

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4783422号
(P4783422)

(45) 発行日 平成23年9月28日(2011.9.28)

(24) 登録日 平成23年7月15日(2011.7.15)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 21/27	(2006.01)	GO 1 N 21/27	B
GO 1 N 21/41	(2006.01)	GO 1 N 21/41	Z
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 2 5 U
		GO 1 N 33/543	5 2 5 E
		GO 1 N 33/543	5 9 5

請求項の数 13 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2008-506705 (P2008-506705)
(86) (22) 出願日	平成18年4月12日(2006.4.12)
(65) 公表番号	特表2008-536148 (P2008-536148A)
(43) 公表日	平成20年9月4日(2008.9.4)
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/013926
(87) 国際公開番号	W02006/127167
(87) 国際公開日	平成18年11月30日(2006.11.30)
審査請求日	平成19年12月11日(2007.12.11)
(31) 優先権主張番号	60/670,524
(32) 優先日	平成17年4月12日(2005.4.12)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	503159210
	エス アール ユー バイオシステムズ, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 01801 マサチュー セッツ州 ウォーバーン, ジル ストリー ト 14 エー
(74) 代理人	230104019
	弁護士 大野 聖二
(74) 代理人	100106840
	弁理士 森田 耕司
(74) 代理人	100105991
	弁理士 田中 玲子
(74) 代理人	100114465
	弁理士 北野 健

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテオリピド膜及び脂質膜バイオセンサー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バイオセンサーの表面が酸化チタン、二酸化チタンまたはリン酸チタンであり、酸化チタン、二酸化チタンまたはリン酸チタン表面をシランで被覆して、酸化チタン - シラン、二酸化チタン - シランまたはリン酸チタン - シラン表面を形成するとともに、脂質二分子層または脂質単分子層が、酸化チタン - シラン、二酸化チタン - シランまたはリン酸チタン - シラン表面に固定化されている、比色共鳴バイオセンサーまたは格子型導波路バイオセンサー。

【請求項 2】

バイオセンサーが、マイクロタイタープレートの底部に組み込まれる、またはマイクロアレイフォーマット内にある、請求項 1 に記載のバイオセンサー。

【請求項 3】

バイオセンサーは、マイクロタイタープレートの底部に組み込まれるものであり、マイクロタイタープレートの各ウェルが約 5 mm^2 乃至約 50 mm^2 である、請求項 2 に記載のバイオセンサー。

【請求項 4】

脂質二分子層または脂質単分子層は、標識を有さない、請求項 1 に記載のバイオセンサー。

【請求項 5】

バイオセンサーが、一種またはそれ以上の界面活性剤でさらに被覆されている、請求項

10

20

1に記載のバイオセンサー。

【請求項 6】

酸化チタン - シラン表面、二酸化チタン - シラン表面またはリン酸チタン - シラン表面を、PEO(a) - PPO(b) - PEO(a)の形状でポリエチレンオキッド及びポリプロピレンオキッドとのブロック共重合体で被覆した、請求項1に記載のバイオセンサー。

【請求項 7】

比色共鳴バイオセンサーまたは格子型導波路バイオセンサーを用いた、脂質二分子層または脂質単分子層における化学的あるいは物理的相互作用を分析する方法であって、脂質層を種に接触させること、ならびに、(a)光の波長がシフトすると種が脂質層と相互に作用する場合には、バイオセンサーの照射に使用される光の反射波長における最大値または伝送波長における最小値を検出することにより、あるいは、(b)屈折率の変化が、種が脂質層と相互に作用したことを示した場合には、バイオセンサーの照射に使用される光の屈折率の変化を検出することにより、脂質層と種の相互作用を分析することが含まれるものであり、ここで、バイオセンサーは酸化チタン - シラン、二酸化チタン - シランまたはリン酸チタン - シラン表面を含み、脂質二分子層または脂質単分子層が酸化チタン - シラン、二酸化チタン - シランまたはリン酸チタン - シラン表面上に固定化されている、該方法。

10

【請求項 8】

バイオセンサーが、マイクロタイタープレートの底部に組み込まれる、またはマイクロアレイフォーマット内にある、請求項7に記載の方法。

20

【請求項 9】

バイオセンサーは、マイクロタイタープレートの底部に組み込まれるものであり、マイクロタイタープレートの各ウェルが約 5 mm^2 乃至約 50 mm^2 である、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

約 300 またはそれ以上の試料を約 10 分またはそれ以内で分析することが可能である、請求項7に記載の方法。

【請求項 11】

脂質層は、静止状態で種に接触する、請求項7に記載の方法。

30

【請求項 12】

脂質層と種との相互作用が、静止状態で分析される、請求項7に記載の方法。

【請求項 13】

脂質層及び種は、無標識である、請求項7に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権情報

本出願は、2005年4月12日に提出された、米国特許出願番号 第60/670,524号の利点をクレームするものであり、その全文は参照により本願に援用される。

40

我々は、膜タンパク質の付着を制御できるであろうことを種々の単一及び二重層の作成により実証してきた。脂質、ヘテロ及びホモ機能性脂質、リン脂質、コレステロール、単鎖及び二重鎖両親媒性物質、ミセル形成組成物、リボソーム形成物質、イオン性洗剤、陰イオン性洗剤、カチオン性洗剤、両性イオン性洗剤及びその他の試薬であって、膜結合タンパク質の付着及び折り畳みを可能とするための適切な環境の作成に必要とされるものを含むが、これに制限されることのない、様々な疎水性物質などの代替試薬を使用する当業者にとって、本発明は直接または前もってタンパク質に固定化された生体分子、小分子または試験用試薬の、該膜状環境におけるバイオセンサーに対する付着、折り畳み、ならびに結合性試験のためのツールとなるものである。

【背景技術】

50

【0002】

Biacore社のX、2000、3000、T100、S51及びCシステムなどの従来のバイオセンサー、または蛍光性に基づくアプローチなどの標識依存性の技術を用いた脂質分析は困難であるが、これは、当業者に既知のように、クエンチングまたは励起に関する様々な問題を抱える非極性環境において、標識がうまく働かないからである。さらに、標識は、脂質の検討に使用されるシステムを予測不能な方法で、さらに重要なことに望まない方法でしばしば混乱させる。Biacoreなどのフローベースシステムが、保持されるべき構造的に脆弱な環境をかき乱し、非極性環境にて測定を実施させる。その上、SPRフローフォーマットは非常に低い試料処理能力しか持たないために、適切な環境を構築するために膨大な時間を加え、適切なタンパク質の付着、アセンブリ及び折り畳みを可能とし、フロー環境において適正に付着し、折り畳まれているべきタンパク質との相互作用に対する試験への時間量を増加させる。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明の一実施形態では、比色共鳴バイオセンサーまたは格子型導波路バイオセンサーであって、バイオセンサーの表面が酸化チタン、二酸化チタンまたはリン酸チタンであるとともに、一つまたはそれ以上の非極性分子が酸化チタンまたはリン酸チタン表面に固定化されているものを提供する。この非極性分子は、脂質、ヘテロ機能性脂質、ホモ機能性脂質、リン脂質、コレステロール、単鎖の両親媒性物質、二重鎖の両親媒性物質、ミセル形成化合物、リポソーム形成物質、イオン性洗剤、陰イオン性洗剤、カチオン性洗剤または両性イオン性洗剤であっても構わない。非極性分子は非標識であっても構わない。バイオセンサーは、マイクロタイタープレートの底部に組み込むことが可能であり、あるいは、マイクロアレイフォーマット内とすることが可能である。バイオセンサーは、マイクロタイタープレートの底部に組み込むことが可能であり、マイクロタイタープレートの各ウェルは約 5 mm^2 乃至約 50 mm^2 である。酸化チタン、二酸化チタンまたはリン酸チタンの表面をシランで被覆して、チタン-シランまたはリン酸チタン-シラン表面を形成することが可能である。バイオセンサーを更に一種またはそれ以上の洗剤で被覆することが可能である。チタン-シラン表面またはリン酸チタン-シラン表面を、PEO(a)-PEO(b)-PEO(a)の形状でポリエチレンオキシド及びポリプロピレンオキシドとのブロック共重合体によって被覆することが可能である。

