

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6416772号
(P6416772)

(45) 発行日 平成30年10月31日(2018.10.31)

(24) 登録日 平成30年10月12日(2018.10.12)

(51) Int.Cl.	F I
B 2 9 C 67/00 (2017.01)	B 2 9 C 67/00
B 0 1 J 13/02 (2006.01)	B 0 1 J 13/02
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127
B 3 3 Y 30/00 (2015.01)	B 3 3 Y 30/00
B 3 3 Y 10/00 (2015.01)	B 3 3 Y 10/00

請求項の数 29 (全 85 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-546096 (P2015-546096)	(73) 特許権者	507226592
(86) (22) 出願日	平成25年12月6日 (2013.12.6)		オックスフォード ユニヴァーシティ イ
(65) 公表番号	特表2016-508076 (P2016-508076A)		ノヴェーション リミテッド
(43) 公表日	平成28年3月17日 (2016.3.17)		英国 オーエックス2 オジェイビー オ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2013/053229		ックスフォード ボトリー ウェスト ウ
(87) 国際公開番号	W02014/087175		エイ3 バクストン コート
(87) 国際公開日	平成26年6月12日 (2014.6.12)	(74) 代理人	100080791
審査請求日	平成28年12月6日 (2016.12.6)		弁理士 高島 一
(31) 優先権主張番号	1222052.1	(74) 代理人	100125070
(32) 優先日	平成24年12月7日 (2012.12.7)		弁理士 土井 京子
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100136629
			弁理士 鎌田 光宣
		(74) 代理人	100121212
			弁理士 田村 弥栄子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 3Dプリンティングによる小滴集合

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

小滴集合を作製するための装置を用いる前記小滴集合の製造方法であって、

該小滴集合が複数の小滴を含み、それぞれの前記小滴が、(i)小滴媒体、及び(ii)前記小滴媒体の表面の周囲の両親媒性分子の外層を含み、前記小滴媒体が水性媒体または疎水性媒体であり、前記小滴の各々が別の前記小滴に接触して、接触する前記小滴同士の間で接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、前記小滴集合は、前記小滴を少なくともn個有し、かつ、接触する前記小滴同士の間で前記接触面を少なくともn-1個有し、ここで、nは4以上であり、

該装置が、少なくとも1の小滴発生器と、前記少なくとも1の小滴発生器に対して移動可能な容器と、制御ユニットとを含み、該制御ユニットが、前記少なくとも1つの小滴発生器からの小滴の吐出、及び前記少なくとも1つの小滴発生器に対する前記容器の前記移動を制御し、

前記装置の前記容器が、大量の媒体を含み、

前記小滴媒体が水性媒体である場合には、前記大量の媒体が疎水性媒体であり、前記小滴媒体が疎水性媒体である場合には、前記大量の媒体が水性媒体であり、

(a) 当該製造方法は、複数の吐出ステップを含み、各吐出ステップが、両親媒性分子の存在下における前記小滴発生器からの前記小滴媒体の小滴の前記大量の媒体への吐出、及びこれによる前記大量の媒体における小滴の形成を含み、該小滴が、(i)前記小滴媒体及び(ii)前記小滴媒体の前記表面の周囲の両親媒性分子の外層を含み、かつ

10

20

(b)当該製造方法は、

前記大量の媒体における前記小滴の相対位置を制御するために、かつ、

前記小滴の各々を少なくとも1の別の前記小滴に隣接するように位置させて、接触する前記小滴同士の間での接触面としての前記両親媒性分子の2層を形成するように、前記小滴の各々を別の前記小滴に接触させるために、

前記少なくとも1つの小滴発生器に対して前記容器を移動させることを含む、

前記製造方法。

【請求項2】

前記小滴媒体が水性媒体であり、前記大量の媒体が疎水性媒体である、請求項1に記載の製造方法。

【請求項3】

当該製造方法が、

(a)第1吐出ステップを含み、該第1吐出ステップが、両親媒性分子の存在下において前記小滴発生器から前記疎水性媒体へ水性媒体の小滴を吐出すること、及びこれにより、前記疎水性媒体において第1の小滴を形成することを含み、該第1の小滴が、(i)前記水性媒体及び(ii)前記水性媒体の前記表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、

(b)前記疎水性媒体における前記第1の小滴に対し、前記疎水性媒体における第2の小滴の前記位置を制御するべく、前記少なくとも1つの小滴発生器に対し、前記容器を移動させることを含む、かつ

(c)第2吐出ステップを含み、該第2吐出ステップが、両親媒性分子の存在下において前記小滴発生器から前記疎水性媒体へ水性媒体の小滴を吐出すること、及びこれによって前記疎水性媒体において第2の小滴を形成することを含み、該第2の小滴が(i)前記水性媒体及び(ii)前記水性媒体の前記表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、

当該製造方法は、さらに、

(d)前記疎水性媒体における他の前記小滴に対して前記疎水性媒体における追加的な小滴の前記位置を制御するべく、少なくとも1つの前記小滴発生器に対し、前記容器を移動させることを更に含み、前記追加的な小滴は、前記疎水性媒体における少なくとも1つの他の小滴に隣接して位置し、それにより、該追加的な小滴は、前記疎水性媒体における少なくとも1つの他の小滴に接触して、接触する前記小滴同士の間での接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、かつ、

(e)追加的な吐出ステップを更に含み、該吐出ステップが、両親媒性分子の存在下における前記小滴発生器から前記疎水性媒体への水性媒体の小滴の吐出、及びこれによって前記疎水性媒体において追加的な小滴を形成することを含み、該追加的な小滴が(i)前記水性媒体、及び(ii)前記水性媒体の前記表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、

当該製造方法は、

少なくとも1つの前記小滴発生器に対し、前記容器を移動させる少なくとも500の前記(d)のステップ、及び少なくとも500の前記追加の吐出ステップ(e)を含む、請求項2に記載の製造方法。

【請求項4】

前記少なくとも1つの小滴発生器に対して前記容器を移動させる前記ステップ(d)を少なくとも10,000有し、かつ、前記追加の吐出ステップ(e)を少なくとも10,000有する、請求項3に記載の製造方法。

【請求項5】

前記複数の吐出ステップが、前記疎水性媒体において全体で前記小滴の列または層を製作する吐出ステップを含み、前記列または層の各小滴が、前記列または層の別の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成する、請求項1～4のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項6】

前記小滴媒体が水性媒体であり、前記大量の媒体が疎水性媒体であり、

前記複数の吐出ステップが第1セットの吐出ステップを含み、該第1セットの吐出ステッ

10

20

30

40

50

ブが、前記疎水性媒体における第1領域の前記小滴を全体で作製し、前記第1領域における各小滴が、前記第1領域における少なくとも1の他の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、かつ、

前記複数の吐出ステップが第2セットの吐出ステップを含み、該第2セットの吐出ステップが、前記疎水性媒体において第2領域の前記小滴を全体で作製し、前記第2領域の各小滴が、前記第2領域において少なくとも1つの他の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成する、

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 7】

前記第1領域の小滴が、前記第2領域の小滴の中に小滴の経路を形成する、請求項 6 に記載の製造方法。

【請求項 8】

前記第1セットの吐出ステップにおいて前記疎水性媒体に吐出された前記小滴の前記水性媒体が、膜タンパク質を更に含み、前記第2セットの吐出ステップにおいて前記疎水性媒体に吐出された前記小滴の前記水性媒体が、前記膜タンパク質を含まないか、または、

前記第1セットの吐出ステップにおいて前記疎水性媒体に吐出された前記小滴の前記水性媒体が、前記第2セットの吐出ステップにおいて前記疎水性媒体に吐出された前記小滴の前記水性媒体よりも高濃度の膜タンパク質を含む、

請求項 6 または 7 に記載の製造方法。

【請求項 9】

前記第1領域において接触する前記小滴間に形成された両親媒性分子の前記2重層が、前記膜タンパク質を含み、かつ、

前記第2領域において接触する前記小滴間に形成された両親媒性分子の前記2重層が、前記膜タンパク質を含まず、または前記第1領域における前記接触する小滴間に形成された両親媒性分子の前記2重層よりも低濃度の前記膜タンパク質を含む、

請求項 8 に記載の製造方法。

【請求項 10】

前記第1セットの吐出ステップにおいて前記疎水性媒体に吐出された前記小滴の前記水性媒体が第1のオスモル濃度を有し、前記第2セットの吐出ステップにおいて前記疎水性媒体に吐出された前記小滴の前記水性媒体が、第2のオスモル濃度を有し、前記第1のオスモル濃度が前記第2のオスモル濃度よりも大きく、かつ、

前記第1領域の小滴が前記第2領域の小滴に接触して、接触する前記小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成するように、前記第2領域の小滴が前記第1領域の小滴に隣接配置される、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 11】

水が前記第2領域から前記第1領域へ移動して、前記小滴集合の変形を引き起こすことを可能にすることを更に含む、請求項 10 に記載の製造方法。

【請求項 12】

前記小滴媒体が水性媒体であり、前記大量の媒体が疎水性媒体であり、前記装置が第1の小滴発生器及び第2の小滴発生器を含み、

前記複数の吐出ステップが、少なくとも1つの吐出ステップを含み、該少なくとも1つの吐出ステップが、両親媒性分子の存在下において前記第1の小滴発生器から前記疎水性媒体へ第1の水性媒体の小滴を吐出し、これによって前記疎水性媒体において前記小滴を形成することを含み、該小滴が、(i)前記第1の水性媒体及び(ii)前記水性媒体の前記表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、かつ、

前記複数の吐出ステップが、少なくとも1つの吐出ステップを含み、該少なくとも1つの吐出ステップが、両親媒性分子の存在下において、前記第2の小滴発生器から前記疎水性媒体へ第2の水性媒体の小滴を吐出し、これによって前記疎水性媒体において前記小滴を形成することを含み、該小滴が、(i)前記第2の水性媒体及び(ii)前記水性媒体の前記表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、

10

20

30

40

50

(a)前記第1の水性媒体が前記第2の水性媒体と異なり、

前記第1及び第2の水性媒体が、異なるオスモル濃度を有し、前記第1及び第2の水性媒体が、異なる塩または緩衝剤の濃度を有するか、または、
前記第1の水性媒体が膜タンパク質を含み、前記第2の水性媒体が前記膜タンパク質を含まず、または、

(b)前記第1の小滴発生器によって吐出される前記第1の水性媒体の前記小滴または複数の小滴が、前記第2の小滴発生器によって吐出される前記第2の水性媒体の前記小滴または複数の小滴と異なる大きさを有する、
請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 13】

10

前記小滴媒体が水性媒体であり、前記大量の媒体が疎水性媒体であり、疎水性媒体である前記大量の媒体が疎水性媒体の液滴であり、

前記疎水性媒体の前記液滴が、水性媒体である第2の大量の媒体内にあり、前記装置の前記容器が、水性媒体である前記第2の大量の媒体、及び前記疎水性媒体の前記液滴を含み、

前記疎水性媒体の前記液滴が、前記液滴と、水性媒体である第2の大量の媒体との間の接触面として、前記液滴の前記表面の周囲の両親媒性分子の周辺層を更に含み、

前記小滴集合が前記疎水性媒体の液滴内に作製されて、小滴封入物を作製し、該小滴封入物が、

- 前記疎水性媒体の前記液滴;
- 前記液滴の前記表面の周囲の両親媒性分子の前記周辺層;及び
- 前記周辺層内の前記小滴集合

20

を含む、

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 14】

前記大量の媒体から前記小滴集合を回収することを更に含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 15】

水性媒体である前記第2の大量の媒体から前記小滴封入物を回収することを更に含む、請求項 13 に記載の製造方法。

30

【請求項 16】

小滴集合を作製するための装置であって、当該装置は:

少なくとも1の小滴発生器;

少なくとも1の小滴発生器に対して移動可能な容器;及び

制御ユニット、を含み、該制御ユニットが少なくとも1の前記小滴発生器からの小滴の吐出を制御、及び少なくとも1の前記小滴発生器に対する容器の移動を制御するように構成され、

当該装置は、複数の小滴を含む小滴集合を作製するように構成され、該小滴集合は複数の小滴を含み、各前記小滴は(i)小滴媒体、及び(ii)小滴媒体表面の周囲の両親媒性分子の外層を含み、前記小滴媒体は水性媒体または疎水性媒体であり、前記小滴の各々が別の前記小滴と接触して、接触する前記小滴同士の間での接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、前記小滴集合は、前記小滴を少なくともn個有し、かつ、接触する前記小滴同士の間での前記接触面を少なくともn-1個有し、ここで、nは4以上であり、かつ、

40

前記容器は、大量の媒体と、該大量の媒体中に配置された前記小滴集合とを収容しており、前記小滴媒体が水性媒体である場合には、前記大量の媒体が疎水性媒体であり、かつ、前記小滴媒体が疎水性媒体である場合には、前記大量の媒体が水性媒体である、
前記装置。

【請求項 17】

前記小滴発生器または各小滴発生器は、小滴媒体を保持するためのチャンバを含み、該小滴媒体は、水性媒体または疎水性媒体であり、前記または各小滴発生器は、吐出口及び

50

、上記吐出口を通してある体積の上記小滴媒体を移動させるための構成要素を含み、それによって小滴としての前記体積を吐出し、

前記吐出口を通して、ある体積の前記小滴媒体を移動させるための前記構成要素が圧電変換器であり、かつ、

前記吐出口が200 μm より小さい直径を有する、
請求項 16 に記載の装置。

【請求項 18】

前記小滴発生器が上記小滴媒体を含む、請求項 16 または 17 に記載の装置。

【請求項 19】

前記小滴媒体が水性媒体である、請求項 16 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の装置。

10

【請求項 20】

前記小滴発生器が水性媒体及び膜タンパク質を含む、請求項 19 に記載の装置。

【請求項 21】

前記または各小滴発生器が、1mm以下の直径または2 μL 以下の体積の小滴を吐出するように構成される、請求項 16 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 22】

前記制御ユニットが0.01から10 s^{-1} の速さにおいて小滴の前記吐出を制御するように構成される、請求項 16 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 23】

前記装置が複数の上記小滴発生器を含み、

20

前記小滴媒体が水性媒体であり、第1小滴発生器が第1水性媒体を含み、第2小滴発生器が第2水性媒体を含み、前記第1水性媒体と第2水性媒体とが異なるか、または、

第1小滴発生器が、第1直径を有する小滴を吐出するように構成され、第2小滴発生器が、第2直径を有する小滴を吐出するように構成され、前記第1直径と第2直径とが異なる、
請求項 16 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 24】

前記第1水性媒体が膜タンパク質を含み、前記第2水性媒体が前記膜タンパク質を含まないか、または、

前記第1及び第2水性媒体が異なるオスモル濃度を有し、または前記第1及び第2水性媒体が異なる塩または緩衝剤濃度を含むか、または、

30

前記小滴発生器が請求項 17 に規定された通りであり、前記第1小滴発生器の吐出口が、前記第2小滴発生器の吐出口とは異なる直径を有する、
請求項 23 に記載の装置。

【請求項 25】

前記小滴集合が、少なくとも10,000の前記小滴を含み、それぞれの該小滴が、(i)水性媒体及び(ii)前記水性媒体の表面の周囲の両親媒性分子の外層を含む、請求項 16 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 26】

前記制御ユニットが(a)前記または各小滴発生器に対する前記容器の前記移動、及び(b)前記小滴の前記吐出を調節して、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記述された通りの方法により小滴集合を作製するように構成される請求項 16 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の装置。

40

【請求項 27】

前記制御ユニットが、(a)前記または各小滴発生器に対する前記容器の前記移動、及び(b)前記小滴の前記吐出を調節して、複数の小滴を含む小滴集合を作製するように構成されており、各前記小滴が、(i)水性媒体、及び(ii)前記水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、それぞれの前記小滴が別の前記小滴に接触して、前記接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、

前記複数の小滴が第1領域の前記小滴及び第2領域の前記小滴を含み、前記第1領域の各小滴が、前記第1領域の少なくとも1つの別の小滴に接触して、前記接触する小滴間の接触

50

面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、前記第2領域の各小滴が、前記第2領域の少なくとも1の他の小滴に接触して、前記接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、

前記第1領域の前記小滴の前記水性媒体が、第1のオスモル濃度を有し、前記第2領域の前記小滴の前記水性媒体が第2のオスモル濃度を有し、前記第1のオスモル濃度が前記第2のオスモル濃度と異なる、請求項 1 6 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 2 8】

前記制御ユニットが、(a)前記または各小滴発生器に対する前記容器の前記移動、及び(b)前記小滴の前記吐出を調節して、複数の小滴を含む小滴集合を作製するように構成されており、各前記小滴が、(i)水性媒体、及び(ii)前記水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、それぞれの前記小滴が別の前記小滴に接触して、前記接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、

10

前記複数の小滴が前記小滴を含まない前記小滴集合内の容積の周囲のシェルの輪郭を示す、請求項 1 6 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 2 9】

前記疎水性媒体が、水性媒体である第2の大量の媒体内における疎水性媒体の液滴であり、前記容器が、水性媒体である前記第2の大量の媒体、及び前記疎水性媒体の前記液滴を含む、請求項 1 9 に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明の分野

本発明は、小滴集合を作製するための装置に関し、該装置が、小滴発生器を含む。小滴発生器を含む装置を使用して小滴集合を作製するための方法も記載される。また、本発明は、複数の小滴を含む小滴集合に関する。小滴集合の様々な使用も記載される。

【背景技術】

【0 0 0 2】

本発明に対する背景

油中の脂質溶液における水性の小滴は、その接触面において脂質2重層を形成することにより、付着する(Poulin, P. et al, Langmuir 14, 6341-6343 (1998) and Holden, M. A., et al, J. Am. Chem. Soc. 129, 8650-8655 (2007))。膜タンパク質で機能的になった小滴のネットワークが構築され、光センサー(Holden, M. A., et al., J. Am. Chem. Soc. 129, 8650-8655 (2007))、バッテリー(Holden, M. A., et al, J. Am. Chem. Soc. 129, 8650-8655 (2007))または単純な電気回路の機能を果たし得る(Maglia, G. et al, Nature Nanotech. 4, 437-440 (2009))。小滴ネットワークは、大量の水溶液中で安定し得、pHまたは温度の変化に応じてその内容物を放出するように予め決められ得る(Villar, G., et al, Nature Nanotech. 6, 803-808 (2011))。しかしながら、実証されたネットワークは、通常、手作業(Holden, M. A., et al, J. Am. Chem. Soc. 129, 8650-8655 (2007) 及び Maglia, G. et al, Nature Nanotech. 4, 437-440 (2009))、マイクロ流体手段 (Ba i, Y. et al, Lab. Chip 10, 1281-1285 (2010), Zagnoni, M. et al, Lab. Chip 10, 3069-3073 (2010) 及び Stanley, C. E. et al, Chem. Commun. 46, 1620-1622 (2010))または外部場を用いた操作(Aghdaei, S., et al, Lab. Chip 8, 1617-1620 (2008), Poulos, J. L., et al, Appl Phys Lett 95, 013706 (2009) 及び Dixit, S. S., et al, Langmuir 26, 6193-6200 (2010))によって組み立てられたわずかな小滴の単純な配置に限定されてきた。

