

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4829240号
(P4829240)

(45) 発行日 平成23年12月7日(2011.12.7)

(24) 登録日 平成23年9月22日(2011.9.22)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N 35/08	(2006.01)	GO 1 N 35/08	B
GO 1 N 37/00	(2006.01)	GO 1 N 37/00	1 O 1
BO 1 J 19/00	(2006.01)	GO 1 N 37/00	1 O 3
GO 1 N 33/50	(2006.01)	BO 1 J 19/00	3 2 1
C 1 2 Q 1/00	(2006.01)	GO 1 N 33/50	Z

請求項の数 4 (全 79 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-536255 (P2007-536255)
 (86) (22) 出願日 平成17年10月12日(2005.10.12)
 (65) 公表番号 特表2008-516251 (P2008-516251A)
 (43) 公表日 平成20年5月15日(2008.5.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2005/003924
 (87) 国際公開番号 W02006/040551
 (87) 国際公開日 平成18年4月20日(2006.4.20)
 審査請求日 平成20年10月14日(2008.10.14)
 (31) 優先権主張番号 10/963,044
 (32) 優先日 平成16年10月12日(2004.10.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 597166578
 メディカル リサーチ カウンシル
 英国 エスエヌ2 1エフエル ウィルト
 シャー, スウィンドン, ノース スタ
 ー アヴェニュー, ポラリス ハウス, デ
 イヴィッド フィリップス ビルディング
 2階

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロ流体制御による区画化されたスクリーニング

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

化合物レポトリ内の所望の活性を有する1つ以上の化合物を同定するための方法であって、

a) 前記レポトリの1サブセットのみが、任意のマイクロカプセル内において多重コピーとして示されるように、化合物をマイクロカプセルに区画化する工程；および

b) 所望の活性を有する化合物を区画化する前記マイクロカプセルの光学特性の少なくとも1つの変化を検出することに基づく、所望の活性を有する化合物を同定する工程、
 を含み、工程 a) および b) のうち的一方または両方がマイクロ流体制御下で実施される、方法。

【請求項 2】

所望の活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 化合物のレポトリの1サブセットのみが、任意の1マイクロカプセル内において多重コピーとして示されるように、化合物をマイクロカプセルに区画化する工程；

(b) その光学特性の変化を用いて、所望の活性を有する化合物を含有する前記マイクロカプセルを同定および選別する工程；および

(c) 所望の活性を有する化合物を同定およびスクリーニングする工程、
 を含み、工程 a) および b) のうち的一方または両方がマイクロ流体制御下で実施される、方法。

【請求項 3】

10

20

標的の活性を変調させる能力をもつ1つ以上の化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 化合物のレパートリの1サブセットのみが、任意の1マイクロカプセル内において多重コピーとして示されるように、化合物をマイクロカプセルに区画化する工程；
 - (b) その光学特性の変化を用いて、所望の活性を有する化合物を含有する前記マイクロカプセルを同定および選別する工程；および
 - (c) 所望の活性を有する標的を1つ以上の化合物と接触させ、前記1つ以上の化合物による前記標的の活性の変調を監視する工程、
- を含み、工程 a、b および c のうちの1つ以上のものがマイクロ流体制御下で実施される、方法。

10

【請求項4】

標的をスクリーニングする方法であって、

- (a) 少なくとも1つの工程が化合物によって容易になる、反応を標的に提供する工程；
 - (b) この工程を容易にする前記化合物を調製する工程；
 - (c) 前記化合物のレパートリの1サブセットのみが、任意の1マイクロカプセル内において多重コピーとして示されるように、前記標的および前記化合物をマイクロカプセルに区画化する工程；
 - (d) その光学特性の変化を用いて、所望の活性を有する前記化合物を含有する前記マイクロカプセルを同定および選別する工程；および
 - (e) 合成の関連工程を容易にするべく(d)で同定された前記化合物を使用して前記標的をスクリーニングする工程、
- を含み、工程 a ~ e のうちの1つ以上のものがマイクロ流体制御下で実施される、方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、流体種の制御のためのシステムおよび方法を用いて化合物ライブラリから化合物を選択する方法、特に流体種の電子制御用のシステムおよび方法に関する。本発明の方法は、任意の所望の薬物標的に対する潜在的活性のための候補薬物といった低分子量化合物の選択に対し特に応用可能である。

30

【0002】

本出願は、その全体が本明細書に参照により援用されている2004年3月31日付けのPCT出願第GB2004/001362号に対する優先権を35. U. S. C 第120条に基づき請求するものである。

【背景技術】

【0003】

本発明は、生化学系の標的コンポーネントに対し結合するかまたは標的の活性を変調させる分子の同定において使用するための方法に関する。

【0004】

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

40

【0005】

50

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

10

20

【0006】

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

【0007】

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

30

【0008】

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

40

【0009】

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

【0010】

従って、非常に低いコストで、わずか数フェムトリットルの反応体積を用いて、莫大な数（ 10^9 以上）の化合物を高速でまたはより少数の化合物を一定範囲の条件（異なる化合物濃度、異なる標的など）の下で、スクリーニングできるようにする方法を提供するこ

50

とが、新規のリード薬物を生成する上できわめて有用であると思われる。

【0011】

タウフィーク (Tawfik) およびグリフィス (Griffiths)、(1998年) および特許文献3は、分子レベルで遺伝子型および表現型を連結するためマイクロカプセル内の区画化を用いるインビトロ進化用システムについて記述している。タウフィークおよびグリフィス(1998年)内および特許文献3内では、遺伝子産物の所望の活性は、結果として、それをコード化した(そして同じマイクロカプセル内に存在する)遺伝要素の修飾をもたらす。修飾された遺伝要素は、このとき、後続工程において選択され得る。

【0012】

本発明は同様に、マイクロカプセル内の区画化、この場合は化合物ライブラリからの化合物の区画化にも基づいている。マイクロカプセルは、流体種の制御のためのシステムおよび方法特に流体種の電子制御用のシステムおよび方法を用いて作られ操作される液滴である。

【0013】

流体の送達、製品製造、分析などを目的とした所望の構成の流体流、不連続流体流、液滴、粒子、分散などを形成するための流体の操作は、相対的に充分研究されている技術である。例えば、毛細管フロー集束と呼ばれる技術を用いて、直径100マイクロン未満のきわめて単分散の気泡が生成されてきた。この技術においては、気体は強制的に毛細管から液体浴内に出され、この管は小さいオリフィスの上に位置づけられ、このオリフィスを通した外部液体の縮流は、気体を薄い噴流の形に集束させ、この噴流はその後、毛細管不安定性を介して急激に等サイズの気泡になる。関連技術では、空気中で液滴を生成するために類似の配置が使用された。

【0014】

「Generation of Steady Liquid Microthreads and Micron-Sized Monodisperse Sprays および Gas Streams」と言う表題の論文、Phys. Rev. Lett.、第80:2号、1998年1月12日、285~288頁(Ganan-Calvo)は、細かいスプレーを発生させる層状加速気体流による微細液体スレッドの形成について記述している。

【0015】

「Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device」と言う表題の論文、Phys. Rev. Lett.、第86:18号、2001年4月30日(トールセン(Thorsen)、ら)は、特定的には2つのマイクロ流体チャンネルの間の「T字形」接合部において流動する油の中に水を導入することによる、マイクロ流体交差フローを介した連続油相中の不連続水相の形成について記述している。

【0016】

2000年9月19日に発行された特許文献4は、例えば生体液分析において流体媒質内の微細粒子を分析するため第1および第2の試料流体流を空間的に封じ込めるための流体集束用チャンバを有するマイクロ加工装置について記述している。

【0017】

2000年9月12日に発行された特許文献5は、毛細管マイクロ噴流の形成およびマイクロ噴流の解離を介した単分散エアロゾルの形成について記述している。

【0018】

2001年2月13日に発行された特許文献6は、2つの不混和流体の相互作用によって生成される約1~約5マイクロンのサイズ範囲内の霧化粒子について記述している。

【0019】

2001年6月19日に発行された特許文献7は、マイクロ噴流を用いて食物の中に導入するための粒子の生産およびマイクロ噴流が解離したときに形成される単分散エアロゾ

10

20

30

40

50

ルについて記述している。

【0020】

標準的には、小型化された実験室（例えば臨床的）分析の状況下で、マイクロ流体システムがさまざまな状況下で記述されてきた。その他の用途も同様に記述されてきた。例えば、特許文献8は、表面上の生体材料および細胞といったような材料パターンを提供するために使用可能なマルチレベルマイクロ流体システムについて記述している。その他の刊行物は、バルブ、スイッチおよびその他のコンポーネントを含めたマイクロ流体システムについて記述している。

【0021】

マクロまたはマイクロ流体規模で動力学における有意な進歩が成し遂げられてきたものの、改良された技術およびこれらの技術の成果が必要とされている。

【特許文献1】米国特許第6,508,988号明細書

【特許文献2】米国特許第5,942,056号明細書

【特許文献3】国際特許出願PCT/GB98/01889号パンフレット

【特許文献4】米国特許第6,120,666号明細書

【特許文献5】米国特許第6,116,516号明細書

【特許文献6】米国特許第6,187,214号明細書

【特許文献7】米国特許第6,248,378号明細書

【特許文献8】アンダーソン(Ander son)他による2001年11月29日付けの国際公開第01/89789号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0022】

現在、我々は、グリフィスおよびタウフィーク(1998年)で記述されたものに基づく区画化されたマイクロカプセルシステムを用いた、遺伝要素によってコード化されない化合物のスクリーニングのための方法を開発した。本発明に従った新規の方法は、近代HTSアプローチと相容性ある形で低コストで標的に対抗する活性のための化合物の高速大量処理スクリーニングを可能にするべく、流体種の制御のためのシステムおよび方法を使用している。

【0023】

流体種の制御のためのこれらのシステムおよび方法は、以下の理由から、化合物のスクリーニングのためにきわめて有利である：

(a) それらは、各々がほとんど同一のきわめて小さいマイクロ反応装置として機能する、きわめて単分散のマイクロカプセル(1.5%未満の多分散性)の形成を可能にする。

(b) マイクロカプセルは、約1フェムトリットル~約ナノリットルの範囲の体積を有することができる。

(c) マイクロカプセル内の区画化が、放物流に起因する拡散および分散を妨害する。

(d) ペルフルオロカーボン担体流を使用することにより、マイクロカプセル間の分子の交換を妨げることが可能である。

(e) マイクロカプセル内の化合物は、不活性ペルフルオロカーボン担体流体の層により分離されることから、マイクロチャンネルの構造と反応することも相互作用することもできない。

(f) マイクロカプセルを $10,000 \text{ 秒}^{-1}$ 以下で作り出すことができ、又、同じ速度で光学的方法を用いてスクリーニングできる。これは一日最高 10^9 の処理量である。

(g) マイクロカプセルを2つ以上のより小さいマイクロ液滴に分割でき、その中に含まれた試薬を並行して異なる一連の分子と反応させるかまたはマルチプリケートで検定することを可能にする。

(h) マイクロカプセルを融合させることができる。こうして分子を(a)希釈させ、(b)その他の分子と混合物させ、(c)精確に定義された時刻に反応を開始、終結また

10

20

30

40

50

は変調させることができる。

(i) カオスの移流を用いてマイクロカプセル内で非常に急速に試薬を混合させることができ(2ms未満)、高速運動測定および非常に高い処理量を可能にする。

(j) 組合せ的に試薬を混合させることができ、例えば、テストすべき標的に対する化合物ライブラリ内の化合物の考えられる全ての対様組合せの効果をも可能にする。

(k) マイクロカプセルの安定流をマイクロチャンネル状に形成し、その相対的位置により同定することができる。

(l) 反応に光シグナル(例えば蛍光変化)にが随伴する場合、マイクロ流体ネットワークの空間分解された光学画像が各々のマイクロカプセル内の反応の時間分解測定を可能にする。

(m) マイクロカプセルは、それに含まれる分子の回収およびさらなる分析または操作を可能にするべくマイクロ流体流選別装置を用いて分離可能である。

【課題を解決するための手段】

【0024】

第1の態様においては、化合物レポトリ内の所望の活性を有する1つ以上の化合物を同定するための方法であって、

a) レポトリの1サブセットのみが、任意のマイクロカプセル内において多重コピーで代表されるような形で、化合物をマイクロカプセルに区画化する工程;および

b) 所望の活性を有する化合物を同定する工程、
を含み、工程a)およびb)のうち的一方または両方が流体種のマイクロ流体制御下で実施される方法が提供されている。

【0025】

本明細書で記述されているようなマイクロ流体デバイスは、本発明に従った化合物のカプセル化、反応および選別における複数の段階のうちいずれか1つ以上のものにおいて使用可能である。例えば、試薬をカプセル化するためにマイクロ流体デバイスを使用し、手順の残りの部分を従来の非マイクロ流体条件下で実施することができる。代替的には、マイクロ流体デバイスまたは非混和液の従来の機械式乳化といったその他の手段によって作り上げられたマイクロカプセルを用いて、該マイクロカプセル内での化合物の反応のうちいずれか1つ以上のもの、マイクロカプセルの選別およびマイクロカプセルの同定を制御するために、該マイクロ流体デバイスを使用することができる。

【0026】

好ましくは、所望の活性は、結合活性および標的の活性の変調からなる群から選択される。標的は有利には、化合物と共にマイクロカプセルに区画化され、標的と化合物と一緒に連結するマイクロカプセル内で、標的に対する化合物の活性を測定できるようにする。

【0027】

好ましくは、いずれか1つのマイクロカプセル内に存在するレポトリのサブセットは、単一の化合物である。各々のマイクロカプセルは、有利には単一の化合物の多重コピーであるレポトリのサブセットの多数の分子を含んでいる。

【0028】

化合物を含むマイクロカプセル内の変化についてスクリーニングすることにより、本発明に従って化合物をスクリーニングすることができる。好ましい一実施形態では、マイクロカプセルは、例えばその光学特性を変化させるために化合物の作用により修飾される。

【0029】

マイクロカプセルの光学特性の変化は、標的に結合したときの化合物の光学特性の変化、または化合物に結合したときの標的の光学特性の変化に起因し得る。さらに、マイクロカプセルの光学特性の変化は、結合時点での標的と化合物の両方の光学特性の変化に起因するものであり得る。

【0030】

マイクロカプセルの光学特性の変化は、化合物による標的の活性の変調に起因するものであり得る。化合物は、標的の活性を活性化または阻害し得る。例えば、標的が酵素であ

10

20

30

40

50

る場合、標的を触媒とする反応の生成物および基質は異なる光学特性を有することができる。有利には、基質および生成物は異なる蛍光特性を有する。

【0031】

マイクロカプセルの検出された変化は、該化合物の直接的な作用または間接的な作用によって引き起こされる可能性があり、ここで所望の活性を有する化合物が関与する1つ以上のものを含めた一連の反応が、該検出された変化を導いている、ということを理解すべきである。

【0032】

マイクロカプセル内の化合物は、質量分析、化学的タグ付けまたは光学的タグ付けを含めた、当業者にはよく知られているさまざまな技術を用いて同定され得る。有利には、該化合物は、マイクロカプセルおよびその中に含まれた化合物の同定を可能にするために、光学的にタグ付けされたマイクロカプセルの中に含まれている。

【0033】

有利には、該マイクロカプセルはその蛍光の変化を検出することによって分析される。例えば、マイクロカプセルはフローサイトメトリーによって分析され、蛍光活性化細胞選別装置(FACS)またはマイクロ流体流選別デバイスを用いて光学的に選別され得る。標的および生成物の異なる蛍光特性は、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)に起因する可能性がある。

【0034】

さらなる実施形態においては、該マイクロカプセルの内部環境は、油相に対する1つ以上の試薬の添加により修飾され得る。こうして、必要とあらば反応の間に試薬をマイクロカプセルに拡散させることができる。

【0035】

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

【0036】

マイクロカプセル化は、油中水型エマルジョンを形成することによって達成可能である。

【0037】

多重コピーでのレパートリのサブセットの区画化は、多くの方法で達成できる。例えば、化合物をビーズに付着させることもできるし、又、実質的に単一のビーズのみが各区画に内含されるようにエマルジョンが形成されてもよい。上述の工程(a)は、こうして、(a)レパートリの1サブセットのみがいずれか1つのマイクロビーズ上で代表されるような形で、マイクロビーズ上に化合物のレパートリを付着させる工程、(b)マイクロビーズをマイクロカプセルに区画化させる工程、を含み、かくして任意の1つのマイクロカプセル内において多重コピーで該レパートリの1サブセットが代表されることになるように修飾される。

【0038】

従って、さらなる態様においては、所望の活性を有する化合物レパートリ内の化合物を同定するための方法であって、

(a)レパートリの1サブセットのみが任意の1マイクロビーズ上で代表されるような形で、化合物レパートリをマイクロビーズ上に付着させる工程；

10

20

30

40

50

(b) マイクロビーズをマイクロカプセルに区画化する工程、
(c) 任意には、マイクロビーズから化合物を放出する工程；および
(d) 所望の活性を有する化合物を同定する工程、
を含み、工程 a) および b) の一方または両方が流体種のマイクロ流体制御下で実施される方法が提供されている。

【0039】

好ましくは、任意の1マイクロビーズ上に存在するレパートリのサブセットは単一の化合物である。有利には、各々のマイクロビーズには単一の化合物の多数の分子が付着されている。

【0040】

好ましくは、化合物は、望まれる場合マイクロビーズからの化合物の放出を可能にする、例えば光開裂可能なリンカーといった開裂可能リンカーを用いてマイクロビーズに付着される。

【0041】

化合物は、化合物を含むマイクロカプセル内の変化または化合物が付着されているマイクロビーズ内またはその上の変化のいずれかについてスクリーニングすることによって、本発明に従ってスクリーニング可能である。

【0042】

ビーズ上の化合物は、質量分析、化学的タグ付けまたは光学的タグ付けを含めた、当業者にはよく知られているさまざまな技術を用いて同定され得る。有利には、該化合物は、ビーズまたは工程(d)でそれにカップリングされた化合物の同定を可能にするために、光学的にタグ付けされたマイクロビーズにカップリングされる。

【0043】

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

【0044】

さらに、マイクロ流体技術を用いて生産された高単分散性のマイクロカプセルに化合物ライブラリを区画化させることが可能である。例えば、各化合物のアリコート油の同時フロー蒸気内での液滴中断により作り出された油中水型エマルジョン内の1つ以上の水性マイクロカプセル(1.5%未満の多分散性)に区画化することができる(アンバンハウアー(Umbanhowar)ら、2000年)。有利には、水性マイクロカプセルは次に、マイクロ流体チャンネル内で油の流れの中の層流により輸送される(トールセンら、2001年)。単一の化合物を含むこれらのマイクロカプセルは、任意にはマイクロ流体工学を用いて2つ以上のより小さいマイクロカプセルへと分割可能である((リンク(Link)ら、2004年；ソング(Song)ら、2003年)。単一の化合物を含むマイクロカプセルは、標的を含むその他のマイクロカプセル(ソングら、2003年)と融合され得る。標的を含む単一のマイクロカプセルは任意には、2つ以上のより小さいマイクロカプセルへと分割され得、これらの小さいマイクロカプセルはその後、異なる化合物または異なる濃度の化合物を含むマイクロカプセルと融合可能である。有利には、標的の活性を検定するのに必要なもの(例えば、標的が酵素である場合その標的のための基質)を送達する第2のマイクロカプセル融合に先立つ、マイクロカプセル融合により化合物と標的を混合させることができる。こうして化合物には標的に結合する時間的余裕がでることになる。マイクロカプセルはマイクロ流体デバイスを用いて分析でき、かつ任意には選別され得る(フー(Fu)ら、2002年)。

【0045】

流体種の制御および操作方法は同様に、例えば、各々本明細書に参照により援用されている(リンクらにより2003年8月27日付けで出願された米国仮特許出願第60/4

10

20

30

40

50

98,091号明細書；ストーン（Stone）らにより2002年6月28日付けで出願された米国仮特許出願第60/392,195号明細書；リンクらにより2002年1月5日付けで出願された米国仮特許出願第60/424,042号明細書；1996年4月30日付けでクマール（Kumar）らに対して発行された米国特許第5,512,131号明細書；ホワイトサイド（Whitesides）らにより1996年6月26日付けで公開された国際公開第96/29629号パンフレット；キム（Kim）らに対して2002年3月12日付けで発行された米国特許第6,355,198号明細書；アンダーソン（Anderson）らにより2001年5月25日付けで出願され、2001年11月29日付けで国際公開第01/89787号パンフレットとして公開された国際特許出願番号第PCT/US01/16973号明細書；ストーンらにより2003年6月30日付けで出願され、2004年1月8日付けで国際公開第2004/002627号として公開された国際特許出願番号第PCT/US03/20542号明細書；リンクらにより2004年4月9日付けで出願された国際特許出願番号第PCT/US2004/010903号明細書；およびリンクらにより2003年4月10日付けで出願された米国仮特許出願第60/461,954号明細書；)の中で記述されている。

10

【0046】

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

20

30

【0047】

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

【0048】

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

40

50

【 0 0 4 9 】

適切なあらゆる技術を用い、例えば（AC、DCなどであり得る）電場内部に第1の液体を置くことおよび/または第1の液体に1つの電荷をもたせるようにする反応例えば化学反応、イオン反応、光触媒反応などの反応を発生させることによって、第2の液体内部で第1の液体内に電荷を作り出すことが可能である。一実施形態においては、第1の液体は、導電体である。本明細書で使用する「導体」というのは、少なくとも約18メガオーム（MΩまたはM Ω ）水の伝導率を有する材料である。第1の液体を取り囲む第2の液体は、第1の液体のものよりも小さい伝導率を有してよい。例えば、第2の液体は、第1の液体に対し絶縁体であるかまたは少なくとも「漏洩しやすい絶縁体」であり得る、すなわち第2の液体は、少なくとも短い時限、第1の液体を少なくとも部分的に電気的に絶縁することができる。当業者であれば、流体の伝導率を同定することができるだろう。1つの限定的意味のない実施形態においては、第1の液体は、実質的に親水性であり得、第1の液体を取り囲む第2の液体は実質的に疎水性であり得る。

10

【 0 0 5 0 】

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

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

20

【 0 0 5 1 】

（II）第2の実施形態においては、1つ以上の共通区画内へのマイクロカプセルのプールの後、マイクロビーズが分析される。この実施形態においては、所望の活性を有する化合物が、後続する工程でそれを同定できるようにする形で、それを担持していた（そして同じマイクロカプセル内に常在している）マイクロビーズを修飾する。反応は停止され、マイクロカプセルはこのとき、個々のマイクロカプセルの全ての中味がプールされるような形で破壊される。修飾されたマイクロビーズは同定され、（a）マイクロビーズ上にコーティングされた化合物の活性に従って物理的に選別され、選別されたマイクロビーズはそれらをコーティングしている（した）化合物の同一性を判定するために分析されるかまたは；（b）マイクロビーズをコーティングしている（した）化合物の同一性を判定するべく選別なしで直接分析されるかのいずれかである。当然のことながら、マイクロビーズの修飾は、それが化合物の直接的作用によって引き起こされるという点で直接的なものであってもよいし、又、所望の活性をもつ化合物が関与するものを1つ以上含めた一連の反応が該マイクロビーズの修飾を導く間接的なものであってもよいことを理解すべきである。有利には、標的はマイクロビーズに結合され、リガンドであり、マイクロカプセル内部の化合物は直接的または間接的に前記リガンドに結合してマイクロビーズの単離を可能にする。もう1つの実施においては、標的のための基質がマイクロビーズに結合され、マイクロカプセル内部の該化合物の活性は結果として、前記基質を、マイクロビーズの一部であり続けその単離を可能にする1つの生成物へと直接的または間接的に転換することになる。代替的には、該化合物の活性は、前記基質の生成物への転換を防止または阻害し得る。その上、マイクロカプセル内部の化合物の活性の生成物は結果として、その後マイクロビーズと複合体化しその同定を可能にする1つの生成物の生成を直接的または間接的にもたらすことができる。