20

30

【0004】

本発明の別の実施形態では、脂質層における化学的あるいは物理的相互作用を分析する方法を提供し、ここで脂質層は比色共鳴バイオセンサーまたは格子型導波路バイオセンサーに固定化されている。この方法には、脂質層を種と接触させること、ならびに、(a) 光の波長がシフトすると種が脂質層と相互に作用する場合には、バイオセンサーの照射に使用される光の反射波における最大値または伝送波における最小値を検出する、あるいは、(b) 屈折率の変化が、種の脂質層との相互作用を示した場合には、バイオセンサーの照射に使用される光の屈折率の変化を検出することによって、脂質層と種の相互作用を分析することが含まれる。約300またはそれ以上の試料を約10分またはそれ以内で分析することが可能である。脂質層は、静止状態で種に接触することができる。脂質層及び種との相互作用を、静止状態で分析できる。脂質層及び種は無標識であっても構わない。

40

【0005】

本発明は、単位時間当たりのより多くの試料数/読み込みに対する脂質及び脂質ベースの分析を可能とする、マイクロタイタープレートベース内または、マイクロアレイフォーマット内のバイオセンサーを提供するものである。現在、単一器具上のリポソームSPRセンサーを使用した単結合の相互作用イベントに対する一般的な分析には、20乃至30分かかる。例えば、Bairdら、Analyt. Biochem. 2002年310巻：第93乃至99ページ、を参照されたい。本発明は、この時間での一つの器具上における4乃至 6×384 ウェルの試料に対するバイオセンサープレートの読み込みを可能にす

50

るだろう。有利なことに、本発明における検体用の標識は不要である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

Stenlundらは、市販のSPR装置内において活性膜結合タンパク質に対する好適な環境を作り上げようと試みることが困難であることを示している。Analyt. Biochem. 2003年、316巻：第243乃至250ページ、を参照されたい。一般的に、これらの装置は、フローベースの装置であり、これにより工程が複雑化する。Stenlundは、疎水性物質及び洗剤の適切な化合物が必須であり、実現しなければならないが、タンパク質の種類ごとに異なるものと思われ、実験的によってのみしか化合物を得られない。経済的に、時間及び金銭の両面から言えば、営利事業の制約内にいる科学者にとって、このタイプの開発は、複数のウェルのマイクロタイタープレートをベースとする、あるいはマイクロアレイスライドをベースとするフォーマット内に巨大な表面領域を提供する、比色共鳴バイオセンサーまたは格子型導波路バイオセンサーのような装置を用いることによってのみ達成できる。

10

【0007】

さらに、SPRタイプの装置は非常に直径が小さく（サンプリングスペースの技術面及び経済面に有意に規定される）、準最適な「混濁した」疎水性物質及び洗剤によって目詰まりしがちである。このタイプの目詰まりは、比色共鳴バイオセンサースライドまたはマイクロタイタープレートベースの装置、あるいは格子型導波路の装置では発生し得ない。また、比色共鳴バイオセンサーにおける混濁は、現在のSPR装置のような失敗に対する高いコストをもない。さらに、Stenlundが実証したように、彼らのアプローチによる活性タンパク質は、おそらく、元となるタンパク質含有細胞成分の不完全な可溶化の後、何かの事情で活性化されたものであろう。比色共鳴バイオセンサーまたは格子型導波路装置は、可溶化が弱いものの、活性タンパク質含有細胞成分をそのまま直接塗布することに対する、十分かつ実用的な表面を提供し、その結果、さらに別の経路によって活性タンパク質の割合をより高くするであろう。可溶化が弱い細胞成分は、おそらく彼らが採用した装置を目詰まりさせ、物質の適切な付着には不十分な表面領域を提供したため、この経路はStenlundのアプローチでは得られない。さらに、適切な付着ならびに生来の環境から除去されたタンパク質に結合した膜の折り畳みは、非常に顕著な時間的要因を有することが示されているが（Cantor及びSchimmel、parts 1-3 Biophysical Chemistry - The behavior and study of biological molecules、W. H. Freeman and Company、New York、1980年版、特に第25章、第1327乃至1371ページ：Introduction to Membrane Equilibria and to Bilayersを参照されたい）、この要因は、フロー装置には使用不能なことである。静的モードで作動する比色共鳴バイオセンサーまたは格子型導波路の装置は、より好ましいものと考えられ、これらによって付着及び折り畳みの進行のリアルタイム測定を行なうことが可能となる。

20

30

【0008】

本発明の一実施形態は、比色共鳴バイオセンサー及び/または格子型導波路バイオセンサー上で、非極性の環境または部分的な非極性環境における結合及び固定化イベントの測定を可能にすることである。例えば、Cunninghamら、“Colorimetric resonant reflection as a direct biochemical assay technique”、Sensors and Actuators B、第81巻、第316乃至328ページ、2002年1月5日；米国特許公開番号 第2004/0091397号；米国特許番号 第6,958,131号；米国特許番号 第6,787,110号；米国特許番号 第5,738,825号；米国特許番号 第6,756,078号を参照されたい。比色共鳴バイオセンサー及び格子型導波路バイオセンサーは、表面プラズモン共鳴バイオセンサーではない。

40

【0009】

50

比色共鳴バイオセンサーは、表面バイディングプラットフォームとして使用される比色共鳴回折格子表面を有する。光学構造を作り出すために導波モード共鳴現象が使用されるが、これは、白色光を点灯した際に、単一波長のみを反射するように設計されている。分子が表面に付着する際には、格子に連結される光の光学経路の変化によって、反射波(色)がシフトする。格子表面に対するレセプター分子の結合により、相補的に結合した分子は、いずれかの種類の蛍光プローブまたは粒子ラベルを使用せずに検出され得る。検出技術は、0.1 nm以下の厚さの結合剤の変化を解析することが可能であり、流体に浸した、あるいは乾燥させた格子表面で実施可能である。

【0010】

読み出しシステムは、例えば、光ファイバースコープを通じて、法線入射での格子の小さなスポットを照射する白色光ランプ、ならびに、こちらも法線入射での第二のファイバーを通じて反射した光を集める分光計により、例えば構成される。単一の分光計による読み出しは、それぞれ数ミリ秒単位で実施されるため、格子表面上で並行して発生する大量の分子間相互作用を迅速に測定することが可能であるとともに、リアルタイムで反応力学をモニターすることが可能である。光の反射波長の最大値または伝送波長の最小値は、バイオセンサーを照射するために使用することが可能であり、光の波長におけるシフトを検出することが可能である。格子ベースの導波路型バイオセンサーは、バイオセンサーを照射するために使用される光の屈折率における変化を検出することにより測定することが可能であるが、ここで、屈折率における変化は、種がバイオセンサー表面上の非極性分子と相互作用したことを示した。この技術は、例えば、多数の生体分子の相互作用が並行して測定されるアプリケーションにおいて、とりわけ、試験下において分子ラベルが分子の機能性を改変するか、あるいは阻害するであろう場合に有用である。標的タンパク質を有する医薬組成物ライブラリーのハイスループットスクリーニング、ならびにプロテオミクスのためのタンパク質-タンパク質の相互作用のマイクロアレイスクリーニングは、このアプローチにより得られた感受性及びスループットを必要とするアプリケーションの事例である。米国出願番号 第60/244,312号、2000年10月30日出願；米国出願番号 第09/929,957号、2001年8月15日出願；米国出願番号 第60/283,314号、2001年4月12日出願；米国出願番号 第60/303,028号、2001年7月3日出願；米国出願番号 第09/930,352号、2001年8月15日出願；米国出願番号 第10/415,037号、2001年10月23日出願；米国出願番号 第10/399,940号、2004年1月16日出願；米国出願番号 第10/059,060号、2002年1月28日出願；米国出願番号 第10/058,626号、2002年1月28日出願；米国出願番号 第10/201,818号、2002年7月23日出願；米国出願番号 第10/237,641号、2002年9月9日出願；米国出願番号 第10/180,374号、2002年6月26日出願；米国出願番号 第10/227,908号、2002年8月26日出願；米国出願番号 第10/233,730号、2002年9月3日出願；米国出願番号 第10/201,878号、2002年7月23日出願；米国出願番号 第10/180,647号、2002年6月26日出願；米国出願番号 第10/196,058号、2002年7月15日出願；米国出願番号 第10/253,846号、2002年9月25日出願；米国出願番号 第10/667,696号、2003年9月22日出願、もまた参照されたいが、これらはすべて、参照によりその全文を本明細書に援用する。