30

40

三次元小滴集合、及び小滴集合を作製するための装置等の複雑な小滴集合を作製する方法を開発するという継続的な必要性がある。

【発明の概要】

【0 0 0 3】

50

本発明の概要

本発明は、小滴集合を作製するための装置に関し、該装置は、自動工程によって作製される小滴集合を可能にする。また、本発明は、小滴集合を作製するための自動工程に関する。

【0004】

本発明の装置及び本発明の方法を用いて小滴集合が作製され得る速さ及び正確さが、作り出される小滴の複雑な集合を可能にする。

【0005】

本発明者らは、1万の小滴を含むミリメートル-スケールの配置が作製され得ることを実証した。10億の小滴を有するより大きな構造さえ、本発明を用いて現在作製され得る。意外にも、これらの構造は、自己支持的 (self-supporting) であり、穏やかな摂動 (perturbations) に耐久性がある。更に、先に知られた方法によって到達できない構造が今や達成可能であるため、これらの構造自体が複雑かつ多様であり得る。

【0006】

小滴集合において各小滴の正確な位置及び配合が制御され得る。それゆえに、小滴集合は、例えば、接触する特定の小滴間の2重層に膜タンパク質を組み込むことにより、容易に機能性を有し得る。例えば、本発明者らは、神経組織の単純な機能的模倣物が、集合内の特定の小滴に膜タンパク質を含めることによって作製され得ることを示した。小分子、酵素及び生きている細胞などの多様な異なる材料を特定の小滴内に含めることによって小滴集合が機能性を有し得る。生きている細胞は、例えば、小滴集合の小滴内において成長することができ、また、プリント後にある程度経ってから小滴間の2重層を解体することができ得る。

【0007】

小滴集合は、固体材料のパターニングのための犠牲鋳型 (sacrificial templates) としても使用され得る。例えば、無機材料が小滴集合の特定の小滴に含まれ得る。異なる無機材料が、小滴集合内の異なる小滴に配置され得る。無機材料は、その後、特定の小滴間において拡散し、硫化カドミウム等の無機個体を形成するべく反応し得る。

【0008】

更に、小滴集合は、2以上の異なる区画を含むように構築され得る。個々の区画は、例えば、膜タンパク質を用いて、互いに及び/または外部環境に通じ得る。それゆえに、精緻な区分化されたシステムが、作製され得る。

【0009】

浸透作用の方法を利用して、本発明者らは、予測可能なように折り重なる自己折り畳み (self-folding) ネットワークも作り出し得た。小滴集合が形状を変化させることができることにより、新規でより精緻な構造を開発することが可能になった。集合は、例えば、筋肉組織の流体模倣物として設計され得る。有機体 (living organisms) または電子機器と相互作用する自律機能的なもの (entity) として小滴集合を使用すること等の応用も、今や現実的に見込みがある。集合は、例えば、薬物送達用のプラットフォームとして、または人工組織の部品としてさえ使用され得る。再生医療における小滴ネットワークの使用が、特に興味深い見込みである。というのは、集合が、細胞の複製及び移動、並びに身体による組織の拒絶等の生きた細胞で通常みられる多くの問題を軽減し、または克服さえし得るからである。

【0010】

適切な方法で、本発明は、小滴集合を作製するための装置を提供し、該装置が、少なくとも1つの小滴発生器と、容器とを含み、該容器が、少なくとも1つの小滴発生器に対して移動可能であり、該装置が、制御ユニットを含み、該制御ユニットが少なくとも1つの小滴発生器からの小滴の吐出、及び少なくとも1つの小滴発生器に対する容器の移動を制御するように構成され、装置が、複数の小滴を含む小滴集合を作製するように構成され、それぞれの前記小滴が、(i)小滴媒体及び(ii)小滴媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、小滴媒体が、水性媒体または疎水性媒体であり、少なくとも1つの前記小滴が別の

前記小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の層を形成する。

【0011】

本発明が、小滴集合を作製するための装置を用いて、小滴集合を作製する方法も提供し、該小滴集合が、複数の小滴を含み、それぞれの前記小滴が(i)小滴媒体、及び(ii)小滴媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、小滴媒体が水性媒体または疎水性媒体であり、少なくとも1つの前記小滴が別の前記小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の層を形成し、該装置が、少なくとも1つの小滴発生器と、容器とを含み、該容器が、少なくとも1つの小滴発生器に対して移動可能であり、該装置が、制御ユニットを含み、該制御ユニットが、少なくとも1つの小滴発生器からの小滴の吐出と、少なくとも1つの小滴発生器に対する容器の移動とを制御するように構成され、装置の前記容器が、大量の媒体を含み、小滴媒体が水性媒体である場合に、大量の媒体が疎水性媒体であり、小滴媒体が疎水性媒体である場合に、大量の媒体が水性媒体であり、該方法は、(a)複数の吐出ステップを含み、各吐出ステップは、両親媒性分子の存在下における前記小滴発生器から大量の媒体への小滴媒体の小滴の吐出を含み、これによって大量の媒体中に小滴を形成し、該小滴が、(i)前記小滴媒体及び(ii)小滴媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、該方法が、(b)少なくとも1つの小滴発生器に対し、容器を移動させ、大量の媒体における小滴の相対位置を制御することを含む。

10

【0012】

別の態様において、本発明は、小滴集合を提供し、該小滴集合は、本明細書中において上述された通りの方法によって取得可能である。

20

【0013】

更なる態様において、本発明は、複数の小滴を含む小滴集合を提供し、それぞれの前記小滴は、(i)水性媒体、及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、それぞれの前記小滴は、別の前記小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、複数の小滴は、第1領域の前記小滴及び第2領域の前記小滴を含み、第1領域の各小滴は、第1領域の少なくとも1つの他の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、第2領域の各小滴が、第2領域の少なくとも1つの他の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、第1領域の小滴の水性媒体が、第1のオスモル濃度を有し、第2領域の小滴の水性媒体が、第2のオスモル濃度を有し、第1のオスモル濃度が、第2のオスモル濃度と異なる。

30

【0014】

また、複数の小滴を含む小滴集合が本発明によって提供され、それぞれの前記小滴が、(i)水性媒体、及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、それぞれの前記小滴は、別の前記小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、複数の小滴は、前記小滴を含まない小滴集合内の容積の周囲のシェルの輪郭を示す。

【0015】

更なる態様において、本発明は、本明細書中において記載されるように、本発明の小滴集合の様々な使用を提供する。

40

【0016】

従って、本発明は、本明細書中に記載されるように、合成生物学における本発明の小滴集合の使用を提供する。

本発明は、薬物送達ビヒクルとしての明細書中に記載されているように、本発明の小滴集合の使用も提供する。

本発明は、明細書中に記載されているように、再生医療における本発明の小滴集合の使用も提供する。小滴集合の小滴は、例えば、生きている細胞を含み得る。

【0017】

本発明は、本明細書中に記載されているように、材料科学及び材料工学において本発明

50

の小滴集合の使用も提供する。

本発明の小滴集合のために本明細書中に記載される通り、固体材料のパターニングのための鋳型 (template) としての小滴集合の使用が本発明によって更に提供される。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1は、小滴発生器の概略図を示す。小滴発生器チャンバは、体積Vの水溶液で満たされる。長さLのノズルは、その土台における内径D、及び先端径dを有する。チャンバの水溶液の液面は、ウェルにおける油剤の液面の距離h上方にある。

【図2】図2は、プリントされた小滴ネットワークを示す。図2aは、装置の配置の概略図を示す。2つの小滴発生器が、油中の脂質溶液で満たされたウェルへ異なる水溶液の小滴を放出する。ウェルは、電動マイクロマニピュレータに取り付けられる。小滴発生器及びマニピュレータは、パーソナルコンピュータ(PC)によって制御される。図2bは、プリントされつつある小滴ネットワークの概略図を提供する。油中に放出された水性小滴が、脂質単分子層を得て、拡大するネットワークにおいて小滴の2重層を形成する。図2cは、3次元小滴ネットワークの好ましい水平断面図を規定する画像を示す。デザインは、50x35小滴の20層をそれぞれ含み、1つおきの断面図のみを示す。図2dにおいて、図2cにおけるデザインに従ってプリントされたネットワークを示す。スケールバーは、5 mmを示す。図2eは、別の3次元デザインの概略図であり、該3次元デザインは、それぞれ24x24の小滴の28層からなる。図2fは、図2eにおけるデザインに従って、プリントされた単独のネットワークの3面図を示す。スケールバーは、1 mmを示す。

【図3】図3は、小滴発生器の略図を示す。装置は、微細加工された (micromachined) ポリ(メチルメタクリル)チャンバ上に取り付けられた圧電変換器からなる。ゴム隔膜は、変換器の反対側に取り付けられ、引き出されて曲がったガラス毛细管が隔壁に差し込まれる。2つの低部の穴が、1つの装置を適所に固定し、別のものを手動のマイクロマニピュレータに取り付けるために使用される。全寸法は、mmである。

【図4】図4は、小滴発生器用の運転電子機器の概略図を示す。電子機器は、-30 Vから+30 Vの範囲において12ビットの分解能で2つの圧電変換器の一方へコンピュータに電圧を印加させる。略語:PC、パーソナルコンピュータ;USB、ユニバーサルシリアルバス;SPI、シリアル周辺インターフェース;DAC、デジタルアナログコンバータ;op amp、演算増幅器。

【図5】図5は、グラフィカルユーザインターフェースを示す。左側及び中央パネルは、それぞれ2つの発生器に対して、電圧パルスの持続時間 (μs) 及び振幅 (60 Vの割合として) の変更、小滴放出のトリガ、トリガ当たりに放出される小滴数の変更、及びトリガ当たりに行われる複数の小滴間の遅延 (ms) の変更を行うことを可能にする。右側パネルは、マニピュレータの対話式制御、並びにマニピュレータのステップサイズ及び速度の変更を可能にする。

【図6】図6は、プリントパターンを示す。図6aは、A(薄灰色)、B(略図の中心の濃灰色)及び空の(黒)ピクセルをなどの49ピクセルのマップの例を示す。図6bは、最も単純な種類のプリントアルゴリズムにおける2つの経路のそれぞれにおいてプリントノズルがマップを横切って通る経路を示す。

【図7】図7は、プリントのひずみを示す。この図の全てのネットワークは、図6bの単純なプリントパターンでプリントされた。図7aは、立方体状にデザインされたネットワークの横図を示すが、凸状の上面を形成している。図7bは、立方体状にデザインされたネットワークの上方からの図を示すが、内側へたわんだ壁面を有している。図7cは、立方体状にデザインされ、かつ単純なプリントパターンによって正確にプリントされたネットワークの上方からの図を示す。

【図8】図8は、プリントアルゴリズムの概要を示す。初期設定と名付けられた指示は、最初の実行され、方向と名付けられた指示が続く。正方形を付された条件は、アルゴリズムが引き続き次の指示を実行する前に、充足される必要がある。ひし形を付された条件の評価において、条件が真であれば、アルゴリズムは、横矢印を付された指示を引き続き実行し、または、条件が偽であれば、縦矢印を付された指示を引き続き実行する。追加的考

10

20

30

40

50

察では、各小滴作製後の遅延または列が実施例において説明される。

【図 9】図9は、一般的な小滴ネットワークの電気的表現を示す。 V_i 、及び V_j は、 i 及び j をそれぞれ付された小滴の電位を示す。 c_{ij} 及び r_{ij} は、それぞれ小滴 i 及び j 間のキャパシタンス及び抵抗である。 I_{ij} は、 j から i に供給されるイオン電流であり、容量性構成要素 I_{ij}^c 及び抵抗性構成要素 I_{ij}^r からなる。小滴は、明瞭性のためだけに正方形格子において図示される。実施例の派生物が、任意の配置のネットワークに適用する。

【図 10】図10は、パルス幅及び電圧の作用として小滴放出を示す。写真は、小滴発生器に印加された様々な電圧パルスの幅及び振幅に対し、小滴放出直後に撮影した。放出された小滴の再現性を判定するため、パルス幅及び振幅の各組み合わせを、パルス間に数秒の間隔をあけて5回印加した。全組み合わせをテストした後、全部の手続きを繰り返した。小滴作製は、既定のノズル用のパルス幅及び振幅($n = 10$)の各組み合わせに対し、一貫性があったが、ノズル間において変化した。強調表示された写真は、このノズルのための条件を示し、該ノズルが、小滴ネットワークをプリントするために適したサイズの単独の小滴を作製する。スケールバーは、 $200\ \mu\text{m}$ を示す。

【図 11】図11は、大量の水溶液中にプリントされた小滴ネットワークを示す。図11aは、水溶液中のプリントの概略図を示す。ノズルが水性小滴を油の液滴内に放出し、該油は、ワイヤーフレームにより、大量の水溶液中に静止される。図11bは、水溶液中にプリントされたネットワークを上方から見た顕微鏡写真を示す。薄灰色の小滴の中心部は、濃灰色の小滴のシェルによって囲われ、該シェルが、蛍光染料ピラニンを含む。スケールバーは、 $400\ \mu\text{m}$ を示す。図11cは、共焦点顕微鏡法によって取得された図11bのネットワークの水平断面を示し、該水平断面は、非蛍光の中心部の周囲の小滴の蛍光のシェルを示す。断面は、ネットワークの低部の約 $150\ \mu\text{m}$ に及ぶ。スケールバーは、 $400\ \mu\text{m}$ を示す。図11dは、大量の水溶液中にプリントされた3つの他のネットワークの顕微鏡写真を示す。スケールバーは、 $400\ \mu\text{m}$ を示す。

【図 12】図12は、導電性経路を示す。図12aは、イオン電流が流れることを可能にする経路を有してプリントされたネットワークの一部の概略図を示す。薄灰色の小滴及び大きな液滴のみが、 HL 孔を含む。大きな液滴は、 Ag/AgCl 電極を挿通されている。拡大断面は、 HL を含む小滴の周囲の2重層における HL 膜孔を図示する。図12bは、電極を挿通された液滴が導電性経路の両端に配置されたプリントされたネットワークの写真を示す。薄灰色の小滴は、 HL を含むが、一方、他の小滴はタンパク質を全く含まない。スケールバーは、 $500\ \mu\text{m}$ を示す。図12cは、図12bの構造において $\text{pH}8.0$ の 1M KCl 中において $50\ \text{mV}$ で測定されたときに、イオン電流が段階的に増加することを示す。図12dは、1つの大きな液滴を分離し、経路から離れた位置においてネットワークに再結合させた後の図12bのネットワークの写真を示す。スケールバーは、 $500\ \mu\text{m}$ を示す。図12eは、dの構造において $50\ \text{mV}$ で測定されたときの選択された部位の1の記録を示し、該記録は、イオン電流の過渡的増加を示す。

【図 13】図13は、 HL を有する小滴ネットワーク及び HL を有しないものの電気的測定結果を示す。図13aは、ネットワークの写真を示し、該ネットワークにおいてどの小滴も HL を含まなかった。ネットワークの小滴及び電極を挿通された大きな液滴は、 $25\ \text{mM}$ トリス(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン) HCl 、 $1\ \text{M}$ KCl 、 $100\ \mu\text{M}$ EDTA 、 $\text{pH}8.0$ を含んだ。ネットワークの小滴は、 $1\ \text{mM}$ キシレンシアノールFFを追加的に含み、電極を挿通された液滴は、 HL 及び $10\ \text{mM}$ ピラニンを追加的に含んだ。スケールバーは、 $500\ \mu\text{m}$ を示す。図13bは、図13aに示される構造において $50\ \text{mV}$ で測定された電流の代表的な部分を示す。どの記録においてもこのネットワークから電流のステップまたは過渡的スパイクは測定されなかった。図13cは、ネットワークの写真を示し、該ネットワークにおいて全ての小滴が HL を含んだ。ネットワークの小滴及び電極を挿通された液滴は図13aの電極を挿通された液滴と同じ溶液である。スケールバーは、 $500\ \mu\text{m}$ を示す。図13dは、大きな液滴がネットワークに配置された直後に、図13cに示される構造において $150\ \text{mV}$ で測定された電流の一部である。ネットワークに対する大きな液滴の2回の除去及び交換後に、同様の電流ステップが測定された。

【図 1 4】図14は、導電性小滴経路の電氣的シミュレーションを示す。図14aは、図12bにおける電氣的記録条件のモデルとしてシミュレートされたシステムの概略図を示す。ネットワークは、面心立方配置の4列、20段及び4層の小滴からなり、図12のネットワークの導電性経路部分のみを示す。2つの大きな液滴は、ネットワークの両端に位置し、各列の端部においてネットワークの小滴を有する2重層を形成する。図14bは、図14aに図示されたシステムにおける電極間のシミュレートされた電流を示す。シミュレーションは、実施例に記載された実験条件の概算として、以下のパラメータ値を使用した。50 mVの加電圧、直径45 μm の2重層、2重層の650 nF cm^{-2} の特定キャパシタンス(Holden, M. A., et al, J. Am. Chem. Soc. 129, 8650-8655 (2007))、1 pSの2重層のコンダクタンス、及び1nSの膜孔コンダクタンス(Holden, M. A., et al, J. Am. Chem. Soc. 129, 8650-8655 (2007))。5つの HL膜孔が最初、ネットワーク内の各2重層にあると想定される。ネットワーク及び液滴a間の各2重層が最初は1つの膜孔を含むと想定されるが、一方、ネットワーク及び液滴b間のものは、膜孔を含まないと想定される。ネットワーク及び液滴a間の2重層への単独の HL膜孔の挿入は、1秒、3秒、5秒及び7秒(濃灰色の矢印)に起こり、ネットワーク及び液滴b間の2重層への挿入は、2秒、4秒、6秒及び8秒(薄灰色の矢印)に起こるとシミュレートされる。各膜孔は、異なる2重層に入り込む。計算時間を減少させるため、シミュレーションの時間間隔を図12cのものより短くしたことに留意すべきである。図14cは、図12dにおける電氣的記録条件のモデルとしてシミュレートされたシステムの概略図を示す。ネットワークは、HLを含まない2段の小滴を加えたことを除いて、図14aのものと同一である。図14dは、図14cの電極間におけるシミュレートされた電流を示す。シミュレーションは、ネットワークにおける右端の段の小滴によって形成された2重層のいずれにも膜孔が最初には存在しないことを除き、図14bに記載されたものと同一の条件で行われた。図14bに記載された通り、矢印が膜孔の挿入を示す。

【図 1 5】図15は、自己-折り畳みネットワークを図示する。図15aは、脂質2重層によって連結された異なるオスモル濃度の2つの小滴の概略図を示す。2重層を介した水の移動が、小滴を膨張させ、または収縮させる。図15bは、小滴のネットワークの概略図を示し、該小滴のネットワークは、異なるオスモル濃度の小滴の2つの細長い片(strip)を含む。小滴間の水の移動は、ネットワークの全体的なゆがみを引き起こす。図15cは、矩形ネットワークが約3時間以上かけて折り重なって円になる写真を示す。薄灰色及び濃灰色の小滴は、当初、それぞれ250 mM KCl及び16 mM KClを含む。スケールバーは、250 μm を示す。図15dは、花の形状のネットワークが自発的に折り重なって球形になることを示す写真を示す。薄灰色及び濃灰色の小滴は、当初、それぞれ80 mM KCl及び8 mM KClを含む。写真は、8時間の期間に及ぶ。スケールバーは、200 μm を示す。図15eは、図15dのネットワークを上方から撮影されたその最終形状において示す。スケールバーは、200 μm を示す。図15fは、図15dに示すネットワークと同様の当初の配置を有するネットワークを折り重ねるシミュレーションからのフレームを示す。濃灰色(最上層)及び薄灰色(最下層)が、それぞれ最も低い最初のオスモル濃度、及び最も高い最初のオスモル濃度を示し、白色(最後のフレーム)が2つの平均を示す。

