This is problematic as it may therefore decrease
the sensitivity and/or specificity of the experiment as well as possibly requiring an
increased amount of protein samples in the assay. Further disadvantages associated with
30 this technology are low flexibility, poor reaction kinetics, long manufacturing turnaround
times, advanced reader technology, high cost and low data quality.

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

Bioassays conducted on micro-particles provide another type of massively parallel array technology. Methods of mutually separating different samples have been achieved by attaching information molecules to small supports so that many tests can be performed simultaneously. A system used to mutually distinguish the supports is normally fluorescence or reflection indexes.

Luminex Corporation and Upstate Biotechnology provide a method for detecting serine/threonine kinases by utilising myelin basic protein (MBP) linked to a fluorescent set of supports. The solid supports are microparticles and use optical labels to react with the MBP to indicate an associated reaction. Advanced sorting apparatus is then used to sort out the supports that have reacted, such sorting achieved by way of differential optical signal intensity associated with the different supports; the optical labels are light emitting and the microparticles supports are sorted depending on the intensity of the light emitted therefrom. Such a sorting method allows greater flexibility than microarrays in the detection of protein characteristics through the use of differently loaded microparticles. However, there are still problems experienced concerning the complexity of instrumentation required for determining the different intensity levels of light emitted from the activated microparticles. The throughput of this technology is also currently limited to 100 samples which does not provide the level of multiplexing required for high volume experiments.

In published international PCT application no. WO 00/16893, there is described a method concerning the use of solid supports in a bioassay, and a process for manufacturing such supports. The supports are fabricated from an anodised metal, preferably aluminium. The supports have, for example, antibodies attached thereto for bonding to antigens.

Another known application for characterisation and identification of proteins is the analysis of analytes associated with disease. The analysis of the analytes is currently performed using a variety of methods including ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay), RIA (radioimmunoassay), chromogenic assays, HPLC (high performance liquid

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

assay), RIA (radioimmunoassay), chromogenic assays, HPLC (high performance liquid chromatography), GCMS (gas chromatography-mass spectroscopy), TLC (thin layer chromatography), NIR (near infrared) analysis. These methods have the disadvantage of being limited in the number of analytes that can be tested at any one time, time-consuming and require expensive equipment.

Another problem experienced with contemporary protein characterization technology is the need for staff to be highly trained and to understand several different system set-ups required when performing increasing numbers of experiments for determining protein characteristics. Such staff requirements results in relatively large initial investments in staff training. It is often necessary, on account of validation requirements and to increase reliability of analysis results, to run experiments repetitively requiring supervision by scientists, which reduces the availability of these scientists for other activities. Moreover, in many industries, such as drug research and development, there are wide ranges of technologies used throughout the process that must all be validated resulting in considerable time requirements and costs.

Summary of the Invention

A first object of the invention is to provide an improved method of detecting protein characteristics.

A second object of the invention is to provide a low cost high-throughput method of performing experiments for detecting protein characteristics.

A further object of the invention is to provide an improved apparatus for detecting protein characteristics.

According to a first aspect of the invention, in order to address one or more of the aforesaid objects of the invention and other objects that will appear from the following specification, there is provided a method as defined in the accompanying Claim 1.

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

Moreover, according to a second aspect of the present invention, in order to address one or more of the aforesaid objects of the invention and other objects that will appear from the following specification, there is provided an apparatus as defined in the accompanying Claim 18.

The method and apparatus are of advantage in that they are capable of addressing the aforesaid objects of the invention.

10 Thus, the first aspect of the present invention concerns a method for detecting protein characteristics, where supports with specific sequential identifications have an information molecule attached to a main surface thereof. Attaching the molecules onto the supports and suspending them in a fluid allows for very good reaction kinetics, thereby improving sensitivity as well as reducing the reaction volume and time. The sample potentially containing a protein characteristic being detected is added to the fluid.

15 A multiplexed experiment of hundreds of thousands of tests in one is possible since a large number of supports with different sequential identification and attached information molecules can be present in the bioassay simultaneously. Use of such molecules in combination with supports decreases the need to perform batched or repeated experiments. Different types of signals are used to indicate the sequential identification of the supports and the interaction signal indicating interaction with one or more protein characteristics. Such an approach results in less advanced reader and detector units being required for performing assay measurements, thereby potentially reducing cost.

25 In a preferred embodiment of the invention, the supports are oxidised prior to the attachment of information molecules thereto. Such attachment allows the surface of the supports to have improved mechanical and chemical attachment properties. Alternatively, or additionally, the supports are coated in one or more molecular binding agents to enhance information molecule attachment thereto.

30

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

In a further preferred embodiment of the invention, a measuring unit performs the detection of signal emitting labels and the reading of the sequential identification substantially simultaneously. This simultaneous measurement decreases the risk of incorrect readings and increases the throughput as advanced software is not employed for the tracking of the supports.

In an additional embodiment of the invention, the reading of the sequential identification means includes locating one or more features arranged to indicate how to interpret the information gathered. This makes it possible to identify the supports irrespectively of their position or flow direction through, for example, a flow cytometer reader system.

A further embodiment of the invention has the fluid including loaded supports placed on and subsequently affixed onto a substrate. This allows a multiple increase of the throughput capacity of the standard planar reading methods while only requiring minor adjustments to existing equipment set-ups.

According to a special aspect of the invention, the measuring unit's reading involves conveying the substrate with its associated supports along a predetermined path. Such motion along the path is preferably achieved by moving the substrate with supports located thereon while the measuring unit is stationary. It is apparent that, alternatively, the measuring unit could be moved while the substrate with supports is stationary. Such approaches are capable of resulting in substantially all supports in the fluid being analysed. Those supports that are only partially in the measuring unit's focal area along the measuring path have their corresponding positions registered so that they are only analysed once.

In other preferred embodiments of the invention, the protein characteristics detected are for drug targeting, proteomics or analysis of analytes. These embodiments of the invention include a system for carrying out massively parallel multiple bioassay tests for drug targeting, proteomics and/or analysis of analytes in a low-cost, fast and convenient manner. Such a scheme achieves high throughput by making a suspension including

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

many thousands of different types of, for example, micro-machined coded supports, also called labels or micro-labels. Each of these supports carries e.g. nucleic acid, peptide nucleic acid (PNA), enzyme and/or protein information molecules. The supports with attached information molecules are mixed with the sample potentially including the protein characteristic under test together with a signal emitting label, namely a reporter system such as fluorescence. Only supports with nucleic acids, PNAs, enzymes and/or proteins probes that bind to the protein characteristics investigated will bind to the signal emitting label which then emits a signal, for example fluoresce.

10 In the second aspect of the invention, there is provided an apparatus for detecting protein characteristics, which has detecting means and identifying means arranged to register two different types of signals, the first signal being associated with the detection of activated signal emitting labels and the second signal being associated with the reading of sequential identification of supports. Such plurality of different
15 types of signal decreases the potential requirement of using advanced and costly image processing equipment.

An embodiment of a solid support suitably used with the apparatus in a drug targeting, proteomics or analysis of analytes biochemical assay, is substantially linear or planar in
20 shape and has an anodised metal surface layer. The largest dimension of the support is preferably less than circa 250 μm , more preferably less than 150 μm , and most preferably less than circa 100 μm in length, whereby an aqueous suspension is formable from a plurality of the supports. This allows the same type of bioassay to be used for several different experiment types.