【0011】

比色共鳴バイオセンサー及び格子型導波路の表面は、高屈折率を有する物質、例えば、硫化亜鉛、二酸化チタン、酸化チタン、酸化タンタル及び窒化ケイ素であることが可能である。種々の表面化学は、脂質環境が要求されるタンパク質の試験をサポートするバイオセンサーのアセンブリに適合する。例えば、米国特許番号 第6,645,644号(有機ホスホン酸塩ならびに無機リン酸塩コート剤)；米国特許番号 第6,146,767号(自動アセンブリ化有機単分子層)；Gawaltら(2001年) Langmuir, Self-Assembly and Bonding of Alkaneph

10

20

30

40

50

osphonic Acids on the Native Oxide Surface of Titanium 17 (19), 第5736乃至5738ページ(チタニウムの自然酸化物表面上の溶液からのアルカンホスホン酸のアセンブリ後、穏やかに加熱することにより、強力に表面結合した、アルカン鎖が順序正しく並んだ酸のフィルムが作成される); Gawaltら (1999年) Langmuir, Enhanced bonding of alkanephosphonic acids to oxidized titanium using surface-bound alkoxycrinium complex interfaces 15:8929乃至8933ページ; Wangら (1998年) Advanced Materials Photogeneration of highly amphiphilic TiO₂ surfaces 10(2):135乃至138ページ; Folkersら (1995年) Langmuir, Self-assembled monolayers of long-chain hydroxamic acids on the native oxides of metals 11:813乃至824ページを参照されたい。本発明の一実施形態において、バイオセンサー表面はシラン、界面活性剤、ポリエチレンオキシドのブロック共重合体及びPEO(a)-PPO(b)-PEO(a)の形状のポリプロピレンオキシド、またはこれらの組み合わせで被覆されている。

【0012】

強力な紫外線領域に配置されるか、あるいは8時間を超えて水溶液中に浸漬させない限り、表面がもともと疎水性の性質を有しているため、比色共鳴バイオセンサーのTiO/TiO₂コーティングは、特にこのアプリケーションの影響を受けやすい。本明細書に記載の処理は、とりわけ、マイクロタイターまたはマイクロチップフォーマットにおいてラベルを使用することなく、細胞及び生命のプロセスの研究に関連する結合イベントの測定のための特殊な生物学的に関連する環境における結合イベントの研究を可能にする。脂質単分子層、脂質二分子層、脂質、リポソーム、プロテオリピド、脂質二分子膜、ミセル、膜結合タンパク質、リポタンパク質、細胞、細胞抽出物、合成による細胞由来の物質及び同等のもの(すなわち、非極性分子)は、本発明のバイオセンサー表面に固定化され得る。これらの非極性分子、例えば脂質層は、例えば、炭水化物、タンパク質、糖質及びその他の生体分子を含み得る。いったん固定化されれば、例えば、種(すなわち、化合物、脂質またはタンパク質のいずれかのタイプ)をバイオセンサー表面に添加することによる、脂質層をわたる受動的な薬剤吸収、タンパク質とフォスファチジルイノシトールの相互作用、ならびに膜受容体-リガンドの相互作用のアクセシビリティに、これらを使用することが可能である。図1及び図2を参照されたい。本発明の一実施形態において、非極性分子、種、あるいは非極性分子及び種の両者はラベル化されない。

【0013】

特に、膜結合タンパク質、とりわけ、製薬会社及びバイオテクノロジー企業により最重要とされる薬剤ターゲットである、G-タンパク質共役受容体(GPCR)として知られている膜結合タンパク質の研究に関連する一連のすべての作業を、本発明は可能にするものである。GPCRを、例えば、バイオセンサー表面上の脂質膜の状態、比色共鳴バイオセンサー表面または格子型導波路バイオセンサーに固定化することが可能であり、阻害剤結合を検出することが可能である。本発明に関する、別の治療上重要なクラスのタンパク質は、細胞内および細胞間シグナルを制御するイオンチャンネル及び細胞表面タンパク質である。薬剤、その他の膜に結合または関連するタンパク質と相互に作用し、細胞、シグナルタンパク質、代謝産物に結合するかあるいは結合せず、細胞内の複数の組成物との相互作用を誘発するなど、これらの相互作用に関連する変化を起こすため、一連の作業には、本来の環境におけるこれらのタンパク質の研究が含まれる。その他の非極性物質を、結合相互作用分析を目的として、これらの表面に固定化することが可能である。

【0014】

本発明に関する機能的有利には、例えば、マイクロタイターウェル中でラベル化されていない、これらの本来の環境におけるこれらのタンパク質、脂質、脂質ベースの分子及び

10

20

30

40

50

その他の非極性物質が含まれる。結合相互作用または構造変化は、本発明の組成物及び方法を使用して定量化することができる。

【0015】

いずれのサイズまたは厚さの脂質層であっても、比色共鳴バイオセンサー表面、例えば、実施例1に記載されているような疎水性の比色共鳴バイオセンサー表面上に作成することができる。例えば、脂質単分子層（例えば、POPCリポソームまたはTaO上のミセル）、脂質二分子層（例えば、アンカーリポソームに対する（アルカン類など）親油基を含むヒドロゲル）；脂質二分子層に結合する、Lahiriの両親媒性アンカー脂質表面（Langmuir、2000年、第16巻、7805乃至7810ページ）；SA表面上のビオチン化リポソーム（Bieriら、Nature Biotech.、1999年、第17巻、第1105乃至1108ページ）；プロテオリピド二分子層（洗剤可溶性GPCRを方向性を持たせながら表面に付着させ、洗剤を除去する間に脂質ミセルを用いて固定化されたGPCRの周囲に脂質膜を再構築する）（Analyt. Biochem. 2002年1月15日；300（2）：132乃至8ページ；過剰発現した受容体を含む膜画分を使用）。脂質表面もまた、例えば、Bairdら、Analyt. Biochem. 2002年 310：93乃至99ページ；Stenlundら、Analyt. Biochem. 2003年 316：243乃至250ページ；Abdiche及びMyszka、Analyt. Biochem. 2004年 328：233乃至243ページ；Fergusonら、Bioconjugate Chem. 2005年 16：1457乃至1483ページ；米国特許番号 第6,756,078号に記載されている。