【図 1 6】図16は、小滴接触面の2重層の透水性の測定結果を示す。図16aは、異なる塩濃度の1のペアの小滴が2重層によって結合された後、20分ごとに該ペアを撮影した写真を示す。濃灰色の小滴は、25 mM トリス-HCl、1 M KCl、100 μM EDTAをpH8.0で含んだ。より薄い灰色の小滴は、250 mM KClの塩濃度を得るように希釈された同じ溶液を含んだ。濃灰色の小滴は、1 mM キシレンシアノールFFを追加的に含み、より薄い灰色(より小さい)小滴は、2.5 mM オレンジGを追加的に含んだ。スケールバーは、1 mmを示す。図16bは、図16aに例示した3つのペアの小滴の体積を示す。小滴及び2重層の直径は、写真から測定され、小滴の体積は、球状のキャップ配置(spherical cap geometries)であるという仮定の下に算出された。濃灰色及び薄灰色の円は、それぞれ濃灰色及び薄灰色の小滴の体積の測定結果を示す。追加的方法では、これらのデータは、実施例において記述したように、透過係数Pを算出するために使用された。濃灰色及び薄灰色の線は、追加的方法で実施例において方程式(9)を使用し、 $P = 27 \mu\text{ms}^{-1}$ の平均測定値を用いて算出された小滴の体積を

示す。算出された曲線により、データがPの平均値を用いるモデルによってうまく説明されることが実証される。

【図17】図17は、折り重なるネットワークの割れ目を示す。図17aは、ネットワークにおいてより低いオスモル濃度の小滴の細長い片が水平方向により薄いことを除き、図15cに示すものと同様の小滴の2つの細長い片からなるネットワークを示す。図17bには、折り畳みの完了後の図17aと同じネットワークが図示される。濃灰色の小滴の領域において割れ目の位置は明白である。図17cは、図15d及び15eの花弁状ネットワークと同様に、当初は十字のネットワークを示す。より低いオスモル濃度の層が、その領域において濃灰色の小滴がないことによって実証されるように、上部のアームの土台付近において割れている。割れたアームの折れ曲がりの程度が他のものに比べて少ないことに留意すべきである。

10

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明の詳細な説明

本発明は、小滴集合を作製するための装置に関し、該装置が、少なくとも1の小滴発生器と、容器とを含み、該容器が少なくとも1つの小滴発生器に対して移動可能であり、該装置が、制御ユニットを含み、該制御ユニットが、少なくとも1つの小滴発生器からの小滴の吐出、及び少なくとも1つの小滴発生器に対する容器の移動を制御するように構成され、装置が複数の小滴を含む小滴集合を作製するように構成され、それぞれの前記小滴が(i)小滴媒体、及び(ii)小滴媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、小滴媒体が、水性媒体または疎水性媒体であり、少なくとも1つの前記小滴が、別の前記小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の層を形成する。

20

【0020】

通常は、装置が、前記小滴集合を作製するように構成され、各前記小滴が、別の前記小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の層を形成する。

接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層が、例えば、前記両親媒性分子の2重層またはブロック共重合体の層であり得る。ブロック共重合体の層は、例えば、トリブロック共重合体の層であり得る。

小滴媒体が水性媒体である場合に、接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層が、例えば、前記両親媒性分子の2重層またはブロック共重合体の層であり得る。

【0021】

30

小滴媒体が疎水性媒体である場合に、接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層が、例えば、前記両親媒性分子の2重層またはブロック共重合体の層であり得る。形成された両親媒性分子の2重層において、両親媒性分子の極性頭(polar heads)が互いに接触している(例えば、Aronson et al., Nature, Vol. 286, July 1980及びPoulin et al., J. Phys. Chem. B, Vol. 103, no. 25, June 1999.参照)。

【0022】

接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層は、通常、前記両親媒性分子の2重層である。

小滴媒体は、通常、水性媒体である。しかしながら、小滴媒体が疎水性媒体である別の実施の態様が予測される。

40

【0023】

通例、小滴媒体は水性媒体である。水性媒体が適切な水性媒体であり得る。例えば、水性媒体は、純水、もしくは水性緩衝溶液、または1以上の塩の水溶液であり得る。あるいは、水性媒体は、ヒドロゲルを含み得る。水性媒体がヒドロゲルを含む場合、水性媒体は、例えば、アガロース及び水を含み得る。水中のアガロースの濃度は、通常、10%以下のw/vアガロースである。例えば、前記水中のアガロース濃度は、0.25から5%のw/vアガロースであり得る。アガロース以外のヒドロゲルも使用され得る。例えば、水性媒体は、メチルセルロース、ポリエチレングリコールジアクリレート、ポリアクリルアミド、マトリゲル、ヒアルロン酸、ポリエチレンオキシド、ポリAMPS(ポリ(2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸))、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリアクリル

50

酸ナトリウム、アクリレート重合体またはポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を含み得る。あるいは、水性媒体本体は、シリコーンヒドロゲルまたはLB(ルリア培地)寒天を含み得る。

【0024】

水性媒体の1つの重要な性質は、pHであり、これは、広範囲にわたって変化し得る。いくつかの実施の態様では、例えば、より高いpH値及びより低いpH値も可能であるが、水性の小滴または複数の小滴内の水性媒体のpHが、5から9の範囲であり得る(または例えば、6から8の範囲である)。水性媒体は、それゆえに水性緩衝溶液であり得る。所望のpHに応じて、任意の適切な緩衝液が使用され得る。緩衝溶液は、例えば、トリスHCl及び/またはKClを含み得る。いくつかの実施の態様では、水性緩衝溶液のpHは、5から9、または例えば、6から8である。溶質の種類及び濃度は、溶液の性質を変化させるべく、変更され得る。

10

【0025】

小滴集合における各小滴の水性媒体は、同一または異なり得る。

小滴の両親媒性分子は、全て同じタイプである必要はない。どちらかといえば、両親媒性分子は、いくつかの実施の態様では、2以上の異なる種類の両親媒性分子の混合物であり得る。別の重要な実施例は、異なる小滴間に形成された(複数の)2重層が、非対称となるように、小滴集合の異なる小滴の各外層における両親媒性分子が、異なるタイプであり得る。

【0026】

通常、装置が、大量の媒体中に配置された小滴集合を作製するように構成され、小滴媒体が水性媒体である場合に、大量の媒体が疎水性媒体であり、小滴媒体が疎水性媒体である場合に、大量の媒体が水性媒体である。大量の媒体が水性媒体である場合に、水性媒体は、更に明細書中に前述される通りであり得る。同様に、小滴媒体が疎水性媒体である場合、疎水性媒体は、更に明細書中に後述される通りであり得る。

20

【0027】

通例、小滴媒体は水性媒体であり、大量の媒体は疎水性媒体であり、本発明は、これらの用語において広く明細書中に後述されるだろう。しかしながら、当業者が理解するように、これらの用語において本明細書中に記載された本発明の任意の実施の態様は、水性媒体のかわりに小滴媒体としての疎水性媒体を使用し、疎水性媒体のかわりに大量の媒体としての水性媒体を使用して、「逆に」実施もされ得る。

30

【0028】

通常、小滴媒体は、水性媒体であり、装置は、疎水性媒体中に配置された小滴集合を作製するように構成される。疎水性媒体は、更に明細書中に後述されるように、例えば、疎水性媒体であり得る。

水性媒体の小滴は、通例、両親媒性分子の存在下において疎水性媒体へ吐出される。両親媒性分子は、例えば、水性媒体中または疎水性媒体中に配置され得る。通常、両親媒性分子は、疎水性媒体に配置される。

水性媒体が、両親媒性分子の存在下において疎水性媒体へ吐出される場合、水性の小滴が生じ、該小滴が、(i)水性媒体及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含む。

40

【0029】

小滴集合は、互いに接触する少なくとも2つの小滴を含む。対象(objects)間の接触点において接触する小滴間において共有される境界は、本明細書中において接触面という。接触面は、1つの小滴の外層の一部が、別の小滴の外層の一部に接触するとき形成される。例えば、小滴が別の小滴に接触する場合、両親媒性分子の2重層が、2つの対象間の接触面において生じ得る。2重層は、接触面において各小滴の水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層からの両親媒性分子を含み得る。2重層が生じるのは、それを採用することが、両親媒性分子にとってエネルギー的により有利な構造であるからである。接触する小滴は、最も小さい表面自由エネルギーを有する形状を得るだろう。

【0030】

50

通常、本発明の装置は、前記小滴集合を作製するように構成され、それぞれの前記小滴が、別の前記小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成する。

小滴集合は、1の接触面を含み得、または2以上の接触面を含み得る。通常、小滴集合は、少なくともn個の前記小滴、及び接触する小滴間の少なくともn-1個の前記接触面を含み、nは2以上である。整数nは、3以上であり得る。より一般的には、nは4以上である。

【0031】

いくつかの実施の態様では、小滴集合が、少なくともn個の前記小滴を含む場合に、ネットワークは、n以上の接触面を含み得、nは、本明細書中に記述される通りであり、任意の1の小滴が2以上の他の小滴に接触し得る(それゆえに接触面を形成する)と理解される。

10

【0032】

本発明の長所は、ミリメートルスケール、またはそれより大きい小滴集合が作製されることを装置が可能にすることである。整数nは、原理上は非常に大きくなり得、例えば、100万の次数になり得る。原理的に数百万の小滴を含み得るかかるネットワークは、例えば、原型組織(proto-tissue)(すなわち、多区画アナログの原細胞(proto-cell))または最小組織を作製するために有益であり得る。いくつかの実施の態様では、それゆえに、整数nが数百万程度に大きくなり得、例えば、最大約100,000,000になり得、または例えば最大約50,000,000になり得る。整数nは、例えば、最大約10,000,000、または例えば最大約5,000,000になり得る。

【0033】

20

他の実施の態様では、nは少なくとも数百、例えば少なくとも約500、または例えば少なくとも約1000であり得る。整数nは、例えば、500から5,000,000の整数であり得、または5,000から500,000の整数であり得る。nは、10,000から50,000の整数であり得る。

小滴集合は、例えば、本明細書中に後述される通りの小滴集合であり得る。

【0034】

本発明の装置を用いて作製された小滴集合は、多区画のシステムであり得る。小滴集合は、例えば、第1の区画及び第2の区画を含み得る。小滴集合内の第1の区画は、膜タンパク質を経由して第2の区画に通じ得る。第1及び/または第2の区画は、膜タンパク質を経由して外部環境(すなわち、小滴集合の外部環境)に通じ得る。原理上、小滴集合は、多数の区画を含み得、建築上記述された構造が、ひいては作製され得る。

30

【0035】

装置の制御ユニットは、通例、(a)1又はそれぞれの小滴発生器に対する容器の移動及び(b)小滴の吐出を調整して、前記小滴集合を作り出すように構成される。

【0036】

制御ユニットは、例えば、容器の移動を制御するように構成され得る。別の方法としては、制御ユニットが、1又はそれぞれの小滴発生器の移動を制御するように構成され得る。通常、制御ユニットは、容器の移動を制御するように構成され得る。

【0037】

通常、制御ユニットは、コンピュータまたは専用電子機器を含む。より一般的には、制御ユニットは、少なくとも1つのコンピュータを含む。普通は、少なくとも1つのパーソナルコンピュータ(PC)を含む。制御ユニットは、例えば、PCであり得る。いくつかの実施の態様では、制御ユニットは、PC及び専用電子機器(図4に示すように)を含む。

40

【0038】

通常、制御ユニットは、1又はそれぞれの小滴発生器からの水性媒体の小滴の吐出を制御するように構成される。1又はそれぞれの小滴発生器のための運転中の電子機器の例は、図4に提示される。

【0039】

小滴発生器は、例えば、マイクロ流体システムであり得る。例えば、(a)要求に応じて小滴を生成し得、または(b)次々と小滴を作製し、配置すべき特定の小滴を選択し得る。通常、小滴発生器は、要求に応じて小滴を生成する。小滴発生器は、(i)一段階において

50

小滴を生成及び吐出し得、または(ii)複数の段階において小滴を生成及び吐出し得る。通常、小滴発生器は、一段階において小滴を生成及び吐出する。

【0040】

通常、少なくとも1つの小滴発生器は圧電性の小滴発生器である。より一般的には、少なくとも1つの小滴発生器が圧電性の小滴発生器であり、該小滴発生器が小滴を吐出するための圧電変換器を含む。

【0041】

水性媒体は、例えば、圧電構成部品に電圧パルスを印加することによって、1またはそれぞれの小滴発生器から吐出され得る。通常、制御ユニットが、圧電構成部品への電圧パルスの印加を制御する。通常、電圧パルスは、5 Vから100 Vの頂点間振幅を有し、例えば、10 Vから80 Vの頂点間振幅を有する。頂点間振幅は、例えば、20 Vから60 Vであり得る。通常、各パルスは、10から1,500 μ sの持続時間を有し、例えば、50から1,000 μ sの持続時間を有する。より一般的には、各パルスは、100から800 μ sの持続時間を有する。通例、電圧パルスは、矩形の電圧パルスである。

【0042】

図10に示すように、小滴の直径は、電圧パルスの振幅及び持続時間を変更することによって調製され得る。これらのパラメータを変更することにより、小滴の直径が適切な直径に変更され得る。直径は、例えば、約10から200 μ mに調整され得る。それゆえ、制御ユニットは、第1の電圧パルス及び第2の電圧パルスの印加を制御し、第1の電圧パルス及び第2の電圧パルスが異なるように構成され得る。従って、単独の小滴発生器が、異なるサイズの小滴を作製するために使用され得る。別の方法としては、第1及び第2の電圧パルスが、2つの異なる小滴発生器の圧電構成部品に対して印加され得る。

【0043】

頂点間振幅は、ピーク(または最高電圧)及び谷(または最低値)の間の違いの絶対値を規定する。

小滴生成物のサイズは、小滴発生器を変化させることによって制御され得る。図1及び3に説明されるように、小滴発生器は、吐出口を含み得る。吐出口は、作製される小滴のサイズを制御するように構成され得る。吐出口は、更に以下に説明される。

【0044】

通常、小滴が0.01から100 s^{-1} の速さで吐出されるように、例えば、0.01から50 s^{-1} の速さで吐出されるように、制御ユニットが、1又はそれぞれの小滴発生器からの水性媒体の小滴の吐出を制御するように構成される。通例、小滴が0.01から10 s^{-1} の速さで吐出されるように、制御ユニットが、1またはそれぞれの小滴発生器からの水性媒体の小滴の吐出を制御するように構成される。

【0045】

通例、装置は、2以上の前記小滴発生器を含む。通常、各小滴発生器は、本明細書中に記述された通りである。

生成される小滴のサイズは、小滴発生器を変更することによって制御され得る。2以上の前記小滴発生器を有することが、異なるサイズの小滴を作製することを可能にする。

【0046】

2以上の小滴発生器は、同一の水性媒体を吐出し得、または2以上の小滴発生器が異なる水性媒体を吐出し得る。それゆえに、2以上の前記小滴発生器を有することにより、異なる水性媒体を有する小滴を作製することが可能になる。例えば、第1の水性媒体を含有する第1の小滴と、第2の水性媒体を含有する第2の小滴とを含む小滴集合が、本発明の装置を使用して作製され得る。

【0047】

2以上の前記小滴発生器を有することにより、例えば、(i)異なるサイズの小滴を作製すること及び/または(ii)異なる水性媒体を含む小滴を作製することが可能になる。異なるサイズの小滴は、例えば、異なる小滴発生器の圧電構成部品に異なる電圧を印加することにより、または小滴発生器を変化させることにより、作製され得る。

【0048】

両親媒性分子が水性媒体中に配置される場合、異なる両親媒性分子を含む小滴が、例えば、作製され得る。例えば、第1の小滴発生器は、第1の両親媒性分子を含有する第1の水性媒体を含み得、第2の小滴発生器は、第2の両親媒性分子を含有する第2の水性媒体を含み得る。

【0049】

本発明の装置は、通例、1またはそれぞれの小滴発生器に対して容器を移動させるためのマイクロマニピュレータを更に含む。通常、制御ユニットは、マイクロマニピュレータを用いて、1またはそれぞれの小滴発生器に対する容器の移動を制御するように構成される。

10

より一般的には、本発明の装置は、容器を移動させるためのマイクロマニピュレータを更に含み、マイクロマニピュレータを用いて容器の移動を制御するように構成される。

マイクロマニピュレータは、一般に電動マイクロマニピュレータである。

【0050】

マイクロマニピュレータの移動が容器の移動を引き起こすように、容器が、通常、マイクロマニピュレータに配置される。通常、制御ユニットが、マイクロマニピュレータの移動を制御するように構成され、該マイクロマニピュレータが、今度は容器を移動させる。

制御手段は、通常、電氣的または無線の信号を介して、容器を移動させるためのマイクロマニピュレータと通信するように構成される。制御手段は、通常、マイクロマニピュレータと電氣的に接続している。別の方法としては、制御手段が、マイクロマニピュレータと無線で通信可能である。

20

いくつかの実施の態様では、装置が、1またはそれぞれの小滴発生器を移動させるためのマイクロマニピュレータを更に含み、装置が1以上の前記小滴発生器を含む場合には、小滴発生器の相対的変位を調整するためのマイクロマニピュレータを更に含む。

【0051】

個々の小滴発生器は、例えば、一斉にまたは別々に移動され得る。

容器を移動させるためのマイクロマニピュレータは、1またはそれぞれの小滴発生器を移動させるためのマイクロマニピュレータと同様であり得る。別の方法としては、容器を移動させるためのマイクロマニピュレータが、1またはそれぞれの小滴発生器を移動させるためのマイクロマニピュレータと異なり得る。通常、容器を移動させるためのマイクロマニピュレータは、1またはそれぞれの小滴発生器を移動させるためのマイクロマニピュレータと同じである。

30

【0052】

制御手段は、通常、電氣的または無線の信号を介して、マイクロマニピュレータと通信するように構成される。制御手段は、通常、マイクロマニピュレータに電氣的に接続される。別の方法としては、制御手段は、マイクロマニピュレータと無線で通信することができる。

【0053】

通常、1またはそれぞれの小滴発生器は、小滴媒体(通常は、水性媒体)を保持するためのチャンバ;吐出口;及び前記吐出口を経由してある容量の前記小滴媒体を移動させ、それによって小滴としての前記容量を吐出するための構成要素を含む。

40

いくつかの実施の態様では、1またはそれぞれの小滴発生器が吸気口を更に含む。通常、吸気口により、吐出口からの小滴の吐出時に小滴発生器のチャンバへの空気が流入することが可能になる。