30

40

50

【 0 0 5 2 】

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

10

【 0 0 5 3 】

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

【 0 0 5 4 】

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

20

【 0 0 5 5 】

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

【 0 0 5 6 】

マイクロカプセルの光学および / または電荷特性の変化は、該化合物による標的の活性の変調に起因するものであり得る。該化合物は標的の活性を活性化または阻害し得る。例えば、標的が酵素である場合、標的を触媒とする反応の生成物および基質は、異なる光学および / または電荷特性を有する可能性がある。有利には、基質および生成物は異なる蛍光特性を有する。マイクロカプセルがマイクロビーズを含有する場合には、基質および生成物の両方が類似の光学および / または電荷特性を有し得るが、基質ではなく反応の生成物のみがマイクロビーズに結合するかまたはこれと反応し、かくしてマイクロビーズの光学および / または電荷特性を変化させる。

30

【 0 0 5 7 】

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

40

【 0 0 5 8 】

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

【 0 0 5 9 】

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

50

【0060】

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

【0061】

マイクロビーズは、非磁性、磁性または常磁性であり得る。

10

【0062】

有利には、マイクロカプセルまたはマイクロビーズは、その蛍光の変化を検出することによって分析される。例えば、マイクロビーズは、フローサイトメトリーによって分析され得、任意には蛍光活性化細胞選別装置 (FACS) またはマイクロ流体流選別デバイスを用いて選別され得る。標的および生成物の異なる蛍光特性は、蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) に起因する可能性がある。

【0063】

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

20

【0064】

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

【発明を実施するための最良の形態】

【0065】

定義

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

30

【0066】

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

【0067】

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

40

【0068】

「マイクロカプセル」という用語は、本明細書では、当該技術分野において通常割当てられ以下で詳述される意味に従って使用されている。しかしながら基本的には、マイクロカプセルというのは、所望の活性を有する分子の同定を可能にする、本明細書で記述されている分子機序のコンポーネントの交換を制限する画定境界線をもつ人工的区画である。画定境界線は好ましくは、該マイクロカプセルの中味を完全に封じ込めている。好ましくは、本発明の方法において使用されるマイクロカプセルは、極めて大量に生産され、かくして化合物ライブラリを区画化する能力をもつことになる。任意には、化合物はマイクロビーズに付着され得る。本明細書で用いられるマイクロカプセルは、本発明の方法の高速処理能力を容易にするべく、カプセル上で行われる混合および選別を可能にする。本発明

50

に従ったマイクロカプセルは、異なる流体の中の1つの流体の液滴であり得、ここで閉込められたコンポーネントは液滴内で可溶であるが担体流体中では可溶でなく、もう1つの実施形態においては、膜（例えば脂質小胞およびリポソームに関連する場合）または非イオン界面活性剤小胞といったような壁を構成するもう1つの材料または、剛性の非透過性膜または半透過性膜を伴うものが存在する。固体表面、マルチウェル平板およびマイクロ流体システム内の「プラグ」上の液滴すなわち本明細書で定義されている通りの第2の流体によって完全に取り囲まれていない流体液滴のアレイは、本明細書で定義づけされる通りのマイクロカプセルではない。

【0069】

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

【0070】

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

【0071】

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

【0072】

化合物の「レパートリ」というのは、化合物ライブラリとも呼ぶことのできるさまざまな化合物の一群である。化合物レパートリは、組合せ化学、化合物進化を含めた当該技術分野において既知のあらゆる手段、例えば2003年3月31日付けの我々の同時係属国際特許出願第PCTGB04/001352号の方法によって生成可能であり、そうでなければ、シグマ・アルドリッチ（Sigma Aldrich）、ディスカバリー・パートナーズ・インターナショナル（Discovery Partners International）、メイブリッジ（Maybridge）およびトリポス（Tripos）といった市販の供給源から購入可能である。1レパートリには有利には、構造的または機能的に関係あるまたは無関係の少なくとも 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 個以上の異なる化合物を含む。

【0073】

レパートリの「サブセット」というのは、単一の化合物または関係あるまたは無関係の構造をもつ化合物の一群であり得る、このレパートリの一部分である。有利には、サブセ

10

20

30

40

50

ットは単一の化合物である。好ましくは、各化合物の多重コピーが1マイクロカプセルの中にカプセル化される。マイクロビーズに付着され得る該レパートリのサブセットは、有利には各化合物の多重コピーで付着されており、例えば、各マイクロビーズがそれに付着されている化合物を1つしか有していない場合、その化合物の多数の分子が前記マイクロビーズに付着される。マイクロビーズに付着された化合物の量は、そのマイクロカプセル内の該化合物の濃度を決定する。

【0074】

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

10

【0075】

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

20

【0076】

本明細書で言及されている「所望の活性」というのは、本明細書で検定される通り1つ以上の化合物によって直接的または間接的に変調可能である、標的の任意の活性または該標的により影響される分子の活性の変調である。標的の活性は、結合活性、酵素活性、第3の酵素またはその他の分子に対する活性化または阻害活性、疾病をひき起こすまたは代謝またはその他の機能に影響を及ぼす能力などを含めた、任意の測定可能な生物学的または化学的活性であり得る。本明細書で言及されている活性化および阻害というのは、所望の活性の1.5、2、3、4、5、10、100倍以上の増加または減少を意味する。変調が不活性化である場合、不活性化は實質的に完全な不活性化であり得る。所望の活性はさらに、純粹に、結合された標的の活性の変調が關与してもしなくてもよい1つの結合活性でもあり得る。

30

【0077】

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

40

【0078】

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

50

【0079】

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

【0080】

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

【0081】

本明細書で用いられる「マイクロ流体制御」というのは、本発明の方法を実施するためにマイクロカプセル（または「液滴」）の形成および/または運動を誘導するかまたはその他の形で制御するための、本明細書で定義されているようなマイクロ流体チャンネルを含むマイクロ流体システムの使用を意味する。例えば、マイクロカプセル形成の「マイクロ流体チャンネル」は、第2の流体の中で流体の「液滴」を形成しかくしてマイクロカプセルを作り出すための、マイクロ流体デバイスを用いたマイクロカプセルの創出を意味する。マイクロ流体制御下で選別されるマイクロカプセルは、本明細書で記述されている通り、選別手順に付随する機能のうちの1つ以上のもを実施するべくマイクロ流体デバイスを使用して選別される。従って「流体種のマイクロ流体制御」というのは、本発明の方法を実施する目的での、定義されている通りのマイクロ流体システム内の流体の取扱いを意味する。

【0082】

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

【0083】

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

【0084】

チャンネルの「断面寸法」は、流体流の方向に対し垂直に測定される。本発明のコンポーネント内の大部分の流体チャンネルは2mm未満、一部のケースでは、1mm未満の最大断面寸法を有する。1組の実施形態においては、本発明の実施形態を含む全ての流体チャンネルは、マイクロ流体チャンネルであるかまたは2mmまたは1mm以下の最大断面

10

20

30

40

50

寸法を有する。もう1つの実施形態においては、流体チャンネルは、一部分、単一のコンポーネント（例えばエッチングされた基板または成形ユニット）で形成されていてよい。当然のことながら、流体をバルクで貯蔵し、本発明のコンポーネントに流体を送達するためには、より大きなチャンネル、管、チャンバ、タンクなどを使用することができる。1組の実施形態においては、本発明の実施形態を含むチャンネルの最大断面寸法は500マイクロメートル未満、200マイクロメートル未満、100マイクロメートル未満、50マイクロメートル未満または25マイクロメートル未満である。

【0085】

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

【0086】

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

【0087】

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

【0088】

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

【0089】

液滴集団の「平均直径」は液滴の直径の算術平均である。当業者であれば、例えばレーザー光散乱またはその他の既知の技術を用いて液滴集団の平均直径を判定することができ

10

20

30

40

50

るだろう。非球形液滴内の液滴の直径は、表面全体を横断して積分された該液滴の数学的に定義された平均直径である。限定的意味のない例として、液滴の平均直径は、約1 mm未満、約500マイクロメートル未満、約200マイクロメートル未満、約100マイクロメートル未満、約75マイクロメートル未満、約50マイクロメートル未満、約25マイクロメートル未満、約10マイクロメートル未満、または約5マイクロメートル未満であり得る。液滴の平均直径は同様に、一部のケースでは、少なくとも約1マイクロメートル、少なくとも約2マイクロメートル、少なくとも約3マイクロメートル、少なくとも約5マイクロメートル、少なくとも約10マイクロメートル、少なくとも約15マイクロメートル、または一部のケースにおいて少なくとも約20マイクロメートルでもあり得る。

【0090】

本明細書で使用する「流体」にはその通常の意味すなわち液体または気体という意味が付与される。好ましくは、流体は液体である。流体は、流動を可能にする任意の適切な粘度を有し得る。2つ以上の流体が存在する場合、各々の流体は、流体間の関係を考慮することにより当業者によって基本的にあらゆる流体（液体、気体など）の中から独立して選択され得る。流体は各々混和性または非混和性であり得る。例えば2つの流体は、流体流の形成の時間枠内または反応または相互作用の時間枠内で非混和性であるように選択可能である。これらの部分が有意な時限中液体にとどまる場合には、流体は有意に非混和性であるべきである。接触および/または形成の後、分散された部分が重合などによって急速に硬化される場合、流体はさほど非混和性である必要はない。当業者であれば、本発明の技術を実施するべく、接触角測定などを用いて、適切な混和性または不混和性流体を選択することができる。

【0091】

本明細書で使用されるように、第2のエンティティ(entity)のみを通して第1のエンティティの周りに閉ループを描くことができる場合、該第1のエンティティは第2のエンティティによって「取り囲まれて」いる。該第2のエンティティのみを通して進む閉ループが方向の如何に関わらず第1のエンティティの周りに描くことができる場合、第1のエンティティは「完全に取り囲まれている」。一態様では、第1のエンティティは細胞であり得、媒質中に懸濁している細胞が該媒質により取り囲まれている。もう一つの態様においては、第1のエンティティは粒子である。本発明のさらにもう一つの態様においては、エンティティは両方共流体であり得る。例えば、親水性液体が疎水性液体内で懸濁している可能性があり、疎水性液体が親水性液体中で懸濁している可能性もあり、又、気泡が液体中で懸濁しているなどの可能性もある。標準的には、疎水性液体および親水性液体は、互いに対し実質的に非混和性であり、ここで親水性液体は、疎水性液体よりも大きい水に対する親和性を有する。親水性液体の例としては、水および水を含むその他の水溶液、例えば細胞または生物学的媒質、エタノール、塩溶液などが含まれるが、これらに制限されるわけではない。疎水性液体の例には、油、例えば炭化水素、シリコン油、フッ化炭素油、有機溶媒などが含まれるが、これらに制限されるわけではない。

【0092】

本明細書で使用される「判定(決定)する」という用語は、例えば定量的または定性的な、1つの種の分析または測定、または該種の存在および不在の検出を一般に意味する。「判定(決定)する」という用語は同様に、例えば定量的または定性的な、または該相互作用の存在または不在を検出することによる、2つ以上の種の間での相互作用の分析または測定をも意味する。技術例としては、分光法、例えば赤外光、吸光、蛍光、可視紫外光、FTIR(「フーリエ変換赤外分光」)、またはラマン;重量分析法;偏光解析法;圧電測定法;免疫学的検定法;電気化学測定法;光学測定、例えば光学密度測定法;円二色法;光散乱測定法、例えば、準電気(quasi electric)光散乱;偏光分析法;屈折計法;または濁度測定法が含まれるがこれらに制限されるわけではない。

【0093】

一般的技術

別段の定義のないかぎり、本明細書で使用されている全ての技術的および科学的用語は

10

20

30

40

50

、（例えば細胞培養、分子遺伝学、核酸化学、ハイブリダイゼーション技術および生化学などにおいて）当業者により一般に理解されるものと同じ意味を有する。分子、遺伝子および生化学的方法（一般に、本明細書に参照により援用されているサンプルック（Sambrook）ら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第2版（1989年）、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.およびアウスベル（Ausubel）ら、Short Protocols in Molecular Biology（1999年）第4版、John Wiley & Sons、Inc.を参照のこと）および化学的方法については、標準的方法が使用される。さらに、標準的な免疫学的技術のためには、ハーロウ（Harlow）およびレーン（Lane）、A Laboratory Manual Cold Spring Harbor、N.Yが参照される。

10

【0094】

(A) 一般的な説明

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

【0095】

まず第1に、化合物および標的がマイクロカプセル間で拡散しないようにするためには、各々のマイクロカプセルの中味を周囲のマイクロカプセルの中味から隔離し、かくして、実験のタイムスケール全体にわたりマイクロカプセル間で化合物および標的の交換が全くまたはほとんど無いようにしなければならない。しかしながら、望まれる場合試薬がマイクロカプセルの中および/または外へ拡散できるように、マイクロカプセルの透過性を調整することができる。

20

【0096】

第2に、本発明の方法は、マイクロカプセルあたり制限された数の異なる化合物しか存在しないことを必要とする。化合物がビーズに付着させられる場合、本発明の方法は、マイクロカプセル1つあたり制限された数のビーズしか存在しないことを必要とする。

【0097】

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

30

【0098】

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

【0099】

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

【0100】

さまざまなその他の方法により生成されるマイクロカプセル内で、酵素を触媒とした生化学的方法も実証されてきた。数多くの酵素が逆ミセル溶液中（ブラウ（Bru）およびヴァルデ（Walde）、1991年；ブラウおよびヴァルデ、1993年；クレイ（Creagh）ら、1993年；ハーバー（Haber）ら、1993年；クマール（Kumar）ら、1989年；ルイジ（Luisi）およびビー（B）、1987年；マオ（Mao）およびヴァルデ、1991年；マオら、1992年；ペレス（Perez）ら、1992年；ヴァルデら、1994年；ヴァルデら、1993年；ヴァルデら、1988年）、例えばAOT-イソオクタン-水システム（メンゲル（Menger）および山田、1979年）中で活性である。

40

【0101】

50

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

10

【0102】

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

【0103】

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

【0104】

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

20

【0105】

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

30

40

【0106】

フッ化炭素（またはペルフルオロカーボン）連続相を伴うエマルジョン（クラフト（Krafft）ら、2003年；リース（Ries）ら、2002年）が特に有利である。例えば、界面活性剤としてF - アルキルジモルホリノホスファートを用いて、安定した臭化ペルフルオロオクチル中水型およびペルフルオロオクチルエタン中水型エマルジョンを形成させることができる（サトラー（Sadler）ら、1996年）。非フッ素化

50

化合物は基本的に、フッ化炭素およびペルフルオロカーボン中で不溶性であり（カラン（Curran）、1998年；ヒルデブランド（Hildebrand）およびコクラン（Cochran）、1949年；ハッドリキー（Hudlicky）、1992年；スコット（Scott）、1948年；スチューダー（Studer）ら、1997年）、小さい薬物様の分子（標準的に、 $< 500 \text{ Da}$ および $\text{Log P} < 5$ ）（リピンスキー（Lipinski）ら、2001年）が、マイクロカプセル間の交換がほとんどまたは全く無い状態で、フッ化炭素中水およびペルフルオロカーボン中水エマルジョンの水性マイクロカプセルにきわめて有効に区画化される。

【0107】

エマルジョンを作り出すには、相を合わせて強制するために機械的エネルギーを加えることが一般に必要とされる。攪拌器（例えば磁気攪拌棒、プロペラおよびタービン攪拌器、パドルデバイスおよびホイスク）、ホモジナイザ（ロータ・スタータ・ホモジナイザ、高圧バルブ式ホモジナイザおよびジェットホモジナイザを含む）、コロイドミル、超音波および「膜乳化（membrane emulsification）」デバイス（ベッヒャー、1957；ディキンソン（Dickinson）、1994年）、およびマイクロ流体デバイス（アンバンハウアーら、2000年）を含めて、これを行なうさまざまな機械的デバイスを利用したさまざまな方法が存在する。

10

【0108】

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

20

【0109】

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

30

【0110】

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

【0111】

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

40

【0112】

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

【0113】

マイクロ流体技術を用いて、高い単分散性のマイクロカプセルを生産することができる

50

。例えば、油の同時フロー蒸気内の液滴中断により、3%未満の多分散性をもつ油中水型エマルジョンを生成することができる（アンバンハウアーら、2000年）。マイクロ流体システムは同様に、マイクロ流体チャンネル内の油流の中に分散した微水滴の層流のためにも使用可能である（トールセンら、2001年）。こうして、マイクロ液滴のフロー分析そして任意にはフロー選別のためのマイクロ流体デバイスが構築できる（フーら、2002年）。

【0114】

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

【0115】

1組の実施形態においては、流体を液体内部で個々の液滴へと分離させ得る、液体によって取り囲まれた流体の上に電荷を作り出すことができる。一部の実施形態においては、流体および液体は、例えば液体との関係における流体の運動を制限することにより、例えばマイクロ流体チャンネルといった1本のチャンネルの中、または流体に対する（「AC」つまり交流、「DC」つまり直流などであり得る）電場の印加を容易にするその他の狭窄された空間の中に、存在し得る。かくして、流体は、液体内で一連の個々の荷電されたかつ/または電気的に誘発可能な液滴として存在し得る。一実施形態においては、流体液滴に対し加えられる電気力は、該液滴が液体内を移動するのに十分なほど大きいものであり得る。一部のケースでは、流体液滴に加えられる電気力は、例えばチャンネルまたはマイクロ流体チャンネル（例えば以下で詳述するようなもの）などに対してまたはそれらの内部で、液体内部の液滴の所望の運動を導くために使用され得る。一例としては、図3Aの器具5内では、流体供給源10により作り出された液滴15は、電場発生器20により作り出された電場を用いて荷電され得る。

【0116】

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

【0117】

一部の実施形態においては、流体上（例えば一連の流体液滴上）に作り出される電荷は少なくとも約 10^{-22} C/立方マイクロメートルであり得る。一部のケースでは、該電荷は少なくとも約 10^{-21} C/立方マイクロメートルであり得、かつその他のケースでは、該電荷は少なくとも約 10^{-20} C/立方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-19} C/立方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-18} C/立方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-17} C/立方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-16} C/立方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-15} C/立方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-14} C/立方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-13} C/立方マイクロメートル、少な

10

20

30

40

50

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

10

【0118】

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

20

【0119】

適切な電場（AC、DCなどであり得る）を生成するための技術は、当業者にとっては既知である。例えば、一実施形態においては、流体システム（例えばチャンネルまたはマイクロ流体チャンネルを構成する基質）上に位置づけされているかまたはその内部に埋込まれているかつ/または電場の少なくとも一部分が流体と相互作用するように流体に近接して位置づけされている可能性のある対の電極を横断して電圧を印加することにより、電場が生成される。該電極は、銀、金、銅、炭素、白金、銅、タンゲステン、錫、カドミウム、ニッケル、インジウム錫酸化物（「ITO」）など、ならびにそれらの組合せを含む（ただしこれらに制限されるわけではない）、当業者にとって既知の任意の1つ以上の電極材料から作ることができる。一部のケースでは、透明または実質的に透明の電極を用いることができる。ある実施形態においては、少なくとも約 0.01 V / マイクロメートル、かつ一部のケースでは、少なくとも約 0.03 V / マイクロメートル、少なくとも約 0.05 V / マイクロメートル、少なくとも約 0.08 V / マイクロメートル、少なくとも約 0.1 V / マイクロメートル、少なくとも約 0.3 V / マイクロメートル、少なくとも約 0.5 V / マイクロメートル、少なくとも約 0.7 V / マイクロメートル、少なくとも約 1 V / マイクロメートル、少なくとも約 1.2 V / マイクロメートル、少なくとも約 1.4 V / マイクロメートル、少なくとも約 1.6 V / マイクロメートル、または少なくとも約 2 V / マイクロメートルという流体に印加可能な電場を作り出すように、電場発生器を構築し配置する（例えば位置づけする）ことができる。一部の実施形態においては、例えば少なくとも約 2 V / マイクロメートル、少なくとも約 3 V / マイクロメートル、少なくとも約 5 V / マイクロメートル、少なくとも約 7 V / マイクロメートル、または少なくとも約 10 V / マイクロメートル又それ以上といったさらに高い電場強度を使用することができる。

30

40

【0120】

50

一部の実施形態においては、液滴に電気力を経験させるべく流体液滴に対し電場を加えることができる。流体液滴上に及ぼされる電気力は、一部のケースでは、少なくとも約 10^{-16} N / micrometer³ であり得る。あるケースでは、流体液滴上に及ぼされる電気力はさらに大きく、例えば少なくとも約 10^{-15} N / 立方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-14} N / 立方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-13} N / 立方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-12} N / 立方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-11} N / 立方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-10} N / 立方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-9} N / 立方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-8} N / 立方マイクロメートル、または少なくとも約 10^{-7} N / 立方マイクロメートル又それ以上であり得る。その他の実施形態においては、流体の表面積との関係における流体液滴上に及ぼされる電気力は、少なくとも約 10^{-15} N / 平方マイクロメートル、および一部のケースでは、少なくとも約 10^{-14} N / 平方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-13} N / 平方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-12} N / 平方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-11} N / 平方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-10} N / 平方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-9} N / 平方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-8} N / 平方マイクロメートル、少なくとも約 10^{-7} N / 平方マイクロメートル、または少なくとも約 10^{-6} N / 平方マイクロメートルまたはそれ以上であり得る。さらにその他の実施形態においては、流体液滴上に及ぼされる電気力は、少なくとも約 10^{-9} N、少なくとも約 10^{-8} N、少なくとも約 10^{-7} N、少なくとも約 10^{-6} N、少なくとも約 10^{-5} N、または一部のケースでは少なくとも約 10^{-4} N 又それ以上であり得る。

10

20

【0121】

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

【0122】

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

30

40

【0123】

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

50

づけられたまたはこのチャンネルに一体化された圧電デバイス 520 が、このときチャンネル 510 を機械的に締め付けるかまたは「圧搾」して、流体 500 を個々の流体液滴 515 へと崩壊させることができる。

【0124】

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

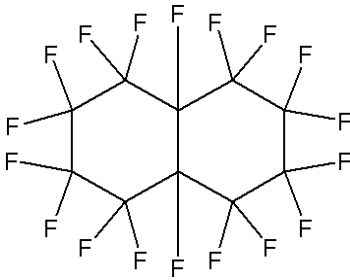
10

【0125】

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

20

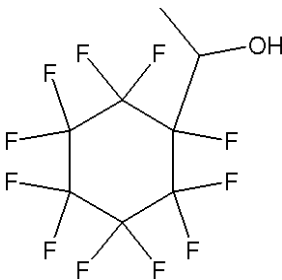
【化 1】



30

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

【化 2】



40

が含まれる。

【0126】

かかるシステムの限定的意味のない例が、図 14B に例示されている。この図では、流体ネットワーク 710 には、液体担体 705 を含むチャンネル、および第 1 の流体 701 および第 2 の流体 702 が含まれている。液体担体 705 は、入口 725 を通って流体ネ

50

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

10

【0127】

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

【0128】

一部の実施形態においては、流体液滴は、各々実質的に同じ形状および/またはサイズであり得る。形状および/またはサイズは、例えば液滴の平均直径またはその他の特徴的寸法を測定することによって判定可能である。本明細書で使用される「判定(決定)する」という用語は、例えば定量的または定性的な、1つの種の分析または測定、および/または該種の存在および不在の検出を一般に意味する。「判定(決定)する」という用語は同様に、例えば定量的または定性的な、または該相互作用の存在または不在を検出することによる、2つ以上の種の間の相互作用の分析または測定をも意味する。限定的意味のない適切な技術例としては、分光学、例えば赤外光、吸光、蛍光、可視紫外光、FTIR(「フーリエ変換赤外分光」)、またはラマン;重量分析法;偏光解析法;圧電測定法;免疫学的検定法;電気化学測定法;光学測定、例えば光学密度測定法;円二色法;光散乱測定法、例えば、準電気光散乱;偏光分析法;屈折計法;または濁度測定法などが含まれる。

20

30

【0129】

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

40

【0130】

あるケースでは、本発明は、基本的に内部の種の実質的に均等な数のエンティティ(すなわち分子、化合物、細胞、粒子など)から成る液滴の生産を提供している。例えば約90%、約93%、約95%、約97%、約98%または約99%以上の複数のまたは一連