10

20

【0016】

PEG2000、DPPE脂質に付着したPEG5000、DPPE脂質に付着したPEG2000-ビオチン、脂質上のカルボキシ-NHS PEG、POPC（1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン；分子量 760.1；avanti 850457）、PE-rhod（ジアシルホスファチジルエタノールアミン-lissamineローダミン B；18：1；分子量 1259.11；avanti 810150；exc. 550 em. 590）リポソーム外部での蛍光）、MPEG-5000-PE（1,2 ジパルミトイルsn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ（ポリエチレングリコール）-5000；分子量 5727；avanti 880200]、MPEG-2000-PE（1,2 ジパルミトイルsn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ（ポリエチレングリコール）-2000；分子量 2731.39；avanti 880160]、PE-NBD（18：1,12：0-N-NBD、ホスファチジルエタノールアミン-NBD；分子量 1259.11；avanti 810133；exc. 460 em. 534）リポソーム内部の蛍光）などの脂質はバイオセンサー表面に固定化することが可能である。

30

【0017】

比色共鳴バイオセンサーまたは格子型導波路バイオセンサー表面上の脂質の被覆範囲は、例えば、蛍光脂質をリポソームに組み込み、蛍光シグナルを調べる脂質単分子層及び二分子層に対する予測シグナルのモデルを使用することにより、あるいはBSA結合をモニターすることにより（密集した脂質表面はBSA結合への抵抗性を有する）分析が可能である。

40

【0018】

本発明の一実施形態において、本発明のバイオセンサーは、例えば液体を含有する容器の底部表面のように内表面を含有していても構わない。液体を含有する容器は、例えば、マイクロタイタープレートウェル、試験管、ペトリ皿またはマイクロ流体チャンネルであっても構わない。本発明の一実施形態は、いずれかのタイプのマイクロタイタープレートに組み込まれたバイオセンサーである。例えば、バイオセンサー表面上の反応容器の壁面をアセンブリすることによって、マイクロタイタープレートの底部表面にバイオセンサー

50

を組み込むことが可能であり、これによって各ウェルは個別の試験用試料に曝露することが可能となる。したがって、それぞれのマイクロタイタープレートウェルは、別々の反応容器として機能することが可能である。したがって、反応流体が混ぜ合わされずに、それぞれの化学反応を隣接するウェル内で発生させることが可能であり、化学的に異なる試験溶液をそれぞれのウェルに入れることが可能である。

【0019】

医薬的な高スループットスクリーニング研究所、分子生物学研究所ならびに診断分析研究所にとって、最も一般的な分析フォーマットは、マイクロタイタープレートである。このプレートは標準サイズのプラスチックカートリッジで、格子内に配列された96、384または1536個の各反応容器を含んでいる。これらのプレートの標準的なメカニカル構造により、液剤の分注、ロボットによるプレート処理、ならびに検出システムはこの一般的なフォーマットと共に作動するように設計されている。本発明のバイオセンサーは、標準マイクロタイタープレートの底表面に組み込むことが可能である。バイオセンサー表面を広範囲に作ることが可能であり、読み出しシステムがバイオセンサー表面と物理的に接触しないことから、任意の数の各バイオセンサー領域を特定することができるが、このバイオセンサー領域は、照明光学系の焦点解析及びバイオセンサー表面にわたる照明/検出プローブをスキャンするx-y局面によってのみ限定される。マイクロタイタープローブの各ウェルは、例えば約1mm²を超えるものであるか、あるいは、約5、10、15、20、30、50、100mm²またはこれを超えるものであってもよい。

【0020】

本発明の別の実施形態において、バイオセンサーはマイクロアレイフォーマットである。一つまたはそれ以上の異なる非極性種(例えば、脂質)「スポット」は、バイオセンサー上の異なる位置のマイクロアレイ中に配置される。非極性種スポットのマイクロアレイは、表面には多くの異なる位置が含まれ、それぞれが異種の非極性種スポットまたは異なる量の非極性種スポットを伴うようなバイオセンサーの表面上に一つまたはそれ以上の非極性種スポットを含有している。例えば、一つのアレイには1、10、100、1,000、10,000または100,000ヶ所の異なる位置を含むことが可能である。x-y座標中の標準的な格子パターン内には、一つまたはそれ以上のスポットが通常設計されていることから、このようなバイオセンサー表面はマイクロアレイと呼ばれている。しかしながら、本発明のマイクロアレイは、規則または不規則なパターンのいずれかの型で設計された、一つまたはそれ以上のスポットを含有することが可能である。例えば、異なる部位は一つまたはそれ以上の特定の非極性種のスポットのマイクロアレイを特定することができる。

【0021】

本発明のマイクロアレイの一例は、核酸マイクロアレイであり、アレイ内のそれぞれの異なる位置に異なる核酸分子を含んでいる。この実施形態において、核酸マイクロアレイ内のスポットは、テスト試料中の核酸の対立ストランドとの相補的な化学結合を検出する。

【0022】

本発明の一実施形態において、一つの読み取り機を用いて、約100、200、300、400、500、1,000、2,000またはそれ以上の各ウェルまたは試料を、約5、10、20、30、40、50、60分またはそれ以下の時間で分析することが可能である。

【0023】

本明細書に具体的に記載される本発明は、本明細書に特に記載されていないようないずれかの構成要素(単数または複数)または制限(単数または複数)なしに、適切に実施することができる。したがって、本明細書中の各事例において、例えば、「...を含む(c o m p r i s i n g)」、「...を必須として含む(c o m p r i s i n g e s s e n t i a l l y o f)」、「...よりなる(c o n s i s t i n g o f)」の用語は、いずれも他の二つの用語に置き換えても構わない。採用された用語及び表現は、記載上の用語とし

10

20

30

40

50

て制限されずに使用されるものであり、このような用語及び表現の使用において、図示され、記載される特徴またはこれらの一部と同等のものを排除することを意図するものではなく、クレームされる本発明の権利範囲内において様々な変更が可能であると認識される。したがって、本発明は好適な実施形態により具体的に開示されるものの、本明細書に開示される概念のオプション機能は、当業者により行なわれてもよく、こうしたオプション機能は、明細書の記載及びこれに付随する特許請求の範囲により定義される本発明の範囲内としてみなされるものであると解釈されるべきである。

【0024】

さらに、本発明の特徴及び態様がマーカッシュグループまたは代替となるその他のグループの用語として記載されている場合、当業者であれば、本発明は、いずれも個別あるいはサブグループとしての構成要素としても記載されるものであることに気付くであろう。

【実施例】

【0025】

以下は、例証することを目的としているだけであり、先の広義語で記載される本発明の権利範囲を制限することを目的とするものではない。この開示において引用されるすべての参考文献は、参照により本願明細書に援用される。

【0026】

<実施例1：安定した疎水性バイオセンサー表面>

安定した疎水性比色共鳴バイオセンサー表面は、撥水シラン (Amer sham Biosciences 17-1332-01) を、比色共鳴バイオセンサーTiO₂表面を含むウェル、例えば、96-ウェルプレートに注入することにより調製することができる。7分間インキュベーションを行なう。90 μ lのヘキサン(無水)(Sigma 227064)を各ウェルに注入する。90 μ lのシラン混合物を、マルチチャンネルピペットを用いて吸引する。90 μ lのヘキサン(第2回目の注入)をウェルに注入する。90 μ lのシラン混合物(第2回目の吸引)を、マルチチャンネルピペットを用いて吸引する。90 μ lのヘキサン(第3回目の注入)をウェルに注入する。ウェルに残っている全溶液を、真空ポンプに接続した8チャンネルステンレススチール製の多岐管を用いて吸引する。最終吸引後、バイオセンサーを空气中に戻す。100 μ lのPBSでプレートを二回洗浄した後、プレートに100 μ lのPBSを充填する。エネルギーをプレート中にわたって均一に分散させるために超音波処理浴内でプレートを前後に動かしながら、5乃至10秒間、プレートを超音波処理する。N₂ガンを使用し、プレートの裏面を乾燥させる。