【0054】

吸気口は、例えば、水性媒体をチャンバへ導入するためのものであり得る。チャンバは、200から600 μ lの水性媒体、例としては、400から500 μ lの水性媒体で通常満たされる。例えば、チャンバは、約400 μ lの水性媒体で満たされ得る。通例、チャンバは、毛細管現象を介して水性媒体で満たされる。当業者が理解するであろう通り、水性媒体をチャンバから蒸発させることが可能であり得る。蒸発は、小滴発生器から吐出される小滴の直径に

50

影響を与え得る。水性媒体の上部に疎水性媒体の層を有することにより、蒸発が抑制され得る。それで、いくつかの実施の態様において、水性媒体が、その上部に疎水性媒体の層を有する。疎水性媒体は、任意の適切な疎水性媒体であり得る。通常、疎水性媒体は、明細書中に記述される通りの疎水性媒体だろう。

【0055】

いくつかの応用のために、少量の水性媒体のみが必要になる。それゆえに、他の実施の態様において、チャンバは、0.5から50 μl の水性媒体、例えば1から10 μl の水性媒体で満たされる。例えば、チャンバは、約5 μl で満たされ得る。これらの実施の態様において、小滴発生器は、通常、最初に水で満たされる。発生器の吐出口は、その後、疎水性媒体を含むウェルに浸され得、該疎水性媒体は、明細書中に記述される通りであり得る。吸引は、その後、例えば、マイクロピペットを用いて小滴発生器の吸気口に適用され得る。これを行うことにより、疎水性媒体は、吐出口へ引きこまれる。例えば、吐出口へ引き込まれる疎水性媒体の量は、0.5から50 μl 、例としては1から10 μl であり得る。吐出口は、その後、水性媒体を含む別のウェルに浸され得る。更に、0.5から50 μl の水性媒体、例としては1から10 μl の水性媒体を吐出口に込めるために、吸引が使用され得る。疎水性媒体は、ノズル内の栓(plug)を形成し、この栓が、吐出口先端において水性媒体がより大容量の水と混合することを抑制する。通例、この容量の水及び疎水性媒体が、組み合わさって圧電変換器によって生成された圧力パルスで吐出口の先端に伝え、小滴が水性媒体から形成される。吐出口は、例えば、ノズルを含み得る。

【0056】

1またはそれぞれの小滴発生器が、小滴媒体(通常は水性媒体)を保持するためのチャンバ;吐出口;及び前記吐出口を通してある容量の前記小滴媒体を移動させ、それによって小滴としての前記容量を吐出するための構成要素を含む場合に、前記吐出口を通してある容量の前記小滴媒体を移動させるための手段が、適切な移動可能な構成要素等の、任意の適切な構成要素であり得、該構成要素が、チャンバから小滴発生器の吐出口を経由してある容量の小滴媒体を移動させることができ、制御ユニットによって制御され得る。ある容量の前記小滴(例えば、水性の)媒体を移動させるための構成要素が、制御ユニットの制御下の機械的構成要素であり得る。通常、このコンポーネントは、圧電変換器である。

【0057】

通例、制御手段は、前記吐出口を通して、ある容量の前記小滴(例えば、水性)媒体を移動させるための構成要素と通信し、それによって吐出口からの小滴媒体の小滴の吐出を制御するように構成される。

通常、制御手段は、マイクロコントローラへの指示を中継し、該マイクロコントローラ自体が、構成要素と通信することができる。制御手段は、通常、マイクロコントローラと電氣的に接続している。別の方法としては、制御手段が、マイクロコントローラと無線で通信することができ得る。構成要素が圧電変換器である場合、圧電変換器を移動させ、該圧電変換器が、今度は、小滴発生器の吐出口を通して、ある容量の小滴媒体(例えば、水性媒体)を移動させるように、マイクロコントローラが、圧電変換器への電圧パルスの印加を制御することができる。

【0058】

いくつかの実施の態様では、前記吐出口を通して、ある容量の前記小滴媒体(例えば、水性媒体)を移動させるための構成要素は、圧電変換器である。他の実施の態様では、吸気口の背後に蒸気泡が形成され、流体を押し出した場合に、小滴が形成される。

【0059】

通常、吐出口が、500 μm より小さい直径、例としては、250 μm よりも小さい直径を有する。吐出口の直径は、小滴が吐出される領域の寸法を提示する。直径は、追加的方法において説明される内径であり、図3に示される。吐出口は円形であり、吐出口の直径は円の直径である。吐出口が円形以外である場合、吐出口の直径は、吐出口と同じ面積を有する円の直径である。

【0060】

より一般的には、吐出口は、200 μm よりも小さい直径を有し、例としては、150 μm よりも小さい直径を有する。例えば、吐出口は、通常、20 μm から200 μm の直径を有し、例としては、60 μm から120 μm の直径を有する。吐出口は、例えば、約100 μm の直径を有する。

【0061】

本発明者らは、吐出口は小滴と比べて可能な限り小さいことが好ましいことを見出した。このことは、少なくとも1つの小滴発生器に対し、容器が移動される場合、例えば、小滴集合が疎水性媒体に配置される場合に、生じるけん引力を減少させることに役立つ。

通常、吐出口は、円筒形状である。

10

【0062】

通例、1またはそれぞれの小滴発生器が、チャンバへの毛細管を更に含み、毛細管は、ノズルであり、毛細管の先端は前記吐出口である。通常、毛細管の先端は、150 μm より小さい直径を有する。例えば、毛細管の先端は、20 μm から200 μm 、例としては60 μm から120 μm の直径を有し得る。毛細管の先端は、例えば、約100 μm の直径を有し得る。

通常、小滴発生器は、1 mm以下、例としては、200 μm 以下の直径を有する小滴を吐出するように構成される。

【0063】

通例、小滴発生器は、10 μm から1 mmの直径、例としては、10 μm から200 μm の直径を有する小滴を吐出するように構成される。小滴発生器は、例えば、30 μm から60 μm の直径を有する小滴を吐出するように構成され得る。いくつかの実施の態様では、1またはそれぞれの小滴発生器が、約50 μm の直径を有する小滴を吐出するように構成される。

20

先に述べたように、通常、小滴は大量の媒体へ吐出される。小滴媒体が水性媒体である場合、大量の媒体は疎水性媒体である。通例、小滴発生器の先端は、前記大量の媒体に浸される。しかしながら、いくつかの実施の態様では、小滴発生器の先端は、前記大量の媒体の上方にある。

【0064】

本発明者らは、1またはそれぞれの小滴発生器のチャンバにおける小滴媒体(通例は水性媒体)の液面及び大量の媒体(通例は疎水性媒体)の液面の間の高さが、吐出される小滴の直径に影響を与え得ることを見出した。通常、高さの違いが大きくなるほど、吐出される小滴の直径が大きくなる。通例、高さの違いは、1 cmから2 cm、例えば、約1.5 cmである。

30

【0065】

電圧パルスは、上記で説明される。必要な電圧パルスは、疎水性媒体において両親媒性分子の濃度に依存し得る。両親媒性分子の濃度が増加するにつれて、水性媒体及び疎水性媒体間の接触面における両親媒性分子の吸着が、この接触面の表面張力を減少させ、小滴を形成するために必要なエネルギーを低くする。通常、電圧パルスは、5 Vから100 Vの頂点間振幅、例としては、10 Vから80 Vの頂点間振幅を有する。頂点間振幅は、例えば、20 Vから60 Vであり得る。

【0066】

40

両親媒性分子は、任意の適切な両親媒性分子であり得る。通例、両親媒性分子は、十分高濃度に存在する場合に、任意の1の前記接触面に2重層を形成することができるものであるだろう。2重層を形成することができる両親媒性分子のタイプは、例えば、接触する小滴の追加的な構成要素によって決まり得る。例えば、小滴が疎水性媒体に配置される場合、両親媒性分子は、疎水性媒体内に2重層を形成することが可能な適切な両親媒性分子であり得る。疎水性媒体内に2重層を形成することが可能な両親媒性分子のタイプは、通常、小滴の疎水性媒体及び水性媒体の性質によって決まるだろうが、広範囲の両親媒性分子が可能である。

【0067】

両親媒性分子は、疎水基及び親水基の両方を有する分子である。両親媒性分子の外層は

50

、通例、小滴の表面において両親媒性分子の単分子層を含む。親水基が水性媒体の方向へ内側に向き、疎水基が、例えば、疎水性媒体の方向へ外側に向いて、分子が小滴の表面に整列するように、単分子層は、通常、水性媒体及び大量の媒体との親水基及び疎水基の相互作用により自然に形成され、維持される。

両親媒性分子は、例えば、非高分子両親媒性分子 (non-polymeric amphipathic molecules) であり得る。別の方法としては、両親媒性分子は、高分子両親媒性分子 (polymeric amphipathic molecules) であり得る。

【0068】

小滴集合において使用され得る両親媒性分子の重要なクラス (class) は、脂質分子である。脂質分子は、リン脂質、脂肪酸、脂肪酸アシル、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、ステロール脂質 (sterol lipids)、プレノール脂質、サッカロ脂質及びポリケチドなどの任意の主要なクラスの脂質であり得る。いくつかの重要な実施例は、リン脂質及び脂肪酸を含み、例としてはリン脂質である。脂質分子は、天然素材または合成品であり得る。脂質分子からの2重層の形成を示すが、更に、本発明の方法は、任意の両親媒性分子に対して適していると見込まれる。

【0069】

両親媒性分子において存在し得る共通の疎水基のクラスは、例えば、ほとんどの脂質にあるように、炭化水素基である。しかしながら、用い得る別の適した種類の疎水基は、フッ化炭素基である。それゆえに、両親媒性分子の更なる重要なクラスは、少なくとも1つのフッ化炭素基を含む両親媒性分子である。かかる分子の例は、疎水性フッ化炭素のテール (tail) 及び親水性ヘッド (head) 基を含む脂質様分子だろう。

【0070】

小滴の両親媒性分子は、全て同じタイプである必要はない。どちらかといえば、両親媒性分子は、いくつかの実施の態様において2以上の異なる種類の両親媒性分子の混合物であり得る。別の重要な実施例は、2重層が形成される場合に、異なる小滴間に形成される2重層が非対称であり得るように、小滴集合における異なる小滴のそれぞれの外層中の両親媒性分子が異なるタイプであり得るというものである。いくつかの実施の態様において、2つの接触する小滴の脂質膜が異なる。

【0071】

従って、通常は、両親媒性分子が脂質分子を含む。脂質分子は、全て同じタイプである必要はない。それゆえに、両親媒性分子は、1のタイプの脂質、または2以上の異なるタイプの脂質分子の混合物を含み得る。同様に、小滴が別の小滴と接触している場合、個々の小滴の外層の脂質組成は、互いに同一または異なり得る。脂質2重層、またはより一般的な両親媒性分子の2重層は、細胞膜のモデルであり、それゆえに、小滴集合が、例えば、膜タンパク質の基礎的研究用の新規のプラットフォームとして、または「ボトムアップの」合成生物学のための多区画の原型細胞の外枠 (protocellular chassis) としてなど、様々な実験的研究のための優れたプラットフォームとしての機能を果たし得るため、脂質分子は、特に都合がよい。

【0072】

脂質は、例えば、その環境を感知し得る (すなわち、高性能な脂質 (smart lipid) であり得る)。脂質は、例えば、pH、光または温度における変化を感知し得る。それゆえに、脂質は、pH感受性の脂質、温度感受性脂質または光感受性脂質であり得る。

脂質は、膜タンパク質 (天然の、改変のまたは合成の膜タンパク質等) が最小の組織の機能的な構成要素として作用できるようにし得る。

リン脂質は、上に概説される理由のため、また、これらは全ての細胞膜の主要な構成要素であるため、特に好ましく、薬剤の送達と同様に合成生物学の適用に特に適したリン脂質を含む小滴を作製する。

【0073】

それで、少なくとも水性媒体の表面の一部における外層を形成する両親媒性分子は、通常、リン脂質分子を含む。リン脂質分子は、同一または異なり得る。すなわち、両親媒性

10

20

30

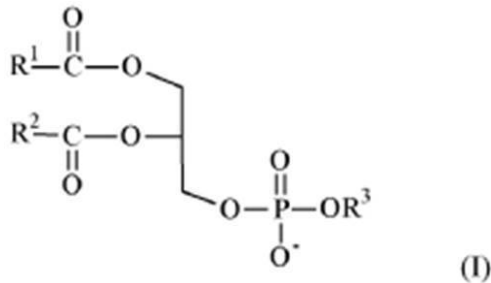
40

50

分子は、1種類のリン脂質、または2以上の異なるリン脂質の混合物を含む。リン脂質は、当業者に周知であり、多くがAvanti Polar Lipid等の供給業者から市販されている。リン脂質分子は、グリセロリン脂質もしくはスフィンゴリン脂質または2つの混合であり得る。リン脂質分子は、陰イオンリン脂質、すなわち、1級アミン、コリン含有リン脂質及び/またはスフィンゴ糖脂質 (glycosphingolipids) を含むリン脂質を含み得る。通例、両親媒性分子は、1以上のグリセロリン脂質を含む。当業者が理解するであろうように、グリセロリン脂質は、グリセロリン脂質を含むがこれに限定されず、該グリセロリン脂質は、以下の式(I):

【0074】

【化1】



10

【0075】

(式中:

R^1 及び R^2 は、同一または異なり、 C_{10} - C_{25} アルキル基及び C_{10} - C_{25} アルキレン基から選択される;

OR^3 が O^- であるように R^3 が存在しないか、または R^3 が存在して H 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^4)_3^+$ 、糖類、またはアミノ酸基であるかのいずれかであり;かつ

各 R^4 は、同一または異なり、 H 及び非置換の C_1 - C_4 アルキルから独立して選択される。) に規定される通りの構造を有する。

20

【0076】

通常、 R^3 が $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^4)_3^+$ である場合に、各 R^4 は同じか異なり、該各 R^4 が H 及びメチルから選択される。当業者が理解するであろう通り、ありとあらゆる R^4 がメチルである場合に、 R^3 基はコリン基であり、ありとあらゆる R^4 が H である場合に、 R^3 基はエタノールアミン基である。

30

【0077】

R^3 がアミノ酸基である場合に、例えば、セリン基、すなわち、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)(\text{COOH})$ であり得る。 R^3 が糖類である場合に、例えば、グリセロール、すなわち、 $-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ 、または例えば、イノシトール、すなわち、 $-\text{CH}(\text{CHOH})_5$ であり得る。

【0078】

R^1 及び R^2 基の典型的な例は、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}-$ 等の直線状 C_{10} - C_{25} アルキル基、及び例えば、 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 等の分岐状 C_{10} - C_{25} アルキル基を含むが、これらに限定されない C_{10} - C_{25} アルキル基である。

40

【0079】

R^1 及び R^2 基の更に典型的な例は、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3-$ 、及び $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7-$ を含むが、これらに限定されない非置換の C_{10} - C_{25} アルキレン基である。

【0080】

当業者が理解するであろう通り、 OR^3 基に隣接するリン酸基における O^- 基は、いくつかの実施の態様においてプロトン化され得、または適切なカチオン、例えば、 Na^+ 等の金属カチオンに結合され得る。

従って、両親媒性分子は、上に規定された通りの式(I)の構造を有する1以上のグリセロ

50

リン脂質を含み得る。

【0081】

例えば、両親媒性分子は、いずれかの1以上の次のグリセロリン脂質を含み得る：1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPhPC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、または1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-rac-(1-グリセロール)](DPPG)が、小滴における両親媒性分子、または1以上のそれらの混合物として用いられ得る。グリセロリン脂質1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)も使用され、通常、pH感受性脂質、例えば脂肪酸との組み合わせにおいて使用される。

【0082】

追加として、または別の方法として、両親媒性分子が、ステロイドを含み得、該ステロイドが、アルキル側鎖を含む。両親媒性分子は、例えば、コレステロール、 β -シトステロール及びラノステロールを含み得る。

【0083】

いくつかの実施の態様では、両親媒性分子は、リン脂質派生物を含む。例えば、両親媒性分子が、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)またはDPPC(1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)等のホスファチジルコリン、またはPOPG(1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール)等のホスファチジルグリセロールを含み得る。

【0084】

好ましくは、両親媒性分子は、DPhPCを含む。

両親媒性分子は、例えば、1以上の脂肪酸、例えば、オレイン酸を含み得る。脂肪酸は、いうまでもなく、当業者にとって周知であり、幅広いものが市販されている。

両親媒性分子は、例えば、(a)1以上のリン脂質、及び(b)1以上の脂肪酸を含む混合物を含み得る。

【0085】

両親媒性分子に加えて、小滴は、PEG修飾脂質(PEGylated lipid)を更に含み得る。「PEG修飾脂質」という用語は、明細書中に使用されているように、ポリ(エチレングリコール)を用いて誘導体化された脂質のことをいう。

【0086】

小滴集合がある容量の(液滴等の)疎水性媒体中にあり、該容量が水性媒体等の親水性媒体中にある場合には、PEG修飾脂質が特に有用であり得る。小滴集合が小滴封入物の一部を形成する場合(例えば、以下に記述された通り)、PEG修飾脂質が、例えば、特に有用であり得る。封入物は、例えば、PEG修飾脂質を用いて機能的になり得る。

【0087】

小滴に1以上のPEG修飾脂質を含めることにより、通常、インビボでの小滴集合が安定化し、また特に、小滴集合の血中濃度半減期が延びる。このことは、小滴集合が1以上の治療用または診断用の薬剤を含む場合、例えば、薬物送達ビヒクルとして使用される場合に、1以上のPEG修飾脂質を含めることにより、小滴集合内の薬剤の血中濃度半減期を引き延ばす有用な効果もあり得るということを意味する。PEG修飾脂質がリポソーム製剤に使用される場合に、かかる効果が以前に観察されている。PEG修飾脂質は、この技術分野において公知であり、NOFコーポレーション、ジャパン(http://www.phospholipid.jp/phospholipid_2-3.html参照)等の供給業者から市販されている。PEG-リン脂質(PEG-phospholipids)、ジアシルグリセロール-PEG(diacylglycerol-PEG)、コレステロール-PEG派生物(cholesterol-PEG derivatives)、及びこれらの混合物などの任意の適切なPEG修飾脂質が使用され得るが、これらに限定されない。

【0088】

PEG修飾脂質のポリ(エチレングリコール)(PEG)構成要素は、複数の異なる配列のいずれか1つを有し得る。それゆえに、実質的には直線状PEGまたは分岐状PEGであり得る。分岐PEGは、例えば、中核グループ(central core group)から生じる3から10のPEG鎖を有し得

10

20

30

40

50

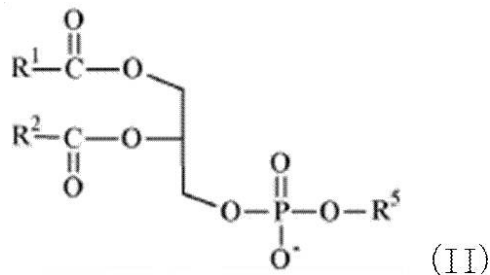
る。別の方法として、分岐PEGは、中核グループから生じる10から100のPEG鎖を有する星状PEG (star PEG) であり得る。別の方法として、PEGは、高分子主鎖 (polymer backbone) に結合された多数のPEG鎖を有するくし状PEG (comb PEG) であり得る。