50

の液滴が各々、同じ数の特定の種のエンティティを含み得る。例えば、上述した通りの実質的な数の生産された流体液滴は、1エンティティ、2エンティティ、3エンティティ、4エンティティ、5エンティティ、7エンティティ、10エンティティ、15エンティティ、20エンティティ、25エンティティ、30エンティティ、40エンティティ、50エンティティ、60エンティティ、70エンティティ、80エンティティ、90エンティティ、100エンティティなどを含むことができ、ここで該エンティティは分子または高分子、細胞、粒子などである。一部のケースでは、該液滴は各々個々に、一範囲のエンティティ、例えば、20未満のエンティティ、15未満のエンティティ、10未満のエンティティ、7未満のエンティティ、5未満のエンティティ、または一部のケースでは3未満のエンティティを含み得る。1組の実施形態においては、一部は問題の種を含み一部はそれを
10
含んでいない流体液滴を含む液体の中で、流体液滴は、以下で詳述するように（例えば
以上で記述したような蛍光またはその他の技術を用いて）該種を含む流体液滴についてスクリーニングまたは選別され得、一部のケースでは、該液滴は、例えば前述した通り、問題の種の特
20
定の数、または範囲のエンティティを含むような流体液滴についてスクリーニングまたは選別され得る。かくして、一部のケースでは、一部が該種を含み一部がこれを含んでいない複数のまたは一連の流体液滴を、例えば少なくとも約2、少なくとも約3、
少なくとも約5、少なくとも約10、少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約50、
少なくとも約100、少なくとも約125、少なくとも約150、少なくとも約200、
少なくとも約250、少なくとも約500、少なくとも約750、少なくとも約1000、
20
少なくとも約2000、または少なくとも約5000または一部のケースではそれ以上の
30
倍数だけ、該種をまさに含む液滴の比率について富化（または枯渇）させることができる。その他の
ケースでは、該富化（または枯渇）は少なくとも約 10^4 、少なくとも約 10^5 、
少なくとも約 10^6 、少なくとも約 10^7 、少なくとも約 10^8 、少なくとも約 10^9 、
少なくとも約 10^{10} 、少なくとも約 10^{11} 、少なくとも約 10^{12} 、
少なくとも約 10^{13} 、少なくとも約 10^{14} 、少なくとも約 10^{15} 、又それ以上の比率であり得る。例えば、
特定の種を含む流体液滴を、さまざまな種を含む流体液滴ライブラリから選別することができ、
ここでこのライブラリは、例えばDNAライブラリ、RNAライブラリ、タンパク質ライブラリ、
組合せ化学ライブラリなどといったように、約 10^5 、約 10^6 、約 10^7 、約 10^8 、
約 10^9 、約 10^{10} 、約 10^{11} 、約 10^{12} 、約 10^{13} 、約 10^{14} 、約 10^{15} 以上の項目を有し得る。ある実施形態においては、
30
該種を担持する液滴は次に、以下で詳述するように、例えば1つの反応を開始するかまたは
判定するために融合、反応またはその他の形で使用または加工され得る。

【0131】

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

(a) それらは、各々がほぼ同一の非常に小さい超小型反応器として機能する高単分散性のマイクロカプセル（ $< 1.5\%$ 未満の多分散性）の形成を可能する、b) マイクロカプセルは約1フェムトリットルから約1ナノリットルの範囲の体積を有することが可能である、c) マイクロカプセルの区画化は放物線流に起因する拡散および分散を防止する
40

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

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

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

【0132】

マイクロカプセル（または液滴；これらの用語は本明細書で考慮されている目的では互換性ある形で使用可能である）は、有利にも融合または分割可能である。例えば、微水滴は、
50
マイクロ流体システムを用いて併合および分割可能である（リンクら、2004年；

ソングら、2003年)。マイクロカプセル融合は、試薬の混合を可能にする。例えば、該化合物を含むマイクロカプセルと標的を含むマイクロカプセルの融合が標的と化合物の間の反応を開始させることができる。マイクロカプセル分割は、単一のマイクロカプセルをより小さい2つ以上のマイクロカプセルに分割させることができる。例えば、化合物を含む単一のマイクロカプセルを多数のマイクロカプセルに分割することができ、これらを次に異なる標的を含む異なるマイクロカプセルと各々融合させることができる。標的を含む単一のマイクロカプセルも同様に多数のマイクロカプセルに分割でき、これらをその後、1つの異なる化合物または異なる濃度の複数の化合物を含む異なるマイクロカプセルと融合させることができる。

【0133】

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

【0134】

1組の実施形態に従うと、印加された電場を用いて、1つの流体液滴を分割することが可能である。電場は、AC場、DC場などであり得る。この実施形態における流体液滴は、周囲の液体よりも高い導電率を有してよく、一部のケースでは、流体液滴は中性に荷電され得る。一部の実施形態においては、もとの流体液滴から生産された液滴はほぼ等しい形状および/またはサイズを有する。ある実施形態においては、印加された電場の中で、電荷を促して流体液滴の内部から分配対象表面まで移動させ、かくして、液滴の内部に見られる電場を相殺することが可能である。一部の実施形態においては、流体液滴の表面上の電荷は、印加された電場に起因する力を経験することもでき、こうして相対する極性をもち電荷を反対方向に移動させることになる。電荷の移動は、一部のケースにおいて、滴が2つの分離した流体液滴へと引き離されるようにする。流体液滴に対し印加される電場は、例えば反応、電場発生器などの上述の技術を用いて作り出すことができる。

【0135】

いかなる電場も印加されない図1A中の限定的意味のない例として、チャンネル230内に含まれた流体液滴215は、チャンネル250および255へと通じる交差部240に向かって流れる周囲の液体によって担持されている。この例では、周囲の液体は、等しい流速でチャンネル250および255を通過して流れる。かくして交差部240では、流体液滴215は好ましい配向性または方向をもたず、該周囲液体流に起因して等しい確率で出口チャンネル250および255内へと移行する。これとは対照的に、図1Bでは、周囲液体流が1.4V/マイクロメートルの印加電場の影響下で図1Aと同じ要領で流れる一方で、流体液滴215は交差部240で2つの液滴へと分割されて、新しい液滴216および217を形成する。液滴216はチャンネル250内を左へと移動し、一方液滴217はチャンネル255内を右へと移動する。

【0136】

このプロセスの概略図は図5に見られ、ここでは、チャンネル540中の液体535により取り囲まれている中性流体液滴530が、電極526および527により作り出された印加電場525に付されている。電極526はチャンネル542近くに位置づけられ、一方電極527はチャンネル544の近くに位置づけられている。電場525の影響下で、電荷分離が流体液滴530内部で誘発される、すなわち該液滴の片端で正の電荷が誘発

10

20

30

40

50

される一方で該液滴のもう一方の端部では負の電荷が誘発されるようになっている。液滴は次に、負の荷電された液滴545と正の荷電された液滴546へと分割され得、これらはその後それぞれチャンネル542および544内を走行することができる。一部のケースでは、結果として得られた荷電液滴上の電荷の一方または両方を、前述の通りに中和することも可能である。

【0137】

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

10

【0138】

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

20

【0139】

一実施形態においては、2つの流体液滴には、相対する電荷（すなわち正および負の電荷、絶対値が同じとは限らない）が与えられてよく、こうして2つの液滴の電氣的相互作用は増大させられ、かくして例えば本明細書に記述されている技術を用いて液滴の相対する電荷に起因して液滴の融合または合体が発生し得るようにすることができる。例えば、液滴に電場を印加することができる、液滴をコンデンサに通すことができる、化学反応が液滴を荷電状態にさせることができる等々である。一例としては、図13Aに概略的に示されているように、マイクロ流体チャンネル653内部に含まれた液体654により担持された未荷電液滴651および652は、互いに接触させられるが、該液滴はそのサイズおよび/または表面張力などのため融合も合体もできない。液滴は、一部のケースでは、液滴の表面張力を低下させるべく界面活性剤が適用された場合でさえ融合できない可能性がある。しかしながら、流体液滴が、（同じ絶対値でありうるものの必ずしもそうとは限らない）反対の電荷で荷電されている場合、液滴は、融合または合体することができるかもしれない。例えば、図13Bでは、正に荷電された液滴655および負に荷電された液滴656が一般的に互いに向かって導かれ、かくして、相対する荷電を受けた液滴の電氣的相互作用が液滴を融合した液滴657へと融合させるようになっている。

30

【0140】

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

40

50

のチャンネルを流れる液滴 6 5 3 を形成する。

【 0 1 4 1 】

さまざまな実施形態において、合体できるようにされた 2 つ以上の液滴は必ずしも「真っ正面から」遭遇する必要がないということを指摘しておくべきである。液滴の少なくとも一部の融合が最初に発生するかぎり、任意の接触角で充分である。一例として、図 1 2 H においては、液滴 7 3 および 7 4 は各々実質的に同じ方向に（例えば異なる速度で）走行しており、遭遇して融合できる。もう 1 つの例として、図 1 2 I においては、液滴 7 3 および 7 4 は一定の角度で遭遇し、融合する。図 1 2 J においては、3 つの流体液滴 7 3、7 4 および 6 8 が遭遇し、融合して液滴 7 9 を生成する。

【 0 1 4 2 】

流体液滴の融合または合体のその他の例は、本明細書に参照により援用されているリンクら、により 2 0 0 4 年 4 月 9 日付けで出願された国際特許出願番号第 P C T / U S 2 0 0 4 / 0 1 0 9 0 3 号パンフレットの中で記述されている。

【 0 1 4 3 】

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

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

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

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

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

【 0 1 4 4 】

マイクロ流体システム内のマイクロカプセルの創出および操作は、以下のことを意味する：

(a) マイクロカプセルの安定流をマイクロチャンネル内に形成し、その相対的位置により同定することができる。

(b) 反応に光シグナル (例えば蛍光変化) が随伴する場合、マイクロ流体ネットワークの空間的に分解された光学的画像が、各マイクロカプセル内の反応の時間分解測定を可能にする。

(c) マイクロカプセルが含む分子の回収およびさらなる分析または操作を可能にするべくマイクロ流体フロー選別装置を用いてマイクロカプセルを分離することができる。

【 0 1 4 5 】

マイクロカプセルのスクリーニング / 選別

さらにもう 1 つの態様においては、本発明は、一部のケースでは液体中の流体液滴を比較的高い速度でスクリーニングまたは選別するためのシステムおよび方法を提供している。例えば、液滴の特性を検知しかつ / または何らかの形で (例えば以下で詳述する通り) 判定することができ、その後該液滴を、例えば選別またはスクリーニングを目的としてデバイスの特定の領域に向かって導くことができる。

【 0 1 4 6 】

一部の実施形態においては、流体液滴の特性を何らかの形で、例えば本明細書に記述されている通りに検知および / または判定することができ (例えば流体液滴の蛍光を判定することができる)、かつこれに応じて、特定の領域 (例えばチャンネル) に、流体液滴を導くべく電場を印加するかまたは流体液滴から除去することができる。一部のケースでは、本発明のあるシステムおよび方法を用いて、高い選別速度を達成することができる。例えば、一部のケースでは少なくとも毎秒約 1 0 液滴を判定し選別することができ、その他

10

20

30

40

50

のケースでは、少なくとも毎秒約20液滴、少なくとも毎秒約30液滴、少なくとも毎秒約100液滴、少なくとも毎秒約200液滴、少なくとも毎秒約300液滴、少なくとも毎秒約500液滴、少なくとも毎秒約750液滴、少なくとも毎秒約1000液滴、少なくとも毎秒約1500液滴、少なくとも毎秒約2000液滴、少なくとも毎秒約3000液滴、少なくとも毎秒約5000液滴、少なくとも毎秒約7500液滴、少なくとも毎秒約10,000液滴、少なくとも毎秒約15,000液滴、少なくとも毎秒約20,000液滴、少なくとも毎秒約30,000液滴、少なくとも毎秒約50,000液滴、少なくとも毎秒約75,000液滴、少なくとも毎秒約100,000液滴、少なくとも毎秒約150,000液滴、少なくとも毎秒約200,000液滴、少なくとも毎秒約300,000液滴、少なくとも毎秒約500,000液滴、少なくとも毎秒約750,000液滴、少なくとも毎秒約1,000,000液滴、少なくとも毎秒約1,500,000液滴、少なくとも毎秒約2,000,000液滴またはそれ以上、或いは少なくとも毎秒約3,000,000液滴またはそれ以上をこのような形で判定および/または選別することができる。

【0147】

1組の実施形態においては、液滴上に電荷を作り出し(例えば前述の通り)、AC場、DC場などであり得る印加電場を用いて液滴を操縦することによって、流体液滴を導くことができる。一例として、図2-4を参照すると、特定の領域に流体液滴を導くために必要とされる通りに、電場を選択的に印加し除去することができる(或いは又例えば図4Aに示されているように、逆電場といった異なる電場を印加してもよい)。一部の実施形態では、流体液滴を含有する液体のフローを実質的に改変させることなく、必要に応じて、電場を選択的に印加し除去することが可能である。例えば液体は、実質的に定常状態ベース(すなわち、流体液滴を含有する液体の平均流速は、定常状態流または時間との関係における液体のフローの予測値の20%未満または15%未満しか逸脱せず、一部のケースでは平均流速は10%未満または5%未満しか逸脱し得ない)、または本発明の流体システムを通した(例えば1本のチャンネルまたはマイクロチャンネルを通した)その他の予め定められたベースでフローでき、該液体内部に含まれた流体液滴は、流体システムを通った液体のフローを実質的に改変することなく例えば電場を用いてさまざまな領域に導かれ得る。特定の例として、図2A、3Aおよび4Aでは、流体液滴15を含有する液体は、流体供給源10からチャンネル30を通過して交差部40まで流れ、チャンネル50および55を通過して退出する。図2Aでは、流体液滴15がチャンネル50および55の両方を通過して導かれ、一方図3Aでは、流体液滴15はチャンネル55のみに導かれ、図4Aでは流体液滴15はチャンネル50のみに導かれる。

【0148】

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

【0149】

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

10

【0150】

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

20

【0151】

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

30

40

【0152】

限定的意味のない例としては、図11Aにおいて、流体液滴600がチャンネル610内で液体605により取り囲まれている。チャンネル610はチャンネル611、612に分かれる。チャンネル611および612と流体連絡状態に位置づけされているのは、例えば圧電コンポーネント615および616、ピストン(図示せず)などにより膨張および/または収縮され得る液体タンク617および618である。図11Bにおいては、液体タンク617は、膨張され、一方液体タンク618は収縮されている。タンクの膨張

50

／収縮の効果は、矢印 6 0 3 により表わされているように、チャンネル 6 1 1 に向かっての液体の正味フローをひき起こすことにある。かくして流体液滴 6 0 0 は、チャンネル間の接合部に達した時点で、液体 6 0 5 の運動によりチャンネル 6 1 1 に導かれる。逆の状況は図 1 1 C に示されており、ここでは液体タンク 6 1 7 が収縮され、一方液体タンク 6 1 8 は膨張されている。(矢印 6 0 3 により表わされている)チャンネル 6 1 2 に向かつての液体の正味フローが発生し、流体液滴 6 0 0 をチャンネル 6 1 2 内に移動させる。ただし、チャンネル 6 1 1 または 6 1 2 内に流体液滴 6 0 0 を導くためにタンク 6 1 7 および 6 1 8 の両方を活動化させる必要はない、という点を指摘しておくべきである。例えば、一実施形態においては、(タンク 6 1 8 のいかなる改変もなく)液体タンク 6 1 7 の膨張により、流体液滴 6 0 0 をチャンネル 6 1 1 に導くことができ、一方、もう一つの実施形態では、(タンク 6 1 7 のいかなる改変もなく)液体タンク 6 1 8 の収縮によりチャンネル 6 1 1 に流体液滴 6 0 0 を導くことができる。一部のケースでは、2 つ以上の液体タンクを使用することができる。

10

【 0 1 5 3 】

一部の実施形態においては、流体液滴を 2 本以上のチャンネル内に選別することができる。液滴の送達のために流体システム内部に多数の領域をもつ本発明の実施形態の限定的意味のない例が、図 6 A および 6 B に示されている。その他の配置が、図 1 0 A - 1 0 D に示されている。図 6 A においては、それぞれに電極 3 2 1 / 3 2 2、3 2 3 / 3 2 4 および 3 2 5 / 3 2 6 を用いて交差部 3 4 0、3 4 1 および 3 4 2 において液滴の運動を制御するべく電場を印加することにより、出口チャンネル 3 5 0、3 5 2、3 5 4 または 3 5 6 のいずれか 1 本に対し、望まれる通り、チャンネル 3 3 0 内に荷電液滴 3 1 5 を導くことができる。図 6 A では、上述のものと類似の原理を用いて、印加電場 3 0 0 および 3 0 1 を用いてチャンネル 3 5 4 に液滴 3 1 5 が導かれる。類似の要領で、図 6 B では、それぞれに電極 4 2 1 / 4 2 2、4 2 3 / 4 2 4、4 2 5 / 4 2 6 および 4 2 7 / 4 2 8 を用いて交差部 4 4 0、4 4 1、4 4 2 および 4 4 3 において液滴の運動を制御するべく電場を印加することにより、チャンネル 4 3 0 内の荷電液滴 4 1 5 を出口チャンネル 4 5 0、4 5 2、4 5 4 または 4 5 6 のいずれか 1 本に導くことができる。この図では、液滴 4 1 5 はチャンネル 4 5 4 に導かれ、当然のことながら、望まれる場合、荷電液滴を任意のその他の出口チャンネルに導くことができる。

20

【 0 1 5 4 】

もう一つの例においては、器具 5 において、図 2 A に概略的に例示されるように、流体供給源 1 0 により作り出された流体液滴 1 5 は、2 つの電極 2 2、2 4 を含む電場発生器 2 0 を用いて作り出された印加電場に起因して、正に荷電されている。流体液滴 1 5 は、液滴を含む液体によりチャンネル 3 0 を通して導かれ、交差部 4 0 に向かって導かれる。交差部 4 0 では、流体液滴は好ましい配向性または方向をもたず、同等の確率で出口チャンネル 5 0 および 5 5 内へと移動する(この実施形態では、液体は、実質的に等しい速度で、両方の出口チャンネル 5 0 および 5 5 を通って排出する)。類似の要領で、電極 1 2 2 および 1 2 4 を含む電場発生器 1 2 0 を用いて作られた印加電場に起因して、流体供給源 1 1 0 により作り出された流体液滴 1 1 5 は負に荷電される。交差部 1 4 0 に向かってチャンネル 1 3 0 を通って走行した後、流体液滴は、好ましい配向性または方向を有しておらず、液体が実質的に等しい速度で出口チャンネル 1 5 0 および 1 5 5 を通って退出するにつれて、同等の確率で出口チャンネル 1 5 0 および 1 5 0 内に移動する。交差部 1 4 0 の代表的な顕微鏡写真が図 2 B に示されている。

30

40

【 0 1 5 5 】

図 3 A の概略図においては、器具 5 の右に向かう方向で、図 2 A の器具 5 に対し、1 . 4 V / マイクロメートルの電場 1 0 0 が印加されている。チャンネル 3 0 内の正に荷電された流体液滴 1 5 は、交差部 4 0 に到達した時点で、印加電場 1 0 0 に起因してチャンネル 5 5 内を右に導かれ、一方液滴を含む液体は実質的に等しい速度で出口チャンネル 5 0 および 5 5 を通って退出し続ける。類似の要領で、チャンネル 1 3 0 内の負に荷電された流体液滴 1 1 5 は、交差部 1 4 0 に到達した時点で、印加電場 1 0 0 に起因してチャネル

50

ル 1 5 0 内を左に導かれ、一方液体流体は、実質的に等しい速度で出口チャンネル 1 5 0 および 1 5 5 を通って退出し続ける。かくして望まれる通り特定のチャンネル内に流体液滴を導くために電場 1 0 0 を使用することができる。交差部 1 4 0 の代表的顕微鏡写真が図 3 B に示されている。

【 0 1 5 6 】

図 4 A は、同じく 1 . 4 V / マイクロメートルのただし反対方向である (すなわち - 1 . 4 V / マイクロメートル) 印加電場 1 0 0 を伴う、図 2 A の器具 5 の概略図である。この図では、チャンネル 3 0 内の正に荷電された流体液滴 1 5 は、交差部 4 0 に到達した時点で、印加電場 1 0 0 に起因してチャンネル 5 0 内へと左に導かれ、一方、チャンネル 1 3 0 内の負に荷電された流体液滴 1 1 5 は、交差部 1 4 0 に到達した時点で、印加電場 1 0 0 に起因してチャンネル 1 5 5 内へと右に導かれる。液滴を含む液体は、実質的に等しい速度で出口チャンネル 5 0 および 5 5 および 1 5 0 および 1 5 5 を通って退出する。交差部 1 4 0 の代表的顕微鏡写真が図 4 B に示されている。

10

【 0 1 5 7 】

本発明の一部の実施形態においては、例えば特定の利用分野に応じて、2 つ以上の別々の液滴へと選別および / または分割され得る。液滴を分割および / または選別するために、上述の技術のいずれかを用いることができる。限定的意味のない例として、例えばデバイス (またはその一部分) に第 1 の電場を印加 (または除去) することにより、第 1 の領域またはチャンネルに対し流体液滴を導くことができる ; デバイス (またはその一部分) に第 2 の電場を印加 (または除去) することにより、第 2 の領域またはチャンネルに対し液滴を導くことができる ; デバイス (またはその一部分) に第 3 の電場を印加 (または除去) することにより第 3 の領域またはチャンネルに対して液滴を導くことができる。ここで、電場は、何らかの形で、例えば、強度、方向、周波数、持続時間などにおいて異なる可能性がある。一連の液滴において、各々の液滴は独立して選別および / または分割され得る。例えば一部の液滴を一つの場所またはもう一つの場所に導くことができ、一方その他の液滴は、2 つ以上の場所に導かれる多数の液滴へと分割可能である。

20

【 0 1 5 8 】

1 つの特定の例として、図 8 A では、チャンネル 5 6 0 内の流体液滴 5 5 0、周囲の液体 5 5 5 は、チャンネル 5 5 6、チャンネル 5 5 7 に導かれるかまたは、何らかの形でチャンネル 5 6 2 と 5 6 4 の間で分割され得る。図 8 B では、周囲液体 5 5 5 をチャンネル 5 6 2 に向かって導くことにより、流体液滴 5 5 0 はチャンネル 5 6 2 へと左に向かって導かれ得る。図 8 C では、周囲液体 5 5 5 をチャンネル 5 6 4 に向かって導くことにより、流体液滴 5 5 0 はチャンネル 5 6 4 へと右に向かって導かれ得る。図 8 D では、液滴に接合部 5 6 1 を攻撃させて該液滴が 2 つの別々の流体液滴 5 6 5、5 6 6 に分割させ得る電場が、流体液滴 5 5 0 を取り囲む液体 5 5 5 のフローの制御と組合わせて印加され得る。流体液滴 5 6 5 はチャンネル 5 6 2 に導かれ、一方流体液滴 5 6 6 はチャンネル 5 6 6 に導かれる。液滴形成を制御するため、印加電極の高度の制御が達成可能である。かくして例えば、流体液滴 5 6 5 が液滴 5 6 5 および 5 6 6 に分割された後、液滴 5 6 5 および 5 6 6 は実質的に等しいサイズのものであり得、そうでなければ、それぞれ図 8 E および 8 F に示されているように、液滴 5 6 5 および 5 6 6 のいずれかが大きい可能性もある。

30

40

【 0 1 5 9 】

もう一つの例として、図 9 A では、流体液滴 5 3 0 および液体 5 3 5 を担持するチャンネル 5 4 0 は、チャンネル 5 4 2 および 5 4 4 に分かれる。流体液滴 5 3 0 は、荷電されていてもよいし、又非荷電であってもよい。電極 5 2 6 はチャンネル 5 4 2 近くに位置づけられ、一方電極 5 2 7 はチャンネル 5 4 4 の近くに位置づけられている。電極 5 2 8 は、電極 5 4 0、5 4 2 および 5 4 4 の接合部の近くに位置づけられている。流体液滴 5 3 0 が接合部に到達した時点で、それは電場を受けかつ / または、例えば周囲液体をチャンネル内に導くことによりチャンネルまたはその他の領域へと導かれ得る。図 9 B に示されているように、電極 5 2 6 および 5 2 7 を用いて液滴に電場 5 2 5 を印加することにより、流体液滴 5 3 0 は、2 つの別々の液滴 5 6 5 および 5 6 6 に分割可能である。図 9 C で