25 In further embodiments, the support's surface layer has a cellular-structure anodisation layer with the growth direction of the cells of the anodisation layer being perpendicular to the plane of the surface layer. Suitably the support has nucleic acid, PNA, enzyme and/or protein information molecules (probe) bound to the surface layer. The support's surface
30 layer may be of aluminium and may also be porous. Further-more the pore size of the surface layer is suitably approximately matched to the size of the nucleic acid, PNA,

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

enzyme and/or protein molecules to be bound. This provides the support with excellent mechanical and chemical bonding properties for the attachment of information molecules.

- 5 In another embodiment, the support incorporates a spatially varying pattern for identification purposes. This pattern, namely sequential identification, is preferably a bar-code. Suitably a measuring unit, for example an optical reader, is used for reading the patterns and identifying the supports.
- 10 It will be appreciated that features of the invention described in the foregoing can be combined in any combination without departing from the scope of the invention.

Description of the Drawings

- 15 Embodiments of the invention will now be described, by way of example only, with reference to the accompanying drawings wherein:

- Figure 1 is a plan view and a side view of a single support comprising a sequential identification;
- 20 Figure 2 is a schematic diagram of a bioassay comprising supports, information molecules and signal emitting labels;
- Figure 3 is a cross sectional view in the flow direction of a flow-based reader;
- 25 Figure 4 is a schematic flow diagram of the incubation and reading process of a planar-based reader;
- Figure 5 is a schematic diagram illustrating a planar-based reader for interrogating supports on a planar substrate; and
- 30

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

Figures 6a, 6b are schematic top views of a planar substrate illustrating examples of the measuring path taken by the planar-based reader.

5 Description of Embodiments of the Invention

In Figure 1, an illustration of a preferred embodiment of the invention is provided. There is shown a single support 1; such a support will also be referred to as a "micro label" in the following description. The support 1 can be fabricated from a wide variety of materials ranging from polymers, glasses to metal alloys, but is preferably fabricated from a metal and most preferably fabricated from aluminium. The support 1 incorporates a sequential identification 2 which can be in the shape of at least one (or any combination thereof) of grooves, notches, depressions, protrusions, projections, and most preferably holes. The sequential identification 2 is suitably a transmission optical bar-code. The bar code 2 is implemented as a spatially sequential series of holes extending through the support 1. Such holes can be of varied shape and size. They are also capable of providing a very good optical contrast as solid areas of the support 1 are substantially non-transmissive to light whereas holes of the bar code 2 are highly transmissive to light received thereat.

The support 1 can be of many different types of shape, but has preferably a substantially planar form with at least a principal surface 11. Each support 1 of this type has a largest dimension 3 of less than circa 250 μm , more preferably less than 150 μm , and most preferably less than circa 100 μm in length. The support 1 has suitably a width 4 to length 3 ratio in a range of circa 1:2 to circa 1:20, although a ratio range of circa 1:5 to circa 1:15 is especially preferred. Moreover, the support 1 has a thickness 5 which is preferably less than circa 3 μm , and more preferably less than circa 1 μm . The thickness of less than circa 1 μm has been shown to provide sufficient mechanical support strength for rendering the support 1 useable in bioassays. A preferred embodiment of the invention concerns supports 1 having a length 3 of circa 100 μm , a width 4 of circa 10 μm and a thickness 5 of circa 1 μm ; such supports are capable of storing up to 100,000 different identification sequence bar codes 2. Experimental demonstrations of up to 100,

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

000 different variants of the supports 1 for use in bioassays for protein characterization experiments have been undertaken. Supports 1 of different lengths 3 in a range of 40 to 100 μm , carrying between two and five decimal digits of data in the sequential identification 2, have been fabricated for use in different experiments for the detection of protein characteristics.

Around ten million such supports 1, namely micro-labels, can be fabricated on a single 6-inch diameter substrate, for example a silicon wafer, using contemporary established manufacturing techniques. Conventional photolithography and dry etching processes are examples of such manufacturing techniques used to manufacture and pattern an anodised aluminium layer to yield separate solid supports 1.

A fabrication process for manufacturing a plurality of supports similar to the support 1 involves the following steps:

- (1) depositing a soluble release layer onto a planar substrate;
- (2) depositing a layer of aluminium material onto the release layer remote from the substrate;
- (3) defining support features in the aluminium material layer by way of photolithographic processes and etching processes;
- (4) optionally anodising the aluminium material layer; and
- (5) removing the release layer using an appropriate solvent to yield the supports released from the planar substrate.

It will be appreciated that steps (3) and (4) can be executed in either order. Moreover, if required, step (4) can be omitted. Optionally, gaseous anodisation of the aluminium material during step (2) can be employed; such gaseous anodisation is capable of imparting to the supports 1 anodisation regions extending deeply into the supports 1. The release layer is preferably polymethyl methacrylate (PMMA) or other suitable type of material, for example an optical resist as employed in conventional semiconductor microfabrication; the release layer is selected to exhibit properties allowing the aluminium material layer to be held in place with respect to the planar substrate during

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

steps (3) and (4). When PMMA is employed, a suitable solvent comprises acetone and/or methyl isobutyl ketone (MIBK).

Referring now to Figure 2, there is shown a method of detecting protein characteristics in the form of a bioassay indicated generally by 6. The bioassay 6 comprises two binding event experiments denoted by mutually different exposed molecular groupings as illustrated. The assay 6 comprises a plurality of supports, each support being similar to the support 1. Moreover, the assay 6 is generated by mixing together suspensions of chosen sets of active supports 1. Each active support 1 with a corresponding specific sequential identification code 2 has associated therewith a unique information molecule 7, for example a nucleic acid or PNA probe associated therewith, which binds to and/or interacts with a specific type of sample molecule 8 detected during subsequent protein characterization analysis. Information molecules 7 are used in a generic meaning rather than being limited to the meaning of a molecule in its physical or chemical meaning. The information molecules 7 may be attached to the supports 1 either before or after the supports 1 are released from a corresponding planar substrate employed during their fabrication. Enhanced coating of the information molecules 7 onto the supports 1 is achieved by attaching the molecules 7 to the supports 1 after their release from their associated planar manufacturing substrate. Signal emitting labels, for example a label 9, are preferably fluorescent labels. Only supports with information molecules 7 that have bound to the protein characteristic sample molecule 8 detected will fluoresce. The fluorescent label 9 that is bound to the sample molecule 8 detected and indirectly the information molecule 7 causes this fluorescence, denoted by 10. The sample molecule 8 preferably comprises matter for protein characteristic detection. The sample molecule 8 is preferably labelled with the signal emitting labels 9 before being introduced into the bioassay 6, namely a fluid, preferably a liquid solution and most preferably a liquid solution including water. Alternatively, the signal emitting labels 9 can be introduced into the liquid solution prior to adding the sample to be characterised with respect to proteins. The result of the test is measured by the degree of fluorescence of different types of supports 1. The fluorescent intensity of the signal emitting labels 9 quantifies the level of detected sample molecules 8 with the protein characteristics present in the bioassay 6.

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

Experiments where a binary yes/no reaction indication is preferred only require determination whether or not the supports 1 in the bioassay 6 are fluorescent.