【0089】

用いられる1以上のPEG修飾脂質は、例えば、以下の式(II)のPEG-リン脂質を含み得る。

【0090】

【化2】



10

【0091】

(式中 R^1 及び R^2 は、式(I)のグリセロリン脂質のために上述された通りであり、 R^5 は、ポリ(エチレングリコール)を含む基である。)

【0092】

ポリ(エチレングリコール)を含む基は、例えば、式 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC(O)}-\text{X}$ 、または例えば、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC(O)}(\text{CH}_2)_3\text{C(O)}-\text{X}$ を有し得、式中、Xは、前記ポリ(エチレングリコール)を含む。X基は、例えば、略直線状PEG、または例えば、中核グループから生じる3から10のPEG鎖を有する分岐PEGを含み得る。別の方法として、例えば、中核グループから生じる10から100のPEG鎖を有する星状PEGであり得る。すなわち、例えば、高分子主鎖に結合された多数のPEG鎖を有するくし状PEGであり得る。

20

【0093】

それゆえに、 R^5 は、例えば、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC(O)}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_q\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC(O)}(\text{CH}_2)_3\text{C(O)}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_q\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC(O)}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_q\text{OH}$ 、または $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC(O)}(\text{CH}_2)_3\text{C(O)}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_q\text{OH}$ であり得、qは正の整数である。整数qは、例えば、5から10,000、または例えば10から1,000であり得る。

30

【0094】

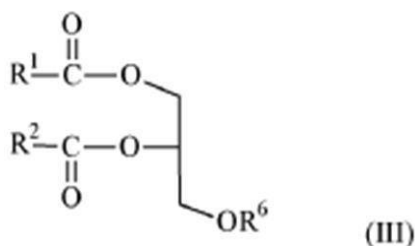
別の方法として、 R^5 は、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q\text{CH}_3$ または $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q\text{H}$ であり得、qは正の整数である。整数qは、例えば、5から10,000、または例えば、10から1,000であり得る。

【0095】

追加として、または別の方法として、1以上のPEG修飾脂質が式(III)のジアシルグリセロール-PEGを含み得る。

【0096】

【化3】



40

【0097】

(式中 R^1 及び R^2 は、式(I)のグリセロリン脂質のために上述された通りであり、 R^6 は、ポリ(エチレングリコール)を含む基である。)

【0098】

ポリ(エチレングリコール)は、例えば、略直線状PEG、または例えば、中核グループか

50

ら生じる3から10のPEG鎖を例えば有する分岐PEGを含み得る。別の方法として、例えば、中核グループから生じる10から100のPEG鎖を有する星状PEGであり得る。または、例えば、高分子主鎖に結合された多数のPEG鎖を有するくし状PEGであり得る。

【 0 0 9 9 】

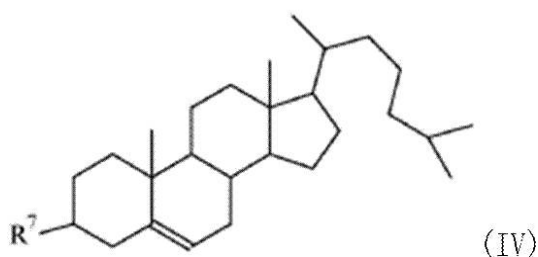
R^6 は、例えば、 $-(CH_2CH_2O)_qCH_3$ 、 $-(CH_2CH_2O)_qH$ 、 $-CH_2CH_2NHC(O)-(OCH_2CH_2)_qOCH_3$ 、 $-CH_2CH_2NHC(O)-(OCH_2CH_2)_qOH$ 、 $-CH_2CH_2NHC(O)(CH_2)_3C(O)-(OCH_2CH_2)_qOCH_3$ または $-CH_2CH_2NHC(O)(CH_2)_3C(O)-(OCH_2CH_2)_qOH$ であり得、 q は正の整数である。整数 q は、例えば、5から10,000、または例えば10から1,000であり得る。

【 0 1 0 0 】

追加として、または別の方法として、1以上のPEG修飾脂質が式(IV)のコレステロール-PEG派生物を含み得る。

【 0 1 0 1 】

【 化 4 】



【 0 1 0 2 】

(式中 R^7 は、ポリ(エチレングリコール)を含む基である。)

【 0 1 0 3 】

更に、ポリ(エチレングリコール)は、略直線状PEG、または例えば、中核グループから生じる3から10のPEG鎖を例えば有する分岐PEGを含み得る。別の方法として、例えば、中核グループから生じる10から100のPEG鎖を有する星状PEGであり得る。または例えば、高分子主鎖に結合する多数のPEG鎖を有するくし状PEGであり得る。

【 0 1 0 4 】

R^7 は、例えば、 $-(OCH_2CH_2)_qOH$ または $-(OCH_2CH_2)_qOCH_3$ であり得、 q は正の整数である。整数 q は、例えば、5から10,000、または例えば10から1,000であり得る。

ポリグリセリンは、ポリ(エチレングリコール)の代わりに使用され得る。

両親媒性分子の濃度は、任意の適切な濃度であり得る。

【 0 1 0 5 】

通常、両親媒性分子の濃度は、 15 mg mL^{-1} 以下である。例えば、両親媒性分子の濃度は、0から 10 mg mL^{-1} であり得る。通例、両親媒性分子の濃度は、 0.05 mg mL^{-1} から 10 mg mL^{-1} であり、例えば、 0.05 mg mL^{-1} から 5 mg mL^{-1} である。より一般的には、両親媒性分子の濃度は、 0.1 mg mL^{-1} から 2.5 mg mL^{-1} であり、例えば、 0.2 mg mL^{-1} から 0.5 mg mL^{-1} である。

【 0 1 0 6 】

通常、小滴媒体は水性媒体であり、小滴は疎水性媒体中に配置され、両親媒性分子の濃度は疎水性媒体中の両親媒性分子の濃度である。

追加として、または別の方法として、小滴が形成された場合に、小滴の水性媒体は、両親媒性分子を含み得る。従って、両親媒性分子の濃度は、水性媒体中の両親媒性分子の濃度であり得る。

【 0 1 0 7 】

本発明の装置の容器は、通例、大量の媒体を含む。小滴媒体が水性媒体である場合、大量の媒体は、疎水性媒体である。小滴媒体が疎水性媒体である場合、大量の媒体は水性媒体である。

通常、小滴媒体は水性媒体であり、本発明の装置の容器は、疎水性媒体を含む。

【0108】

疎水性媒体は、広範囲の材料から選択され得る。疎水性媒体は、単独の疎水性化合物を含み得る。別の方法として、2以上の異なる疎水性化合物の混合物を含み得る。疎水性媒体は、例えば、小滴の浮力、及び小滴が最初に疎水性媒体に導入された後の少なくとも一部の小滴の周囲の両親媒性分子の形成速度に影響を与えるべく選択され得る。

【0109】

通常、疎水性媒体は油である。油は単独の純粋な化合物であり得、または油は、2以上の化合物の混合物を含み得る。油は、形成された2重層の安定性を顕著に損なわないことが通例、望ましい。

油は、例えば、シリコーン油(例えば、ポリフェニルメチルシロキサン)を含み得る。油は、単独のシリコーン油、例えば、ポリフェニルメチルシロキサンからなり得る。別の方法として、油は、2以上の異なるシリコーン油の混合物を含み得る。

10

【0110】

任意の適切なシリコーン油が使用され得る。例えば、油は、シリコーン油DC200($-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-$ のモノマー単位を含む高分子)、ポリ(ジメチルシロキサン)(PDMS)、水素基末端またはPDMS200を含み得る。いくつかの実施の態様では、シリコーン油は、AR20等のポリ(メチルフェニルシロキサン)である。

追加として、または別の方法として、油は、炭化水素を含み得る。油が炭化水素を含む場合、単独の炭化水素化合物、または2以上の炭化水素の混合物を含み得る。

【0111】

20

いくつかの実施の態様では、油は、(a)1以上の炭化水素、及び(b)1以上のシリコーン油を含む混合物である。炭化水素は、例えば、任意の適切な液化炭化水素であり得る。特定の炭化水素が液体であるか否かは、疎水性媒体の温度によって決定されるだろう。従って、液体炭化水素という用語は、疎水性媒体が存在する温度において液体である炭化水素のことをいう。通常、疎水性媒体は、室温で存在するだろう。しかしながら、いくつかの実施の態様において、疎水性媒体は、室温より高くまたは低くあり得る。

【0112】

いくつかの実施の態様において、油は、固体を含み得る。固体の炭化水素は、例えば、シリコーン油と組み合わせて使用され得る。油は、例えば、溶解して液体を形成する固体の混合物であり得る。

30

【0113】

油が炭化水素を含む場合、炭化水素は、分岐し、または無分岐であり得、例えば、5から40個の炭素原子、または5から30個の炭素原子を有する炭化水素(低分子量の炭化水素は、蒸発の抑制を必要とするが)であり得る。好ましくは、炭化水素は、本発明において使用される小滴の操作温度において液体である。適切な例としては、ヘキサデカン、デカン、ペンタンまたはスクアレン等のアルカンまたはアルケンが挙げられる。通例、油は炭化水素を含む。

【0114】

通常、炭化水素は、非置換の C_{10} - C_{20} アルカン、例えばヘキサデカンである。

例えば、集合の浮力効果がより重要ではなく、その両親媒性分子の外層が小滴の表面の少なくとも一部に、より素早く生じ得る集合では、より短いアルカンが適切であり得る。

40

【0115】

いくつかの実施の態様において、炭化水素は、非置換の C_{15} - C_{40} アルカン等のより長鎖の炭化水素である。例えば、スクアレン等の非置換の C_{16} - C_{30} アルカン鎖である。

1の実施の態様では、疎水性媒体は、非置換の C_{10} - C_{20} アルカンを含み、両親媒性分子は、1以上のグリセロリン脂質を含む。例えば、疎水性媒体は、ヘキサデカンを含み得、両親媒性分子の外層は、DPhPCを含み得る。

【0116】

他のタイプの油が可能である。例えば、油はフッ化炭素であり得る。このことは、例えば、小滴集合からの特定の膜タンパク質もしくは溶質の損失を最小にするべく、または酸

50

素等の気体の内容物を制御すべく、いくつかのシステムの研究用に有益であり得る。フッ化炭素は、疎水性及び疎油性の両方であり得るため、フッ化炭素を含む油相は、小滴集合が表面へ接着することを有益に抑制し得る。

【0117】

別の実施の態様では、炭化水素が、臭素置換された (bromo-substituted) C_{10} - C_{30} アルカン、または例えば、臭素置換された C_{10} - C_{20} アルカン、例えば、プロモデカンである。

通常、油はシリコン油または炭化水素を含む。任意の適切なシリコン油が用いられ得る。通例、シリコン油は、明細書中に記述された通りである。

【0118】

シリコン油は、その密度が水の密度に近いという理由で都合がよく、このことは、小滴が水中においてほぼ中立的な浮力 (neutrally buoyant) となることを確実にする。シリコン油は、例えば、ポリフェニルメチルシロキサンであり得、このポリフェニルメチルシロキサンは、約 1 g cm^{-3} の密度を有する。

【0119】

通常、炭化水素は、5から40個の炭素原子 (C_5 - C_{40} の炭化水素) を有し、より一般的には10から30個の炭素原子 (C_{10} - C_{30} の炭化水素) を有する。通常、アルカンまたはアルケンである。従って、炭化水素は、 C_5 - C_{30} アルカン、または C_{10} - C_{20} アルカンであり得る。別の実施の態様では、炭化水素は、 C_5 - C_{20} アルケン、または C_{10} - C_{20} アルケンであり得る。通常、炭化水素は非置換である。1の実施の態様では、スクアレンである。好ましい実施の態様では、炭化水素は、非置換の C_5 - C_{20} アルカンであり、好ましくは非置換の C_{10} - C_{20} アルカンである。

【0120】

炭化水素は、例えば、スクアレン、ヘキサデカンまたはデカンであり得る。しかしながら、いくつかの実施の態様では、炭化水素は、ハロゲン原子、例えば臭素で置換され得る。

【0121】

いくつかの実施の態様では、疎水性媒体は、シリコン油及び炭化水素の混合物を含む。かかる混合物が、安定な2重層が形成されるのに必要なインキュベーション時間を好都合に短くすることをもたらすことが発見されている。混合物中のシリコン油及び炭化水素は、上に更に記述される通りであり得る。通常、炭化水素は、非置換の C_{10} - C_{20} アルカンであり、好ましくはヘキサデカンである。通例、シリコン油は、プリント中の小滴の沈降速度を制御すべく、水の密度に近いが水より小さい密度を有する。小滴集合がある容量 (液滴等) の疎水性媒体中にある場合、該容量は親水性媒体 (水性媒体等) 中であり、通常、シリコン油は、水の密度に近い密度を有して、小滴集合における小滴が、親水性媒体においてほぼ中性の浮力を有することを確実にする。

【0122】

シリコン油は、例えば、ポリフェニルメチルシロキサンであり得る。通例、炭化水素に対するシリコン油の体積比は、0.5:1以上である。炭化水素に対するシリコン油の体積比は、例えば、0.5:1から5:1であり得、例えば、約1:1である。いくつかの実施の態様では、炭化水素に対するシリコン油の体積比は、5:1以上である。

用いられる疎水性媒体は、例えば、水の密度に近い密度、例えば、約 1 g cm^{-3} 以下の密度を有し得る。

1の実施の態様では、疎水性媒体は、シリコン油及びヘキサデカンの両方を含む。通常、シリコン油は、ポリフェニルメチルシロキサンである。通常、ヘキサデカンに対するシリコン油の体積比は、0.5:1以上であり、例えば、0.5:1から5:1である。例としては、約1:1であり得る。いくつかの実施の態様では、炭化水素に対するシリコン油の体積比は、5:1以上である。

【0123】

好ましくは、疎水性媒体はヘキサデカンを含む。いくつかの実施の態様では、疎水性媒

10

20

30

40

50

体は、シリコーン油を更に含む。

【0124】

通常、疎水性媒体はヘキサデカンを含み、両親媒性分子はDPhPCを含む。より一般的には、疎水性媒体がヘキサデカンを含み、両親媒性分子がDPhPCを含み、水性媒体が水性緩衝溶液を含む。

【0125】

本発明の装置の容器は、任意の適切な容器であり得る。

通常、容器は、ポリ(メチルメタクリレート)等の高分子を含む。例えば、容器は、前記高分子から微細加工されたウェルを含み得る。

【0126】

いくつかの実施の態様では、容器の底面がガラスを含む。前記複数の小滴のうち、少なくとも1つの小滴は、通常、ガラスに接触している。ガラスは、小滴があちこち移動することを抑制する。

【0127】

他の実施の態様では、容器の底面が、ポリ(メチルメタクリレート)等の高分子を含む。

例えば、本発明の装置が自己-折り畳み小滴集合(例えば、以下に述べる自己-折り畳み集合)を作製するために使用され、前記複数の小滴のうち、少なくとも1つの小滴が、通常、高分子に接触している。自己-折り畳み小滴集合の小滴は、通例、高分子表面に接着せず、小滴集合が折り重なることが可能になる。

【0128】

更なる実施の態様では、容器がポリスチレン等の高分子を含む。例えば、本発明の装置が小滴集合を作製するために使用され、該小滴集合において水性の小滴が疎水性媒体の液滴中にあり、該液滴が今度は水性媒体である第2の大量の媒体内にある場合に、容器がポリスチレンを含み得る。かかる小滴集合は後述される。

通常、容器は、疎水性媒体である大量の媒体と両親媒性分子とを含む。追加として、または別の方法として、小滴発生器は、水性媒体である小滴媒体と、両親媒性分子とを含み得る。

【0129】

通例、本発明の装置の小滴発生器は、小滴媒体を含む。明細書中に前述したように、通常、小滴媒体は水性媒体である。水性媒体は、例えば、明細書中に更に記述するとおりであり得る。いくつかの実施の態様では、小滴発生器が、水性媒体及び膜タンパク質を含む。通例、膜タンパク質は水溶液中にある。追加として、または別の方法として、大量の疎水性媒体が膜タンパク質を含み得る。

【0130】

膜タンパク質は、任意のタイプのものであり得る。不可欠な膜タンパク質を使用することが示されているが、重要性の低い(peripheral)膜タンパク質が使用され得ることは等しく予想される。膜タンパク質は、例えば、(i)集合内の個々の小滴の間、及び(ii)小滴集合及び外部媒体の間における物質の交換、及び電気的通信の正確な制御を可能にするための膜ポンプ、チャンネル及び/または膜孔であり得る。膜タンパク質は、例えば、ブドウ球菌-溶血素膜孔等の-溶血素(HL)膜孔であり得る。しかしながら、任意の適切な膜タンパク質は、2つの主要なクラス、すなわち、-バレルまたは-ヘリックス束からの1つを含んで使用され得る。重要な応用は、膜孔またはチャンネルである膜タンパク質である。タンパク質膜孔またはチャンネルに加えて、更に考えられる膜タンパク質としては、受容体、輸送体または、細胞認識または細胞間相互作用を生じさせるタンパク質が挙げられるが、これらのみではない。チャンネルは、電圧依存イオンチャンネル、バクテリオロドプシン等の光感受性チャンネル、リガンド依存性チャンネルまたは機械受容チャンネルであり得る。

【0131】

物質の交換及び電気的通信を可能にする適切な膜タンパク質が公知であり、当業者にとって容易に利用可能である。多くのかかるタンパク質が市販されているか、または公知の方法によって作製可能であるかのいずれかである。例えば、野生型の(WT) HLモノマーは

10

20

30

40

50

、インビトロの転写-翻訳 (IVTT) によって作製され得、ウサギ赤血球細胞膜を用いたインキュベーションによって7量体化される。7量体は、通常、ナトリウム硫酸ドデシルポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって精製される (Maglia, G. et al., Method. Enzymol. 475, 591-623, (2010)。また、Bayley, H. et al, Droplet interface bilayers. Mol. Biosyst. 4, 1191-1208 (2008) は、大量の油中において作製された小滴接触面2重層への挿入のために分析されたいくつかのタンパク質を一覧表にする。他の適切な膜タンパク質としては、細菌ペプチド及びイオノフォアが挙げられるが、これらに限定されない。

【0132】

膜タンパク質は、別の方法として、改変膜タンパク質または合成膜タンパク質であり得る。改変膜タンパク質は、例えば、遺伝子的な改変タンパク質であり得、または共有結合性または非共有結合性の化学的な改変タンパク質であり得る。合成膜タンパク質は、例えば、ペプチドまたは有機分子であり得る。

10

【0133】

小滴は、小滴間の2重層に組み込まれた膜タンパク質を通して互いに化学種 (chemical species) を交換し得る。適切な膜タンパク質としては、ポンプ、チャネル及び/または膜孔、受容体タンパク質、輸送体タンパク質、及び/または細胞認識または細胞間相互作用を生じさせるタンパク質、例えば HL膜孔が挙げられるが、これらに限定されない。他の適切な膜タンパク質としては、細菌ペプチド及びイオノフォアが挙げられるが、これらに限定されない。膜タンパク質は、別の方法として、改変膜タンパク質または合成膜タンパク質であり得る。