50

は、電極 5 2 7 および 5 2 8 を用いて液滴に電場 5 2 5 を印加することにより、液滴 5 3 0 内に双極子を誘発することができる。印加された電場の強さに起因して、液滴は右に、チャンネル 5 4 4 内へと強くひきつけられ得る。類似の要領で図 9 D では、電極 5 2 6 および 5 2 8 を用いて液滴に電場 5 2 5 を印加することによって液滴 5 3 0 内に双極子が誘発されて、液滴をチャンネル 5 4 2 内にひきつけさせることができる。液滴 5 3 0 を横断する電場を誘発するのにどの電極を用いるかおよび/または印加電場の強さを制御することにより、チャンネル 5 4 0 内部の 1 つ以上の流体液滴を選別しかつ/または 2 つの液滴へと分割し、かつ各液滴を個別に餞別しかつ/または分割することができる。

【 0 1 6 0 】

例えば、各々化合物ライブラリからの異なる化合物を含む高単分散性のマイクロカプセルと、標的酵素を含む高単分散性のマイクロカプセルを融合させることができる。融合されたマイクロカプセルはマイクロ流体チャンネルに沿って流れ、化合物が標的酵素に結合する時間を与える。各々のマイクロカプセルはその後、蛍光発生酵素基質を含むもう 1 つのマイクロ液滴と融合される。酵素反応速度は、理想的には(異なる時刻に対応する)多数の点で各マイクロ液滴の蛍光を測定することにより判定される。

10

【 0 1 6 1 】

マイクロカプセルは、例えば蛍光色素を取込むことによって光学的にタグ付けされ得る。好ましい構成では、該マイクロカプセルは量子ドットを取込むことによって光学的にタグ付けされる。すなわち、10 個の濃度での 6 色の量子ドットによって 10^6 個のマイクロカプセルのコード化が可能になる(ハン(Han)ら、2001年)。マイクロ流体チャンネルを整然とした順序で流れるマイクロカプセルを、マイクロカプセルの流れの中でそのシーケンスにより(全体的または部分的に)コード化することができる(位置的コード化)。

20

【 0 1 6 2 】

当業者によりマイクロスフェア、ラテックス粒子、ビーズまたはミニビーズとしても知られているマイクロビーズは、20 nm ~ 1 mm の直径で入手可能であり、シリカを含めたさまざまな材料およびポリスチレン(PS)、ポリメチルメタクリレート(PMMA)、ポリビニルトルエン(PVT)、スチレン/ブタジエン(S/B)共重合体、およびスチレン/ビニルトルエン(S/VT)共重合体(www.bangslabs.com)を含めたさまざまな重合体、共重合体および三元重合体から作ることができる。これらは、疎水性表面(例えばプレーンポリスチレン)から多種多様な官能的表面基すなわちアルデヒド、脂肪族アミン、アミド、芳香族アミン、カルボン酸、クロロメチル、エポキシ、ヒドラジド、ヒドロキシル、スルホナートおよびトシルにより付与される非常に親水性の高い表面に至るまで、さまざまな表面の化学的性質を伴って入手可能である。官能基は、マイクロビーズの表面に対する化合物の安定したまたは可逆的な付着のための広範囲の共有結合によるカップリング反応を可能にする。

30

【 0 1 6 3 】

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

40

【 0 1 6 4 】

当業者が精通することになるさまざまな手段により共有結合的または非共有結合的に、マイクロビーズに対し化合物を連結させることができる(例えば、(ハーманソン(Hermanson)、1996年)を参照のこと)。有利には、化合物は、開裂可能なリンカーを介して付着される。当業者にとっては、光化学的に開裂され得るリンカーおよび、pH を変えること(例えばイミンおよびアシルヒドラゾン)、酸化還元特性を調整すること(例えばジスルフィド)または外部触媒を使用すること(例えばクロス・メタセシスお

50

よびアミノ基転移)によって制御可能である可逆的共有結合などを含めたさまざまなかかるリンカーがなじみのあるものである(例えば(ゴルドン(Gordon)およびバラシュブ라마ニアン(Balasubramanian)、1999年))を参照のこと)。

【0165】

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

【0166】

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

【0167】

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

【0168】

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

【0169】

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

【0170】

これまで体積1n1のスポットの2次元マイクロアレイを用いて単一の実験でスクリーニングされ得る最大のレパートリは、最高 10^3 である(ハーゲンローザーら、2000年)。本発明を用いると、2.6mmのマイクロカプセル直径で(タウフィークおよびグリフィス、1998年)、3次元分散を形成することにより、20mlのエマルジョン中の1mlの水相を用いて少なくとも 10^{11} のレパートリサイズをスクリーニングすることができる。

【0171】

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

10

20

30

40

50

ったようなさまざまな実験室教本の中で提供されている。

【0172】

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

【0173】

(B) スクリーニング手順

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

【0174】

(i) 結合についてのスクリーニング

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

【0175】

一変形実施形態においては、当業者にとってなじみ深いさまざまな手段により、マイクロビーズに標的を付着させることができる（例えば（ハーマンソン、1996年）を参照のこと）。

【0176】

スクリーニングすべき化合物は、共通の特徴つまり1つのタグを含有する。化合物はマイクロビーズから放出され、該化合物が標的に対する親和性を有する場合、それはその標的に結合することになる。反応の終りで、全てのマイクロカプセルは組合わされ、全てのマイクロビーズは1つの環境内で一緒にプールされる。「タグ」に特異的に結合するかまたは「タグ」と特異的に反応する分子を用いた親和性精製により、所望の結合を示す化合物を担持するマイクロビーズを、選択することができる。

【0177】

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

【0178】

親和性による選別は、結合が発生し得るような条件下での結合対の2つの成員の存在により左右される。この目的で、任意の結合対を使用することができる。本明細書に使用されている結合対という用語は、互いに対し結合する能力をもつ任意の分子対を意味する。本発明において使用可能な結合対の例としては、抗原およびそれと結合する能力をもつ抗体またはそのフラグメント、ビオチン - アビジン / ストレプトアビジン対（サヴェージ（Savage）ら、1994年）、カルシウム依存性結合ポリペプチドとそのリガンド（

10

20

30

40

50

例えばカルモジュリンおよびカルモジュリン結合ペプチド（モンティジアニー（Montigiani）ら、1996年；ストフコ（Stofko）ら、1992年）、結果としてロイシンジッパーを形成するポリペプチド対（トリペット（Triplet）ら、1996年）、ヒスチジン（標準的にはヘキサヒスチジンペプチド）とキレート化された Cu^{2+} 、 Zn^{2+} および Ni^{2+} （例えばNi-NTA；（ホフーリ（Hochuli）ら、1987年）、ジンクフィンガーモチーフを含むもの（クリュグ（Klug）およびシュワブ（Schwabe）、1995年）およびDNAメチルトランスフェラーゼ（アンダーソン、1993年）を含めたRNA結合およびDNA結合タンパク質（クリュグ、1995年）、およびそれらの核酸結合部位、が含まれる。

【0179】

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

【0180】

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

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

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

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

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

【0181】

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

【0182】

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

【0183】

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

【0184】

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

10

20

30

40

50

【0185】

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

10

【0186】

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

【0187】

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

20

【0188】

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

【0189】

(ii) 結合調節についてのスクリーニング

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

30

【0190】

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

40

【0191】

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

【0192】

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

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

50

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

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

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

10

【0193】

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

【0194】

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

20

【0195】

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

【0196】

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

30

【0197】

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

40

【0198】

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

【0199】

(iii) 触媒作用の調節についてのスクリーニング

一変形実施形態においては、本発明は所望の活性を有する化合物がマイクロカプセルの

50

光学特性の変化を誘発し、かくして該化合物そして任意にはその中に含まれているマイクロビーズを同定し任意には選別できるようにする方法を提供している。マイクロカプセルの光学特性は、次のいずれかにより修飾可能である：

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

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

10

【0200】

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

【0201】

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

20

【0202】

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

【0203】

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

30

【0204】

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

40

【0205】

一部のケースでは、基質がマイクロビーズに付着されないことも望ましい可能性がある

50

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

【0206】

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

【0207】

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

(1) 例えば

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

(b) 類似の光学特性を有するものの、基質ではなく生成物のみがマイクロビーズに結合するかまたはこれと反応する、基質および生成物、に起因して、基質-マイクロビーズ複合体の中には見られない特徴的光学特性を有する生成物-マイクロビーズ複合体、かまたは

(2) 生成物(基質)に対し特異的に結合するかまたはそれと特異的に反応しかくしてその同定を可能にするマイクロビーズの光学特性の変化を誘発する試薬を添加すること(マイクロカプセルの破壊およびマイクロビーズのプールの前後に、これらの試薬を添加できる)。試薬は、

(a) 基質および生成物の両方がマイクロビーズに付着している場合、生成物に対し特異的に結合するかまたはそれと特異的に反応するが、基質とはしない(またはその逆)

(b) 生成物のみがマイクロビーズに結合するかまたはこれと反応する場合、任意には基質と生成物の両方に結合する(またはその逆)。

【0208】

この筋書きでは、基質(または複数の基質の1つ)は、マイクロビーズに連結されていない各々のマイクロカプセル内に存在し得るものの、分子「タグ」(例えばビオチン、DIGまたはDNPまたは蛍光基)を有する。調節された酵素が基質を生成物に転換させた場合、該生成物は「タグ」を保持し、次に生成物特異的抗体によりマイクロカプセル内に捕捉される。全ての反応が停止されマイクロカプセルが組合せられた時点で、これらのマイクロビーズは「タグ付け」されることになり、かつ、「タグ」が蛍光基であった場合には、すでに光学特性を変化させているかもしれない。代替的には、「タグ付けされた」マイクロビーズの光学特性の変化は、「タグ」を結合させる蛍光標識されたりガンドを添加

10

20

30

40

50

することによって誘発可能である（例えば、蛍光標識されたアビジン/ストレプトアビジン、蛍光性である抗「タグ」抗体、または第2の蛍光標識された抗体により検出され得る非蛍光性抗「タグ」抗体）。

【0209】

(iv) 化合物特異性/選択性についてのスクリーニング

ある種の標的について特異性および選択性を有するもののその他については有していない化合物は、1つの基質を用いた反応の調節のための正のスクリーンおよびもう1つの基質との反応の調節のための負のスクリーンを実施することにより、特異的に同定可能である。例えば、2つの異なる標的酵素に特異的な2つの基質が、各々異なる蛍光発生部分で標識される。各々の標的酵素は、2つの標的のための化合物の特異性に応じてマイクロカプセルの異なる光学特性を結果としてもたらす異なる蛍光スペクトルをもつ生成物の生成の触媒として作用する。

10

【0210】

(v) 細胞を用いたスクリーニング

現行の薬物発見パラダイムにおいては、有効な組換え型標的がインビトロの高速大量処理スクリーニング(HTS)検定の基礎を成している。しかしながら単離されたタンパク質を、複雑な生体系を代表するものとみなすことはできない。従って、細胞ベースの系は、無傷の生体系の中での化合物活性に対する信頼性を高くすることができる。リード薬物のための広範囲の細胞ベースの検定が当業者にとって既知である。油中水型エマルジョンの微水滴といったようなマイクロカプセルに、細胞を区画化することができる(ガデシー(Ghadesy)、2001年)。標的に対する化合物の効果は、化合物と共にマイクロカプセルに細胞を区画化し、細胞に対する所望の効果をもつ化合物を含むこれらの区画を同定するために適切な細胞ベースの検定を用いることにより、判定可能である。フッ化炭素中水型エマルジョンの使用が特に有用であり得る。フッ化炭素の高いガス溶解能力は、呼吸ガスの交換を支援することができ、又、細胞培養系にとって有益であることが報告されている(ルーヴ(Lowe)、2002年)。

20

【0211】

(vi) フロー分析および選別

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

30

【0212】

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

【0213】

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

40

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

(2) 各々のマイクロカプセルまたはマイクロビーズからの蛍光シグナルは、存在する蛍光分子の数に密に対応する。マイクロカプセルまたはマイクロビーズ1個あたり数百個

50

の蛍光分子という少量の分子を定量的に検出することができる。

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

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

【0214】

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

【0215】

(vii) マイクロカプセルの同定および選別

本発明は、利用中の選別技術によりそれが可能となっている場合には、無傷のマイクロカプセルの同定そして任意にはその選別を提供する。所望の化合物によって誘発された変化がマイクロカプセルの表面で発生するかまたは現われるかまたはマイクロカプセルの外側から検出可能である場合、マイクロカプセルを同定し、任意にそのように選別することができる。変化は、化合物の直接的作用によって引き起こされてもよいし、または、所望の活性をもつ化合物がそのうちの1つに関与している一連の反応がその変化を導く間接的作用によって引き起こされてもよい。例えば、マイクロカプセルが膜形成性マイクロカプセルである場合、そのマイクロカプセルは、標的を含む生化学系のコンポーネントがその表面で表示され、かくしてマイクロカプセル内部のマイクロビーズ上の化合物によって調節される生化学系の中の変化を検出し得る試薬にアクセス可能であるような形で構成され得る。

【0216】

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

【0217】

本発明の方法は、試薬を迅速に混合させることができ(2 ms 未満で)、従ってマイクロ流体ネットワーク内のマイクロカプセルの空間的に分解された光学画像が、各マイクロカプセル内の反応の時間分解測定を可能にする。マイクロカプセルは任意には、それが含

10

20

30

40

50

む分子の回収およびさらなる分析または操作を可能にするため、マイクロ流体フロー選別装置を用いて分離可能である。有利には、フロー選別装置は電子的フロー選別デバイスであると思われる。かかる選別デバイスは、マイクロ流体デバイス上に直接一体化され得、かつ、マイクロカプセルを選別するために電子手段を使用することができる。同様にマイクロ流体デバイス上に直接組込まれた光学検出を用いてマイクロカプセルをスクリーニングし、選別を始動させることができる。電荷に加えて、マイクロカプセルを制御するその他の手段も同様に、マイクロ流体デバイス上に内蔵することができる。

【0218】

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

【0219】

（C） 化合物ライブラリ

化合物ライブラリをさまざまな商業的供給源から得ることができる。ライブラリ内の化合物は、当業者にとって周知のさまざまな手段により作ることができる。任意には、1ビーズ - 1化合物ライブラリを生成するべく、空間分解された並行合成または分割合成を用いて、組合せ合成により化合物ライブラリを作ることができる。該化合物は任意にはビーズ上で合成可能である。これらのビーズは、マイクロカプセルに直接区画化され得、そうでなければ化合物は区画化の前に放出される。

【0220】

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

【0221】

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

【0222】

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

【0223】

有利には、化合物は、開裂可能なリンカーを介してマイクロビーズに付着される。pHを変えることにより（例えばイミンおよびアシルヒドラゾン）、酸化 - 還元特性を調整することにより（例えばジスルフィド）または外部触媒を使用して（例えばクロス・メタセシスおよびアミノ基転移）制御可能である可逆的共有結合および光化学的に開裂され得る

10

20

30

40

50

リンカーを含め、さまざまなこのようなリンカーが当業者にとってなじみの深いものである（例えばゴルドンおよびパラシュブラマニアン、1999年参照）。

【0224】

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

【0225】

(D) 化合物の同定

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

【0226】

有利には、各化合物は、異なる濃度（標準的にはmMからnMまで変動する濃度）で異なるマイクロカプセル内に存在し、用量 - 応答曲線の生成を可能にする。これは例えば、阻害性化合物の阻害定数（ K_i ）の判定を可能にすると思われる。マイクロカプセル内の化合物の濃度は、例えば上述のとおりマイクロカプセルまたはマイクロビーズの光学的コード化または位置的コード化によつて判定され得る。

【0227】

マイクロ流体チャンネル内を整然とした順序で流れるマイクロカプセルは同様に、マイクロカプセル流内のそれらのシーケンスによつても（全体的にまたは部分的に）コード化され得る（位置的コード化）。

【0228】

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

【0229】

(E) 標的の同定

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

【0230】

(F) マイクロカプセル内の試薬の高速混合

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

【0231】

(G) マイクロカプセル特性の検知

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

10

【0232】

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

20

【0233】

1つ以上のセンサーおよび/またはプロセッサを流体液滴とセンシング通信状態になるよう位置づけることができる。本明細書で使用する「センシング通信」というのは、流体システム内(例えば1本のチャンネル内)の流体液滴および/または該流体液滴を含む流体システムの一部が何らかの形で検知および/または判定され得るように、センサーをどこかに位置づけることができることを意味する。例えば、センサーは、流体液滴および/または流体液滴を含む流体システムの一部と、流動的に、光学的にまたは視覚的、熱的、空気圧的、電子的といった形でセンシング通信状態にあり得る。センサーは、流体システムの近くに位置づけられる、例えばチャンネルの壁の内部に埋込まれるかまたはこの壁に一体化して連結される、または流体システムと物理的、電気的および/または光学的に連絡しながら流体システムから分離して位置づけられ、かくして流体液滴および/または流体液滴を含む流体システム(例えばチャンネルまたはマイクロチャンネル、流体液滴を含む液体)の一部分を検知および/または判定することができるようになってい可能性がある。例えば、センサーは、液滴を含むチャンネルとのいかなる物理的連結も有していなくてよいが、赤外線、紫外線または可視光線といったような液滴または流体システムから生じる電磁放射線を検出するように位置づけられ得る。電磁放射線は、液滴により生成され得、かつ/または流体システムのその他の部分から(または流体システムの外部で)発生し、例えば吸光、反射、回折、屈折、蛍光、リン光、極性変更、位相変化、時間に関する変化などを通して、流体液滴および/または流体液滴を含む流体システムの一部と相互作用することができる。一例として、流体液滴および/または該流体液滴を取り囲む液体に向かってレーザーを導くことができ、該流体液滴および/または周囲の液体の蛍光を判定することができる。本明細書で使用する「センシング通信」は、直接的でも間接的でもあり得る。一例としては、流体液滴からの光をセンサーに導くこともできるし、または最初に光ファイバシステム、導波管などを通して導き、その後センサーへと導くこともできる。

30

40

【0234】

本発明において有用であるセンサーの限定的意味のない例としては、光学または電磁ベースのシステムが含まれる。例えば、センサーは、蛍光センサ(例えばレーザーにより刺

50

激されるもの)、顕微鏡システム(これはカメラまたはその他の記録デバイスを内含し得る)などであり得る。もう1つの例としては、センサーは、電子センサー、例えば電場またはその他の電気的特性を判定できるセンサーであり得る。例えばセンサーは、流体液滴および/または流体液滴を含む流体システムの一部のキャパシタンス、インダクタンスなどを検出することができる。

【0235】

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

10

【0236】

特定の限定的意味のない例としては、本発明のデバイスは、1つ以上の細胞を含有する流体液滴を含み得る。化合物の所望の活性は結果として、例えば緑色蛍光タンパク質(GFP)のための遺伝子といった「マーカー」遺伝子の発現(または発現阻害)をもたらし得る。細胞は、ある条件が存在した場合に結合する蛍光シグナルマーカーに曝露され得、例えば該マーカーは第1の細胞型には結合するが第2の細胞型には結合しない可能性もあるし、発現されたタンパク質に結合する可能性もあり、細胞の生存能力を標示することもでき(すなわち細胞が生きているか死んでいるか)、細胞の発達または分化状態などを標示する可能性もあり、細胞は蛍光シグナルマーカーの有無および/または絶対値に基づいて本発明の流体システムを通して導かれ得る。例えば、蛍光シグナルマーカーの判定は、細胞をデバイスの1領域(例えば収集チャンバ)に導かせることができ、一方蛍光シグナルマーカーの不在は、細胞をデバイスのもう1つの領域(例えば廃棄チャンバ)に導かせる可能性がある。かくしてこの例では、細胞集団は、例えば生きた細胞、あるタンパク質を発現する細胞、ある細胞型などを選択するべく、細胞の1つ以上の判定可能なまたはターゲティング可能な特性に基づいて、スクリーニングおよび/または選別され得る。

20

【0237】

(H) 材料

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

30

40

【0238】

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

50

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

【0239】

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

【0240】

1組の実施形態においては、例えばシリコンエラストマポリジメチルシロキサンといったシリコン重合体が好ましい。PDMS重合体の限定的意味のない例としては、ミシガン州Midlandのダウケミカル（Dow Chemical Co.）により、Sylgardの商標名、特にSylgard 182、Sylgard 184およびSylgard 186として販売されているものが含まれる。PDMSを含めたシリコン重合体は、本発明のマイクロ流体構造の製造を簡略化するいくつかの有益な特性を有する。例えば、かかる材料は廉価であり、容易に入手でき、熱による硬化を介してプレポリマー液体から凝固され得る。例えば、PDMSは、約1時間といった曝露時間、約65～約75の温度にプレポリマー液体を曝露することにより、標準的に硬化可能である。同様に、PDMSといったようなシリコン重合体は、エラストマであり得、かくして本発明のある実施形態において必要である比較的高いアスペクト比をもつ非常に小さいフィーチャを形成するために有用であり得る。この点において、可とう性（例えばエラストマ）モールドまたはマスターが有利であり得る。

【0241】

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

10

20

30

40

50

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

10

【0242】

20

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

【0243】

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

30

【実施例】

【0244】

40

実施例1: インビトロ区画化を用いたスクリーニングのためのマイクロ流体デバイス

マイクロ流体デバイスの概略的表示が、図15に示されている。マイクロチャンネルを、ポリ(ジメチルシロキサン)(PDMS)(マクドナルド(McDonald)およびホワイトサイズ、2002年)での高速プロトタイプ製造を用いて矩形断面を伴って製造し、(ソングおよびイスマギロフ(Ismagilov)、2003年)の通りに疎水性にした。フローを駆動するには、シリンジポンプを使用した(ハーバード・アパレイタス(Harvard Apparatus) PHD、2000)還流ポンプ)。水溶液のためには、27ゲージの取外し可能な針のついた250 μ l入りのハミルトン・ガスタイト(Hamilton Gastight)シリンジ(1700シリーズ、TLL)を、30ゲージのテフロン管類(ウェイコ・ワイヤー・アンド・ケーブル(Weico Wire

50

and Cable))と共に使用する。担体流体のためには、ハミルトン製の1つのハブ付き30ゲージのテフロン針(ソングおよびイスマギロフ、2003年)と共に、1ml入りのハミルトン・ガスタイトシリンジ(1700シリーズ、TLL)を使用する。担体流体は、ペルフルオロデカリン(PFD)中の9%(v/v)の $C_6F_{11}C_2H_4OH$ である(ソングら、2003年)。マイクロ流体デバイスは、一連の相互接続されたモジュールから成る。各モジュールは、特定の機能を有する。これらのモジュールには、液滴を生成する、液滴を融合する、液滴を混合する、液滴を反応させる、液滴を検出するおよび液滴を選別するモジュールが含まれる(図16参照)。1つの実施例においては、異なる分子または異なる濃度の分子から成る液滴が作られる。液滴は最高 10^4 秒^{-1} の速度で作られ、1.5%未満の多分散性および $1 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ の範囲内のサイズで作られる。各々の液滴は第2組の反応物質を含む第2の液滴と融合され、急速に混合されて化学反応を開始する。この化学反応は、各液滴を遅延チャンネルの中で通過させることによって各液滴内で進行できるようになっている。次に各々の液滴は第2の組の反応物質を含むもう1つの液滴と融合され、その後第2の化学反応を開始させるべく急速に混合される。第2の反応が遅延モジュール内で進行した後、反応の結果は、光センサーまたはその他の形態の検出モジュールを用いて判定される。最終的に、所望の液滴は、光学検出モジュールからのシグナルに基づいて2つの集団内に選別され、一方の集団はさらなる処理のために保たれ、もう一方は廃棄される。これらのおよびその他のモジュールを、この組合せまたはその他の組合せで使用することができる。

10

【0245】

20

液滴発生モジュール：我々は、液滴を形成するためにフロー集束幾何形状を使用する。水流が1本のチャンネルから狭い狭窄を通して注入され、対抗伝搬する油流が、水流を流体力学的に集束させ、それが図20Aに示されている通りの狭窄を通過するにつれてそのサイズを削減する。この液滴発生器は、油中の水の均質な液滴の定常流を生成するフロー様式で作動させることができる。水滴のサイズは、油および水の相対的流速により制御され、粘性力が表面張力に打ち克って均質な液滴を作り出す。水の流速が速すぎる場合、オリフィスの中をより長い流体噴流が通過し、さらに下流側で液滴の形に崩壊する。これらの液滴はサイズがさほど均等でない。水の流速が低すぎる場合、オリフィス内の液滴崩壊は再び不規則になり、より広範囲の液滴サイズを生成する。この乳化技術は堅牢であるものの、それは、任意の既定の流速での1つのサイズの液滴の生成に制限され、この液滴サイズは概してチャンネルの寸法により決定される。その上、液滴生産のタイミングを制御することができない。