【0027】

【表1】

実施例2：疎水性シランセンサー処理Poly-Phe-Lys沈着試験

表1

PPL	プレート1			プレート2			プレート3			プレート4			プレート5		
	シフト t	S D	%CV	シフト t	S D	%CV	シフト t	S D	%CV	シフト t	S D	%CV	シフト t	S D	%C V
なし	4.0	0.1	3.5	4.1	0.1	3.4	4.0	0.1	3.3	4.1	0.1	3.3	4.1	0.1	2.9
ヘキサン	4.2	0.1	2.5	4.2	0.1	2.9	4.0	0.1	2.8	4.1	0.1	2.5	4.1	0.1	2.8
撥水	4.8	0.6	12.6	4.8	0.6	12.1	4.6	0.2	5.0	6.0	1.6	26.4	6.8	1.6	23.1

各報告数用のNは32ウェルである。

【0028】

マイクロタイターバイオセンサープレートのウェル中で、50 μ lの撥水シランを処理時間7分間でインキュベートすることにより、比色共鳴バイオセンサー表面を撥水シラン(オクタメチルシクロテトラシロキサン中2% w/v)で処理した。シラン溶液を吸引し、表面を90 μ lのヘキサンの3回洗浄した。ヘキサンによる最終洗浄後、プレートを

乾燥させることにより、マイクロタイターバイオセンサープレートを処理した。プレートを pH 7.4 の PBS で 3 回洗浄した。シラン処理を行ったバイオセンサー表面に PPL を沈着させた。40 μ l の 0.1 mg/ml PPL を含む pH 9.05 の 10 mM リン酸ナトリウムを、マイクロタイターバイオセンサープレートの各直径 6 mm のウェルに加えた。マイクロタイターバイオセンサープレートを室温で一晩乾燥させた。プレートを PBS で 3 回洗浄した。

【0029】

TiO₂ 表面への poly - phe - lys の付着の増加により証明されたように、撥水シランを用いたバイオセンサー表面の処理により、バイオセンサー表面の疎水性特性が増加した。ヘキサシラン洗浄よりも撥水処理のほうがより有効な疎水性表面処理である。図 3 及び表 1 を参照されたい。

10

【0030】

【表 2】

ストレプトアビジン結合-PPL 及びアルデヒド処理後

表 2

SA	プレート1			プレート2			プレート3			プレート4			プレート5		
	シフト t	S D	%C V	シフト t	S D	%C V	シフト t	S D	%C V	シフト t	S D	%C V	シフト t	S D	%C V
なし	3.2	0.1	4.1	3.1	0.1	4.3	3.0	0.1	4.6	3.3	0.4	11.1	3.3	0.2	4.7
ヘキサシラン	3.4	0.2	5.1	3.3	0.1	3.7	3.1	0.1	4.5	3.5	0.2	4.5	3.5	0.1	4.3
撥水	3.9	0.1	3.8	3.8	0.2	4.8	3.6	0.2	6.1	3.9	0.2	4.0	3.8	0.2	4.4

20

各報告数用の N は 32 ウェルである。

【0031】

撥水コーティングの目的は、TiO₂ の疎水性特性を増加させることであり、これは、生体膜環境を形成するための表面にとって必要な特性である。適切な撥水コーティングは、フェニルアラニン残基及び撥水シランとの非極性相互作用を介して、被験（タンパク質）ポリマーである poly - phe - lys のバイオセンサーに対する吸着作用の増加をもたらす。適切なタンパク質の付着及び折り畳みをサポートするだろうバイオセンサー上の膜状環境を作り上げるためには、表面が疎水性の撥水タイプであることが重要である。この場合、リジン上の（フェニルアラニン - リジンのポリマーにおけるアミノ酸残基は、疎水性相互作用に関与しない）アミンは、続いて化学的に変化して、次に他のタンパク質と共に（それらの第 1 級アミンを通じて）シッフ塩基を形成し得るアルデヒド基となる。

30

【0032】

50 μ l の 0.1 mg/ml ストレプトアビジンを含む pH 5.0 の酢酸ナトリウムを、マイクロタイターバイオセンサープレートにおける直径 6 mm の各ウェルに加えた。この溶液をウェル中で 1 時間インキュベートした後、pH 5.0 の酢酸ナトリウムで 3 回洗浄した。結果を図 4 及び第 2 表に示す。表 2 のデータは、疎水性コーティングの均質な層がバイオセンサー上に形成されたこと、この塗布された層の均質な化学的修飾、ならびに、これに続くバイオセンサーへの更なる機能的タンパク質層の付着を示している。

40

【0033】

【表 3】

撥水シラン処理後のPoly-Phe-Lys対Poly-Lys付着

表 3

ポリマー	シフト(nm)	S _D (標準偏差)	%CV	N
PPL	4.42	0.13	2.9	96
PLL	0.73	0.13	17.5	96
PLL	0.76	0.19	25.3	96
PLL	0.68	0.12	17.7	96
PLL	0.80	0.14	17.6	96

10

【0034】

50 μ l の撥水シランを7分間でバイオセンサーマイクロタイタープレートのウェルに加えた。このシランを吸引し、90 μ l のヘキサンでバイオセンサーを3回洗浄した。ヘキサンによる最終洗浄後、マイクロタイターバイオセンサープレートを5分間処理した。プレートをpH 7.4のPBSで3回洗浄した。40 μ l の0.1 mg/ml PPLを含むpH 9.05の10 mM リン酸ナトリウムを、ウェルに加えた。バイオセンサープレートを室温で一晩乾燥させて、プレートをPBSで3回洗浄した。

【0035】

図5及び表3は、バイオセンサー表面との静電相互作用によるものではなく、むしろバイオセンサー表面の疎水性特性によって結合が操作されることを示している。poly-phe-lys (PPL) 及び poly-lys-lys (PLL) の二つのポリマーは、PPL内に疎水性フェニルアラニンの残基の存在を除けば、ほぼ同一である。リジン残基はプラスに帯電しており、ポリマーの結合に影響を与える可能性があると共に、バイオセンサーへの付着におけるこの態様を試験するために使用される。本実施例において、PPLに比べて非常に付着が少ないことから証明されるように、リジン上の帯電は明らかに、バイオセンサーへのポリマーの付着に関する主たる原動力ではない。バイオセンサーは疎水性にコーティングされており、この実施例のタンパク質(PPL)のようなその他の疎水性ポリマーを引き付けて吸収する。

20

【0036】

<実施例3：撥水シラン処理によるPPL結合性の改善>

30

撥水処理の前に、バイオセンサープレートをO₂プラズマ処理した。バイオセンサープレートの直径6 mmウェル内で、50 μ l の撥水シランによる7分間のインキュベーション処理を行なった。残存するシランを吸引し、90 μ l のヘキサンでバイオセンサーを3回洗浄した。最終ヘキサン洗浄後、バイオセンサープレートを5分間処理した。バイオセンサープレートをpH 7.4のPBSで3回洗浄した。pH 6.0、7.4、9.0及び10.1の10 mM NaH₂PO₃緩衝液中において、0.1 mg/ml PPL溶液を調製したが、これらの緩衝液は、pH 4.0の11 mM NaH₂PO₃緩衝液を1 MのNaOHで調節することにより調製された。40 ml のPPL溶液をバイオセンサープレートのウェルに加え、室温で一晩乾燥させた。バイオセンサープレートをPBSで3回洗浄した。図6は、モデルタンパク質であるPPLの捕捉を改善することを目的とした、疎水性コーティングの最適化の結果である。

40

【0037】

<実施例4：撥水シラン処理による表面の疎水性特性の増大>

撥水処理前に、バイオセンサーにO₂プラズマ処理を行なった。バイオセンサー物質の一部に、撥水シランによる7分間のインキュベーション処理を行なった。残存するシランを吸引し、バイオセンサーをヘキサンで3回洗浄した。最終ヘキサン洗浄後、バイオセンサーを5分間処理した。その後バイオセンサーをpH 7.4のPBSで3回洗浄した。水接触角測定を、AST製品(Billerica, MA)である水接触角測定装置を使用して行なった。図7を参照されたい。