- 5 The information molecules 7 attached to the supports 1 are preferably used in experiments for detecting sample molecules with specific protein characteristics in different embodiments of the invention, for example the molecules 7 can be:
- (a) enzyme, protein and/or PNA molecules for analysis of analytes;
 - (b) nucleic acid, protein and/or PNA molecules for drug targeting; or
 - 10 (c) nucleic acid, protein and/or PNA molecules for proteomics.

It will be appreciated that the information molecules 7 are not limited to (a) to (c) above and can comprise a broad range of compounds capable of being uniquely distinguished and identified. An example of a suitable compound is a peptide fragment tailored to bind
15 to a specific target. All molecules in this broad range and/or probes may be attached to supports fabricated by steps (1) to (5) above either before or after executing photolithographic operations or releasing the supports 1 from the planar substrate. The information molecules 7 are preferably attached only to one side of the support 1; alternatively, the molecules 7 preferably cover the support 1 in whole or partially.

20 The molecules 7 can be arranged to bind only weakly to the supports 1; such weak binding is achieved by arranging for the aluminium surface 11 to be in an untreated state when incubated in a liquid solution, for example an aqueous solution. By modifying the surface 11 of the supports 1 or the information molecules 7, such binding can be
25 selectively enhanced. Anodising the attachment surface 11 of the supports 1 is one way of providing such enhancement. Methods of growing porous surfaces on aluminium are known in the art. Likewise, processes for sealing such porous surfaces are also known. The Applicant has exploited such knowledge to develop a relatively simple process for growing an absorbing surface having accurately controlled porosity and depth. Such
30 porous surfaces are capable of binding well to preferred nucleic acid, PNA, enzyme or protein molecules. Using an avidin-biotin system is another approach for improving

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

binding between the supports 1 and their associated information molecules 7. The support's 1 surface 11 may also be treated with a polymer material such as silane and/or biotin, to further enhance attachment properties. The supports 1 preferably have silane baked onto their surfaces 11. Attaching linking molecules, for example avidin-biotin sandwich system, to the information molecules 7 further enhances their chemical molecular attachment properties.

Such enhanced attachment is important because it allows the probe molecules 7 to be bound strongly to the support surface 11 during manufacture whilst maintaining weak non-specific binding of fluorescent target molecules 8 during tests. Moreover, such enhanced attachment is preferably achieved through having covalent bonds between attachment surface 11 of the support 1 and the information molecule 7. The covalent bonds prevent the information molecules 7 from being dislodged from the supports 1 and causing disturbing background noise in the bioassay 6 during analysis. It is found to be important to wash the active supports 1, said supports having information molecules 7 attached thereto, after attachment to remove any excess information molecules 7 that could otherwise increase the noise in the bioassay 6 during analysis. Discrimination of the tests is thereby enhanced through a better signal-to-noise ratio.

As described in foregoing, each different sequential identification code 2 fabricated onto the supports 1 is associated with a unique corresponding information molecule 7. The sequential identification code 2 is preferably stored on the supports 1 as a series of holes using coding schemes similar to those found on conventional bar code systems, for example as employed for labelling merchandise in commercial retailing outlets. Such a code allows the use of existing reader technology to identify the bar-codes 2 of the supports 1, thereby decreasing the initial investment when adopting technology according to the invention.

Reader systems for use with the bioassay 6 and associated supports will now be described.

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

The Applicant has developed two classes of reader system. These are based on flow cells for handling the supports 1, and on planar imaging of plated-out supports 1.

- 5 A flow-based reader system, similar in construction to a flow cytometer, can be used to draw through thousands of supports 1 per second, thereby reading simultaneously the bar code 2 of each support 1 and the results of its associated test result. The test result is measured as a yes/no binary result or by the degree of fluorescence 10. Alternatively, a planar reader system can be employed, wherein:
- 10 (a) the supports 1 are plated out onto a planar substrate; and then
(b) fluorescence microscopy and associated image processing are employed to read the bar codes of the supports and the results of their associated tests.

- Embodiments of the flow-based reader system and the planar reader system will now be described in further detail with reference to Figures 3, 4, 5 and 6.
- 15

- Referring to Figure 3, there is shown a flow-cell reader indicated generally by 30. The reader 30 comprises a flow tube 31 having an upstream end and a downstream end. At the upstream end, there is included within the tube 31 an injection nozzle 33 in fluid communication with an associated focussing zone 32, the zone 32 being situated outside the tube 31. The zone 32 is tapered where it interfaces to the nozzle 33. Moreover, the nozzle 33 comprises at its remote end within the tube 31 an exit aperture 43.
- 20

- At the downstream end, the reader 30 comprises a measuring unit indicated by 35 for reading supports 1 conveyed in operation in fluid flow from the nozzle 33 at the upstream end to the measuring apparatus 35 at the downstream end. The apparatus 35 includes a reading zone 34, a reader unit 37, a light source 38, a detector unit 40, a signal emitting unit 39 and a processing unit 36. The signal emitting unit 39 is preferably a fluorescent source.
- 25

30

Operation of the reader 30 will be described initially in overview.

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

A bioassay 6, for example a liquid comprising a plurality of the supports 1 dispersed therein, is introduced into the focussing zone 32. Moreover, a flow of fluid 45, for example filtered water, is generated along the tube 31 in a direction from the upstream end towards the downstream end. Supports 1 in the focussing zone 32 are encouraged, by the tapered profile of the zone 32, to align into a row-like formation as illustrated. The supports 1 are ejected from the exit aperture 43 and are swept in the flow 45 along the tube 31 into the reading zone 34 and eventually therepast. When one or more of the supports 1 enter the reading zone 34, light from the source 38 illuminates the one or more supports 1 so that they appear in silhouette view at the reader unit 37. The reader unit 37 generates a corresponding silhouette signal which is communicated to the processing unit 36 for subsequent image processing to determine the sequential identification 2 of the supports 1. The signal emitting unit 39 also illuminates the zone 34 with radiation having a wavelength selected to induce fluorescence in one or more the active supports 1. The detector unit 39 detects any fluorescence occurring in the zone 34 and generates a corresponding fluorescence signal which is subsequently received by the processing unit 36. For each support 1 transported through the zone 34, the processing unit 36 is programmed to determine the sequential identification 2 of the support 1 with its corresponding magnitude of fluorescence. Moreover, the processing unit 36 is also connected to an associated database relating the sequential identification 2 with a test provided by its associated information molecules 7.

Preferably, the fluid 45 flowing in operation along the tube 31 is a liquid. Alternatively, the fluid 45 can be a gas at reduced pressure relative to the nozzle 33 so that liquid bearing the supports 1 to the exit aperture 43 is vaporised at the aperture 43, thereby assisting to launch supports 1 into the tube 31. Whereas it is easier to establish a laminar flow regime within the tube 31 when fluid flowing therethrough is a liquid, gas flow through the tube 31 potentially offers extremely fast support 1 throughput and associated interrogation in the zone 34.

Design and operation of the reader 30 will now be described in more detail.