30

【0246】

我々は、電気的に対処可能な乳化システムを作り出すために電場を内蔵することによりこれらの制限を克服している。これを達成するために、我々は、図20Aに概略的に示されているように、水流に高圧を印加し、油水界面に荷電する。水流は導体として挙動し、一方油は絶縁体である。電気化学反応が、コンデンサのように流体界面に荷電する。スナップオフの時点で、界面上の電荷は、液滴上にとどまる。さらに、油または水の注入速度を変えなく、液滴体積 V_d および周波数 f をほぼ3ケタにわたり調整することができる。液滴サイズおよび周波数は、独立しておらず、むしろそれらの積は分散相の注入速度により決定される $Q_d = f V_d$ 。液滴サイズは、図20、B~Eに示されているように、電場の強さの増大に従って減少する。3つの異なる流速についての印加電圧に対する液滴サイズの依存性は、図20Fにまとめられている。低い印加電圧では、電場は無視できるほどの効果しかなく、液滴の形成は専ら表面張力と粘性流の間の競合によって駆動される。これとは対照的に、高い電場強度では、成長する滴に対する有意な付加的力が存在する、 $F = q E$ (なお式中 q は液滴上の電荷である)。液滴の界面はコンデンサとして挙動することから、 q は印加電圧 V に正比例している。こうして力の V^2 依存性が導かれ、このことが、図20Fに示されている印加電場の増大に伴う液滴サイズの減少を説明している。電場が過度に大きくなった場合、水流の荷電界面は強く荷電された滴によってはじかれる。これにより、生産は不安定になり液滴サイズの変動が増大する。

40

50

【0247】

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

【0248】

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

10

【0249】

静電電荷の使用は、これらの問題点を克服する。各液滴上に反対の正負符号の電荷を置き、電場を印加すると、それらを強制的に合体させることになる。一例として我々は、図21Aに素描されている、異なる組成と反対の電荷をもつ液滴を生成する2つの別々のノズルから成るデバイスを示している。液滴は2つの流れの合流点で統合される。形成時点で液滴に荷電するのに用いられる電極も同様に、液滴を強制して流線を横断させ、合体を導くために、電場を提供する。2本のノズルの構造におけるわずかな変動が結果として、電場の不在下でのその液滴生成の周波数と相にわずかな差異をもたらす。かくして、注入速度が同一でも、液滴のサイズは異なる。その上、液滴は正確に同時に合流点に到着しない。その結果、液滴は、図21Bに示されているように合体しない。これとは対照的に、電場の印加時点で、液滴形成は正確に同期化された状態となり、同一サイズの液滴の対が各々合流点に確実に同時に到達するようにする。その上、液滴は、反対に荷電されており、これらを強制的に流線を横断させ互いに接触させ、かくして、図21Cに示されている通り、これらを合体させる。液滴形成の驚くべき同期化は、電場により媒介されるような液滴の各々の中断をカップリングさせる結果もたらされる。電場の絶対値は2つの液滴の前縁間の離隔距離が変わるにつれて変動し、液滴中断の周波数は、電場にモードロックされる。おそらくは界面活性剤コーティングの安定化効果を理由として、液滴を合体させるためには最小の電荷が必要とされる。このことは、実際に合体する互いに接触した滴の百分率の電圧依存性を示す図21Dから明らかである。

20

30

【0250】

液滴ミキサーモジュール：並進運動と回転の連続的の反復を通して（図22）かまたはフロー方向に平行な方向に沿って滴を合体させることによって（図23）、高速混合が達成される。

【0251】

液滴反応器 / 時間遅延モジュール：反応のための定時間を提供するために使用される。いかにしてこれが達成できるかの2つの限定的意味のない例は「単一ファイル」と「大断面」チャンネルである。「単一ファイル」遅延ラインは、定められた反応時間を達成するために長さをを用いる。これによると例外的に長いチャンネルが結果としてもたらされることが多いことから、担体油と水滴の両方と非混和性である第3の流体のスペーサ液滴を水滴対の間に置くことが望ましい。このとき担体油内の水性和非水性液滴の間に交番が存在する。このことは図24Aに示されている。長い時間的遅延を達成するための第2の可能性は、液滴の平均速度を低くするため「大きな断面積」をもつ広く深いチャンネルを使用することである。この例は図24Bに示されている。

40

【0252】

再荷電モジュール：試薬を組合わせ混合するための反対に荷電された液滴および電場の使用はきわめて堅実なことであり、100%の液滴が反対の流れからのそのパートナーと合体する。しかしながら、これらが合体した後、結果としての液滴はいかなる静電電荷も

50

担持していない。形成中に液滴に荷電するのは便利であるが、さらなる処理のために必要とされる場合、混合した液滴に再荷電するため、いずれかの堅牢な液滴ベースのマイクロ流体システムの中でその他の方法を利用しなければならない。これは、中性液滴を分極する電場の存在下で中性液滴を分割しその結果2つの相対する電荷をもつ娘液滴をもたらすために伸長流を使用することによって容易に達成される。これは、図25Aに素描されている。図25Bの中の顕微鏡写真は、分岐に入り荷電娘液滴へと分割する中性液滴を示す。図25Bの破線領域は、電場内の荷電液滴の非対称素描を示すため、図25Cで拡大されている。垂直破線は、液滴がその対称な球形形状に戻る電極の縁部を表わしている。電場は同様に、液滴分割の精密制御をも可能にし、同一試薬の2つ以上のアリコートへの中味の分割を可能にして同じマイクロ反応器の中味についての多数の検定を容易にする堅牢な液滴分裂モジュールのための基礎を提供している。

10

【0253】

検出モジュール：検出モジュールは、図26に素描されているように、光ファイバ、1つ以上のレーザー、1つ以上の二色性ビームスプリッタ、帯域通過フィルター、および1つ以上の光電子増倍管(PMT)で構成されている。

【0254】

選別モジュール：個々の液滴の中味は、プローブ探査されなくてはならず、選択された液滴は個々の流れに選別されなくてはならない。液滴の静電荷電の使用は、精確に制御され得、高周波数で切替えされ得かつ可動部分を全く必要としない選別用手段を提供する。液滴上の静電荷電は、外部電場への電荷の線形カップリングに基づく滴毎の選別を可能にする。一例としては、担体流体の流れを等分割するT字形接合分岐が同様に、図27Aに示される通り、2つの流れへと液滴集団を無作為に等分割する。しかしながら、分岐点に印加される小さな電場は、どのチャンネルにその液滴が入るかを精確に指図する。電極構成の概略図が図27Bに示されている。電場の方向を変動させることになり、図27Cおよび27Dに示されている通り、選別された液滴の方向が変動する。液滴に付与され得る大きな力、および高い切替え周波数がこれを、可動部分の全く無い高速かつ堅牢な選別エンジンにしている。かくして処理速度は、液滴発生速度によってのみ制限される。

20

【0255】

実施例2

マイクロ流体システム内のマイクロカプセルを用いたタンパク質チロシンホスファターゼ1B(PTP1B)阻害物質についてのスクリーニング

30

PTP1Bは、インシュリンおよびレプチンシグナル形質導入の負の調節因子である。インシュリンおよびレプチンに対する耐性は、2型真性糖尿病および肥満の特質であり、従ってPTP1Bは、糖尿病および肥満療法のための魅力的な薬物標的である(ジョンソン(Johnson)ら、2002年)。実施例1で記述されている通りのマイクロ流体デバイスを使用して、マイクロ流体システムの中でマイクロカプセルを用いていかにPTP1B阻害物質をスクリーニングできるかを記述する。

【0256】

全ての水溶性試薬を、PTP1B活性と相容性ある緩衝液である(25mMのHEPES、pH7.4、125mMのNaCl、1mMのEDTA)の中で溶解させる。50mU/mlの標的酵素(ヒト組換え型PTP1B、残渣1~322;バイオモル・リサーチ・ラボラトリーズ(Biomol Research Laboratories)、Inc)の溶液およびa)ビスジフルオロメチレンホスホナート有し既知のPTP1B阻害物質である100μMの化合物2(図17)(ジョンソンら、2002年)または、b)PTP1B阻害物質でない化合物である100μMのヒドロ桂皮酸(アルドリッチ)のいずれかの溶液を、該デバイスを用いてマイクロカプセルに区画化する。標的酵素を含む各々のマイクロカプセルを、化合物2を含むマイクロカプセルまたはヒドロ桂皮酸を含むマイクロカプセルと融合させる。化合物2またはヒドロ桂皮酸のいずれかを含むマイクロカプセルは、化合物2およびヒドロ桂皮酸の入ったシリンジでの注射間の切換えによって形成させることができる。

40

50

【 0 2 5 7 】

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

10

【 0 2 5 8 】

実施例3. 化合物ライブラリからのPTP1B阻害物質のスクリーニング

96の水性混合物を、(反応を防ぐため)氷上で作る。第1の混合物は、ビス-ジフルオロメチレンホスホナートを有しかつ既知のPTP1B阻害物質(ジョンソンら、2002年)である100μMの化合物2(図17)、および585nm、655nmおよび705nmの発光極大をもつ予め定義された比率のQdot(商標)ストレプトアビジンコンジュゲート(カンタム・ドット・コーポレーション(Quantum Dot Corporation)、Hayward、カリフォルニア州)を、PTP1B活性と相容性ある緩衝液(25mMのHEPES、pH7.4、125mMのNaCl、10%のグリセロール、1mMのEDTA)(ドマン(Doman)ら、2002年)中で含有している。95のその他の水性混合物は上述のものと同ーであるが、各々化合物2の代りにカルボン酸有機ビルディングブロックライブラリ(アルドリッチ)からの95のカルボン酸のうちの一つおよび585nm、655nmおよび705nmの発光極大をもつ異なる比率のQdot(商標)ストレプトアビジンコンジュゲートを含有している。全ての混合物において、705nmQdot(商標)ストレプトアビジンコンジュゲートの濃度は100nMであり、585nmおよび655nmのQdot(商標)ストレプトアビジンコンジュゲートの濃度は、0、11、22、33、44、55、66、77、88または100nMのいずれかである。従って、Qdot(商標)ストレプトアビジンコンジュゲート濃度の100(10×10)個の順列が存在し、これが、各化合物を含有するマイクロカプセルに、705nm、585nmおよび655nmでの蛍光の蛍光比を判定することによって読取られる独特の蛍光サインをもたせることを可能にしている。

20

30

【 0 2 5 9 】

96の混合物を、マイクロタイター平板の96のウェル内に分配させる。平板の各ウェルからのアリコート、を、所望の化合物を含むタンク内に浸漬されるマイクロ流体デバイスに連結された薄い管を用いて実施例1に記述されたマイクロ流体デバイスの中に順次装填し、毛管現象を使用してタンクからマイクロ流体デバイス内に所望の化合物を引き込む。混合物をデバイス内のマイクロカプセルに区画化する。各々のマイクロカプセルを、5mU/mlで標的酵素(ヒト組換え型PTP1B、残渣1-322;バイオモル・リサーチ・ラボラトリーズ、Inc)を含有するもう一つのマイクロカプセルと融合させ、急速に混合する。10分間37で遅延ライン内でインキュベートした後、該マイクロカプセルを、蛍光発生PTP1B基質、6,8-ジフルオロ-4-メチルウンベリフェリルホスファート(DiFMUP)(モレキュラー・プローブ)を含むさらなるマイクロカプセルと融合させ、遅延ライン内で30分間37でインキュベートする。阻害物質は、脱リン酸生成物(DiFMU;励起/発光極大358/452nm;青色蛍光)に変換された非蛍光基質(DiFMUP)の量を削減する。次にマイクロカプセルの蛍光を分析する。主に、化合物2を含有するマイクロカプセルのQdot蛍光サインを伴うものを除いて、PTP1BによるDiFMUPの脱リン酸に起因して、全てのマイクロカプセルが青色蛍光

40

50

を示した。

【0260】

実施例4. マイクロビーズに対する化合物ライブラリの付着

オレンジ色(585 nm)および赤色(>650 nm)の蛍光色素(フルトンら、1997年)を精確な比率で取込んだ結果として、表面上にカルボキシラート官能基を担持する直径5.5 μmのポリスチレンマイクロビーズが光学タグ付けされた形で市販されている(www.luminexcorp.com)。各々独特の光学サイン(www.luminexcorp.com)をもつこのような100個のビーズのセットを余剰のエチレンジアミンおよびEDC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド(ピアース(Pierce)を用いて(ハーマンソン、1996年)の通りに修飾し、表面上に一級アミン基を作り上げる。該光開裂可能リンカー、4-(4-ヒドロキシメチル-2-メトキシ-5-ニトロフェノキシ)ブタン酸(ノババイオケム(NovaBiochem))(ホームズ(Holmes)およびジョーンズ(Jones)、1995年)を次に、上述のとおりEDCを用いてアミド結合を形成することによってビーズに付着させる。カルボン酸有機ビルディングブロックライブラリ(ブロックライブラリ(Block Library)(アルドリッチ)からの100個の異なるカルボン酸を次に、リンカーアルコールと反応させることによりビーズにカップリングさせて、カルボキシラートエステルを形成するが、ここで100個の異なる光学タグ付けされたビーズが異なるカルボン酸にカップリングされており、各ビーズは最高約10⁶個のカルボン酸分子で誘導体化されている。最高5 cmの距離からB100AP354 nmのUV灯(UVP)を用いて氷上で4分間照射した結果、カルボン酸としてビーズから化合物が放出される。

【0261】

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

オレンジ色(585 nm)および赤色(>650 nm)の蛍光色素(フルトンら、1997年)を精確な比率で取込んだ結果として、表面上にカルボキシラート官能基を担持する直径5.5 μmのポリスチレンマイクロビーズが光学タグ付けされた形で市販されている(www.luminexcorp.com)。まず最初に、マイクロビーズ上のカルボキシラート官能基を、実施例6にある通り、エチレンジアミンおよびEDCを用いて一級アミンに転換させる。その後、PTP1Bのためのホスホペプチド基質、ウンデカペプチド(EGFR₉₈₈₋₉₉₈(DADEpYLI PQQG)(チャン(Zhang)ら、1993年)を、EDCを用いて表面アミノ基を介してマイクロビーズの両方のセットにカップリングさせる。このペプチドは、カルボキシラート-O-アリルエステルを用いた側鎖カルボキシラート基上の直交保護を伴うSieberアミド樹脂((9-Fmoc-アミノ-キサンテン-3-イルオキシ-Merrifield樹脂)(ノババイオケム))上の固相合成によって作られる。テトラデカン二酸から成るリンカーをN-末端にカップリングし、1%のTFAを用いてビーズからペプチドを開裂させて、C末端アミドを伴うペプチドを生成する。リンカーを介して該ペプチドをビーズにカップリングし(EDCを用いて)、1ビードあたり最高10⁵個のペプチドを得る。その後残った表面アミノ基を、実施例6にあるように光化学的に開裂可能なリンカー、4-(4-ヒドロキシメチル-2-メトキシ-5-ニトロフェノキシ)ブタン酸を付着させることによって修飾する。その後Pd(Ph₃)₄/CHCl₃/HOAc/N-メチルモルホリンを用いて、ペプチドの側鎖カルボキシラート上の保護基を除去する。最初のマイクロビーズセットを、既知のPTP1B阻害物質である化合物3-(4-ジフルオロホスホノメチルフェニル)プロパン酸(化合物1、図17)、で誘導体化する(ジョンソンら、2002年)。第1のビーズセットとは相異なる光学タグを伴う第2のビーズセットを、PTP1B阻害物質でない化合物であるヒドロ桂皮酸(アルドリッチ)で誘導体化する。各々のケースにおいて、リンカーアルコールと反応させることによって化合物をカップリングして、実施例6にあるように、カルボキシラートエステルを形成させる。各々のマイクロビーズを、最高

10⁶個の分子(フルトンら、1997年)で誘導体化させる。

【0262】

その後、図15に概略的に記されたマイクロ流体システムを用いてマイクロビーズをスクリーニングする。1:1000から1:1(化合物1ビーズ;ヒドロ桂皮酸ビーズ)まで変動する比率で2セットのマイクロビーズを混合し、PTP1B活性と相容性ある緩衝液(25mMのHEPES、pH7.4、125mMのNaCl、10%グリセロール、1mMのEDTA)(ドマンら、2002年)の中で(反応を防ぐため)氷上で、10nMの濃度で標的酵素(ヒト組換え型PTP1B、残渣1-322;バイオモル・リサーチ・ラボラトリーズ、Inc.)と10⁸個の合計マイクロビーズを混合する。次に、実施例1に記述されたマイクロ流体システムを用いてマイクロカプセルを形成することにより、マイクロカプセル内で単一ビーズおよび標的酵素(PTP1B)を同時局在化する。ビーズの濃度は、大部分のマイクロビーズが1つのビーズを含むかまたは全くビーズを含まないようなものである。各マイクロビーズを、5mU/mlで標的酵素(ヒト組換え型PTP1B、残渣1-322;バイオモル・リサーチ・ラボラトリーズ、Inc.)を含有するもう1つのマイクロカプセルと融合させ、高速混合する。該化合物を光化学的に(実施例4にあるように)放出させる。遅延ライン内で37で10分間インキュベートした後、蛍光発生PTP1B基質(6,8-ジフルオロ-4-メチルウンベリフェリルホスファート(DiFMUP)(モレキュラー・プローブス))を含むさらなるマイクロカプセルと該マイクロカプセルを融合させ、遅延ライン内で30分間37でインキュベートする。阻害物質は、生成物(脱リン酸ペプチド)に転換された基質の量を削減する。マイクロカプセルを収集し、4まで冷却し、(グリフィスおよびタウフィーク、2003年)の通りに100μMのパナジウム酸塩へと破壊して反応を停止させる(ハーダー(Harder)ら、1994年)。緑色(530nm)蛍光色素フルオレセインイソチオジアンアート(マウスモノクローナルIgG_{2b}重合体20(サンタ・クルス(Santa Cruz))で標識された抗-基質(抗-ホスホチロシン)抗体を用いてメーカーの指示事項に従って標識した後、FACScan(ベクトン・ディッキンソン(Becton-Dickinson))、FACScalibur(ベクトン・ディッキンソン)またはMofio(サイトメーション)フローサイトメータを用いて3色フローサイトメトリーによりビーズを分析して、阻害の程度およびビーズ上の化合物を同時に判定する。主に、PTP1Bでコーティングされたマイクロビーズ上でのみペプチドの脱リン酸化が見られ、その他のマイクロビーズ上には見られない。

【0263】

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

オレンジ色(585nm)および赤色(>650nm)の蛍光色素(フルトンら、1997年)を精確な比率で取込んだ結果として、各々独特の光学シグニチャーを伴う、表面上にカルボキシラート官能基を担持する直径5.5μmのポリスチレンマイクロビーズ100個のセット(www.luminexcorp.com)を、PTP1Bのためのホスホペプチド基質、ウンデカペプチドEGFR₉₈₈₋₉₉₈(DADEpYLIPQQG)(チャンら、1993年)、および実施例4にあるように各々光化学的に開裂可能なリンカーを介して付着されている100個の異なるカルボン酸を用いて誘導体化する。これらのカルボン酸のうちの1つは、既知のPTP1B阻害物質である化合物(ジョンソンら、2002年)、3-(4-ジフルオロホスホノメチルフェニル)プロパン酸(化合物1、図17)である。その他の99のカルボン酸は、実施例4の通り、カルボン酸有機ビルディングブロックライブラリ(Carboxylic Acid Organic Building Block Library)(アルドリッチ)からのものである。次に、100ビーズセットの各々同数を、実施例5と同様に、混合し、スクリーニングする。主に、PTP1B阻害物質、3-(4-ジフルオロホスホノメチルフェニル)プロパン酸(化合物1、図17)でコーティングされたマイクロビーズ上でのみペプチドの脱リン酸化が見られ、その他の化合物でコーティングされたマイクロビーズ上には見られない。

10

20

30

40

50

【0264】

実施例7. フッ化炭素中水型エマルジョン内の小分子の区画化

基本的に(サトラーら、1996年)の通りに、14 μm のフィルター(オスモニックス(Osmonics))を通した押出し(15回)によってかまたは5mmの分散工具と共にUltra-Turrax T8ホモジナイザー(IKA)を用いた25,000rpmで5分間の均質化によって、95%(v/v)のペルフルオロオクチルプロミド、溶解状態の問題の分子を含む5%(v/v)のリン酸緩衝生理食塩水そして界面活性剤としての2%(w/v)の $\text{C}_8\text{F}_{17}\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{OP}(\text{O})[\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}]_2$ (F8H11DMP)を含有するフッ化炭素中水エマルジョンを形成させた。100 μm から2mMの濃度で水相中に溶解した一連の小さい蛍光分子を含有するエマルジョンを作った。カルセイン、テキサスレッド、フルオレセイン、クマリン102、7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸および7-ジエチルアミノ-4-メチルクマリン(クマリン1)を含むこれらの分子は、SRCのLogKow/KowWinプログラム(メイラン(Meylan)およびハワード(Howard)、1995年)を用いて計算された-0.49~4.09の範囲内のLogP値と203~625Daの分子量を有していた。ボルテックス処理により、異なる色の蛍光色素を含むエマルジョンを混合した。混合型エマルジョンの落射蛍光顕微鏡法により区画化を観察した。混合後24時間、区画間に交換が全くないことを観察した(図19参照)。

10

【0265】

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

基本的に、実施例1に記述されている通りに、多重液滴発生モジュールを用いて、95%(v/v)のペルフルオロオクチルプロミド、溶解状態の問題の分子を含む5%(v/v)のリン酸緩衝生理食塩水そして界面活性剤としての2%(w/v)の $\text{C}_8\text{F}_{17}\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{OP}(\text{O})[\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}]_2$ (F8H11DMP)を含有するフッ化炭素中水エマルジョンを形成させた。各ノズルにおいて水相は、100 μm から2mMの濃度で溶解した異なる小さな蛍光分子を含有していた。カルセイン、テキサスレッド、フルオレセイン、クマリン102、7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸および7-ジエチルアミノ-4-メチルクマリン(クマリン1)を含むこれらの分子は、SRCのLogKow/KowWinプログラム(メイラン(Meylan)およびハワード(Howard)、1995年)を用いて計算された-0.49~4.09の範囲内のLogP値と203~625Daの分子量を有していた。全てのタイプの液滴を含有する単一の流れの中に異なるフルオロファーを有する液滴を担持する流れを組み合わせることにより、異なる色の蛍光色素を含有するエマルジョンを混合した。液滴収集物を担持する流れはこのとき、デバイス上の深いウェル内に出され、ここで液滴は近接して保管され最高24時間にわたり監視可能である。液滴間の交差汚染は全く観察されない。

20

30

【0266】

実施例9. -ガラクトシダーゼ上のPETGの K_i および阻害様式の判定

実施例1に記述されているとおりのマイクロ流体デバイスを用いて、我々は、フェニルエチル-D-チオガラクトピラノシド(PETG)による酵素、大腸菌-ガラクトシダーゼ(LacZ)の阻害様式が競合的であることを実証し、いかにして、PETGの阻害定数(K_i)を得ることができるかを示している。酵素阻害検定においては、触媒作用速度は、LacZについての非蛍光性基質、フルオレセインモノ-D-ガラクトシド(FMG)(FMG)を使用し、蛍光性生成物フルオレセインの外観(励起488nm、発光514nm)を測定することによって決定される。LacZ阻害検定の全てのコンポーネントは、検定緩衝液(10mMの MgCl_2 、50mMの NaCl 、1mMのDTT、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のBSA、10mMのTris-HCl、pH7.9)の中で溶解せられる。

40

【0267】

各々の液滴形成モジュール(図15)へと導いているのは、シリンジポンプから通じる

50

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

【0268】

第1の液滴融合により酵素(LacZ)と阻害物質(PETG)が混合される。組合せられた液滴は、2分間を遅延ラインで経過した後、蛍光発生酵素基質(FMG)を含有する第3の液滴と融合させられる。最終的に、全てのコンポーネントが混合された後、個々の液滴の蛍光を測定することによって、または、第2の長さ10分間の遅延ライン内の多数の箇所において10秒の曝露時間中同じ濃度の各々のコンポーネントと液滴からの蛍光を積分することによって、反応を観察する。異なる位置における各々の蛍光強度値は、異なる反応時間における生成物の量に正比例する。生成物形成速度は、初期反応時間中線形であり、初期速度(v)は、線形フィッティングから判定され得る。FMGおよびPETGの異なる濃度での反復的測定に由来するデータが、ラインウィーバ・パークプロットの形で表現される($1/v$ 対 $1/[S]$; なお式中 $[S]$ = 基質の濃度)。PETGの異なる濃度での同じ y -切片値は、PETG阻害様式が競合的であることを示している。競合的阻害においては、 y -切片により分けられる各勾配は、阻害物質の濃度の一次関数である見かけのミカエリス・メンテン定数を表わしている。見かけのミカエリス・メンテン定数対競合的阻害物質濃度のグラフの中の y -切片は、メカエリス・メンテン定数を与え、その勾配に y -切片を乗じたものの逆数が K_i である。以下の条件(最終融合マイクロカプセル内)、すなわち30 nM LacZ、0 ~ 13 μMのPETGおよび10 ~ 700 μMのFMGを用いると、LacZのFMGの K_M を、以前に発表された値(118 μM: ホアン(Huang)、1991年)の20%以内まで決定することができ、又LacZについてのPETGの K_i を、以前に発表された値(0.98 μM: ホアン、1991年)の範囲内にあるものとして決定できる。

【0269】

参考文献

- Adang, A. E., and Hermkens, P. H. (2001). The contribution of combinatorial chemistry to lead generation: an interim analysis. *Curr Med Chem* 8, 985-998.
- Anderson, J. E. (1993). Restriction endonucleases and modification methylases. *Curr Opin Struct Biol* 3, 24-30.
- Becher, P. (1957) Emulsions: theory and practice. Reinhold, New York.
- Benita, S. (ed.). (1996) Microencapsulation: methods and industrial applications. Marcel Dekker, New York.
- Bernath, K., Hai, M., Mastrobattista, E., Griffiths, A.D., Magdassi, S. and Tawfik, D.S. (2004) In vitro compartmentalization by double emulsions: sorting and gene enrichment by fluorescence activated cell sorting. *Anal Biochem*, 325, 151-157.
- Bru, R. and Walde, P. (1991) Product inhibition of alpha-chymotrypsin in reverse micelles. *Eur J Biochem*, 199, 95-103.
- Bru, R. and Walde, P. (1993) Catalytic activity of elastase in reverse micelles. *Biochem Mol Biol Int*, 31, 685-692.
- Burbaum, J. (1998). Miniaturization technologies in HTS: how fast, how small, how soon? *Drug Discov Today* 3, 313-322.
- Calvert, P. (2001) Inkjet printing for materials and devices. *Chem. Mater.*, 13,

10

20

30

40

50

3299-3305.