【0038】

50

水接触角試験の結果より、バイオセンサー表面に疎水性表面が形成されたことがさらに立証された。水接触角がより高くなると、表面がより疎水性となることが示される。このタイプの試験では、脂質試験における調製に用いるバイオセンサー表面上のさまざまな層の形成の確認が、比色共鳴バイオセンサーで容易に実施されるが、非常に狭い表面領域（通常は 1 mm^2 以下）を有し、提供されるフローセルの密封性を有する市販のSPRフロー装置上でこれを実施することは、はるかに難しい。本発明は、一般的に表面領域が最大約 28 mm^2 で、完全に開放されており、このタイプの測定及びその他の定量的な表面解析（すなわち、X線光電子分光（XPS）、エネルギー分散型分光（EDS）、原子間力顕微鏡（AFM））は容易に実施される。

【0039】

10

【表4】

表4. PLURONIC®界面活性剤は、PEO (a)-PPO (b)-PEO (a)の形状のポリエチレンオキシド及びポリプロピレンオキシドのブロック共重合体である。

Pluoronicの種別	a-b	a-bの分子量、Da
F68F	80-27	7680-9510
F108NF	141-44	12700-17400
F127NF	101-56	9840-14600

20

【0040】

TiO表面のPLURONIC（登録商標）修飾

PLURONIC（登録商標）界面活性剤の1%溶液を水中で作製した。この溶液の $100\text{ }\mu\text{l}$ を非加工TiOもしくは疎水性TiO（撥水シラン修飾）ウェルに分注する。この界面活性剤を2時間かけてセンサー表面に吸収させた。その後バイオセンサーを水で3回洗浄した。

【0041】

バイオセンサー表面へのタンパク質結合

0.1 mg/ml でストレプトアビジン溶液を含むPBSを作製した。この溶液の $100\text{ }\mu\text{l}$ をウェルに分注した。ウェル内の溶液を1時間インキュベートした。結合しなかった物質を除去してバイオセンサーをPBSで3回洗浄した。

30

【0042】

種々のタンパク質密度による表面の作製

1 mg/ml 乃至 0.001 mg/ml の様々な濃度のPLURONIC（登録商標）F127を水中で作製した。 $100\text{ }\mu\text{l}$ のPLURONIC（登録商標）溶液を、疎水性処理済みTiO（撥水シラン修飾）ウェルに分注した。この界面活性剤を2時間かけてセンサー表面に吸収させた。液体界面活性剤を除去し、バイオセンサーを水で3回洗浄した。 $100\text{ }\mu\text{l}$ のストレプトアビジン溶液（PBS中 1 mg/ml ）を、PLURONIC（登録商標）でコーティングしたウェルに分注して、1時間インキュベートした。ストレプトアビジンを除去してバイオセンサーをPBSで3回洗浄した。

40

【0043】

PLURONIC（登録商標）界面活性剤は、生体膜が細胞環境中にパーティションを形成し、極性部分から非極性部分などの分子種の一つのタイプを分離するのと同様の方法でミセルを形成する、非イオン性洗剤である。このことによって、これらは、バイオセンサー上に、混成（mixed）極性タンパク質（すなわち、いくらかの極性領域及びいくらかの非極性領域を有するタンパク質）の適切な付着及び折り畳みが行なわれるような環境を作るための、適切なモデル及び試薬となる。

【0044】

撥水コート化TiOに対するPLURONIC（登録商標）結合

X 図8は、界面活性剤（ポリプロピレンオキシド）の疎水性ブロックと疎水性撥水表面

50

との好ましい相互作用に起因した、より多量の P L U R O N I C (登録商標) 界面活性剤結合を示している。P L U R O N I C (登録商標) ウェルに対しては $N = 24$ 、ならびに、対照ウェルに対しては $N = 8$ 。

【0045】

1. P L U R O N I C (登録商標) バイオセンサーは、T i O に対するタンパク質結合の低下を示す。

図9は、P L U R O N I C (登録商標) 界面活性剤の分子量の関数として、非加工 T i O に対するストレプトアビジン結合の減少を示している。バイオセンサーへの P L U R O N I C (登録商標) 洗剤吸着の効果、ならびに、撥水層の表面上における P L U R O N I C (登録商標) 層の形成、したがって、バイオセンサー上に二重の層(すなわち、撥水性の疎水性層及び P L U R O N I C (登録商標) の疎水性層) が形成されたことを実証している。このことは、二重層に修飾されたセンサー表面に対するタンパク質の付着及び付着密度の制御能をさらに実証している。P L U R O N I C (登録商標) ウェルに対しては $N = 24$ 、ならびに、対照ウェルに対しては $N = 8$ 。

10

【0046】

2. P L U R O N I C (登録商標) 界面活性剤は、T i O 及び撥水コート化 T i O に対するストレプトアビジンの結合能を低下させる。

図10は、より高密度の P L U R O N I C (登録商標) を吸着した表面は、その下の疎水性 T i O 表面に対するストレプトアビジン結合を低下させることを示している。対照表面には非加工 T i O 及び撥水修飾 T i O が含まれる。P L U R O N I C (登録商標) ウェルに対しては $N = 24$ 、ならびに、対照ウェルに対しては $N = 8$ 。

20

【0047】

3. P L U R O N I C (登録商標) 層濃度の濃度を变化させることにより種々の密度のストレプトアビジンを作製するために使用された、P L U R O N I C (登録商標) が吸着された表面。

P L U R O N I C (登録商標) 界面活性剤は、撥水修飾表面に対するタンパク質結合量を制御するために使用できる。吸着された P L U R O N I C (登録商標) 層であって、その中に分散させたタンパク質を含むものは、対象のタンパク質を正確に選択することによって、ならびに、吸着された界面活性剤層中の隙間のタンパク質に適するように P L U R O N I C (登録商標) 層の密度を注意深く操作することによって、膜結合タンパク質のためのモデルシステムとして使用することができるであろう。表11は種々の P L U R O N I C (登録商標) 修飾表面に対するストレプトアビジン結合を示している。タンパク質の結合量は、P L U R O N I C (登録商標) 密度の低下にしたがって、特定の臨界濃度に減少し、その後 P L U R O N I C (登録商標) コーティングの完全性/連続性の関数として増加する。

30

【0048】

図12における B I N D I m a g e r ^{T M} 画像は、P L U R O N I C (登録商標) コート化表面上に様々な表面密度のストレプトアビジンを有するウェルを示している。

【0049】

洗剤 T W E E N (登録商標) 20 の結合

40

p H 7 . 4 の P B S でバイオセンサープレートを3回洗浄した。P B S を除去し、新たな溶液を加えて25乃至40分間インキュベートを行なった。

a P B S

b 2 . 5 % の D M S O を含む P B S

c 2 . 5 % のグリセロールを含む P B S

d 0 . 5 % の T W E E N (登録商標) 20 を含む P B S

e 5 % の D M S O を含む P B S

プレートは P B S で10回洗浄した。

【0050】

合成膜状環境の組成において洗剤は重要な試薬である。図13は、バイオセンサー表面

50

に安定した洗剤の吸着を集めることが可能であることを示している。T W E E N (登録商標) は、極性の先端及び非極性の末端を有する非イオン性洗剤である。バイオセンサー表面の化学的性質は、膜状環境の構成においてT W E E N (登録商標) を正しく位置づけるように必要に応じて操ることができる。

【 0 0 5 1 】

シラン層の密度を増加させるためのリン酸を用いたT i O₂表面の修飾

リン酸を含む環境は、生体脂質の重要な特性である。これらは一般的に脂質のヘテロ機能要素として発見されるものであり、非極性区画を隔離するように脂質を隔離し、正しく位置づける。本実施例では、バイオセンサーと膜状環境との結合した成分を保持していることが示されており、とりわけ、これは脂質試験の支持表面である、シラン機能性を有するリン酸塩の二層構造に関連している。