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

The reader 30 is designed to induce the supports 1, namely micro-labels, to flow along a central region of a tube 31 through the defined interrogation zone 34. By utilizing an accelerated sheath fluid 41 configuration and the injecting nozzle 33, the supports 1
5 injected into the central region of the tube 31 are subjected to a hydrodynamic focusing effect 42 causing all the supports 1 to align lengthwise, namely axially, and to pass through a well-defined focal point 44 in the interrogation zone 34 downstream from an exit aperture 43. In the tube 31, there is a laminar flow of a reading fluid 45 which mixes with the bioassay solution 6 entering the tube 31 through the injection nozzle 33. The
10 distance between the exit aperture 43 and the interrogation zone 34 must be sufficiently long to dissipate any turbulence caused by the injection nozzle 33. This sufficient length allows for a substantially laminar flow of the reading fluid 45 and hence provides the supports 1 with a non-oscillating movement past the focal point 44. If required, the nozzle 33 can be provided with a radially symmetrical arrangement of feed tubelets from
15 the focussing zone 32 so as to obtain a more symmetrical velocity profile within the tube 31. A velocity profile 61 included in Figure 3 provides an illustration of the velocity of the substantially laminar fluid flow in the tube 31; fluid velocity increases from a central region of the tube 31 towards interior peripheral surfaces of the tube 31. In an interface surface region in close proximity to the peripheral surfaces of the tube 31, fluid velocity
20 progressively reduces to substantially zero at the interior surface of the tube 31.

Prior to entering the tube 31, the supports 1 pass through the focusing zone 32 which is operable to arrange the supports 1 for injection into the tube 31. The supports 1 are transported through the tube 31 to the interrogation zone 34 where they are interrogated
25 by the measuring unit 35 when at the focal point 44. Preferably, the supports 1 used in the flow-based reader system 30 have information molecules 7 attached on at least two opposite principal surfaces 11 of the supports 1.

The light source 38 emits light that passes through the reading zone 34 and illuminates the support 1 at the focal point 44. Preferably, the light source 38 emits light in a plane A-A
30 that is substantially perpendicular to the bioassay's flow 45 direction and from two

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

different radial directions, the radial directions preferably having a mutual angle separation, for example with a mutual angular separation of circa 45° separation. Such an arrangement of support 1 illumination in the focal point 44 enables the supports 1 to be identified irrespectively of their rotational position along their longitudinal axis. The

5 reader unit 37, located substantially at an opposite side of the interrogation zone 34 relative to the light source 38, reads the light that passes through one or more supports 1 at the focal point 44. The reader unit 37 is in optical communication with the supports 1 when they pass through the interrogation zone 34. A feature in the form of a marking at one end of each support 1 is used to indicate to the reader unit 37 how to interpret the

10 read information. This allows the support 1 to be read from either direction along its longitudinal axis. The marking is also susceptible to being used to increase the number of possible sequential identification codes on a support 1 to be greatly in excess of 100, 000. For example, employing four different markings on separate sets of supports 1 is capable of increasing the number of identification combinations of supports to about 400, 000. An

15 alternative feature to indicate how information codes are to be read is to start each block with 0's and end the blocks with 1's, or vice versa. Further alternatives of these features preferably error checking data, for parity bit checks and/or forward error correction, thereby improving testing reliability.

20 In operation, the signal emitting unit 39 emits radiation, for example fluorescent light, that causes the supports 1 that have reacted with the sample molecules 8 and the signal emitting label 9 to give off corresponding fluorescent radiation 10. The detector unit 40 measures the magnitude of the intensity of the fluorescent radiation 10 that is given off by the activated signal labels 9 on the supports 1. This intensity indicates the degree of

25 reaction which can be extrapolated to determine the amount of reactive sample molecule 8 present in the protein characteristic bioassay 6 sample. The processing unit 36 then evaluates the information from the detected sequential identification 2 of the supports 1 measured by the reader unit 37 and to what extent those supports 1 have given off a signal 10 detected by the detector unit 40. The information is then verified with

30 corresponding information in a database comprising preset information linking specific sequential identification 2 to specific information molecules 7.

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

Once a sufficient number of supports 1 have been read, the processing unit 36 of the measuring unit 35 calculates the results of the tests associated with the supports 1. This sufficient number is preferably between 10 and 100 copies of each type of supports 1; this number is preferably to enable statistical analysis to be performed on test results. For example, statistical analysis such as mean calculation and standard deviation calculation can be executed for fluorescence 10 associated with each type of information molecule 8 present. The processing unit 36 also controls the reader and detector units 37, 40 so that the each individual support 1 is only analysed once. It could also be possible to only analyse the fluorescent 10 supports 1 that pass through the flow reader 30 to lower the amount of information processed.

In Figure 4, there are shown an incubation process 46 comprising the steps of :

- 15 (a) placing supports 1 on a planar substrate 49, for example a chip, glass slide or microarray, to provide a corresponding support-loaded substrate 48, and
 - (b) interrogating the support-loaded substrate 48 using a planar measuring unit 35 as illustrated in Figure 3 and described in the foregoing.
- 20 The incubation process 46 involves mixing supports 1, bearing attached information molecules 7, with a sample comprising protein characteristic molecules 8 in a liquid bioassay solution 6. The supports 1 are then deposited on the planar substrate 49 and can be subsequently dried to generate the support-loaded substrate 48. Next, the measuring unit 35 measures the level of fluorescence 10 and also the sequential identification 2 of
- 25 the different supports 1 of the support-loaded substrate 48. Normally, all the supports 1 on the loaded substrate 48 are analysed to verify the total quality of the experiment. In cases where there could be an interest in saving time and/or processing capacity, the software of the processing unit 36 can preferably be configured to analyse only the supports 1 that give off a signal 10, for example through a fluorescent signal label 9,
- 30 indicating that an interaction with the protein characteristic molecules 8 has occurred. The analysis of the loaded substrate 48 using the planar measuring unit 35 is a very cost

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

effective, easy to perform and suitable way to multiply the analysing capacity for low to medium sample numbers in the range of, for example, single figures to a few thousand supports on each substrate 48.

5 A planar reader system is illustrated in Figure 5 and indicated generally by 62. In the reader 62, supports 1 are plated out, namely fixedly deposited or deposited in a liquid, onto the planar light-transmissive substrate 49. Preferably, the planar substrate 49 is fabricated from a polymer, glass or silicon-based material, for example a microscope slide, and most preferably it is in the form of a microarray. Thereafter, the measuring unit
10 35 arranged to perform conventional fluorescence microscopy is used to analyse the support-plated substrate 49 systematically. Preferred paths 60 for systematically interrogating the substrate 49 are shown in Figure 6a and 6b. Figure 6a is a depiction of a meander-type interrogation regime, whereas Figure 6b is a depiction of a spiral-type interrogation regime. There are of course many other possible paths 60 apparent to one
15 skilled in the art, for example moving the substrate 49 in an opposite direction to the path 60, or moving the substrate in a meandering diagonal path. However, the regimes of Figures 6a, 6b are efficient for achieving an enhanced support 1 read speed. Preferably, a stepper-motor actuated base plate 50 supporting and bearing the substrate 49 is used to move the substrate 49 around while the measuring unit 35 is held stationary. The
20 positions of supports 1 are tracked so that they are analysed once only.