Chakrabarti, A.C., Breaker, R.R., Joyce, G.F. and Deamer, D.W. (1994) Production of RNA by a polymerase protein encapsulated within phospholipid vesicles. *J Mol Evol*, 39, 555-559.

Chang, T.M. (1987) Recycling of NAD(P) by multienzyme systems immobilized by microencapsulation in artificial cells. *Methods Enzymol*, 136, 67-82.

Chang, T.M.S. (1992) Recent advances in artificial cells based on microencapsulation. In Donbrow, M. (ed.), *Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 323-339.

Creagh, A.L., Prausnitz, J.M. and Blanch, H.W. (1993) Structural and catalytic properties of enzymes in reverse micelles. *Enzyme Microb Technol*, 15, 383-392. 10

Curran, D.P. (1998) Strategy-level separations in organic synthesis: from planning to practice. *Angew Chem Int Ed*, 37, 1174-1196.

Czarnik, A. W. (1997). Encoding methods for combinatorial chemistry. *Curr Opin Chem Biol* 1, 60-66.

Davis, S. S., and Walker, I. M. (1987). Multiple emulsions as targetable delivery systems. *Methods in Enzymology* 149, 51-64.

de Gans, B.-J., Duineveld, P.C. and Schubert, U.S. (2004) Inkjet printing of polymers: state of the art and future developments. *Advanced materials*, 16, 203-213 20

Dickinson, E. (1994) Emulsions and droplet size control. In Wedlock, D.J. (ed.), *Controlled particle, droplet and bubble formation*. Butterworth-Heinemann, Oxford, pp. 191-257.

Doi, N., and Yanagawa, H. (1999). STABLE: protein-DNA fusion system for screening of combinatorial protein libraries in vitro. *FEBS Lett* 457, 227-230.

Doman, T.N., McGovern, S.L., Witherbee, B.J., Kasten, T.P., Kurumbail, R., Stallings, W.C., Connolly, D.T. and Shoichet, B.K. (2002) Molecular docking and high-throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B. *J Med Chem*, 45, 2213-2221.

Finch, C.A. (1993) Encapsulation and controlled release. *Spec. Publ.-R. Soc. Chem.*, 138, 35. 30

Fornusek & Vetvicka, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1986;2(2):137-74

Fu, A.Y., Chou, H.P., Spence, C., Arnold, F.H. and Quake, S.R. (2002) An integrated microfabricated cell sorter. *Anal Chem*, 74, 2451-2457.

Fulton, R.J., McDade, R.L., Smith, P.L., Kienker, L.J. and Kettman, J.R., Jr. (1997) Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clin Chem*, 43, 1749-1756.

Ghadessy, F.J., Ong, J.L. and Holliger, P. (2001) Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 4552-4557. 40

Gordon, K., and Balasubramanian, S. (1999). Solid phase chemistry - designer linkers for combinatorial chemistry. *J Chem Technol Biotechnol* 74, 835-851.

Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, I. M., Waterhouse, P., Crosby, W. L., Kontermann, R. E., Jones, P. T., Low, N. M., Allison, T. J., and et al. (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *Embo J* 13, 3245-3260.

Griffiths, A.D. and Tawfik, D.S. (2003) Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by in vitro compartmentalization. *Embo J*, 22, 24-35.

Guixe et al., Ligand-induced conformational transitions in *Escherichia coli* phosphofructokinase 2: evidence for an allosteric site for MgATP²⁻. 50

- Biochemistry. 1998 Sep 22;37(38):13269-75.
- Haber, J., Maslakiewicz, P., Rodakiewicz, N.J. and Walde, P. (1993) Activity and spectroscopic properties of bovine liver catalase in sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate/isooctane reverse micelles. *Eur J Biochem*, 217, 567-573.
- Han, M., Gao, X., Su, J. Z., and Nie, S. (2001). Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat Biotechnol* 19, 631-635.
- Han, M., Gao, X., Su, J.Z. and Nie, S. (2001) Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat Biotechnol*, 19, 631-635.
- Handen, J. S. (Summer 2002). High-throughput screening - challenges for the future. *Drug Discov World*, 47-50. 10
- Harder, K. W., Owen, P., Wong, L. K., Aebersold, R., Clark-Lewis, I., and Jirik, F. R. (1994). Characterization and kinetic analysis of the intracellular domain of human protein tyrosine phosphatase beta (HPTP beta) using synthetic phosphopeptides. *Biochem J* 298 (Pt 2), 395-401.
- Haugland, R.P., (1996). *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. Spence, M.T.Z. Ed
- Heim R, Tsien RY. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol*. 1996 Feb 1;6(2):178-82.
- Hergenrother, P. J., Depew, K. P., and Schreiber, S. L. (2000). Small-molecule microarrays: covalent attachment and screening of alcohol-containing small molecules on glass slides. *J Am Chem Soc* 122, 7849-7850. 20
- Hermanson, G.T. (1996) *Bioconjugate techniques*. Academic Press, San Diego.
- Hildebrand, J.H. and Cochran, D.F.R. (1949) *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 22.
- Hochuli, E., Dobeli, H., and Schacher, A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr* 411, 177-184.
- Holmes, C. P., and Jones, D. G. (1995). Reagents for combinatorial organic synthesis: development of a new o-nitrobenzyl photolabile linker for solid phase synthesis. *J Org Chem* 60, 2318-2319. 30
- Huang, Z.J., Kinetic assay of fluorescein mono-beta-D-galactoside hydrolysis by beta-galactosidase: a front-face measurement for strongly absorbing fluorogenic substrates (1991). *Biochemistry*. 30, 8530-4.
- Hudlicky, M. (1992) *Chemistry of Organic Fluorine Compounds*. Ellis Horwood, New York.
- Johannsson, A. (1991). Heterogeneous enzyme immunoassays. In *Principles and practice of immunoassays*, C. P. Price, and D. J. Newman, eds. (New York, Stockton Press), pp. 295-325.
- Johannsson, A., and Bates, D. L. (1988). Amplification by second enzymes. In *ELISA and other solid phase immunoassays*, D. M. Kemeny, and S. J. Challacombe, eds. (Chichester, John Wiley), pp. 85-106. 40
- Johnson, T. O., Ermoliev, J., and Jirousek, M. R. (2002). Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 696 -709.
- Keij et al., *Cytometry*. 1995 Mar 1;19(3):209-16
- Kerker, *Cytometry*. 1983 Jul;4(1):1-10
- Klug, A. (1995). Gene regulatory proteins and their interaction with DNA. *Ann N Y Acad Sci* 758, 143-160.
- Klug, A., and Schwabe, J. W. (1995). Protein motifs 5. Zinc fingers. *Faseb J* 9, 597-604. 50

- Krafft, M.P., Chittofrati, A. and Riess, J.G. (2003) Emulsions and microemulsions with a fluorocarbon phase. *Curr. Op. Colloid Interface Sci.*, 8, 251-258.
- Kumar, A., Kumar, A. and Katiyar, S.S. (1989) Activity and kinetic characteristics of glutathione reductase in vitro in reverse micellar waterpool. *Biochim Biophys Acta*, 996, 1-6.
- Lee, Y.-F., Tawfik, D. S., and Griffiths, A. D. (2002). Investigating the target recognition of DNA cytosine-5 methyltransferase HhaI by library selection using in vitro compartmentalisation (IVC). *Nucleic Acids Res* 30, 4937-4944.
- Lim, F. (ed.). (1984) *Biomedical applications of microencapsulation*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 10
- Lim, F. and Sun, A.M. (1980) Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*, 210, 908-910.
- Link, D.R., Anna, S.L., Weitz, D.A. and Stone, H.A. (2004) Geometrically mediated breakup of drops in microfluidic devices. *Phys. Rev. Letts.*, 92, 054503.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. and Feeney, P.J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 46, 3-26.
- Lissant, K.J. (ed.). (1974) *Emulsions and emulsion technology*. Marcel Dekker, New York.
- Lissant, K.J. (ed.). (1984) *Emulsions and emulsion technology*. Marcel Dekker, New York. 20
- Lowe, K.C. (2002) Perfluorochemical respiratory gas carriers: benefits to cell culture systems. *J. Fluorine Chem.*, 118, 19-26.
- Luisi, P.L. and B., S.-H. (1987) Activity and conformation of enzymes in reverse micellar solutions. *Methods Enzymol*, 136, 188-216.
- Lyne, P. D. (2002). Structure-based virtual screening: an overview. *Drug Discov Today* 7, 1047-1055.
- Mackenzie and Pinder, *Dev Biol Stand.* 1986;64:181-93.
- Mahajan NP, Linder K, Berry G, Gordon GW, Heim R, Herman B. Bcl-2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer. *Nat Biotechnol.* 1998 Jun;16(6):547-52. 30
- Mao, Q. and Walde, P. (1991) Substrate effects on the enzymatic activity of alpha-chymotrypsin in reverse micelles. *Biochem Biophys Res Commun*, 178, 1105-1112.
- Mao, Q., Walde, P. and Luisi, P.L. (1992) Kinetic behaviour of alpha-chymotrypsin in reverse micelles. A stopped-flow study. *Eur J Biochem*, 208, 165-170.
- Masui and Kuramitsu, Probing of DNA-binding sites of Escherichia coli RecA protein utilizing 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid. *Biochemistry.* 1998 Sep 1;37 (35): 12133-43
- McDonald, J.C. and Whitesides, G.M. (2002) Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Acc Chem Res*, 35, 491-499. 40
- Menger, F.M. and Yamada, K. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 6731-6734.
- Meylan, W.M. and Howard, P.H. (1995) Atom/fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients. *J Pharm Sci*, 84, 83-92.
- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature.* 1997 Aug 28;388(6645):882-7.
- Mize, P. D., Hoke, R. A., Linn, C. P., Reardon, J. E., and Schulte, T. H. (1989). Dual-enzyme cascade--an amplified method for the detection of alkaline phosphatase. *Anal Biochem* 179, 229-235.
- Montigiani, S., Neri, G., Neri, P., and Neri, D. (1996). Alanine substitutions in 50

n calmodulin-binding peptides result in unexpected affinity enhancement. *J Mol Biol* 258, 6-13.

New, R.R.C. (ed.). (1990) *Liposomes: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford.

Norman, *Med Phys.* 1980 Nov-Dec;7(6):609-15.

Oberholzer, T., Albrizio, M. and Luisi, P.L. (1995) Polymerase chain reaction in liposomes. *Chem Biol*, 2, 677-682.

Oberholzer, T., Wick, R., Luisi, P.L. and Biebricher, C.K. (1995) Enzymatic RNA replication in self-reproducing vesicles: an approach to a minimal cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 207, 250-257.

10

Obukowicz, M.G., Turner, M.A., Wong, E.Y. and Tacon, W.C. (1988) Secretion and export of IGF-1 in *Escherichia coli* strain JM101. *Mol Gen Genet*, 215, 19-25.

Perelson, A. S., and Oster, G. F. (1979). Theoretical studies of clonal selection: minimal antibody repertoire size and reliability of self-non-self discrimination. *J Theor Biol* 81, 645-670.

Perez, G.M., Sanchez, F.A. and Garcia, C.F. (1992) Application of active-phase plot to the kinetic analysis of lipoxygenase in reverse micelles. *Biochem J*.

Pirrung, M. C., and Huang, C. Y. (1996). A general method for the spatially defined immobilization of biomolecules on glass surfaces using "caged" biotin. *Biotechnology* 7, 317-321.

20

Qi and Grabowski, Acid beta-glucosidase: intrinsic fluorescence and conformational changes induced by phospholipids and saposin C. *Biochemistry*. 1998 Aug 18;37(33):11544-54

Ramstrom, O., and Lehn, J. M. (2002). Drug discovery by dynamic combinatorial libraries. *Nat Rev Drug Discov* 1, 26-36.

Riess, J.G. (2002) Fluorous micro- and nanophases with a biomedical perspective. *Tetrahedron*, 58, 4113-4131.

Rolland, *J Immunol Methods*. 1985 Jan 21;76(1):1-10

Sadtler, V.M., Krafft, M.P. and Riess, J.G. (1996) Achieving stable, reverse water-in-fluorocarbon emulsions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 35, 1976-1978.

30

Sambrook, J., and Russell, D. W., eds. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Savage, M. D., Mattson, G., Desai, S., Nielander, G. W., Morgensen, S., and Conklin, E. J. (1994). *Avidin-biotin chemistry: a handbook*, 2 edn (Rockford, Pierce Chemical Company).

Schick, M.J. (1966) *Nonionic surfactants*. Marcel Dekker, New York.

Scott, R.L. (1948) *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 4090.

Sepp, A., Tawfik, D. S., and Griffiths, A. D. (2002). Microbead display by *in vitro* compartmentalisation: selection for binding using flow cytometry. *FEBS Letters* 532, 455-458.

40

Shapiro, H. M. (1995). *Practical Flow Cytometry*, 3 edn (New York, Wiley-Liss).

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

Song, H. and Ismagilov, R.F. (2003) Millisecond kinetics on a microfluidic chip using nanoliters of reagents. *J Am Chem Soc*, 125, 14613-14619.

Song, H., Tice, J.D. and Ismagilov, R.F. (2003) A microfluidic system for controlling reaction networks in time. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 42, 767-772.

Stofko, H. R., Carr, D. W., and Scott, J. D. (1992). A single step purification for recombinant proteins. Characterization of a microtubule associated protein (MAP 2) fragment which associates with the type II cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett* 302, 274-278.

50

- Studer, A., Hadida, S., Ferritto, R., Kim, S.Y., Jeger, P., Wipf, P. and Curran, D.P. (1997) Fluorous synthesis: a fluorous-phase strategy for improving separation efficiency in organic synthesis. *Science*, 275, 823-826.
- Sun, A.M., Vasek, I. and Tai, I. (1992) Microencapsulation of living cells and tissues. In Donbrow, M. (ed.), *Microencapsulation and nanoparticles in medicine and pharmacy*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 315-322.
- Sundberg, S. A., Barrett, R. W., Pirrung, M., Lu, A. L., Kiangsoontra, B., and Holmes, C. P. (1995). Spatially-addressable immobilisation of macromolecules on solid supports. *J Am Chem Soc* 117, 12050-12057.
- Tawfik, D. S., and Griffiths, A. D. (1998). Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat Biotechnol* 16, 652-656. 10
- Thorsen, T., R.W., R., Arnold, F.H. and Quake, S.R. (2001) Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Phys. Rev. Letts.*, 86, 4163-4166.
- Tripet, B., Yu, L., Bautista, D. L., Wong, W. Y., Irvin, R. T., and Hodges, R. S. (1996). Engineering a de novo-designed coiled-coil heterodimerization domain off the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expressed peptides and proteins. *Protein Eng* 9, 1029-1042.
- Umbanhowar, P.B., Prasad, V. and Weitz, D.A. (2000) Monodisperse emulsions generated via drop break off in a coflowing stream. *Langmuir*, 16, 347-351. 20
- van Hal, D.A., Bouwstra, J.A. and Junginger, H.E. (1996) Nonionic surfactant vesicles containing estradiol for topical application. In Benita, S. (ed.), *Microencapsulation: methods and industrial applications*. Marcel Dekker, New York, pp. 329-347.
- Voss EW Jr. Kinetic measurements of molecular interactions by spectrofluorometry. *J Mol Recognit*. 1993 Jun;6(2):51-8
- Walde, P., Goto, A., Monnard, P.-A., Wessicken, M. and Luisi, P.L. (1994) Oparin's reactions revisited: enzymatic synthesis of poly(adenylic acid) in micelles and self-reproducing vesicles. *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 7541-7547.
- Walde, P., Han, D. and Luisi, P.L. (1993) Spectroscopic and kinetic studies of lipases solubilized in reverse micelles. *Biochemistry*, 32, 4029-4034. 30
- Walde, P., Peng, Q., Fadnavis, N.W., Battistel, E. and Luisi, P.L. (1988) Structure and activity of trypsin in reverse micelles. *Eur J Biochem*, 173, 401-409.
- Whateley, T.L. (1996) Microcapsules: preparation by interfacial polymerisation and interfacial complexation and their applications. In Benita, S. (ed.), *Microencapsulation: methods and industrial applications*. Marcel Dekker, New York, pp. 349-375.
- Wick, R. and Luisi, P.L. (1996) Enzyme-containing liposomes can endogenously produce membrane-constituting lipids. *Chem Biol*, 3, 277-285.
- Zhang, Z. Y., Thieme-Seifler, A. M., Maclean, D., McNamara, D. J., Dobrusin, E. M., Sawyer, T. K., and Dixon, J. E. (1993). Substrate specificity of the protein tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4446-4450. 40

【 0 2 7 0 】

以上の明細書中で言及されている全ての刊行物および前記刊行物中で引用されている参考文献は、本明細書に参照により援用されるものである。本発明の記述された方法およびシステムのさまざまな修正および変形形態が、本発明の範囲および精神から逸脱することなく当業者には明らかになることであろう。本発明は、特定の好ましい実施形態に関連して記述されてきたが、請求されている通りの本発明がかかる特定の実施形態に不当に制限されるべきものではないということを理解すべきである。実際、分子生物学またはそれに関係する分野の当業者にとって明白である本発明を実施するための記載された様式の様々 50

な修正は上記特許請求の範囲の範囲内にあることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0271】

【図1A】本発明の一実施形態に従った液滴の分割を例示する。

【図1B】本発明の一実施形態に従った液滴の分割を例示する。

【図2A】電場を印加する前の、本発明の一実施形態に従った器具を例示している。

【図2B】電場を印加する前の、本発明の一実施形態に従った器具を例示している。

【図3A】電場を印加した後の、図2Aの器具を例示する。

【図3B】電場を印加した後の、図2Bの器具を例示する。

【図4A】逆電場の印加後の図2Aの器具を例示する。

10

【図4B】逆電場の印加後の図2Bの器具を例示する。

【図5】本発明の一実施形態に従った液滴分割の概略図である。

【図6A】本発明の付加的な実施形態の概略図である。

【図6B】本発明の付加的な実施形態の概略図である。

【図7a】本発明に従ったマイクロ流体液滴の形成の概略図である。

【図7b】本発明に従ったマイクロ流体液滴の形成の概略図である。

【図8a】本発明に従った液滴の分割を例示する。

【図8b】本発明に従った液滴の分割を例示する。

【図8c】本発明に従った液滴の分割を例示する。

【図8d】本発明に従った液滴の分割を例示する。

20

【図8e】本発明に従った液滴の分割を例示する。

【図8f】本発明に従った液滴の分割を例示する。

【図9a】本発明に従った液滴内への双極子の誘導を例示する。

【図9b】本発明に従った液滴内への双極子の誘導を例示する。

【図9c】本発明に従った液滴内への双極子の誘導を例示する。

【図9d】本発明に従った液滴内への双極子の誘導を例示する。

【図10a】マイクロ流体システム内の担体流体のフローを改変することによるマイクロカプセルの選別を例示する。

【図10b】マイクロ流体システム内の担体流体のフローを改変することによるマイクロカプセルの選別を例示する。

30

【図10c】マイクロ流体システム内の担体流体のフローを改変することによるマイクロカプセルの選別を例示する。

【図10d】マイクロ流体システム内の担体流体のフローを改変することによるマイクロカプセルの選別を例示する。

【図11a】液滴フローの方向を制御するためのマイクロ流体システム内の圧力変化の使用を例示している。

【図11b】液滴フローの方向を制御するためのマイクロ流体システム内の圧力変化の使用を例示している。

【図11c】液滴フローの方向を制御するためのマイクロ流体システム内の圧力変化の使用を例示している。

40

【図12a】本発明に従ったマイクロ流体システム内の液滴についてのフローパターンを例示する。

【図12b】本発明に従ったマイクロ流体システム内の液滴についてのフローパターンを例示する。

【図12c】本発明に従ったマイクロ流体システム内の液滴についてのフローパターンを例示する。

【図12e】本発明に従ったマイクロ流体システム内の液滴についてのフローパターンを例示する。

【図12f】本発明に従ったマイクロ流体システム内の液滴についてのフローパターンを例示する。

50

【図12g】本発明に従ったマイクロ流体システム内の液滴についてのフローパターンを例示する。

【図12h】本発明に従ったマイクロ流体システム内の液滴についてのフローパターンを例示する。

【図12i】本発明に従ったマイクロ流体システム内の液滴についてのフローパターンを例示する。

【図12j】本発明に従ったマイクロ流体システム内の液滴についてのフローパターンを例示する。

【図13a】本発明における反対に荷電された液滴の使用を例示する。

【図13b】本発明における反対に荷電された液滴の使用を例示する。

10

【図13c】本発明における反対に荷電された液滴の使用を例示する。

【図13d】本発明における反対に荷電された液滴の使用を例示する。

【図14a】非混和性液体を用いたマイクロ流体液体の形成および維持の例示である。

【図14b】非混和性液体を用いたマイクロ流体液体の形成および維持の例示である。

【図14c】非混和性液体を用いたマイクロ流体液体の形成および維持の例示である。

【図15】マイクロ流体システム内のマイクロ液滴を用いた化合物スクリーニング。図版A：コアシステムの概略図。図版B：コアシステム内のモジュールを示すプロセスブロック図である。標的酵素を含むマイクロカプセルが、各々化合物ライブラリからの異なる化合物を含有するマイクロ液滴と融合させられる。化合物が標的酵素に結合できる時間を与えた後、各マイクロ液滴が、蛍光性酵素基質を含有するもう1つのマイクロ液滴と融合させられる。酵素反応の速度は、理想的には多数の点（異なる時刻に対応する）で各マイクロ液滴の蛍光を測定することによって決定される。所望の活性をもつ化合物を含むマイクロ液滴が、必要とあらば選別され収集される。