10

【 0 0 5 2 】

帯電した活性リン酸チタン(T i P)層を得るためのT i O₂表面の修飾用プロトコル

T i O₂コート化B I N D B I O S E N S O R (登録商標) 試料を、0 . 0 1 4 5 MのH₃ P O₄溶液を含む水中で、様々な期間で浸した。バイオセンサー試料をリン酸浴から取り除き、水で十分に洗浄した。試料を8 0 °Cで1 8時間乾燥させ、さらなる解析及び修飾まで貯蔵した。アミノプロピルトリメトキシシランの1 %溶液を、9 5 %エタノール中で新たに作成した。新たに作成したアミノプロピルトリメトキシシラン溶液を含む9 5 %エタノール中に、バイオセンサーストリップを一分間浸し、エタノールで4回洗浄して窒素下で乾燥させた。バイオセンサーストリップを、アルミ箔パッケージ中で6 5 %の相対湿度にて一晩貯蔵した。表5は、T i P及びシラン修飾T i P表面のX P S結果を示す。

20

【表5】

表5

表面	Ti	C	N	O	Si	P
TiO	12.8	29.0	6.5	45.0	6.7	0.0
TiO/SiO ₂	0.0	30.0	6.6	42.3	21.2	0.0
H ₃ PO ₄ /15分間	7.6	30.9	4.9	46.6	5.4	4.6
H ₃ PO ₄ /30分間	7.4	30.4	6.6	45.7	5.9	4.0
H ₃ PO ₄ /1時間	9.6	24.3	5.3	51.2	5.6	4.1
H ₃ PO ₄ /2時間	7.9	29.4	6.7	47.0	7.0	2.1

30

【 0 0 5 3 】

S iの欄は、H₃ P O₄による2時間の表面修飾に対する、最も高いシラン含有量を用いたT i P修飾の機能として、シラン含有量が増加することを示している。シラン及びリン酸は明らかに存在している。表6のデータはX P Sの結果による原子百分率を、リン及びチタンを考慮せずに、また、X P Sスペクトラム中のシランのみの寄与を考慮せずに正規化されたことを示している。

【表 6】

表 6

3-アミノプロピルトリメトキシシラン

元素	化学量論	相対%	TiO	H ₃ PO ₄ /15分間	H ₃ PO ₄ /30分間	H ₃ PO ₄ /1時間	H ₃ PO ₄ /2時間
C	3.0	37.5	29.0	30.9	30.4	24.3	29.4
O	3.0	37.5	45.0	46.6	45.7	51.2	47.0
N	1.0	12.5	6.5	4.9	6.6	5.3	6.7
Si	1.0	12.5	6.7	5.4	5.9	5.6	7.0
合計	8.0	100.0	87.2	87.8	88.7	86.4	90.1

リン及びチタンなしに正規化

元素	化学量論	相対%	TiO	H ₃ PO ₄ /15分間	H ₃ PO ₄ /30分間	H ₃ PO ₄ /1時間	H ₃ PO ₄ /2時間
C	3.0	37.5	33.3	35.2	34.4	28.2	32.6
O	3.0	37.5	51.7	53.1	51.6	59.4	52.2
N	1.0	12.5	7.5	5.6	7.5	6.1	7.4
Si	1.0	12.5	7.7	6.1	6.7	6.5	7.8
合計	8.0	100.0	100.3	100.0	100.2	100.2	100.0

正規化因子 = 1.1 1.1 1.1 1.2 1.1

【 0 0 5 4 】

H₃PO₄ 修飾表面のシラン含有量はTiO表面と類似するものの、二つの表面のアミン基の活性が異なることは、グルタルアルデヒド修飾試薬を使用したアミノ-シラン修飾表面のアルデヒド反応の範囲を測定することにより実証されたとおりである。表6に示される窒素(N)及びシリコン(Si)の有意な存在は、目的の物質である3-アミノプロピルトリメトキシシランによるバイオセンサー表面への安定した適用及び修飾を実証している。実際、これらの二つの要素の存在は、目的の物質の安定な追加による以外に、解析される表面深度において予測されていなかった。

【 0 0 5 5 】

図14は、シラン修飾TiO及びTiO/SiO₂表面のアルデヒド修飾に対するBIND BIOSENSOR(登録商標)シグナルである。N=1プレート(96ウェル)。

【 0 0 5 6 】

図15は、TIP修飾シラン表面に対するより高いBIND BIOSENSOR(登録商標)PWVシフトにより実証されるように、アルデヒド修飾における改善を示している。この結果は反復可能である。N=1プレート(96ウェル)。

【 0 0 5 7 】

図16は、リン酸処理を行なった試料を80℃で18時間乾燥させた場合のTIP層の永続性を示している。室温で乾燥させた試料は時間の関数として水接触角の結果を用いて比較した。非アニール化試料が生来のTiO₂表面の高接触角(約60乃至70)特性に戻る一方、安定した低接触角が長時間保持されることによって実証されているように、アニール化した試料が疎水性表面を維持する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 8 】

【図1】図1は、例えばSRU Biosystems BIND(登録商標)バイオセンサーなどの、比色共鳴バイオセンサーへの脂質の塗布を示している。

【図2】図2は、リポソーム作成の工程を示している。

【図3】図3は、撥水シランは、ヘキサン洗浄に比べより効果的な疎水性表面処理であることを示している。

【図4】図4は、PPL及びアルデヒド処理後のストレプトアビジン結合を示している。

【図5】図5は、シラン除去処理後のPoly(ポリ)-Phe-Lys対Poly(ポリ)-Lys付着を示している。

10

20

30

40

50

【図6】図6は、モデルタンパク質PPLの捕捉を改善するための疎水性コーティングの最適化の結果を示している。

【図7】図7は、シラン除去処理を行ったバイオセンサーに対する水接触角の測定結果を示している。

【図8】図8は、界面活性剤（ポリプロピレンオキシド）の疎水性ブロックと疎水性撥水表面との間の好適な相互作用に起因する、より多量のPLURONIC（登録商標）界面活性剤結合性を立証している。PLURONIC（登録商標）ウェルに対し $N = 24$ 、対照ウェルに対し $N = 8$ である。

【図9】図9は、PLURONIC（登録商標）界面活性剤の分子量の作用としての非加工TiO₂に対するストレプトアビジン結合の減少を示している。

10

【図10】図10は、表面に吸収されている、より高密度のPLURONIC（登録商標）が、その下の疎水性TiO₂表面に対するストレプトアビジン結合を減少させることを示している。対照の表面には、非加工TiO₂及び撥水修飾したTiO₂が含まれる。PLURONIC（登録商標）ウェルに対し $N = 24$ 、対照ウェルに対し $N = 8$ である。

【図11】図11は、種々のPLURONIC（登録商標）修飾表面へのストレプトアビジン結合を示している。

【図12】図12は、PLURONIC（登録商標）による被覆表面上における、異なる面密度のストレプトアビジンを使用したウェルを明示するBIND ImagerTMの画像を示している。

【図13】図13は、安定した洗剤吸収により、バイオセンサー表面をアセンブリすることができることを示している。

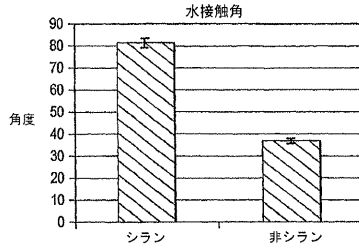
20

【図14】図14は、シラン修飾TiO₂及びTiO₂/SiO₂表面のアルデヒド修飾に対するBIND BIOSENSOR（登録商標）シグナルを示している。 $N = 1$ プレート（96ウェル）。