20

【0134】

従って、外部環境への輸送及び外部環境からの輸送と同様に、小滴集合は、ネットワークを介して、対象物から対象物へ化合物等の物質を輸送することができる。小滴集合は、追加として、または別の方法として、対象から対象へ電気的信号を伝達し、または外部環境へ及び外部環境から電気的信号を伝達することができる。複雑な輸送システムが、このようにして組み立てられ得る。輸送システムは小滴集合を含む。

水等の化学種が、2重層を通して交換され得る。

【0135】

小滴集合は、例えば、センサー分子としての機能を果たし得、例えば、外部環境における特定の化学物質の存在を検出することができ、または光を検出することができる。従って、小滴は、センサー分子を含み得る。センサー分子は、小滴の水性媒体または2重層に存在し得、及び任意の適切なセンサー分子であり得る。センサー分子は、特定の化学物質 (例えば、標的分析物) の存在を感知できる分子、または光感受性分子であり得、またはpHまたは温度における変化を感知し得る。いくつかの実施の態様では、センサー分子が、特定の生化学物質または酵素の存在 (または存在しないこと) を感知し得る。

30

通常、膜タンパク質は、 α -溶血素 (HL) である。

【0136】

通例、存在する場合には、膜タンパク質の濃度が、 0.1 ng mL^{-1} 以上であり、例えば、 1 ng mL^{-1} 以上である。例えば、膜タンパク質の濃度は、 2 ng mL^{-1} 以上であり、例えば、 10 ng mL^{-1} 以上である。膜タンパク質の濃度は、例えば、 0.1 ng mL^{-1} から 100 mg mL^{-1} であり得る。通常、膜タンパク質の濃度は、 0.1 ng mL^{-1} から 10 mg mL^{-1} であり、例えば、 1 ng mL^{-1} から 5 mg mL^{-1} である。より一般的には、膜タンパク質の濃度は、 2 ng mL^{-1} から 1 mg mL^{-1} であり、例えば、 2 ng mL^{-1} から 0.1 mg mL^{-1} である。いくつかの実施の態様では、膜タンパク質の濃度は、約 10 ng mL^{-1} である。

40

【0137】

通常、膜タンパク質の濃度は、小滴が形成される場合の小滴の水性媒体における膜タンパク質の濃度である。膜タンパク質を含む小滴が別の小滴 (膜タンパク質を含み得、または含まなくてもよい) に接触している場合に、両親媒性分子の2重層が接触面に形成される。通常、この2重層が膜タンパク質を含む。従って、当初、水性媒体中の膜タンパク質が

50

、2重層に移動し得る。

膜タンパク質の適切な濃度は、因子の数によって決定され得る。2重層へ膜タンパク質が挿入される割合は、例えば、時間とともに減少し得る。通常、このことは、使用され得る膜タンパク質の濃度に下限を課すだろう。

【0138】

界面活性剤が水性媒体に加えられ得る。界面活性剤は、例えば、水性媒体から2重層への膜タンパクの移動を触媒すべく、加えられ得る。通例、加えられる界面活性剤の濃度は、2重層を不安定化するほど高いわけではないだろう。

【0139】

濃度は、小滴集合をプリントするのにかかる時間によっても決定され得る。もし、例えば、小滴集合における小滴の数が減少する場合、膜タンパク質の濃度も減少し得る。

小滴が別の小滴に接触している場合、小滴及び別の小滴における膜タンパク質の濃度は、同じまたは異なり得る。更に、小滴が滴集合の一部である場合、小滴集合の各小滴における膜タンパク質の濃度は、同じまたは異なり得る。

【0140】

通常、少なくとも1つの2重層は、膜タンパク質を含む。接触する小滴間の接触面における2重層は、1つより多い膜タンパク質を含み得る。例えば、特定の2重層は、同じ膜タンパク質の多数の複製、または2以上の異なるクラスの膜タンパク質を含み得る。1より多いクラスが存在する場合には、2重層は、それぞれの異なるクラスの多数の複製を含み得る。

【0141】

物質の交換及び電氣的通信を可能にする適切な膜タンパク質は、公知であり、当業者にとって容易に利用可能である。多くのかかるタンパク質は、市販されているか、または公知の方法によって作製し得るかのいずれかである。例えば、野生型の HLモノマーは、インビトロの転写-翻訳 (IVTT) によって作製され、ウサギ赤血球細胞膜とともにインキュベーションすることによって7量体化され得る。通常、7量体は、ナトリウム硫酸ドデシルポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) (Maglia, G. et al, Method. Enzymol. 475, 591-623, 2010) によって精製される。また、Bayley, H. et al, Droplet interface bilayers. Mol. BioSyst. 4, 1191-1208 (2008) は、大量の油中において作製される小滴接触面2重層への挿入をテストされたいくつかのタンパク質を一覧表にする。他の適切な膜タンパク質としては、細菌ペプチド及びイオノフォアが挙げられるが、これに限定されない。

【0142】

膜タンパク質は、別の方法として、改変膜タンパク質または合成膜タンパク質であり得る。改変膜タンパク質は、例えば、遺伝的な改変タンパク質、または共有結合性もしくは非共有結合性の化学的な改変タンパク質であり得る。合成膜タンパク質は、例えば、ペプチドまたは有機分子であり得る。

【0143】

小滴は、いくつかの実施の態様において、他の材料、化合物または薬剤を含み得る。例えば、小滴は、染料、または磁石等の小分子を含み得る。適切な染料としては、キシレンシアノールFF、オレンジG、ピラニン、フルオレセイン及び5-cTAMRA (5-カルボキシテトラメチルローダミン) が挙げられるが、これらに限定されない。別の方法としては、小滴は、任意の適切なセンサー分子、例えば、特定の化学物質を感知でき、もしくは光感受性分子であるセンサー分子を含み得、または、pHもしくは温度の変化を感知し得る。いくつかの実施の態様において、センサー分子は、特定の生化学物質もしくは酵素の存在 (または存在しないこと) を感知でき得る。更なる選択肢として、小滴は、プロドラッグ等の治療薬、または造影剤等の診断用薬を含み得る。小滴は、酵素を含み得る。

【0144】

小滴は、生きている細胞 (または生きている複数の細胞)、例えば、再生医療のための細胞を含み得る。例えば、細胞は、プリント後の小滴内において成長し、及び/またはプリ

10

20

30

40

50

ント後の小滴間の2重層を解体し得る。

【0145】

一度プリントされた小滴集合は、固体材料のパターニングのための鋳型として使用され得る。固体材料は、例えば、電子工学、光学、フォトンクス、または他の材料科学の応用において使用され得る。小滴、または複数の小滴は、例えば、特定の小滴間において拡散し得る無機材料を含み得る。無機材料は、その後に反応して、硫化カドミウム等の無機固体を形成し得る。

【0146】

本発明の装置では、通常、1またはそれぞれの小滴発生器が、1 mm以下、例えば、200 μm 以下の直径を有する小滴を吐出するように構成される。

10

通常、小滴は球状の小滴であり、直径は球の直径に等しい。小滴が球状の小滴でない場合には、小滴の直径は小滴として同じ体積を有する球の直径に等しい。

上に述べたように、小滴サイズは、ノズル配置、電圧パルス振幅及び電圧パルスの持続時間等の多様な因子によって制御され得る。

【0147】

通例、1またはそれぞれの小滴発生器は、10 μm から1 mmの直径を有する小滴を吐出するように構成される。1またはそれぞれの小滴発生器は、例えば、10 μm から200 μm 、例としては、30 μm から60 μm の直径を有する小滴を吐出するように構成され得る。いくつかの実施の態様では、1またはそれぞれの小滴発生器は、約50 μm の直径を有する小滴を吐出するように構成される。

20

通常、1またはそれぞれの小滴発生器は、2 μm 以下の体積を有する小滴を吐出するように構成される。

いくつかの実施の態様では、1またはそれぞれの小滴発生器が、0.001 nLから100 nL、例としては、0.005 nLから0.5 nLの体積を有する小滴を吐出するように構成される。

【0148】

通常、制御ユニットは、少なくとも0.01 s^{-1} 、例としては、0.25 s^{-1} の速さにおいて小滴の吐出を制御するように構成される。通例、制御ユニットは、少なくとも0.5 s^{-1} の速さにおいて小滴の吐出を制御するように構成される。

【0149】

通例、制御ユニットは、0.01から100 s^{-1} 、例としては、0.01から50 s^{-1} の速さにおいて小滴の吐出を制御するように構成される。通常、制御ユニットは、0.01から10 s^{-1} 、例としては、0.25から5 s^{-1} の速さにおいて小滴の吐出を制御するように構成される。より一般的には、制御ユニットは、0.5から2.5 s^{-1} 、例としては、0.75から2 s^{-1} の速さにおいて小滴の吐出を制御するように構成される。通例、制御ユニットは、約1 s^{-1} の速さにおいて小滴の吐出を制御するように構成される。

30

【0150】

2以上の小滴発生器がある場合、小滴が吐出される速さは、個々の小滴発生器から小滴が吐出される速さであり、小滴が吐出される全体の速さでは必ずしもない。例えば、多数の小滴発生器が同時に使用される場合、通常、全体のプリントの速さは、小滴が1つの小滴発生器から吐出される速さに、発生器の数を乗算した速さに略等しい。

40

従って、1より多い小滴発生器の使用は、全体のプリント速度を顕著に増加し得る。

【0151】

いくつかの実施の態様では、1つの小滴の吐出及び別の小滴の吐出の間には小休止があり得る。小滴の吐出は、本発明の方法のために、以下により詳細に説明される。追加的方法では、使用されるプリントパターン及びアルゴリズムも、実施例において図示される。

【0152】

通例、本発明の装置は、複数の前記小滴発生器を含む。例えば、装置は、2以上の小滴発生器を含み得る。通常、装置は、1から20個の小滴発生器、例えば1から10個の小滴発生器を含む。より一般的には、装置は、1から5個の小滴発生器、例としては、2または3個の小滴発生器を含む。いくつかの実施の態様では、装置が、2個の小滴発生器を含む。

50

通常、制御ユニットは、各小滴発生器からの小滴の吐出を制御するように構成される。

【0153】

上に述べたように、複数の前記小滴発生器を含む装置の有益な点は、各小滴発生器が異なる小滴媒体(通常、水性媒体)を含み得ることである。このことは、多様な小滴集合がプリントされることを可能にする。小滴集合は、例えば、異なる機能性及び/または複雑な通信システムを有する多数の区画を含み得、該通信システムが、集合内の小滴が互いにまたは外部環境と通信することを可能にする。

【0154】

適切な方法で、いくつかの実施の態様では、装置が複数の前記小滴発生器を含む場合に、装置が通常、第1小滴媒体を含む第1小滴発生器、及び第2小滴媒体を含む第2小滴発生器を含み、第1及び第2小滴媒体が異なる。第1小滴媒体は、本明細書中に記述されるように、通例、水性媒体である。第2小滴媒体も、通常、本明細書中に記述された通りの水性媒体である。それで、いくつかの実施の態様では、装置が複数の前記小滴発生器を含む場合に、装置が、第1水性媒体を含む第1小滴発生器と、第2水性媒体を含む第2小滴発生器とを含み、第1及び第2水性媒体が異なる。第1水性媒体は、通例、本明細書中に記述された通りの水性媒体である。第2水性媒体は、通常、本明細書中に記述された通りの水性媒体である。

【0155】

いくつかの実施の態様では、第1水性媒体が膜タンパク質を含み、第2水性媒体が前記膜タンパク質を含まない。膜タンパク質は、例えば、本明細書中に記述された通りの膜タンパク質であり得る。膜タンパク質は、例えば、(i)集合内の個々の小滴間及び(ii)小滴集合及び外部媒体の間における物質の交換、及び電気的通信を正確に制御することを可能にするための膜ポンプ、チャンネル及び/または膜孔であり得る。膜タンパク質は、例えば、

HL膜孔であり得る。しかしながら、適切な膜タンパク質が、2つの主要なクラス、すなわち、 α -バレルまたは β -ヘリックス束からの1つを含んで使用され得る。タンパク質膜孔またはチャンネルに加えて、更なる考えられる膜タンパク質としては、受容体、輸送体、または細胞認識または細胞間相互作用を生じさせるタンパク質が挙げられるが、これらのみではない。チャンネルは、電位依存性イオンチャンネル、バクテリオロドプシン等の光感受性チャンネル、リガンド依存性チャンネルまたは機械受容チャンネルであり得る。いくつかの実施の態様では、膜タンパク質は、水溶液中にある。他の適切な膜タンパク質としては、細菌ペプチド及びイオノフォアが挙げられるが、これらに限定されない。膜タンパク質は、別の方法として、改変膜タンパク質または合成膜タンパク質であり得る。改変膜タンパク質は、例えば、遺伝的な改変タンパク質であり得、または共有結合性または非共有結合性の化学的な改変タンパク質であり得る。合成膜タンパク質は、例えば、ペプチドまたは有機分子であり得る。

【0156】

別の実施の態様において、第1及び第2水性媒体は、異なる濃度の膜タンパク質を有し得る。膜タンパク質は、例えば、(i)集合内の個々の小滴間及び(ii)小滴集合及び外部媒体の間における物質の交換、及び電気的通信の正確な制御を可能にするための膜ポンプ、チャンネル及び/または膜孔であり得る。膜タンパク質は、例えば、HL膜孔であり得る。しかしながら、任意の適切な膜タンパク質が2つの主要なクラス、すなわち、 α -バレルまたは β -ヘリックス束を含んで使用され得る。タンパク質膜孔またはチャンネルに加えて、更なる考えられる膜タンパク質としては、受容体、輸送体、または細胞認識または細胞間相互作用を生じさせるタンパク質が挙げられる。チャンネルは、電圧依存性イオンチャンネル、バクテリオロドプシン等の光感受性チャンネル、リガンド依存性チャンネルまたは機械受容チャンネルであり得る。他の適切な膜タンパク質としては、細菌ペプチド及びイオノフォアが挙げられるがこれらに限定されない。膜タンパク質は、別の方法として、改変膜タンパク質または合成膜タンパク質であり得る。改変膜タンパク質は、例えば、遺伝的な改変タンパク質、または共有結合性または非共有結合性の化学的な改変タンパク質であり得る。合成膜タンパク質は、例えば、ペプチドまたは有機分子であり得る。

【0157】

いくつかの実施の態様では、第1及び第2水性媒体が異なるオスモル濃度を有し、または第1及び第2水性媒体が塩または緩衝剤の異なる濃度を含む。例えば、第1水性媒体が膜タンパク質を含む場合、第1及び第2水性媒体が異なるオスモル濃度を有し、または第1及び第2水性媒体が異なる濃度の塩または緩衝剤を含有し得る。他の実施の態様では、第1水性媒体が第1の塩を含み、第2水性媒体が第2の塩を含み、第1の塩及び第2の塩が異なる。第1の塩は、例えば、塩化カリウム等の塩化物であり、第2の塩は、炭酸カルシウム等の炭酸塩であり得る。

【0158】

第2水性媒体のオスモル濃度に対する第1水性媒体のオスモル濃度の比は、2:1から50:1であり得、好ましくは5:1から20:1である。いくつかの実施の態様では、第2水性媒体のオスモル濃度に対する第1水性媒体のオスモル濃度の比は、5:1から15:1である。

第2水性媒体の塩または緩衝剤の濃度に対する、第1水性媒体の塩または緩衝剤の濃度の比は、2:1から50:1であり得、好ましくは5:1から20:1である。

【0159】

いくつかの実施の態様では、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、100 mMから1,000 mMであり、第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、0.1 mMから100 mMである。通常、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、150 mMから750 mMであり、第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、0.5 mMから75 mMである。より一般的には、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、150 mMから500 mMであり、第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、5 mM から25 mMである。例えば、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、約250 mMであり、第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、約25 mMであり得る。

【0160】

通例、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度、及び第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、塩化カリウム等のアルカリ金属ハロゲン化物塩の濃度である。例えば、緩衝溶液は、トリス-HCl及び/またはKClを含み得る。異なる塩濃度を含有する2つの小滴が互いに接触して配置される場合、水は、通常、1つの小滴から他方へ移動するだろう。本発明者らは、異なるオスモル濃度の小滴のネットワークを作り出すことにより、この方法の長所を引き立たせて使用した。図15に示す通り、小滴間の水の移動は、小滴間の接着が維持されている限り、ネットワークのゆがみを引き起こす。

ネットワークにおける小滴のオスモル濃度の違い等の因子を制御することにより、本発明の装置は、予測可能な方法において折り重なる小滴集合を作製するように構成され得、該小滴集合は、本明細書中において自己-折り畳みネットワークまたは自己-折り畳み小滴集合という。装置は、例えば、本発明の製品において明細書中に以下に記述した通り、小滴集合を作製するように構成され得る。

【0161】

異なる水性媒体を含む小滴集合における接触する小滴間に浸透作用が生じる場合、1つの小滴から別のものへの水の流入は、2つの小滴の相対的サイズの違いを生じさせるだろう。従って、例えば、2つの小滴が最初に互いに接触したときには、これらは、例えば、同じ直径を有し得るが、浸透作用が起きた後には異なる直径を有し得る。

【0162】

本発明の装置では、第1小滴発生器は、第1直径を有する小滴を吐出するように構成され、第2小滴発生器は、第2直径を有する小滴を吐出するように構成され得、第1及び第2直径は、同一または異なる。いくつかの実施の態様では、小滴が最初に互いに接触するとき、第1及び第2直径は同一である。他の実施の態様では、小滴が最初に互いに接触するとき、第1及び第2直径が異なる。

【0163】

上に述べたように、1またはそれぞれの小滴発生器は、通常、小滴媒体(通常、水性媒体)を保持するためのチャンバと、吐出口と、前記吐出口を通してある容量の前記小滴媒体

10

20

30

40

50

を移動させて、それによって小滴としての前記容量を吐出するための構成要素とを含む。装置は、複数の前記小滴発生器を含み、第1小滴発生器の吐出口は、第2小滴発生器の吐出口としての同じ直径を有し得、または第2小滴発生器の吐出口とは異なる直径を有し得る。

【0164】

いくつかの実施の態様では、制御ユニットは、(a)1またはそれぞれの小滴発生器に対する容器の移動、及び(b)小滴の吐出を調整して、少なくとも1つの小滴の層を含む前記小滴集合を作り出すように構成され、それぞれの前記小滴が(i)小滴媒体及び(ii)小滴媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、小滴媒体が水性媒体または疎水性媒体であり、層における各小滴が、層の少なくとも1の他の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の層を形成する。

10

【0165】

接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層が、例えば、前記両親媒性分子の2重層またはブロック共重合体の層であり得る。ブロック共重合体の層は、例えば、トリブロック共重合体の層であり得る。小滴媒体が水性媒体である場合、接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層が、例えば、前記両親媒性分子の2重層またはブロック共重合体の層であり得る。小滴媒体が疎水性媒体である場合、接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層は、例えば、前記両親媒性分子の2重層またはブロック共重合体の層であり得る。