20

【図16】マイクロ流体を用いたマイクロ液滴の形成および操作の例。図版A：流体力学的集束（上部の2つの図版）により最高 10^4 s e c^{-1} でマイクロ液滴を作り出すことができ、それらは1.5%未満の多分散性（下図版）を示す。図版B：マイクロ液滴は対称または非対称に分割可能である。図版C：正（+q）および負（-q）の電荷を担持するマイクロ液滴が自発的に融合する。図版D：荷電マイクロ液滴は同様に、印加された電場（E）を用いても操縦可能である。

【図17】PTP1B阻害物質の例。ビス-ピフルオロメチレンホスホナート部分を伴う化合物（例2）は、単一部分（例1）を伴うものに比べ著しく効能が高い。

30

【図18】マイクロカプセル化を用いたPTP1B阻害物質のスクリーニング。オレンジ色または赤色の蛍光色素で染色した表面カルボキシラート基を伴うポリスチレンビーズ（フルトン（Fulton）ら、1997年）が、ホスホペプチドPTP1Bで誘導体化され、開裂可能リンカーを介してPTP1B阻害物質または非阻害性化合物のいずれかが付着される（1）。ビーズを混合した後、油中水型エマルジョンを形成することによってマイクロカプセル内に単一ビーズおよび標的酵素（PTP1B）が同時にある（2）。化合物は、光化学的に放出される（3）。阻害物質は、生成物（デホスホリル化ペプチド）に転換された基質の量を低減させる（4）。酵素反応は停止され、エマルジョンは破壊される（5）。緑色蛍光抗基質抗体での標識の後、ビーズ上の化合物および阻害の程度を同時に判定するため3色のフローサイトメトリーによりビーズが分析される（6）。究極的に、化合物ライブラリは、光学的にタグ付けされたビーズ（以下参照）にカップリングされ、フローサイトメトリー（最高 $100,000 \text{ ビーズ s}^{-1}$ ）により急速に復号される（decoded）ことになる。さらなる特徴づけのためヒット化合物を再合成する（7）ことも、又合成進化プロセスにおいてこれを念入りに仕上げ、再度スクリーニングすること（8）も可能である。

40

【図19】フッ化炭素中水型エマルジョン内の小分子の区画化。テキサスレッド（1mM）およびカルセイン（1mM）を含有する臭化ペルフルオロオクチル中水型エマルジョンを、実施例9で記述されている通りに均質化により水相中で作った。ボルテックス処理により2つのエマルジョンを混合し、24時間後に落射蛍光顕微鏡法により画像形成させた

50

。テキサスレッド（赤色蛍光）およびカルセイン（緑色蛍光）のマイクロ液滴間交換は全く観察できなかつた。

【図20】荷電液滴の生成。（A）、油および水の流れが、30マイクロンのオリフィスで収束する。ガラス上のインジウム-錫-酸化物（ITO）電極に印加された電圧Vが、電場Eを生成して、水-油界面を容量荷電する。滴径は低い電場強度では電荷と無関係であるが、高電場での顕微鏡写真〔（B）V=0、（C）V=400、（D）V=600および（E）V=800〕の中で示されている通り、より高い電場では減少する。（F）連続相油の3つの異なる流速（ $Q_c = 80 \text{ nL/秒}$ 、 110 nL/秒 および 140 nL/秒 ）についてのフロー優位および電場優位のスナップオフの間の交差を示す電圧の関数としての液滴サイズ。水の注水速度は恒常である。 $Q_d = 20 \text{ nL/秒}$ }

10

【図21】合体する滴。（A）2つの水流を横断して1つの電圧を印加することにより、静電電荷の相対する正負符号をもつ滴を生成することができる。（B）電場が無い場合、2つのノズルにおける滴形成の頻度およびタイミングは独立しており、各ノズルは異なる頻度で異なるサイズの滴を生産する；注入速度は両方のノズルにおいて同じである。2つの流れの合流の後、上部および下部ノズルからの滴は、流れのそれぞれの半分の中にとどまり、界面活性剤に起因して、チャンネル幅を満たす大きなスラグがある場合でさえ、いかなる合流事象も存在しない。（C）ノズルの500マイクロンの離隔距離を横断して200Vという電圧が印加される場合、滴は、2本のノズルから同時に中断し、同一である。同時滴形成は、体積差の2倍という水流の不等な注入速度についてさえ達成可能である。（D）互いに遭遇し合流する滴の画分は、界面活性剤ソルビトンモノオレアート3%が存在する場合、臨界電場より上で線形的に増大する。

20

【図22】pH感応性染料を担持する液滴は、異なるpHの流体の液滴と合流する。液滴がコーナーのまわりを透過するにつれて、並進運動と回転の組合せを通し、カオス的移流が2つの流体を急速に混合する。

【図23】拡散制限および急速混合戦略。（A）滴はEの方向に沿って遭遇し合流し、次に、垂直方向に運び去られる。素描されているとおり、各渦流は単一の材料を含むため、対抗回転する渦流は、合流点の後2つの流体部分を混合させない。（B）滴が互いに接近するにつれて、増大する電場がその界面を変形させ、（C）ブリッジが飛び出て滴を連結させて、（D）20nmのシリカ粒子およびMgCl₂の場合、粒子がゲル化し始める鮮明な界面を作り出す。（E）1半球内に粒子を伴う標準的な未混合液滴。（F）高速混合を達成するためには、液滴は、電場に対して垂直方向に集められ、それらが併合した方向に対し平行な方向に運び去られる。このとき、対抗回転する渦流が作り出され、ここで各々の渦流は併合前の滴の各々に由来する中味の半分で構成されている。（G）下部滴中のpH感応性染料および上部液滴中の異なるpHの流体を示す。（H）併合の後、液滴は鮮明な線により分割される。（I）混合が発生したことを表わす均等な強度が、液滴中で、それが1直径分並進運動した後に達成され、標準的にこれには1~2msかかる。

30

【図24】時間的遅延反応モジュール。（A）ペルフルオロデカリンの液滴が、ヘキサデカン担体流体内で水滴と交番する。液滴の「一列縦隊」順序づけは、水滴の精確な間隔どりまたは液滴順序に基本的に全く逸脱がない状態で長い遅延を提供する。（B）「広い断面積」のチャンネルを作り出すためにチャンネルの幅および高さを増大させることにより、分単位乃至時間単位のきわめて長い時間的遅延が提供される。液滴間の正確な順序づけおよび間隔どりは、このタイプの遅延ラインにおいては維持されない。

40

【図25】中性滴の再荷電。（A）電場の存在下で破壊することにより中性滴を再荷電するための概略図。未荷電滴（ $q = 0$ ）が電場内で分極され（ $E_s \neq 0$ ）、 E_s が（B）の顕微鏡写真内で示されている通り、充分大きいことを条件として、これらの滴は、分岐点での伸長流内で2つの反対に荷電された娘滴へと分かれる。（C）に示されている破線矩形の拡大は、荷電滴が電場 E_s 内で引き延ばされるが、破線垂直線によって表わされた電極との接触時点で球形に戻る、ということを示している。

【図26】検出モジュール。各液滴がファイバ上を通過するにつれてその中の蛍光を励起させるために使用される光ファイバに対し、1つ以上のレーザーが結合される。該蛍光は

50

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

【図27】荷電滴の操作。（A）では、全く電場が印加されない場合（ $E_s = 0$ ）、荷電滴は左右のチャンネルに交互に入る。（B）の素描は、荷電滴が分岐点で進入することになるチャンネルを選択するために電場 E_s を使用するためのレイアウトを示す。右に電場が印加された時点で（C）、滴は、分岐点で右の分岐に入る；電場が逆転した時点で、これらは左の分岐に入る（D）。分岐点の後、滴間の距離は、油流が均等に分けられていることを標示する前の距離の半分まで削減される。（D）の差し込み図は、電場内のきわめて高い荷電を受けた滴の形状の変形を示している。

10

【図1A】

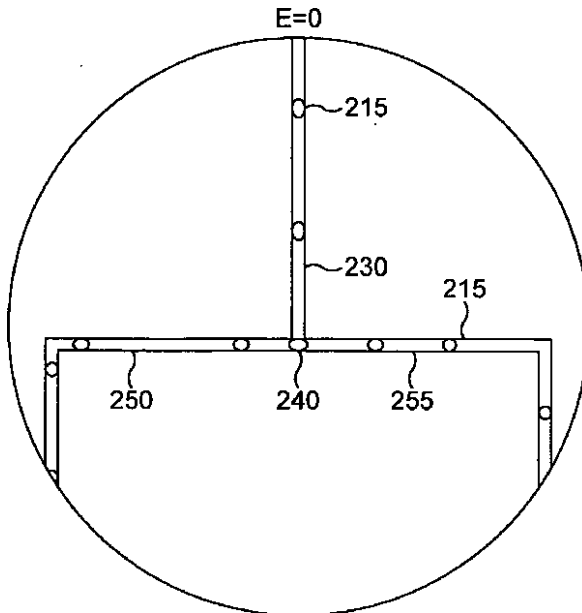


FIG. 1A

【図1B】

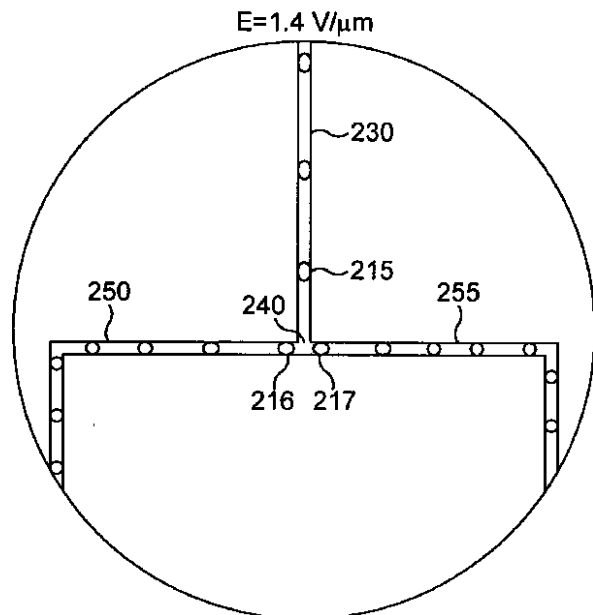


FIG. 1B

【図 2 A】

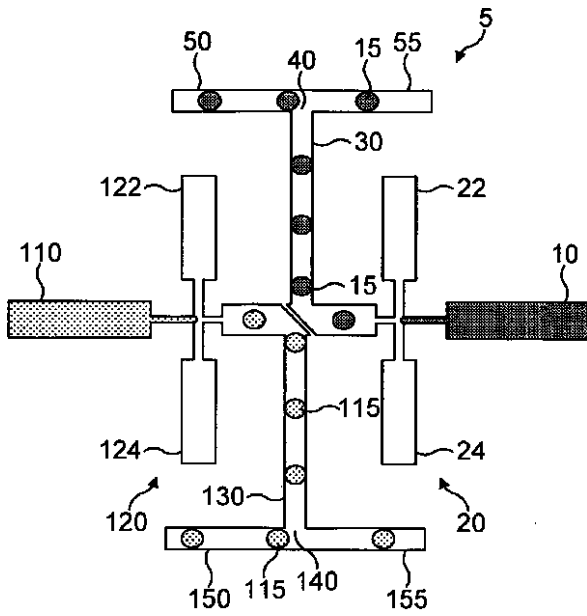


FIG. 2A

【図 2 B】

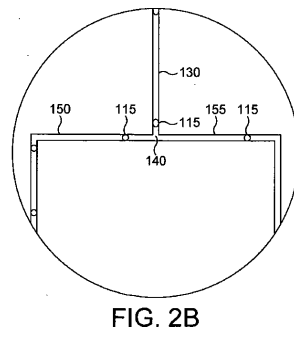


FIG. 2B

【図 3 A】

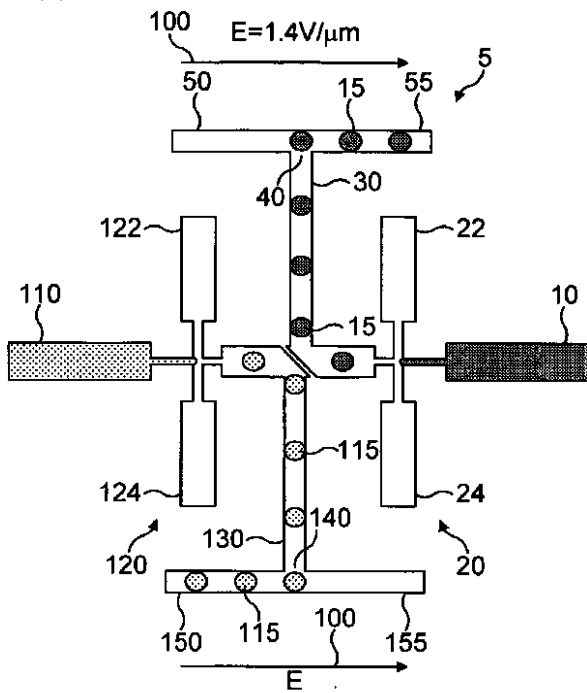


FIG. 3A

【図 3 B】

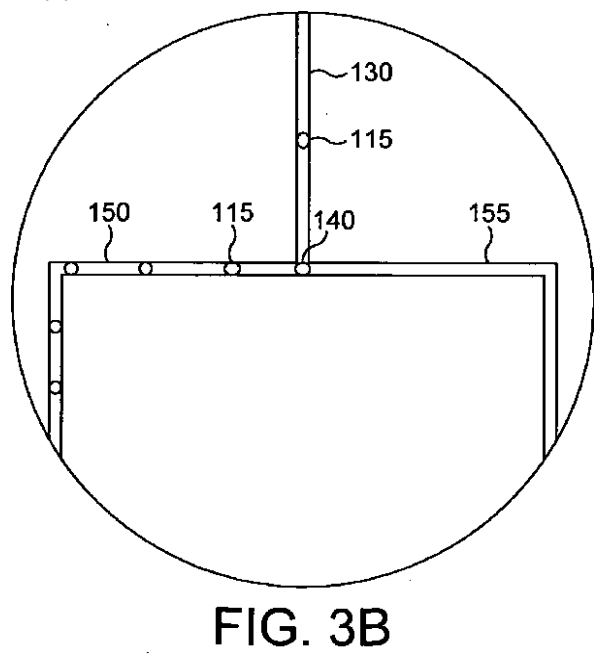


FIG. 3B

【 図 4 A 】

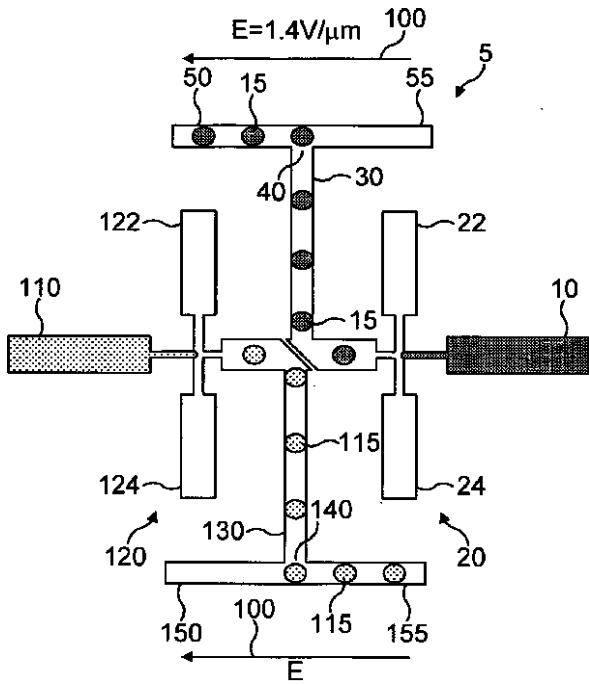


FIG. 4A

【 図 4 B 】

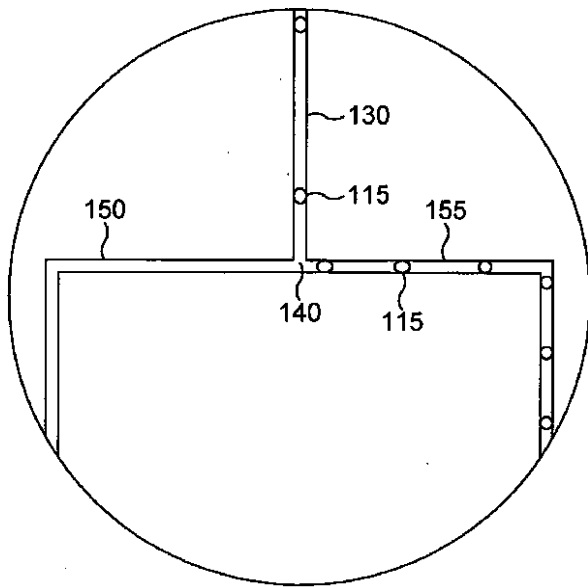


FIG. 4B

【 図 5 】

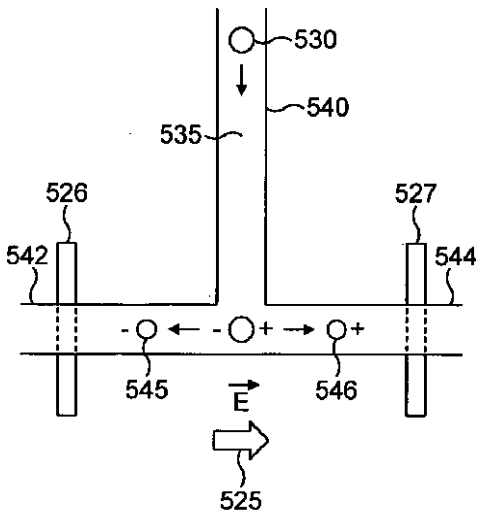


FIG. 5

【 図 6 B 】

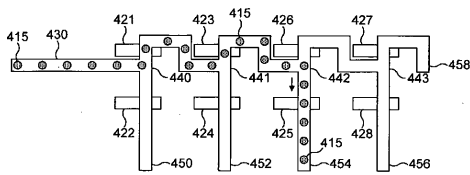


FIG. 6B

【 図 7 A 】

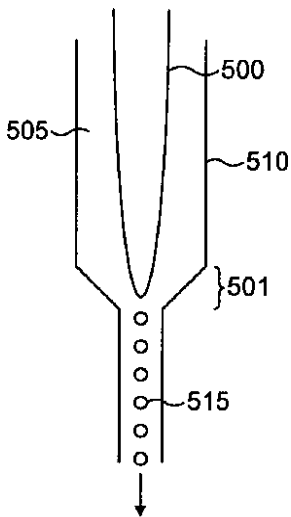


FIG. 7A

【 図 6 A 】

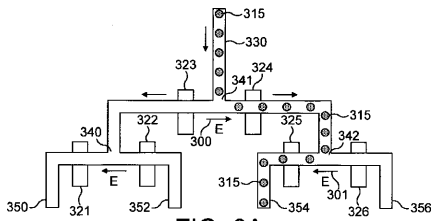
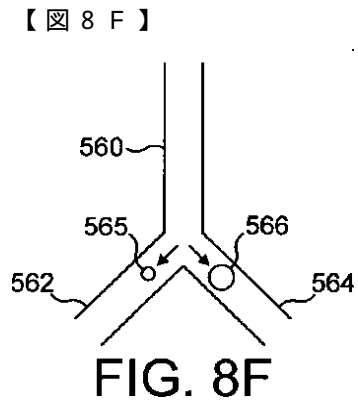
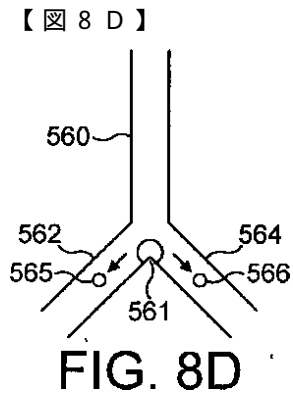
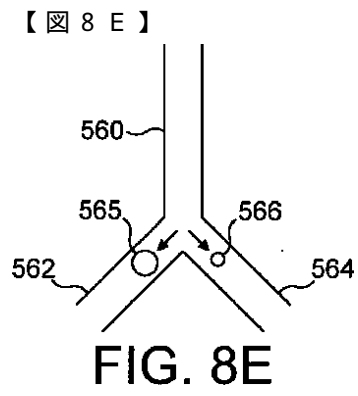
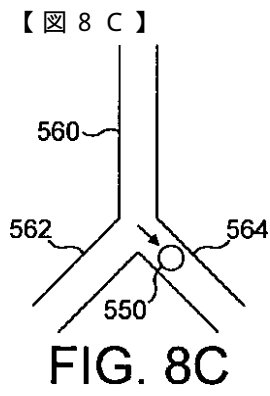
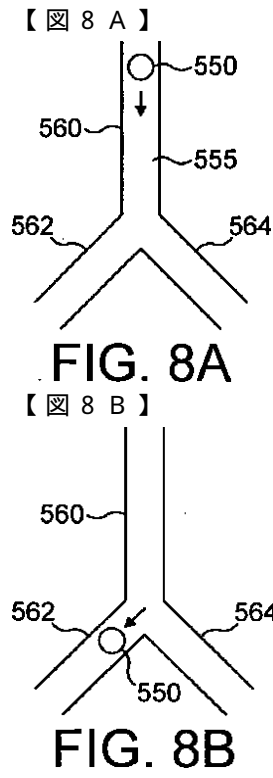
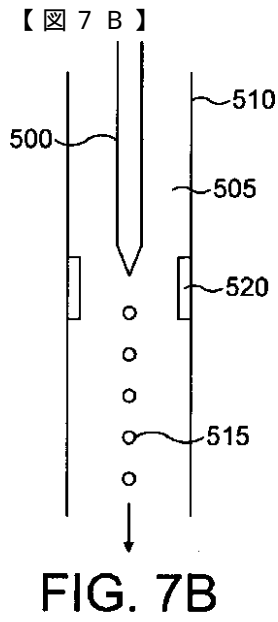