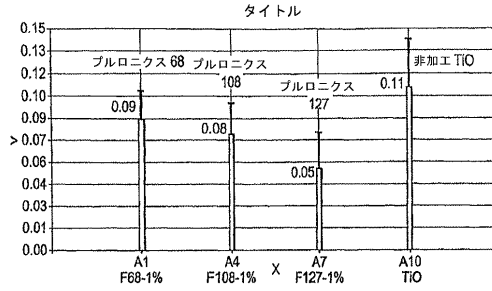
【図15】図15は、TIP修飾シラン表面に対する、より高いBIND BIOSENSOR（登録商標）PWVシフトにより証明されたアルデヒド修飾における改良を示している。結果は反復可能である。 $N = 1$ プレート（96ウェル）。

【図16】図16は、リン酸で処理した試料を80℃で18時間乾燥させた場合の、TiP層の不変性を示している。

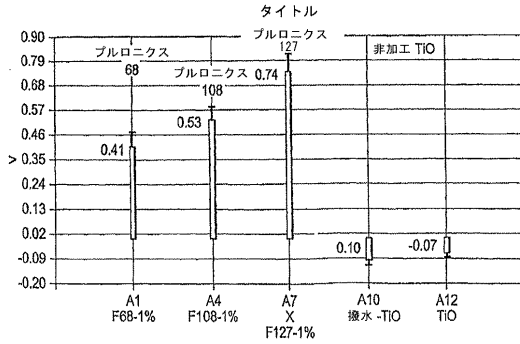
【図7】



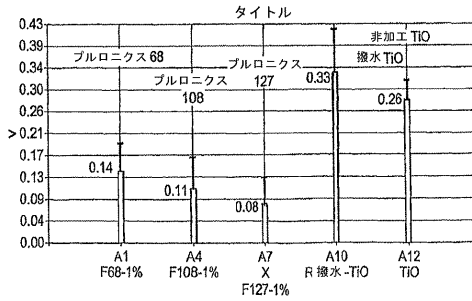
【図9】



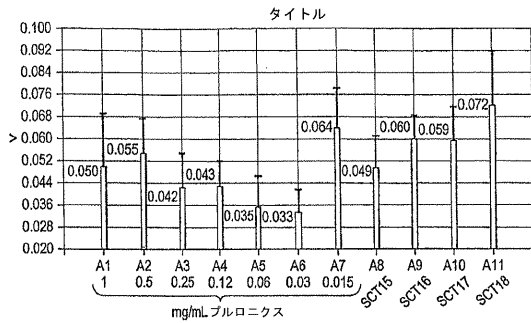
【図8】



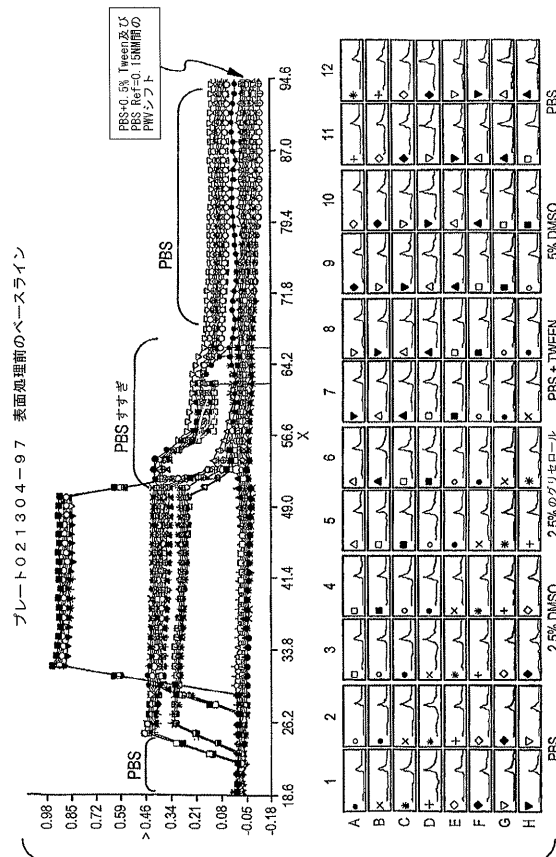
【図10】



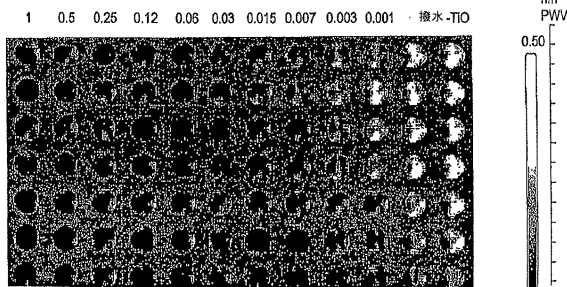
【図11】



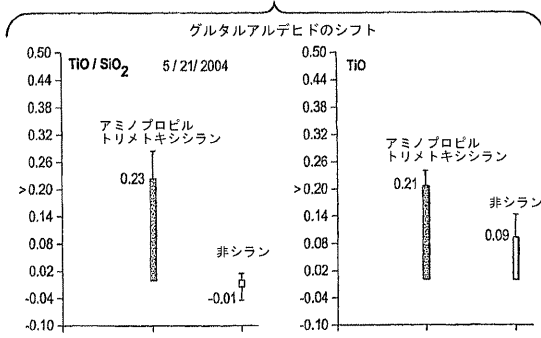
【図13】



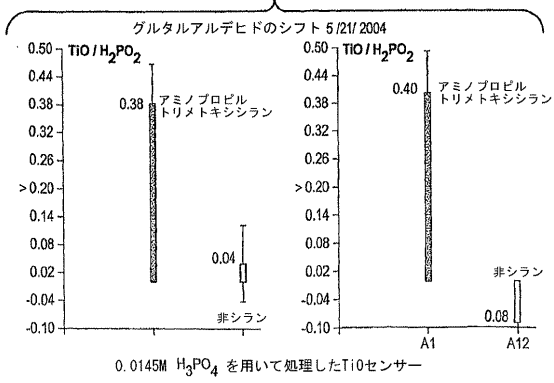
【図12】



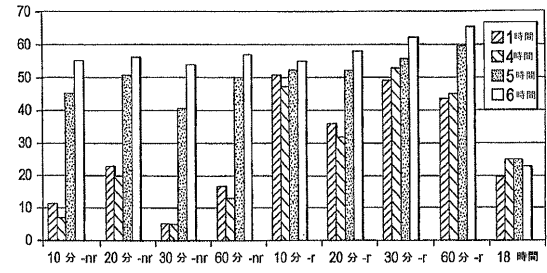
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



フロントページの続き

- (72)発明者 ベアード, シェリル, エル.
アメリカ合衆国 02139 マサチューセッツ州 ケンブリッジ, マガジン ストリート 39
- (72)発明者 ワン, グオ, ピン
アメリカ合衆国 02148 マサチューセッツ州 マルデン, ハイランド アベニュー 586
- (72)発明者 ラング, ランス
アメリカ合衆国 02478 マサチューセッツ州 ベルモント, レスリー ロード 12
- (72)発明者 ジョギカルマス, ガンガダール
アメリカ合衆国 02478 マサチューセッツ州 ベルモント, フォスター ロード 69
- (72)発明者 ガーステンマイヤー, ジョン
アメリカ合衆国 02478 マサチューセッツ州 ベルモント, フォスター ロード 69

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 米国特許第05552272 (US, A)
米国特許出願公開第2003/0068657 (US, A1)
国際公開第96/038726 (WO, A1)
米国特許第06346376 (US, B1)
米国特許出願公開第2004/0022677 (US, A1)
特表2006-506642 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/27
G01N 21/41
G01N 33/543