The planar measuring unit's 35 reader unit 37 for image-processing is used to capture digital images of each field of the substrate 49 to which supports 1 have become affixed. Digital images thereby obtained correspond to light transmitted through the substrate 49
25 and base plate 50 and then through the supports 1 rendering the supports 1 in silhouette view; such silhouette images of the supports 1 are analysed by the reader unit 37 in combination with a processing unit 55. The sequential identification 2, for example a bar-code, associated with each support 1 is hence identified from its transmitted light profile by the reader unit 37. The signal emitting unit 39 generates a fluorescent signal,
30 which signal makes the labels 9 on supports 1 that have interacted with the protein characteristic molecules 8 fluoresce 10. A detector unit 40 detects the magnitude of

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

fluorescence 10 from activated supports 1 to identify the degree of reaction. The fluorescent signal 10 integrated over activated supports' 1 surface 11 is recorded in association with the identification bar-code 2 to construct data sets susceptible to statistical analysis.

5

The processing unit 55 is connected to the light source 38, the signal unit 39, the reader unit 37, and the detector unit 40 and to a display 56. Moreover, the processing unit 55 comprises a control system for controlling the light source 38 and the signal unit 39. The light silhouette and fluorescent signals 10 from the supports 1 pass via an optical assembly 51, for example an assembly comprising one or more lenses and/or one or more mirrors, towards the detector unit 40 and reader unit 37. A mirror 52 is used to divide the optical signals into two paths and optical filters 53, 54 are used to filter out unwanted optical signals based on their wavelength. Alternatively, the light source 38 and signal unit 39 can be turned on and off at intervals, for example mutually alternately. Signals are received from the reader unit 37 and detector unit 40, which are processed and corresponding statistical analysis results presented on a display 56. Similar numbers of each type of supports 1 are required to give optimal statistical analysis of experiments. Such statistical analysis is well known in the art.

20 The preferred embodiment of the biochemical method of detecting one or more protein characteristics utilises the supports 1 with sequential identification 2 described previously. The method comprises several steps, which can be performed in several different orders, and will now be described in more detail.

25 Information molecules 7 are attached to at least a main surface 11 of the supports 1 to allow the detection of potential protein characteristic matter 8 in a sample. Supports 1 with at least one type of sequential identification 2 are then suspended in a fluid 6 to allow a 3-dimensional array where the supports 1 are submersed in the fluid 6. The 3-dimensional array allows for very good reaction kinetics. The number of different types of supports 1 suspended in the fluid 6 is dependant on the test throughput required, but
30 could be hundreds, thousands or even millions. The number of the same types of supports

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

1 suspended in the fluid 6 is amongst other things dependent on quality of statistical analysis and the case of analysis.

5 The sample, potentially containing protein characteristic matter 8, to be analysed is added to the fluid 6 before or after the supports 1 have been suspended in the fluid. Signal emitting labels 9 are also added to the fluid 6. These signal emitting labels 9 are used to indicate interaction, e.g. bonding, between the information molecules 7 on the supports 1 and the protein characteristic matter 8 sought in the analysed sample. There are many different ways of adding the signal emitting labels 9 to the fluid 6. They can, for example, 10 be added to the fluid 6 separately, be attached to the protein characteristic matter 8 to be analysed prior to the sample being added to the fluid 6, or be attached to the information molecule 7 before or after their attachment to the supports 1. There are also many different ways for the signal emitting labels 9 to indicate that interaction between the information molecules 7 and the protein characteristic matter 8 in the analysed sample.

15 One such way is for a signal, such as fluorescence or light of other wavelength (colour), to be activated by the signal emitting label 9 if there is interaction between an information molecule 7, a matching protein characteristic matter 8 and the signal emitting label 9. Alternatively the signal emitting labels 9 are activated before any interaction with 20 the protein characteristic matter 8. When there is an interaction between the information molecule 7 and the protein characteristic matter 8 the active signal emitting label 9 is released from the other molecules deactivating its signal. This would result in a detection that is opposite to the ones discussed previously, i.e. the absence of a signal indicates that a reaction has occurred on a support in e.g. a yes/no experiment. Similarly a decrease in 25 the fluorescent signal 10 can be an indicator of the amount of protein characteristic matter 8 present in the analysed sample introduced into the fluid 6.

The fluid 6 containing supports 1 with information molecules 7, the sample to be analysed 8 and the signal emitting labels 9 is analysed using a detecting unit 40 and a 30 reader unit 37. The reader unit 37 reads the sequential identification 2 of at least those supports 1 with information molecules 7 that have reacted with the protein characteristic

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

matter 8 in the analysed sample. It may also be preferred to read the sequential identification 2 of all the supports 1 as a quality control of the multiplexed experiment. The detection unit 40 detects the absence or presence of interaction signals 10 of the signal emitting labels 9. In an alternative type of biochemical assay method more than
5 one signal may be used on each support indicating the presence of two or more protein characteristics 8 in the analysed sample. This would mean that two or more different information molecules 7 were attached to the same support 1. In such a case the signal emitting labels 9 would give off a different signal 10 depending on the protein characteristic matter 8 bonding to the information molecules 7. Another preferred
10 methodology used for the detection of protein characteristics is to use the combined signal from two or more supports 1 with different sequential identification 2 to indicate the presence of the protein characteristic. The signal combinations could, for example, be an active support A and passive support B, active supports A and B, or a passive support B and active support A, each different combination of supports indicating what type of
15 protein characteristic is detected in the fluid.

The intended uses of the biochemical assay for detecting one or more protein characteristic includes drug targeting, proteomics or analysis of analytes. These uses of the bioassay methods are also suitable for use in the field of screening and diagnostics.
20

It will be appreciated that modifications can be made to embodiments of the invention described in the foregoing without departing from the scope of the invention as defined by the appended claims.
25

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

CLAIMS

1. A biochemical method of detecting one or more protein characteristics, the method utilizing supports (1), wherein the largest dimension (3) of each support (1) is less than 250 μm and wherein each support (1) incorporates sequential identification means (2), characterised in that it comprises the steps of:

- (a) attaching an information molecule (7), which is capable of interacting with at least one of said one or more protein characteristics to be detected, to a main surface (11) of a support (1);
- (b) suspending supports (1) comprising one or more different sequential identifications means (2) and one or more different information molecules (7) in a fluid;
- (c) adding a sample (8) to be analysed;
- (d) detecting interaction signals from supports (1) in the fluid using signal detecting means (40); and
- (e) reading the sequential identification means (2) of the supports (1) which have an interaction signal using reading means (3), thereby detecting at least one of said one or more protein characteristics (8).

2. A method according to Claim 1, characterised in that the method further includes the step of oxidising the supports (1) prior to attachment of associated information molecules (7) thereto.

3. A method according to Claim 1 or 2, characterised in that step (c) is performed either before, after or simultaneously with step (b), and that step (e) is performed either before or after step (d).

4. A method according to Claim 1, 2, or 3, characterised in that the method further includes the step of using a measuring unit (35) for detecting the interaction signals and for reading of the sequential identification means (2), the

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

measuring unit (35) being arranged to detect the interaction signals and the sequential identification means (2) substantially simultaneously, the measuring unit (35) comprising the detecting and reading means (40, 37) for interrogating the supports (1).

5. A method according to any one or more of the Claims 1 to 4, characterised in that signal emitting labels (9) are added to the fluid, which labels (9) emit the interaction signals when information molecules (7) bond to the detected protein characteristic.

6. A method according to any one or more of the Claims 1 to 5, characterised in that reading of the sequential identification means (2) of the supports (1) is independent of the orientation of the supports (1), the sequential identification means (2) including one or more features arranged to indicate how to interpret the information gathered during the reading of the sequential identification means (2).