【0166】

20

通例、接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層は、前記両親媒性分子の2重層である。

通常、小滴媒体は水性媒体である。従って、いくつかの実施の態様では、制御ユニットが、(a)1またはそれぞれの小滴発生器に対する容器の移動及び(b)小滴の吐出を調整して、少なくとも1つの小滴の層を含む前記小滴集合を作り出すように構成され、それぞれの前記小滴が(i)水性媒体及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、層の各小滴が、層の少なくとも1の他の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成する。

【0167】

水性媒体は、通例、本明細書中に記述された通りである。水性媒体は、例えば、任意の適切な水性媒体であり得る。例えば、水性媒体は、純水、もしくは水性緩衝溶液、または1以上の塩の水溶液、あるいはアガロース及び水を含む水溶液であり得る。

30

両親媒性分子は、更に本明細書中に記述される通りであり得る。

【0168】

通例、制御ユニットは、(a)1またはそれぞれの小滴発生器に対する容器の移動、及び(b)小滴の吐出を調整して、複数の前記小滴の前記層を含む前記小滴集合を作り出すように構成され、層の小滴が隣接する層の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての両親媒性分子の層を形成するように、各層が別の層に隣接配置される。

【0169】

接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層は、例えば、前記両親媒性分子の2重層またはブロック共重合体の層であり得る。ブロック共重合体の層は、例えば、トリブロック共重合体の層であり得る。小滴媒体が水性媒体である場合、接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層は、例えば、前記両親媒性分子の2重層またはブロック共重合体の層であり得る。小滴媒体が疎水性媒体である場合、接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層は、例えば、前記両親媒性分子の2重層またはブロック共重合体の層であり得る。

40

【0170】

通常、接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層は、前記両親媒性分子の2重層である。

通例、制御ユニットは、(a)1またはそれぞれの小滴発生器に対する容器の移動、及び(b)

50

)小滴の吐出を調整して、複数の前記小滴の前記層を含む前記小滴集合を作り出すように構成され、1つの層が別の層上に配置される。通常、小滴集合は、水平層において上向きに作り上げられる。

【0171】

小滴集合は、例えば、3以上の層を含み得る。前記小滴の層の数は、例えば、5以上であり得る。通常、前記小滴の層の数は、10以上、例としては、15以上である。より一般的には、前記小滴の層の数は、20以上である。いくつかの実施の態様では、層の数は、10から50であり、例としては、20から30である。層の数は、例えば、約20または約28であり得る。他の実施の態様では、前記小滴の層の数は、50以上、例としては、100以上である。前記小滴の層の数は、500以上であり、例としては1,000以上であり得る。例えば、前記小滴の層の数は、2,000以上であり、例としては4,000以上であり得る。

10

【0172】

本発明の装置は、第1の小滴集合及び第2の小滴集合を形成するために使用され得る。第3の小滴集合が作製され得、該第3の小滴集合は、第1の小滴集合及び第2の小滴集合を含む。第1の小滴集合及び第2の小滴集合は、例えば、第1の小滴集合の少なくとも1の小滴と第2の小滴集合の少なくとも1の小滴との間に形成される2重層によって結合し得る。第1の小滴集合の各小滴が第2の小滴集合の各小滴と2重層を形成することは必須ではない。

【0173】

いくつかの実施の態様では、制御ユニットが(a)1またはそれぞれの小滴発生器に対する容器の移動、及び(b)小滴の吐出を調整して、複数の小滴を含む前記小滴集合を作り出すように構成され、それぞれの前記小滴が(i)水性媒体、及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、それぞれの前記小滴が、別の前記小滴に接触して接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、複数の小滴が、第1領域の前記小滴及び第2領域の前記小滴を含み、第1領域における各小滴が、第1領域における少なくとも1の他の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、第2領域における各小滴が、第2領域における少なくとも1の他の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、第1領域における小滴の水性媒体が、第2領域における小滴の水性媒体と異なり、及び/または第1領域の小滴間の2重層の組成が、第2領域の小滴間の2重層の組成と異なる。

20

【0174】

第1領域における少なくとも1つの小滴が、例えば、第2領域における少なくとも1つの小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し得る。通常、第1領域の小滴と、第2領域の小滴との間に2以上の接触面が形成される。第2領域中の小滴とは2重層を形成しない第1領域中の少なくとも1つの小滴、及び/または第1領域中の小滴とは2重層を形成しない第2領域中の少なくとも1つの小滴が存在し得る。

30

【0175】

1の実施の態様では、第1領域における小滴の水性媒体は、膜タンパク質を含み、第2領域における小滴の水性媒体は、前記膜タンパク質を含まなくてもよく、第1及び第2領域中の小滴の水性媒体は、異なる濃度の膜タンパク質を含み、第1領域の小滴間の2重層は、膜タンパク質を更に含み、第2領域の小滴間の2重層は、前記膜タンパク質を含まないか、または第1領域の小滴間の2重層よりも低濃度の前記膜タンパク質を有するかのいずれかであり、第1及び第2領域における小滴の水性媒体は、異なるオスモル濃度を有し、または第1及び第2領域の小滴の水性媒体は、異なる濃度の塩または緩衝剤を有し得る。

40

【0176】

1の実施態様では、第1領域の小滴の水性媒体が第1の膜タンパク質を含み、第2領域の小滴の水性媒体が第2の膜タンパク質を含み、第1及び第2の膜タンパク質が異なる。第1及び第2の膜タンパク質は、本明細書中に記述された通りの膜タンパク質であり得る。

【0177】

通常、本発明の装置によって作製される小滴集合は、少なくとも100の前記小滴を有し、それぞれの該小滴は、(i)水性媒体及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層

50

を含む。より一般的には、本発明の装置によって作製された小滴集合は、少なくとも1,000の前記小滴を含み、それぞれの前記小滴は、(i)水性媒体及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含む。更に一般的には、本発明の装置によって作製される小滴集合は、少なくとも10,000の前記小滴(例えば、25,000)を含み、それぞれの該小滴が、(i)水性媒体及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含む。

【0178】

いくつかの実施の態様では、本発明の装置によって作製される小滴集合の小滴の数は、非常に大きくなり、例えば、少なくとも100,000であり得る。本発明の装置によって作製される小滴集合の小滴の数は、少なくとも1,000,000であり、例としては、少なくとも10,000,000であり得る。例えば、本発明の装置によって作製される小滴集合の小滴の数は、少なくとも1,000,000,000であり得る。いくつかの実施の態様では、本発明の装置によって作製される小滴集合の小滴の数が、少なくとも10,000,000,00、例としては、少なくとも50,000,000,000であり得る。例えば、小滴集合が少なくとも4000層を含む立方体であれば、本発明の装置によって作製される小滴集合の小滴の数は、少なくとも640億の小滴であり得る。

10

【0179】

従って、本発明の装置は、mm-スケールの配列を有する3次元の小滴集合を作製するように構成され得る。小滴集合は、例えば、少なくとも10,000の前記小滴を含み得、各小滴が、10 μ mから1 mm、例としては、10 μ mから200 μ mの直径を有する。通常、各小滴が、30 μ mから60 μ mの直径を有し、例としては、各小滴が約50 μ mの直径を有する。小滴集合は、例えば、集合の選択された領域(または複数の領域)における膜タンパク質の使用を通して、機能的になり得る。追加として、または別の方法として、小滴集合が、浸透作用を用いて折り重なるように作製され得る。

20

【0180】

本発明の装置は、cm-スケールの配列を有する3次元の小滴集合、またはさらに大きいものを作製するように構成され得る。

3次元の小滴集合は、共にゲル化されて、新たな小滴集合を形成し得る。このようにして、個々の小滴集合は、例えば、複雑な構造を形成するための積み木(building bricks)として使用され得る。

【0181】

いくつかの実施の態様では、制御ユニットは、(a)1またはそれぞれの小滴発生器に対する容器の移動、及び(b)小滴の吐出を調整して、本発明の方法のために以下に記述する通りの方法によって小滴集合を作製するように構成される。

30

他の実施の態様では、制御ユニットは、(a)1またはそれぞれの小滴発生器に対する容器の移動、及び(b)小滴の吐出を調整して、本発明の生産的側面のために以下に記述された通りに小滴集合を作製するように構成される。

【0182】

本発明の装置のいくつかの実施の態様では、容器が疎水性媒体を含む場合に、前記疎水性媒体は、水性媒体である第2の大量の媒体内の疎水性媒体の液滴であり、前記容器が、水性媒体である前記第2の大量の媒体、及び疎水性媒体の液滴を含む。水性媒体である第2の大量の媒体は、先に記述された水性媒体と同一または異なり得る。

40

【0183】

通例、疎水性媒体の液滴は、液滴と水性媒体である第2の大量の媒体との間の接触面として、液滴の表面周囲の両親媒性分子の周辺層を更に含む。両親媒性分子は、水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層における両親媒性分子と同じ両親媒性分子、または異なる両親媒性分子であり得る。通常、両親媒性分子の2重層は、液滴表面に形成される。従って、(i)小滴間における小滴接触面2重層、及び(ii)小滴と及び液滴の表面との間の2重層が存在し得る。これらの2重層は、(i)小滴集合内の小滴間、及び(ii)小滴集合内の小滴及び外部環境の間の通信を可能にする。

本発明の装置は、本発明の方法において使用され得る。

50

【0184】

また、本発明は、小滴集合を作製するための装置を使用して小滴集合を作製するための方法に関し、該小滴集合は、複数の小滴を含み、それぞれの前記小滴は、(i)小滴媒体、及び(ii)小滴媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、小滴媒体は、水性媒体または疎水性媒体であり、少なくとも1つの前記小滴が別の前記小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の層を形成し、該装置は、少なくとも1つの小滴発生器と、少なくとも1つの小滴発生器に対して移動可能な容器と、制御ユニットとを含み、該制御ユニットは、少なくとも1つの小滴発生器からの小滴の吐出、及び少なくとも1つの小滴発生器に対する容器の移動を制御するように構成され、装置の前記容器は、大量の媒体を含み、小滴媒体が水性媒体である場合に、大量の媒体が疎水性媒体であり、小滴媒体が疎水性媒体である場合に、大量の媒体が水性媒体であり、該方法は、(a)複数の吐出ステップを含み、各吐出ステップは、両親媒性分子の存在下において前記小滴発生器から大量の媒体へ小滴媒体の小滴を吐出し、それによって大量の媒体中に小滴を形成することを含み、該小滴が、(i)前記小滴媒体及び(ii)小滴媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、かつ該方法が、(b)少なくとも1つの小滴発生器に対して、容器を移動させて、大量の媒体において小滴の相対位置を制御することを含む。

10

【0185】

接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層が、例えば、前記両親媒性分子の2重層またはブロック共重合体の層であり得る。ブロック共重合体の層が、例えば、トリブロック共重合体の層であり得る。小滴媒体が水性媒体である場合に、接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層が、例えば、前記両親媒性分子の2重層またはブロック共重合体の層であり得る。小滴媒体が疎水性媒体である場合に、接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層が、例えば、前記両親媒性分子の2重層またはブロック共重合体の層であり得る。

20

【0186】

通常、接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層は、前記両親媒性分子の2重層である。

小滴媒体が、通常は水性媒体であり、大量の媒体が、通常は疎水性媒体である。しかしながら、別の実施の態様が想定され、該実施の態様において小滴媒体が疎水性媒体であり、大量の媒体が水性媒体である。

30

【0187】

しかしながら、通常、小滴媒体は、水性媒体であり、大量の媒体が疎水性媒体であり、本発明は、一般的に以下の本明細書中においてこれらの用語で記述されるだろう。しかしながら、当業者が理解するであろうように、これらの用語において本明細書中に記述された任意の本発明の実施の態様は、水性媒体の代わりに小滴媒体として疎水性媒体を用い、疎水性媒体の代わりに大量の媒体として水性媒体を用いて「逆に」も実施され得る。

通常、水性媒体は、本発明の装置のために以下に本明細書中に更に記述される通りの水性媒体である。

【0188】

通常、各複数の小滴は、1 mm以下、例としては、10 μ mから1 mmの直径を有する。通例、各複数の小滴は、10 μ mから200 μ m、例としては、30 μ mから60 μ mの直径を有する。より一般的には、各複数の小滴が、約50 μ mの直径を有する。

40

両親媒性分子は、任意の適切な両親媒性分子であり得る。本発明の装置のために本明細書中に上述された通り、これらは例えば、両親媒性分子であり得る。

両親媒性分子は、例えば、水性媒体中または疎水性媒体中に配置され得る。通常、両親媒性分子は、疎水性媒体中に配置される。

両親媒性分子の存在下において水性媒体が疎水性媒体に吐出される場合、水性の小滴が生じ、該小滴は、(i)水性媒体及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含む。

【0189】

50

いくつかの実施の態様では、小滴が、他の材料、化合物または薬剤を含み得る。例えば、小滴は、染料、または磁石等の小分子を含み得る。適切な染料としては、キシレンシアノールFF、オレンジG、ピラニン、フルオレセイン及び5-cTAMRA(5-カルボキシテトラメチルローダミン)が挙げられるが、これらに限定されない。別の方法として、小滴は、任意の適切なセンサー分子、例えば、特定の化学物質を感知でき、または光感受性分子であるセンサー分子を含み得、または、pHまたは温度の変化を感知可能であり得る。いくつかの実施の態様では、センサー分子が特定の生化学物質または酵素の存在(または存在しないこと)を感知でき得る。更なる選択肢として、小滴が、プロドラッグ等の治療薬、または造影剤等の診断用薬を含み得る。小滴は、酵素を含み得る。

【0190】

10

小滴は、生きている細胞(または生きている複数の細胞)を含み得、例としては、再生医療において使用するための細胞を含み得る。例えば、細胞は、プリント後に小滴内において成長し得、及び/またはプリント後に小滴間における2重層を解体し得る。

【0191】

小滴集合は、1度プリントされた時点で、固体材料のパターニングのための鋳型として使用され得る。固体材料は、例えば、電子工学、光学、フォトニクスまたは、他の材料科学の応用において使用され得る。小滴、または複数の小滴は、例えば、特定の小滴間において拡散し得る無機材料を含み得る。無機材料は、その後反応して、硫化カドミウム等の無機固体を形成し得る。

【0192】

20

方法は、例えば、疎水性媒体における小滴の相対位置を制御すべく、容器を移動させること、及び/または疎水性媒体における小滴の相対位置を制御すべく、少なくとも1つの小滴発生器を移動させることを含む。

通例、容器は、本発明の装置のために本明細書中において上述された通りの容器である。

1またはそれぞれの小滴発生器は、例えば、本発明の装置のために本明細書中において上述された通りの小滴発生器であり得る。

【0193】

通常、制御ユニットは、本発明の装置のために本明細書中において上述された通りの制御ユニットである。通例、制御ユニットは、吐出ステップ及び少なくとも1つの小滴発生器に対する容器の移動を制御する。

30

通例、制御ユニットは、小滴集合を作製すべく、吐出ステップ及び少なくとも1つの小滴発生器に対する容器の移動を調整する。

【0194】

通常、少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させることは、少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させ、少なくとも1つの前記小滴を別の前記小滴に隣接させ、少なくとも1つの前記小滴を別の前記小滴に接触させて、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の層を形成することを含む。

【0195】

接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層は、例えば、前記両親媒性分子の2重層、またはブロック共重合体の層であり得る。ブロック共重合体の層は、例えば、トリブロック共重合体の層であり得る。小滴媒体が水性媒体である場合に、接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層は、例えば、前記両親媒性分子の2重層、またはブロック共重合体の層であり得る。小滴媒体が疎水性媒体である場合に、接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層は、例えば、前記両親媒性分子の2重層、またはブロック共重合体の層であり得る。

40

【0196】

通常、接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層が、前記両親媒性分子の2重層である。

通常、少なくとも1の小滴発生器に対して容器を移動させることは、各小滴を少なくと

50

も1の他の小滴に隣接させるべく、少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させることを含む。

通例、小滴集合は、前記複数の小滴を含み、それぞれの前記小滴は、別の前記小滴に接触して、接触する小滴間の接触面として、前記両親媒性分子の2重層を形成する。

【0197】

例えば、それぞれの前記小滴が別の前記小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の層を形成するように、各小滴を少なくとも1つの他の小滴に隣接させるために、少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させることを、少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させることが含み得る。

【0198】

接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層は、例えば、前記両親媒性分子の2重層またはブロック共重合体の層であり得る。ブロック共重合体の層は、例えば、トリブロック共重合体の層であり得る。小滴媒体が水性媒体である場合に、接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層が、例えば、前記両親媒性分子の2重層またはブロック共重合体の層であり得る。小滴媒体が疎水性媒体である場合に、接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層が、例えば、前記両親媒性分子の2重層またはブロック共重合体の層であり得る。

通常、接触する小滴間の接触面である前記両親媒性分子の層が、前記両親媒性分子の2重層である。

通例、少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させることは、吐出ステップ間において少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させることを含む。

【0199】

例えば、方法は、通例、(b)少なくとも2つの吐出ステップの間に少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させることを含む。いくつかの実施の態様では、方法は、(b)少なくとも50%の吐出ステップの間に、例としては、少なくとも80%の吐出ステップの間に、少なくとも1つの小滴発生器に対して、容器を移動させることを含む。方法は、例えば、(b)実質的に全ての吐出ステップの間に少なくとも1つの小滴発生器に対し、容器を移動させることを含み得る。例えば、方法は、(b)全ての吐出ステップの間に、少なくとも1つの小滴発生器に対し、容器を移動させることを含み得る。

【0200】

吐出ステップの間に少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させる必要があり得るが、吐出ステップの間に、少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させることは必ずしも必要ではない。例えば、同じ小滴発生器が2つの小滴を交互に吐出する場合、1つの小滴が他の小滴の上面に直接的に吐出される場合、正しい位置に小滴が吐出されるために小滴発生器に対して容器が移動される必要はない。同様に、2つの異なる小滴発生器から2つの小滴が交互に吐出され得、小滴を正しい位置に吐出する目的で2つの小滴発生器に対して移動させる必要がないように、2つの小滴発生器が位置し得る。

【0201】

いくつかの実施の態様では、少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させることが、複数の吐出ステップの間、及び吐出ステップ中に、少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させることを含む。

【0202】

例えば、方法は、(b)少なくとも2つの吐出ステップの間及び少なくとも2つの吐出ステップ中に、少なくとも1つの小滴発生器に対し、容器を移動させることを含み得る。方法は、例えば、(b)少なくとも50%の吐出ステップ同士の間、及び50%の吐出ステップ中に、例としては、少なくとも80%の吐出ステップ同士の間、及び80%の吐出ステップ中に、少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させることを含み得る。いくつかの実施の態様では、方法は、(b)実質的に全ての吐出ステップ同士の間及び実質的に全ての吐出ステップ中に、例としては、全ての吐出ステップ同士の間及び全ての吐出ステップ中に、少なくとも1つの小滴発生器に対し、容器を移動させることを含む。