FIG. 6A



【図 9 A】

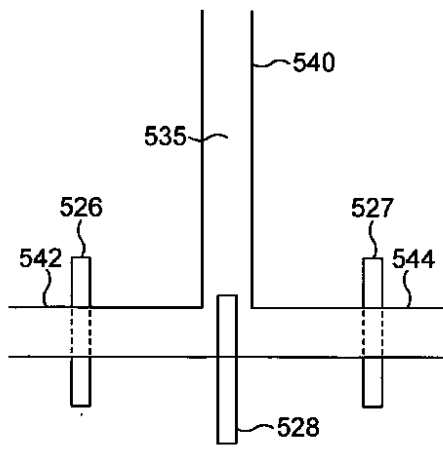


FIG. 9A

【図 9 B】

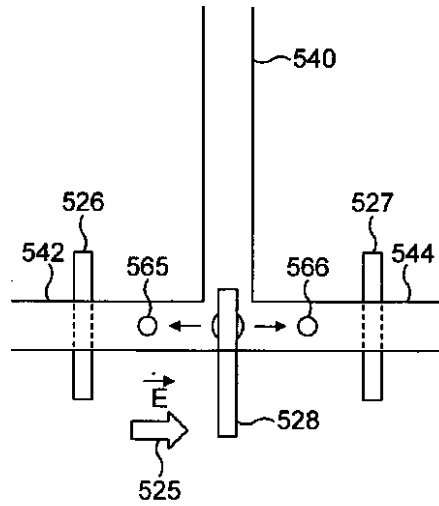


FIG. 9B

【図 9 C】

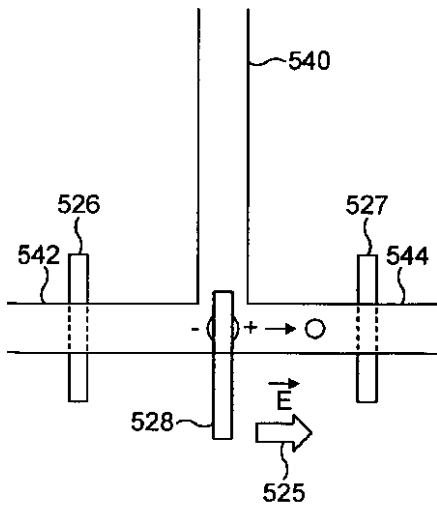


FIG. 9C

【図 9 D】

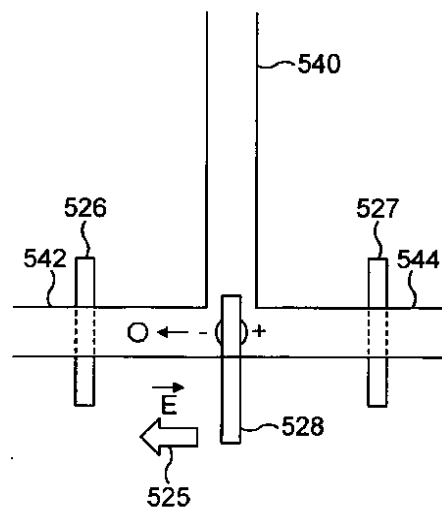


FIG. 9D

【図10A】

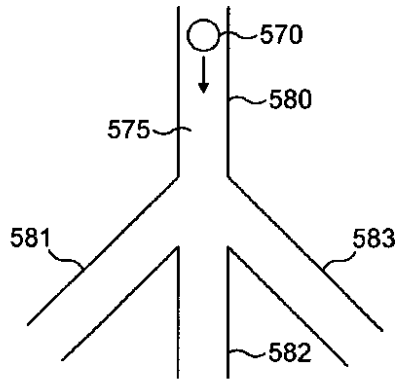


FIG. 10A

【図10B】

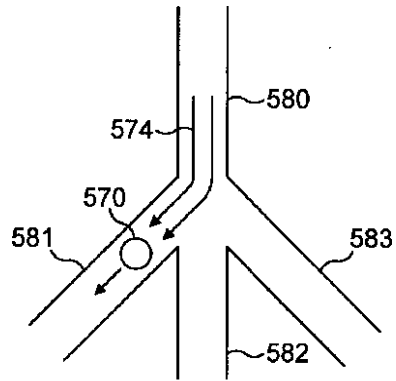


FIG. 10B

【図10C】

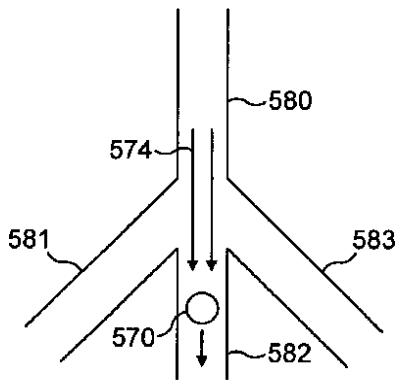


FIG. 10C

【図10D】

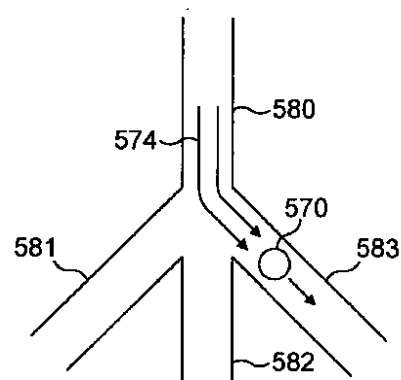


FIG. 10D

【図11A】

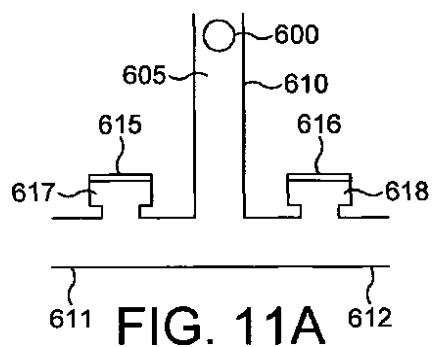


FIG. 11A

【図11B】

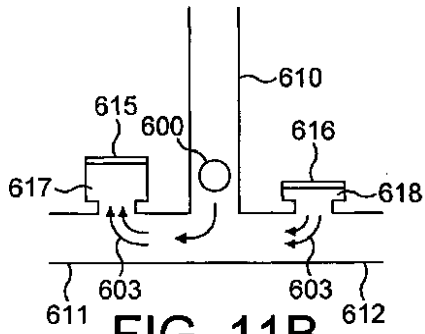


FIG. 11B

【図11C】

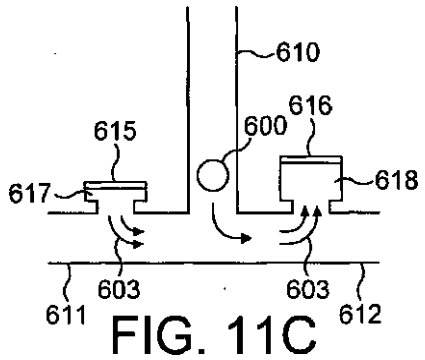


FIG. 11C

【図12A】

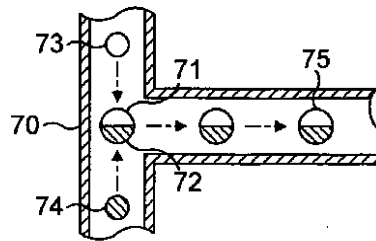


FIG. 12A

【図12B】

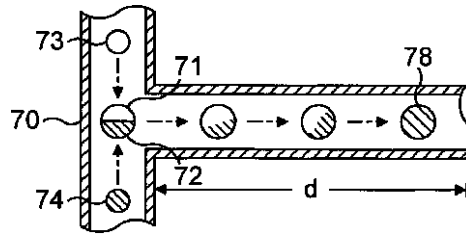


FIG. 12B

【図12C】

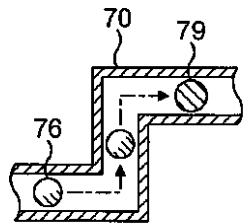


FIG. 12C

【図12F】

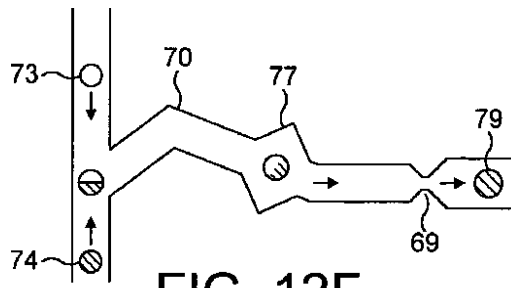


FIG. 12F

【図12D】

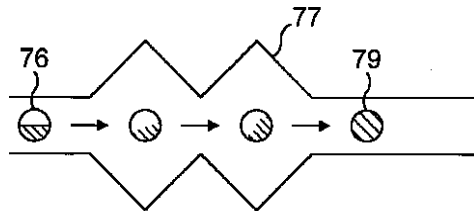


FIG. 12D

【図12G】

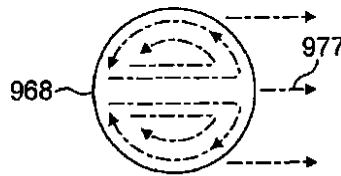


FIG. 12G

【図12E】

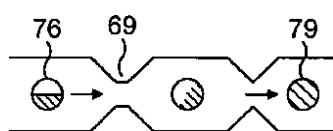


FIG. 12E

【図12H】

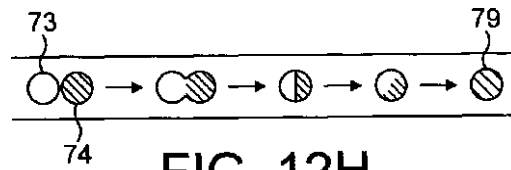


FIG. 12H

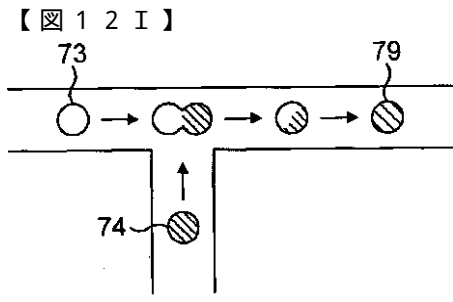


FIG. 12I

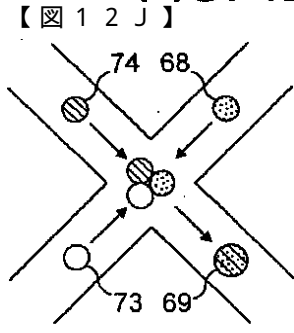


FIG. 12J

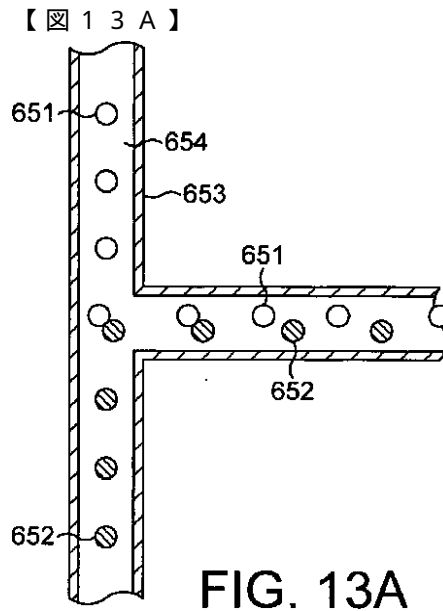


FIG. 13A

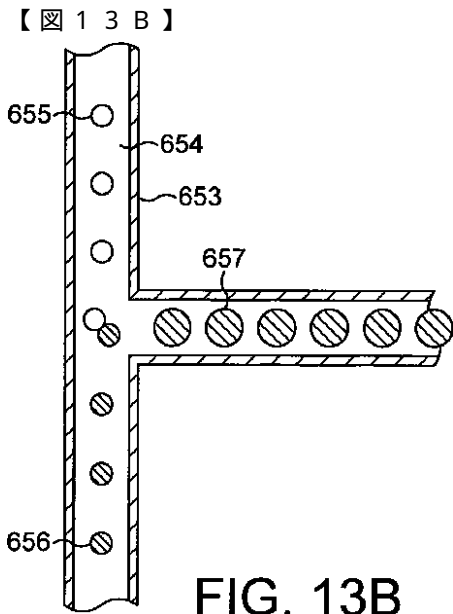


FIG. 13B

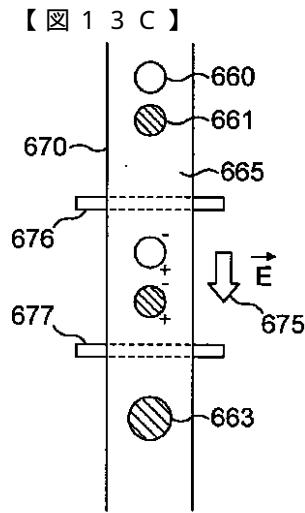


FIG. 13C

【図13D】

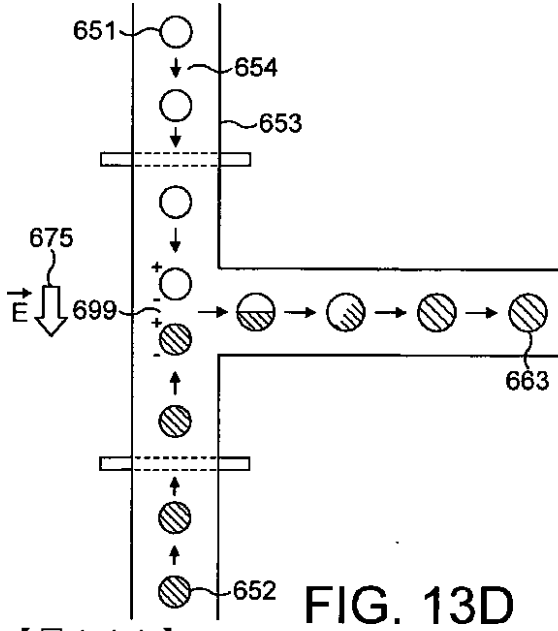


FIG. 13D

【図14A】

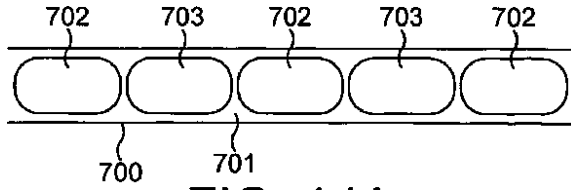


FIG. 14A

【図14B】

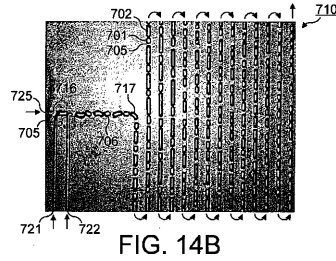


FIG. 14B

【図14C】

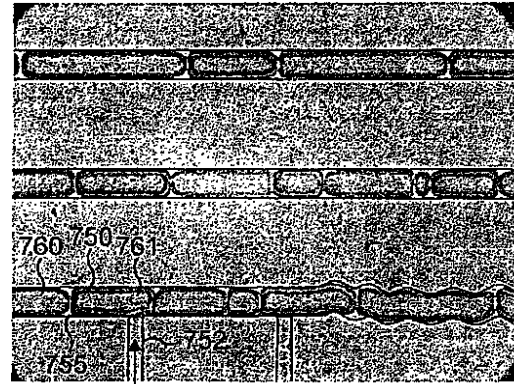


FIG. 14C

【図15】

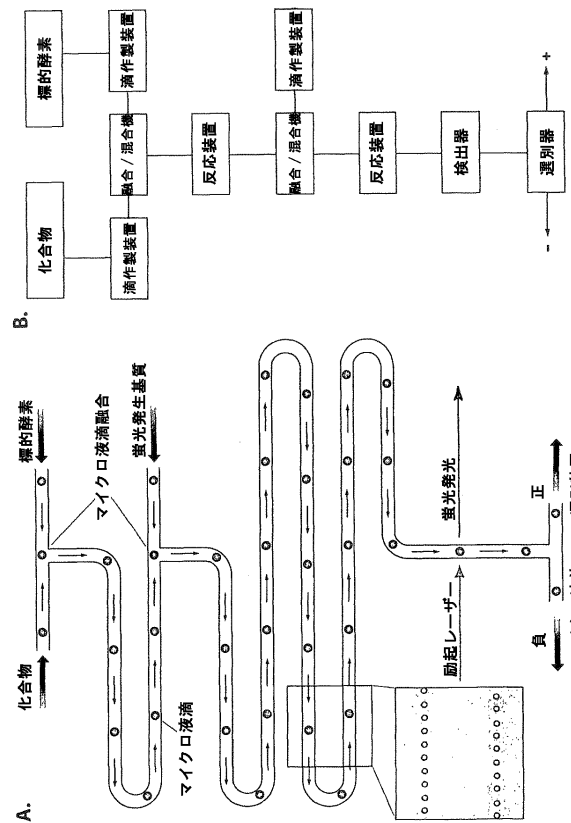


FIG. 15

【図16】

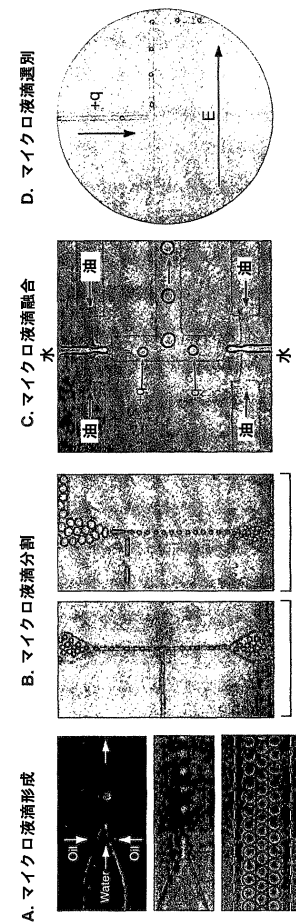


FIG. 16

【 図 17 】

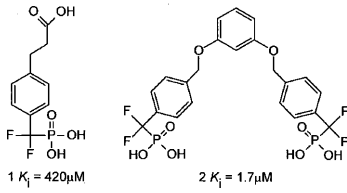


FIG. 17

【 図 18 】

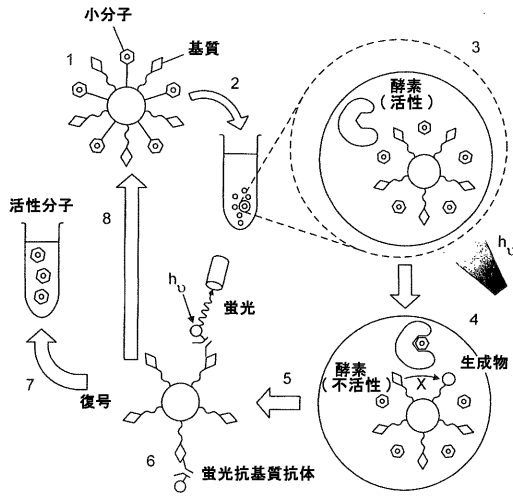


FIG. 18

【 図 19 】

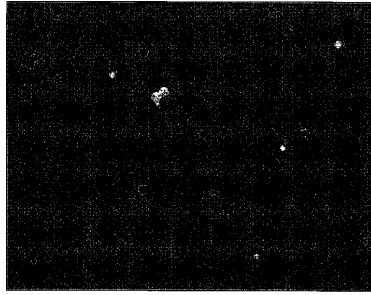


FIG. 19

【 図 20 】

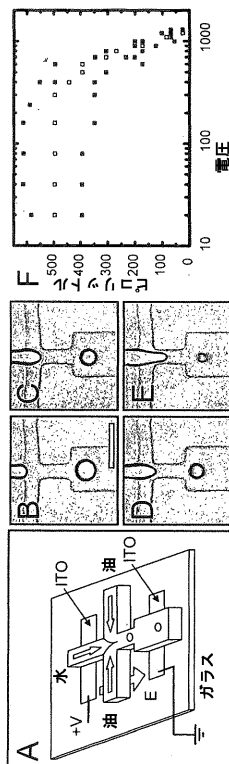


FIG. 20

【 図 21 】

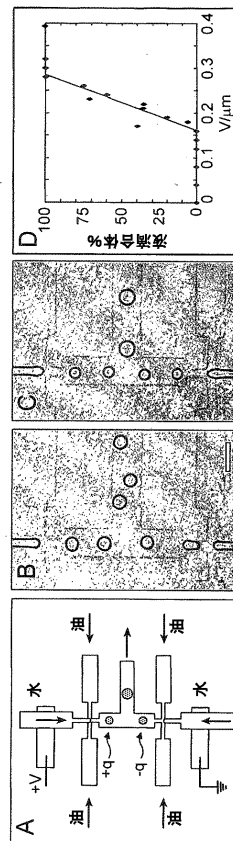


FIG. 21

【図 22】

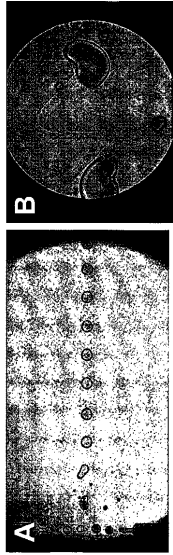


FIG. 22

【図 23】

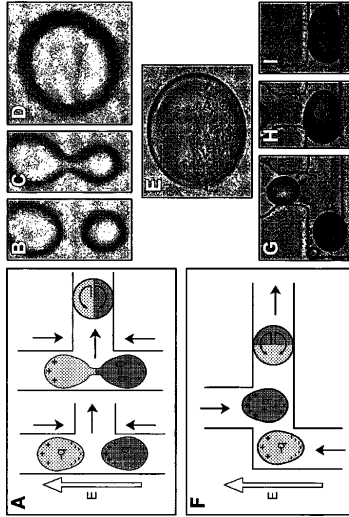


FIG. 23

【図 24】

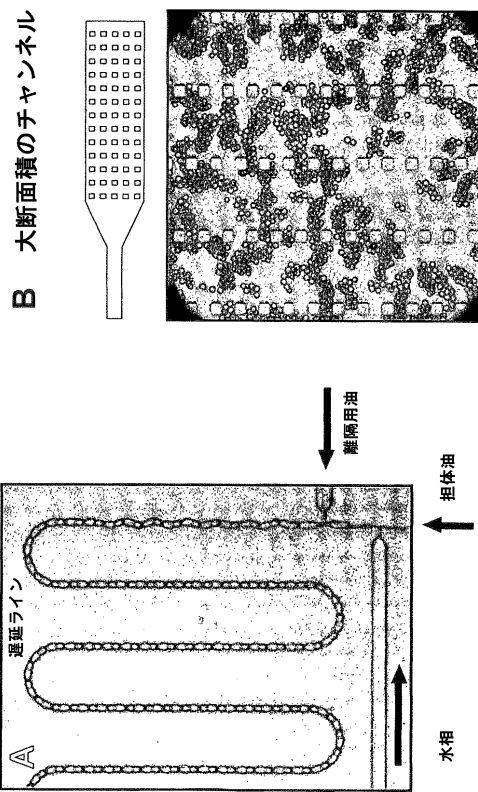


FIG. 24

【図 25】

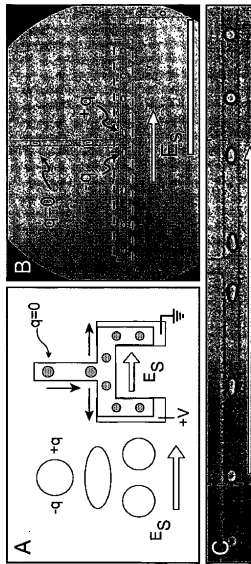


FIG. 25

【図 26】

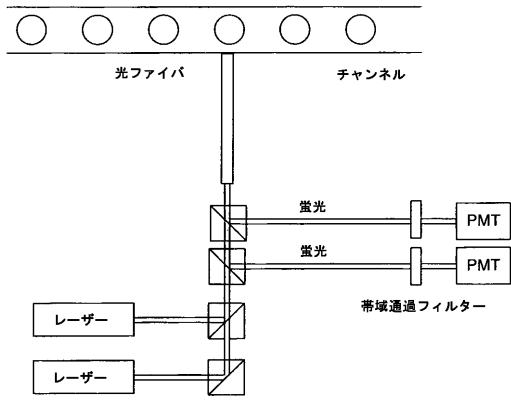


FIG. 26

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	C 1 2 Q	1/00	Z
C 0 7 B 61/00	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
		C 0 7 B	61/00	A

(73)特許権者 502072134

プレジデント アンド フェロウズ オブ ハーバード カレッジ
 President and Fellows of Harvard College
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02138, ケンブリッジ, 17 クインシー ストリート

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74)代理人 100116311

弁理士 元山 忠行

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(72)発明者 アンドリュー・グリフィス

英国シービー2・2キューエイチ、ケンブリッジ、ヒルズ・ロード、エムアールシー・ケンブリッジ・センター・フォー・プロテイン・エンジニアリング

(72)発明者 デイビッド・ウェイツ

アメリカ合衆国02138マサチューセッツ州ケンブリッジ、オックスフォード・ストリート29番、ピアース231

(72)発明者 ダーレン・リンク

アメリカ合衆国06437コネチカット州ギルフォード、ホイトフィールド・ストリート530番、レインダンス・テクノロジーズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 アン・クンホ

アメリカ合衆国02163マサチューセッツ州ボストン、アパートメント813、ウエスタン・アベニュー1番

(72)発明者 ジェローム・ピベット

フランス、エフ-75005パリ、リュ・マルブランシュ4番

審査官 高見 重雄

(56)参考文献 特表2001-509380(JP,A)

特表2002-505590(JP,A)

国際公開第2002/066992(WO,A1)

国際公開第2004/002627(WO,A1)

特表2006-507921(JP,A)

特表2008-518884(JP,A)

国際公開第2002/23163(WO,A1)

特開2001-078786(JP,A)

国際公開第2004/024917(WO,A1)

特表2006-521922(JP,A)

特表2006-522325(JP,A)

GRIFFITHS A D, THE EMBO JOURNAL, 英国, OXFORD UNIVERSITY PRESS, 2003年 1月 2日
 , V22 N1, P24-35

SONG, ANGEWANDTE CHEMIE, ドイツ, WILEY-VCH, 2003年 2月17日, V42 N7, P768-772

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/00-37/00

B01J 19/00

C07B 61/00

C12Q 1/00