7. A method according to any one or more of the Claims 1 to 6, characterised in that the fluid comprising supports (1) are placed on a substrate (49) for subsequent interrogation.

8. A method according to Claim 7, characterised in that the method further comprises the step of reading the fluid along a predetermined path (60) along the substrate (49) using a measuring unit (35) arranged for detecting and reading the supports (1), said path (60) arranged to receive substantially all of the fluid.

9. A method according to Claim 8, characterised in that the method further comprises the step of interrogating individual supports (1) only once.

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

10. A method according to any one or more of the Claims 1 to 6, characterised in that the fluid, comprising supports (1) with associated attached information molecules (7) and the sample including at least one potential protein characteristic (8), is passed through an interrogation zone (34) of a measuring unit (35) via a focusing means for aligning and separating the supports (1) prior to interrogation.

11. A method according to any one or more of the preceding Claims 1 to 10, characterised in that a measuring unit (35) verifies reading and detection information from the supports (1) with a database containing preset information linking specific sequential identification means (2) to specific information molecules (7).

12. A method according to any one or more of the preceding Claims 1 to 11, characterised in that the supports (1) are coated with a binding promoter on one or more of their main surfaces (11) to facilitate molecular attachment thereto.

13. A method according to Claim 12, characterised in that the binding promoter is at least one of silane and avidin-biotin.

14. A method according to any one or more of the preceding Claims 1 to 13, characterised in that the fluid includes a liquid solution.

15. A method according to any one or more of the preceding Claims 1 to 14, characterised in that one or more protein characteristics being detected is drug targeting and the specific types of information molecules (7) being attached to the supports (1) are nucleic acid, protein and/or PNA molecules.

16. A method according to any one or more of the preceding Claims 1 to 14, characterised in that one or more protein characteristics being detected is

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

proteomics and the specific types of information molecules (7) being attached to the supports (1) are nucleic acid, protein and/or PNA molecules.

17. A method according to any one or more of Claims 1 to 14, characterised in that one or more protein characteristics being detected is the analysis of analytes and the specific types of information molecules (7) being attached to the supports (1) are enzyme, protein and/or PNA molecules.

18. A protein characteristic detection apparatus for analysing a fluid comprising supports (1), wherein the largest dimension (3) of each support (1) is less than 250 μm and wherein each support (1) incorporates sequential identification means (2), characterised in that

the apparatus includes detecting means (40) and reading means (37) for detecting two independent signals generated from each support (1) when interrogated in the apparatus, at least the reading means (37) being arranged to be in optical communication with the supports (1) suspended in the fluid for detection of the sequential identification means (2) of the supports (1), and the detecting means (40) being arranged to detect an interaction signal for detection of interaction between one or more protein characteristics in a sample to be analysed and an information molecule (7) attached to a main surface (11) of supports (1) including a corresponding specific sequential identification means (2).

19. A protein characteristic detection apparatus according to Claim 18, characterised in that the interaction signal is generated by a signal emitting label (9), which is activated or deactivated through the interaction between the information molecule (7) and the detected protein characteristic (8) in the analysed sample.

20. A support for use with a protein characteristics detection apparatus according any one of Claims 18 or 19, characterised in the sequential identification

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

means (2) of the support (1) has one or more feature arranged to indicate how to interpret the information gathered during the reading of corresponding sequential identification means (2) from the support (1).

21. A support according to Claim 20, characterised in that the sequential identification means (2) includes at least one of parity bit checking features and forward error correction features.

22. A support according to any one of Claims 20 or 21, characterised in that the sequential identification means (2) of the support (1) is arranged substantially along its largest dimension (3).

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

1/3

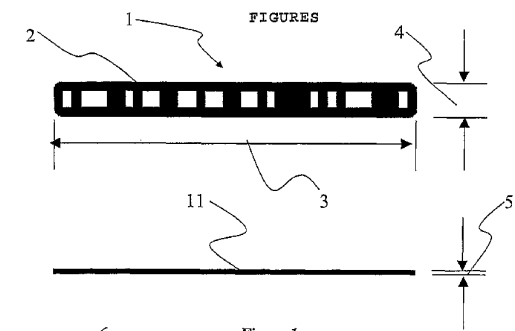


Figure 1

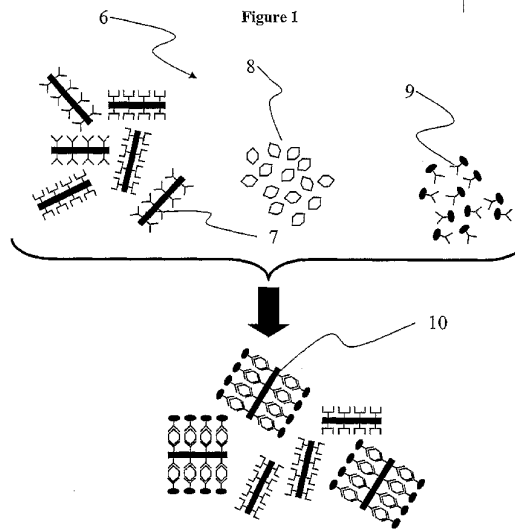


Figure 2

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

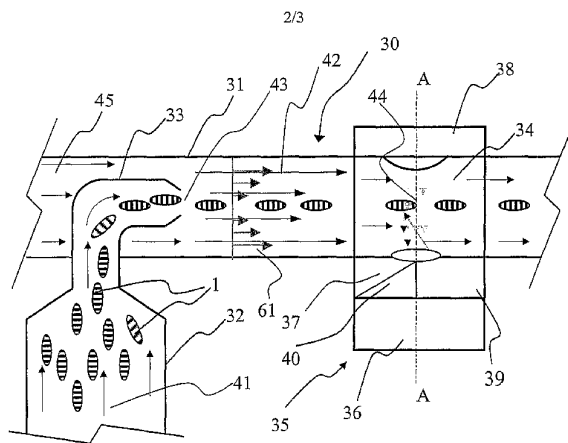


Figure 3

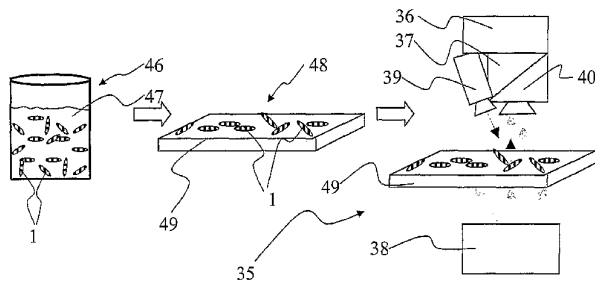


Figure 4

WO 02/065123

PCT/GB02/00628

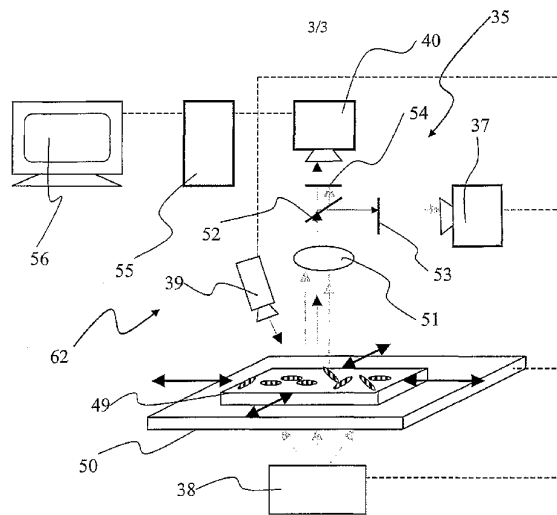


Figure 5

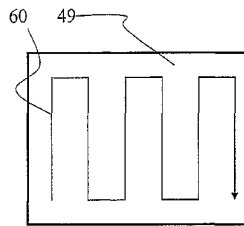


Figure 6a

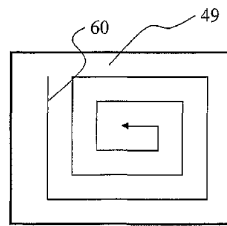


Figure 6b

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
22 August 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/065123 A3

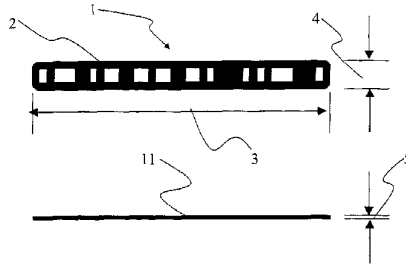
- (51) International Patent Classification: G01N 33/543 (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KL, KG, KP, KR, KZ, LC, I, K, I, R, I, S, I, T, I, U, I, V, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/GB02/00628
- (22) International Filing Date: 13 February 2002 (13.02.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0103464.4 13 February 2001 (13.02.2001) GB
0103473.5 13 February 2001 (13.02.2001) GB
0104125.0 20 February 2001 (20.02.2001) GB
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KI, I, S, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- (71) Applicant (*for all designated States except US*): SMART-BEAD TECHNOLOGIES LIMITED (GB/GB); Bahraham Hall, Bahraham, Cambridge CB2 4AT (GB).

Declarations under Rule 4.17:

as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, I, K, I, R, I, S, I, T, I, U, I, V, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,

[Continued on next page]

(54) Title: BIOCHEMICAL METHOD AND APPARATUS FOR DETECTING PROTEIN CHARACTERISTICS



(57) Abstract: There is described a biochemical method for detecting one or more protein characteristics. The method utilizes supports (1), wherein the largest dimension (3) of each support (1) is less than 250 μm and wherein each support (1) incorporates sequential identification means (2). The method is distinguished in that it includes the steps of: attaching an information molecule (7), which is capable of interacting with at least one of said one or more protein characteristic to be detected, to a main surface (11) of a support (1); suspending supports (1) comprising one or more different sequential identifications means (2) and one or more different information molecules (7) in a fluid; adding a sample (8) to be analysed to the fluid; detecting interaction signals from supports (1) in the fluid using signal detecting means (40); and reading the sequential identification means (2) of the supports (1) which have an interaction signal using reading means (3), thereby detecting at least one of said one or more protein characteristic (8). There is also described apparatus susceptible for use in executing the above method.

WO 02/065123 A3

WO 02/065123 A3



- OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- Published:**
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:**
12 December 2002
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following designations: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【手続補正書】

【提出日】平成14年12月9日(2002.12.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

1 又は複数のタンパク質特性を検出する生化学的方法であって、
最大寸法(3)が $250\mu\text{m}$ 未満であり、そして、各支持体(1)が連続同定手段(2)を組み込んでいる、支持体(1)を利用する方法であって
(a)情報分子(7)を各支持体(1)の主面(11)に接着させ；
(b)情報分子(7)と会合した支持体(1)を流体中で懸濁し；
(c)解析されるべき試料(8)を前記流体に添加し；
(d)その後の問い合わせのために、その会合した支持体(1)及び試料(8)を含んで成る流体を基板(49)上に据え；
(e)シグナル検出手段(40)を用いて、流体中の少なくとも1つの支持体(1)に由来する相互作用シグナルを検出し；そして
(f)読取手段(3)を用いて相互作用シグナルを有する支持体(1)の連続同定手段(2)を読み取り、それによって少なくとも1つの前記1又は複数のタンパク質特性(8)を検出する、
段階を含んで成り、
(g)情報分子(7)が前記1又は複数のタンパク質特性のうちの少なくとも1つと相互作用することができ；そして
(h)同定手段(2)が少なくとも1つの空間認識(spatial orientation)機構を一体的に組み込んでおり、そして読み取り手段(7)を補助するためのエラーコレクション機構が支持体(1)の同一性を決定すること、
を特徴とする方法。

【請求項2】

会合する情報分子(7)の接着前に、支持体(1)を酸化する段階を更に含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

情報分子(7)と会合した支持体(1)及び試料(8)のいずれかが、流体が基板(49)上に据えられる前、後、又それと同時に流体に添加され、段階(c)が、段階(b)の前、後又はそれと同時に、のいずれかに実施され、そして段階(f)が段階(d)の前又は後のいずれかに実施されることを特徴とする、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

相互作用シグナルを検出し、そして連続同定手段(2)を読み取るために測定ユニット(35)であって、相互作用シグナル及び連続同定手段(2)を実質的に同時に検出するために配置され、支持体(1)を問い合わせるための検出手段及び読取手段(37, 40)を含んで成る測定ユニット(35)を用いる段階を更に含むことを特徴とする、請求項1, 2, 又は3に記載の方法。

【請求項5】

シグナル放射ラベル(9)が流体に添加され、前記放射ラベル(9)が、情報分子が1又は複数のタンパク質特性を示す、試料中の分子と結合した場合に相互作用シグナルを放射するように配置されていることを特徴とする、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

支持体(1)の検出及び読取のために配置された測定ユニット(35)を用いて、基板(49)に沿った、規定の経路(60)に沿って流体を読み取る段階を更に含んで成り、前

記経路(60)が実質的に全ての流体を受けるために配置されていることを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

個々の支持体(1)をわずかに1回問い合わせる段階を更に含んで成ることを特徴とする、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

接着情報分子(7)と会合した支持体(1)及び、少なくとも1つの潜在的なタンパク質特性(8)を含む試料を含んで成る流体が、問い合わせの前に支持体(1)を整列させ、そして分離するための集束手段を介して、測定ユニット(35)の問い合わせ領域(34)を通過されることを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

測定ユニット(35)が、特定の連続同定手段(2)を特定の情報分子(7)と結びつける、あらかじめ設定された情報を含むデータベースを用いて、支持体(1)由来の読取情報及び検出情報を確認することを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

支持体(1)が、それらに対する分子接着を容易にするために、1又は複数のそれらの主面(11)上を結合プロモーターでコーティングされることを特徴とする、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

結合プロモーターが少なくとも1つのシラン及びアビジン-ビオチンであることを特徴とする、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

流体が溶液を含むことを特徴とする、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

検出される1又は複数のタンパク質特性が薬物ターゲティングであり、そして支持体(1)に接着される特定の型の情報分子(7)が核酸、タンパク質及び/又はPNA分子であることを特徴とする、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

検出される1又は複数のタンパク質特性がプロテオミクスであり、そして支持体(1)に接着される特定の型の情報分子(7)が核酸、タンパク質及び/又はPNA分子であることを特徴とする、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

検出される1又は複数のタンパク質特性が解析物の解析であり、そして支持体(1)に接着される特定の型の情報分子(7)が酵素、タンパク質及び/又はPNA分子であることを特徴とする、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

支持体(1)を含んで成る流体を解析するためのタンパク質特性の検出装置であって、最大寸法が250µm未満であり、そして各支持体(1)が連続同定手段を組み込んでおり、

その後の問い合わせのために支持体(1)を含んで成る流体の静置のための基板49)を含み、当該装置内で問い合わせをした場合に各支持体(1)から生成する多数の独立したシグナルを検出するための検出手段(40)及び読取手段(37)を含み、少なくとも読取手段(37)が、支持体(1)の連続同定手段(2)の検出のために流体中で懸濁された支持体(1)と光通信するよう配置され、そして検出手段(40)が解析されるべき試料中の1又は複数のタンパク質特性と、相当する特定の連続同定手段(2)を含む支持体(1)の主面(11)に接着した情報分子(7)との間の相互作用の検出のための相互作用シグナルを検出するために配置され、

同定手段が少なくとも1つの空間認識(spatial orientation)機構を一体的に組み込んでおり、そして読み取り手段(7)を補助するためのエラーコレクション機構が支持体(1)

）の同一性を決定すること、
を特徴とする装置。

【請求項 17】

相互作用シグナルが、情報分子（7）と解析試料中のタンパク質特性（8）を示すことが出来る前記 1 又は複数の分子との間の相互作用を介して活性化され、又は不活化されうるシグナル放射ラベルによって生成することを特徴とする、請求項 16 に記載の装置。

【請求項 18】

支持体（1）の同定手段（2）が少なくとも 1 つの空間認識 (spatial orientation) 機構を一体的に組み込んでおり、そして読み取り手段（7）を補助するためのエラーコレクション機構が支持体（1）の同一性を決定すること、を特徴とする、請求項 16 又は 17 に記載のタンパク質特性検出装置に用いるための支持体。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Additional Application No. PCT/GB 02/00628
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 14028 A (CHANDLER MARK B ; CHANDLER VAN S (US); LUMINEX CORP (US); FULTON R) 17 April 1997 (1997-04-17) page 7, line 1 -page 8, line 22 page 10, line 13 -page 11, line 10	1, 3, 4, 6, 10-12, 14-20
X	US 5 981 180 A (CHANDLER MARK B ET AL) 9 November 1999 (1999-11-09) column 1, line 46 -column 2, line 55	1, 3, 4, 6, 10-12, 14-20
X	WO 00 55363 A (AMERSHAM PHARM BIOTECH UK LTD ; THOMAS NICHOLAS (GB); WAGGONER ALAN) 21 September 2000 (2000-09-21) claims 1-15	1, 3, 4, 6, 10-12, 14-20
	--- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (to be specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 July 2002		09/08/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2000 PH Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Diez Schlereth, D

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 02/00628

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 126 450 A (TRIPATZIS IOANNIS) 28 November 1984 (1984-11-28) claims 1-28	1, 3, 4, 6, 10-12, 14-20
X	US 5 206 143 A (HORAN PAUL K ET AL) 27 April 1993 (1993-04-27) column 2, line 57 -column 3, line 28	1, 3, 4, 6, 10-12, 14-20
X	DE 100 31 028 A (SMTECH BIOVISION HOLDING AG EC) 3 January 2002 (2002-01-03) column 2, line 36 -column 4, line 35	1, 3, 4, 6, 10-12, 14-20
A	WO 95 32425 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP ;YAMASHITA DENNIS SHINJI (US); WEINSTOCK J) 30 November 1995 (1995-11-30) page 4, line 11 -page 6, line 5	1-22
A	US 6 096 496 A (FRANKEL ROBERT D) 1 August 2000 (2000-08-01) column 6, line 8 -column 6, line 40	1-22
A	US 4 568 630 A (HUANG JEN-CHI ET AL) 4 February 1986 (1986-02-04) column 1, line 24 -column 1, line 50	1-22
A	US 5 519 200 A (WILLIAMS EDWARD W) 21 May 1996 (1996-05-21) abstract	1-22
P, X	WO 01 44812 A (HAGEN FREDERICK S ;ICOGEN CORP (US); FRAMSON PAUL E (US); OORT PIE) 21 June 2001 (2001-06-21) the whole document	1-22

Form PCT/ISA/E10 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No. PCT/GB 02/00628	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9714028	A	17-04-1997	US 5981180 A		09-11-1999
			US 5736330 A		07-04-1998
			AU 7398996 A		30-04-1997
			CA 2227895 A1		17-04-1997
			EP 0852004 A2		08-07-1998
			WO 9714028 A2		17-04-1997
			US 6057107 A		02-05-2000
US 5981180	A	09-11-1999	AU 7398996 A		30-04-1997
			CA 2227895 A1		17-04-1997
			EP 0852004 A2		08-07-1998
			WO 9714028 A2		17-04-1997
WO 0055363	A	21-09-2000	AU 2928400 A		04-10-2000
			EP 1163367 A2		19-12-2001
			WO 0055363 A2		21-09-2000
EP 0126450	A	28-11-1984	DE 3322373 A1		22-11-1984
			AT 80469 T		15-09-1992
			CA 1248873 A1		17-01-1989
			DE 3485912 D1		15-10-1992
			EP 0126450 A2		28-11-1984
			JP 2040626 C		28-03-1996
			JP 7054324 B		07-06-1995
			JP 60035265 A		23-02-1985
			DK 305084 A		23-12-1984
			NO 842501 A		27-12-1984
US 5206143	A	27-04-1993	AT 72051 T		15-02-1992
			AU 603066 B2		08-11-1990
			AU 6366686 A		16-04-1987
			CA 1279008 A1		15-01-1991
			DE 3683585 D1		05-03-1992
			DK 481386 A		12-04-1987
			EP 0219309 A1		22-04-1987
			ES 2037659 T3		01-07-1993
			GR 3004080 T3		31-03-1993
			PT 83515 A ,B		29-05-1987
DE 10031028	A	03-01-2002	DE 10031028 A1		03-01-2002
			AU 6908701 A		08-01-2002
			WO 0201189 A1		03-01-2002
WO 9532425	A	30-11-1995	EP 0763202 A1		19-03-1997
			JP 10500951 T		27-01-1998
			WO 9532425 A1		30-11-1995
US 6096496	A	01-08-2000	NONE		
US 4568630	A	04-02-1986	NONE		
US 5519200	A	21-05-1996	AT 141429 T		15-08-1996
			DE 69304055 D1		19-09-1996
			DE 69304055 T2		16-01-1997
			EP 0642687 A1		15-03-1995
			ES 2093435 T3		16-12-1996
			WO 9324903 A1		09-12-1993
			JP 8507393 T		06-08-1996

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No.	
Information on patent family members				PCT/GB 02/00628	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0144812	A	21-06-2001	AU	2261601 A	25-06-2001
		WO	0144812 A1		21-06-2001

Form PCT/ISA(210 (patent family annex)) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/68

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

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 ゲイリー, キャロライン

イギリス国, ケンブリッジ シービー 4 1 ビーエヌ, マリナーズ ウェイ 1 7

(72)発明者 ハドレー, ジョディー

イギリス国, エリー シービー 6 3 ダブリュエル, コロンバイン ロード 2 9

(72)発明者 イングランド, マーク

イギリス国, ケンブリッジ シービー 4 6 ディージー, バット レーン ミルトン 4 4 エー

F ターム(参考) 2G045 DA36 FB03 FB08 FB12 FB15 GC15 JA01