【0203】

通常、小滴媒体は水性媒体であり、大量の媒体は疎水性媒体である。従って、通例、本発明の方法は、小滴集合を作製するための装置を使用して小滴集合を作製するための方法であり、該小滴集合が、複数の小滴を含み、それぞれの前記小滴が(i)水性媒体、及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、少なくとも1つの前記小滴が別の前記小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、該装置は、少なくとも1つの小滴発生器と、少なくとも1つの小滴発生器に対して移動可能な容器と、制御ユニットとを含み、該制御ユニットは、少なくとも1つの小滴発生器からの小滴の吐出、及び少なくとも1つの小滴発生器に対する容器の移動を制御するように構成され、前記装置の容器は、疎水性媒体を含み、該方法は、(a)複数の吐出ステップを含み、各吐出ステップは、両親媒性分子の存在下における前記小滴発生器から疎水性媒体への水性媒体の小滴の吐出、及びこれによって疎水性媒体において小滴を形成することを含み、該小滴が、(i)前記水性媒体及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、かつ(b)少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させて、疎水性媒体における小滴の相対的位置を制御することを含む。

10

【0204】

通常、本発明の方法が、(a)第1吐出ステップを含み、該第1吐出ステップが、両親媒性分子の存在下において前記小滴発生器から疎水性媒体へ水性媒体の小滴を吐出し、これによって疎水性媒体において第1の小滴を形成することを含み、該第1の小滴が、(i)前記水性媒体及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、本発明の方法が、(b)少なくとも1つの小滴発生器に対し容器を移動させて、疎水性媒体中の第1の小滴に対して疎水性媒体中の第2の小滴の位置を制御することを含み、本発明の方法が、(c)第2吐出ステップを含み、該第2吐出ステップが、両親媒性分子の存在下において前記小滴発生器から疎水性媒体へ水性媒体の小滴を吐出して、これによって疎水性媒体において第2の小滴を形成することを含み、該第2の小滴が、(i)前記水性媒体及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含む。

20

【0205】

第1吐出ステップの小滴発生器は、第2吐出ステップの小滴発生器と同じ小滴発生器であり、または異なる小滴発生器であり得る。

先に述べたように、本発明の装置のために、小滴サイズが、例えば、小滴が吐出される小滴発生器によって制御され得る。第1吐出ステップの小滴発生器が、第2吐出ステップの小滴発生器と異なる場合、第1の小滴が第2の小滴と同じ直径を有し、または異なる直径を有し得る。

30

【0206】

通常、第1の小滴の直径は、1 mm以下、例としては、10 μm から1 mmだろう。通例、第1の小滴の直径は、10 μm から200 μm 、例としては、30 μm から60 μm だろう。より一般的には、第1の小滴の直径は、約50 μm だろう。

通例、第2の小滴の直径は、1 mm以下、例としては、10 μm から1 mmだろう。通常、第2の小滴の直径は、10 μm から200 μm 、例としては、30 μm から60 μm だろう。いくつかの実施の態様では、第2の小滴の直径は、約50 μm である。

40

【0207】

第1の小滴の水性媒体は、第2の小滴の水性媒体と同じであり、または異なり得る。第1吐出ステップの小滴発生器が第2吐出ステップの小滴発生器と同じである場合、第1の小滴の水性媒体が、通常は第2の小滴の水性媒体と同じである。第1吐出ステップの小滴発生器が第2吐出ステップの小滴発生器と異なる場合、第1の小滴の水性媒体が、例えば、第2の小滴の水性媒体と異なり得る。

【0208】

第1の小滴の両親媒性分子は、第2の小滴の両親媒性分子と同じであるか、または異なり得る。通常、両親媒性分子は、本発明の装置のために本明細書中に記載された通りの両親媒性分子である。

50

いくつかの実施の態様では、前記(b)少なくとも1つの小滴発生器に対する容器の移動は、第1及び第2の小滴が互いに接触するように第2の小滴が第1の小滴に隣接して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成するように、少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させることを含む。

【0209】

通常、方法は、(d)少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させて、疎水性媒体中の他の小滴に対して疎水性媒体中の追加的な小滴の位置を制御すること、及び(e)両親媒性分子の存在下において前記小滴発生器から疎水性媒体へ水性媒体の小滴を吐出し、これによって疎水性媒体中に追加的な小滴を形成する追加的な吐出ステップを更に含み、該追加的な小滴が、(i)前記水性媒体及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を

10

【0210】

追加的な小滴の水性媒体は、通例、本明細書中に追加的に記述された水性媒体である。

通常、両親媒性分子は、本発明の装置のために本明細書中に記述された通りの両親媒性分子である。

通例、前記(d)少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させることは、疎水性媒体において追加的な小滴を少なくとも1つの他の小滴に隣接させ、疎水性媒体において追加的な小滴が少なくとも1つの他の小滴に接触し、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成するように、少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させることを含む。

20

【0211】

いくつかの実施の態様では、本発明の方法は、少なくとも500の前記追加的な吐出ステップ(e)を含む。通常、方法は、1,000の前記追加的な吐出ステップ(e)、例としては、5,000の前記追加的な吐出ステップ(e)を含む。例えば、方法は、少なくとも10,000の前記追加的な吐出ステップ(e)を含み得る。いくつかの実施の態様では、方法は、少なくとも25,000の前記追加的な吐出ステップ(e)を含む。

【0212】

通例、方法は、少なくとも500の前記ステップ(d)少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させること、及び少なくとも500の前記追加的な吐出ステップ(e)を含む。例えば、方法は、少なくとも1,000の前記ステップ(d)少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させること、及び少なくとも1,000の前記追加的な吐出ステップ(e)を含み得る。いくつかの実施の態様では、方法は、例えば、少なくとも5,000の前記ステップ(d)少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させること、及び少なくとも5,000の前記追加的な吐出ステップ(e)を含み得る。

30

【0213】

通常、方法は、少なくとも10,000の前記ステップ(d)少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させること、及び少なくとも10,000の前記追加的な吐出ステップ(e)を含む。いくつかの実施の態様では、方法は、少なくとも25,000の前記ステップ(d)少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させること、及び少なくとも25,000の前記追加的な吐出ステップ(e)を含む。

40

【0214】

方法は、少なくとも1,000,000の前記ステップ(d)少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させること、及び少なくとも1,000,000の前記追加的な吐出ステップ(e)を含み得る。例えば、方法は、少なくとも1,000,000,000の前記ステップ(d)少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させること、及び少なくとも1,000,000,000の前記追加的な吐出ステップ(e)を含み得る。

【0215】

通例、複数の吐出ステップが吐出ステップを含み、該吐出ステップは、疎水性媒体中に前記小滴の列を全体で作製し、列の各小滴は、列の別の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成する。

50

【0216】

通常、列における小滴の数は、少なくとも5、例としては、少なくとも10である。より一般的には、列における小滴の数は、少なくとも20、例としては、少なくとも50である。通常、列における小滴の数は、5から500、例としては、10から250である。いくつかの実施の態様では、列における小滴の数は、20から100である。例えば、列における小滴の数は、20から35であり得る。

【0217】

いくつかの実施の態様では、列における小滴の数は、少なくとも500、例としては、少なくとも1,000である。例えば、列における小滴の数は、少なくとも2,000、例としては、少なくとも4,000であり得る。列における小滴の数は、例えば、5から5,000であり得る。

10

【0218】

複数の小滴の列は、互いに隣接配置されて層を形成し得る。1の列における小滴が、隣接する列または複数の列における小滴に接触して、隣接する列において接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成するように、複数の列が通常、層において互いに接触している。層は、例えば、互いに隣接配置された少なくとも10のかかる列を含み、または例えば、互いに隣接配置された少なくとも20のかかる列を含み得る。いくつかの実施の態様では、層は、互いに隣接配置された少なくとも50のかかる列を含み、または例えば、互いに隣接配置された少なくとも100のかかる列を含む。列における小滴の数は、上述される通りであり得る。矩形の層は、例えば、少なくとも20行20列の小滴の層であり得る(すなわち、少なくとも20x20の小滴の層)。しかしながら、各列は、同じ長さである必要はなく、それで、様々な異なる層の形状が、互いに隣接する異なる長さの列を配置することによって形成され得る。自己-折り畳み小滴集合は、例えば、実施例の節において説明されるように、異なる長さの列を含み得る。

20

【0219】

いくつかの実施の態様では、複数の吐出ステップが、第1セットの吐出ステップを含み、該第1セットの吐出ステップが、疎水性媒体中の前記小滴の第1列を全体で作製し、第1列の各小滴が第1列の別の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、第2セットの吐出ステップが、疎水性媒体中の第2列の前記小滴を全体で作製し、第2列の各小滴が、第2列における別の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成する。

30

【0220】

通常、第1列における小滴が第2列における小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成するように、第2列の小滴が第1列における小滴に隣接配置される。

通例、複数の吐出ステップが、疎水性媒体中の前記小滴の複数の列を全体で作製する吐出ステップを含み、列における各小滴が列における少なくとも1つの他の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、列における小滴が隣接する列の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての両親媒性分子の2重層を形成するように、各列が別の列に隣接配置される。

【0221】

互いに隣接配置される列の数は、上述した通りであり得る。

40

いくつかの実施の態様では、複数の吐出ステップは、疎水性媒体中の前記小滴の層を全体で作製する吐出ステップを含み、層の各小滴は、層の少なくとも1の他の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成する。

【0222】

列における小滴が、隣接する列または複数の列における小滴と接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成するように、層が、互いに隣接して配置され、かつ互いに接触している複数の小滴の列を一般に含む。層が、例えば、互いに隣接配置された少なくとも20のかかる列を含み得る。列における小滴の数は、上述した通りであり得る。層における異なる列は、異なる数の小滴を有し得、それで、層は、矩形で

50

ある必要はなく、任意の形状であり得る。例えば、層は、矩形、円形、卵形、ダイヤモンド形、または任意の他の二次元形状であり得る。また、層は、所定位置または複数の位置における1以上の間隙(すなわち、小滴が全くない箇所)を有し得る。従って、層は、例えば、環状、または棒状であり得る。矩形の層は、例えば、少なくとも20行20列の小滴の層(すなわち、20 x 20の小滴の層)であり得る。通常、1の層は別の層の上側または下側である。通例、小滴集合は、平面層において上向きに作り上げられる。

【0223】

互いの上面に小滴の層を配置することにより、様々な3次元(3D)形状を有する小滴集合が、作り上げられ得る。最も単純な3D小滴集合の1つは、直方体形状を有する。しかしながら、異なる形状の層を1枚1枚配置することにより、例えば、ピラミッド形状を有する小滴集合、または例えば、角柱形状を有するもの等、様々な他の3次元の小滴集合構造が形成され得る。

10

【0224】

通常、複数の吐出ステップが、疎水性媒体中の第1層の前記小滴を全体で作製する第1セットの吐出ステップを含み、第1層における各小滴が、第1層における少なくとも1つの他の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、また、複数の吐出ステップが、疎水性媒体中の第2層の前記小滴を全体で作製する第2セットの吐出ステップを含み、第2層における各小滴が、第2層における少なくとも1つの他の小滴に接触し、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成する。

20

【0225】

第1層における小滴が、第2層における小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成するように、通例、第2層における小滴が、第1層における小滴に隣接して配置される。

より一般的には、第1層における小滴が、第2層における小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成するように、第2層における小滴が、第1層における小滴上に配置される。

【0226】

一般に、複数の吐出ステップは、疎水性媒体中の前記小滴の複数の層を全体で作製する吐出ステップを含み、層における各小滴は、層における少なくとも1つの他の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、層における小滴が、隣接する層の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての両親媒性分子の2重層を形成するように、各層が別の層に隣接配置される。

30

【0227】

層における小滴が、別の層における小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての両親媒性分子の2重層を形成するように、通例、各層が、別の層に隣接して配置される。

より一般的には、層における小滴が、別の層における小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての両親媒性分子の2重層を形成するように、各層が別の層上に配置される。

【0228】

いくつかの実施の態様では、第1層における小滴が、第2層における小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての両親媒性分子の2重層を形成するが、第2層内の小滴は、互いに接触しない。このことは、例えば、第2層における小滴が、第1層における小滴よりも小さな直径を有する場合に起こり得る。例えば、間隙(すなわち、小滴を有さないスペース)が第2層に明確に残されている場合にも起こり得る。

40

【0229】

層は、例えば、1の層上及び別の層の下であり得る。

前記小滴の層の数は、例えば、5以上であり得る。通常、前記小滴の層の数は、10以上、例としては、15以上であり得る。より一般的には、前記小滴の層の数は、20以上、例としては、25以上である。いくつかの実施の態様では、前記小滴の層の数は、50以上、例としては、100以上である。別の実施の態様では、層の数は、10から50、例としては、20か

50

ら30である。

【0230】

いくつかの実施の態様では、層の数は、少なくとも500、例としては、少なくとも1,000である。層の数は、例えば、少なくとも2,000、例としては、少なくとも4,000であり得る。層の数は、例としては、5から5,000であり得る。

本発明の方法は、それゆえに、例えば、mm-スケールの配列を有する多数の小滴を含む小滴集合を作製するための効果的な方法を提供する。

本発明の方法は、cm-スケール以上の配列を有する3次元小滴集合を作製するために使用され得る。

【0231】

追加的方法で実施例において説明するように、小滴集合を作製するために使用されるプリントパターンは、プリントされる集合の正確さを制御するためにコントロールされ得る。例えば、少なくとも1つの小滴発生器に対して容器が移動される場合、運動が、直近に吐出された小滴の移動を引き起こし得る。例えば、小滴発生器の先端が、疎水性媒体中に浸される場合、疎水性媒体に対するチップの移動が、けん引力を引き起こす。例えば、少なくとも1つの小滴発生器に対して容器が移動される前に、直近に吐出された小滴が別の小滴と接触するために十分な時間を付与することは、好都合であり得る。しかしながら、長すぎる休止が方法に組み込まれれば、数千の小滴を含む大きな集合は、作製するために非常に長い時間がかかり得る。本発明者らは、いくつかの実施の態様において各列のプリント後の休止が、顕著にプリント品質(追加的説明を参照)を損なうことなく、プリント時間を有意に減少させることを可能にすることを見出した。

【0232】

全体のプリント速度が調節され得るいくつかの方法がある。全体のプリント速度は、例えば、2以上の小滴発生器から同時に小滴を吐出することによって調節され得る。

個々の小滴は、容器に対する小滴発生器の移動によって移動され得る。それゆえ、容器に対して小滴発生器が移動する前に、各小滴、または少なくとも各列の小滴が、ネットワークにおけるその意図された位置に到達することを可能にすることが望ましくあり得る。プリント速度は、より素早く小滴を沈めることによって変更され得、このことは、(i)疎水性媒体の粘性を減少させること、(ii)疎水性媒体の密度を減少させること、(iii)水性媒体の密度を増加させること、または(iv)1またはそれぞれの小滴発生器から吐出される小滴の直径を増加させることによって達成され得る。例えば、疎水性媒体の粘性を低下させることは、容器に対する小滴発生器の相対的な運動によって引き起こされる小滴の移動を減少させ、沈降速度を増加させるだろう。

【0233】

通常、このことは、小滴発生器がより素早く次の位置に移動し得ることを意味するだろう。

別の方法として、1またはそれぞれの小滴発生器の先端間の距離、及び小滴が停止する位置を増加または減少させることによってプリント速度が変更され得る。

【0234】

1の実施態様では、各小滴が停止する位置の少なくとも100 μm 上方、例としては、少なくとも150 μm 上方において吐出される。通常、各小滴は、停止する位置の少なくとも200 μm 上方において吐出される。本発明者らは、より小さな距離において小滴作製が試みられた場合、これらの小滴形成が妨げられ得ることに気付いた。しかしながら、例えば、疎水性媒体の粘性または密度が変更され、または水性媒体の密度が変更される場合、より小さな距離が適し得る。

【0235】

吐出された小滴が別の小滴に接触する前に、必要な両親媒性分子の外層が生じる。このことは、例えば、(a)疎水性媒体または水性媒体中の両親媒性分子の濃度を増加させること、または(b)小滴の直径を減少させること、または(c)迅速な単層形成を促す疎水性媒体を用いることによって制御され得る。本発明者らは、疎水性媒体がシリコン油及び/ま

10

20

30

40

50

たはヘキサデカン等の炭化水素を含む場合に、迅速な単分子層形成が促され得ることを見出した。単分子層は、例としては、小滴形成後約1秒以内に生じ得る。

【0236】

通常、本発明の方法は、吐出ステップと少なくとも1つの小滴発生器に対する容器の移動のステップとの間に、小滴のずれを減少させるための遅延を更に含む。

通例、遅延は、1 ms以上であり、例としては、10 ms以上である。通常、遅延は、25 ms以上であり、例としては、50 ms以上である。例えば、遅延は、約50 msであり得る。

【0237】

いくつかの実施の態様では、遅延は、列が作製された後である。方法は、例えば、疎水性媒体において第1列の前記小滴を全体で作製する第1セットの吐出ステップを含み得、第1列の各小滴が第1列における別の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、方法は、疎水性媒体中の第2列の前記小滴を全体で作製する第2セットの吐出ステップを含み得、第2列における各小滴が第2列における別の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、方法が、第1セットの吐出ステップと第2セットの吐出ステップとの間の遅延を含み得る。通例、遅延は、1秒以上である。例えば、遅延が約2秒であり得る。

【0238】

いくつかの実施の態様では、複数の吐出ステップが、疎水性媒体中において1列の前記小滴を全体で作製する少なくとも1セットの吐出ステップを含み得、列における各小滴は、列における別の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、方法は、(i)前記小滴の列を全体で作製する吐出ステップのセットにおける最後の吐出ステップと、及び(ii)少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させる後続するステップとの間に前記遅延を更に含む。

【0239】

通例、方法は、1列の前記小滴を全体で作製する各セットの吐出ステップにおける最後の吐出ステップと、少なくとも1つの小滴発生器に対して容器を移動させる後続するステップとの間に、前記遅延を更に含む。

通常、疎水性媒体、もしくは水性媒体、または両方が、両親媒性分子を更に含む。両親媒性分子は、通例、本発明の装置のために本明細書中に記述された通りである。

【0240】

いくつかの実施の態様では、1以上の追加的な小滴が、列の末尾に吐出され得る。1以上の追加的な小滴により、例えば、小滴集合における内側の小滴が意図された境界から転がり出ることが抑制され得る。

通例、少なくとも1つの小滴発生器は、小滴を吐出するための圧電変換器を含む圧電性小滴発生器であり、各吐出ステップは、圧電構成部品に対する電圧パルスの印加を含む。制御ユニットは、通常、圧電性構成部品に対する電圧パルスの印加を制御する。

【0241】

通常、電圧パルスは、5Vから100Vの頂点間振幅、例としては、20Vから60Vの頂点間振幅を含む。

通例、各パルスは、10から1,500 μ s、例として、100から800 μ sの持続時間を有する。

通常、電圧パルスは、矩形の電圧パルスである。

【0242】

図10に示される通り、小滴の直径は、振幅及び電圧パルスの持続時間を変更することにより調整され得る。

本発明の方法は、周期的に、例えば、約10から30秒ごとに、小さな電圧パルス(例えば、6Vから18Vの電圧パルス、より一般的には約12 Vの電圧パルス)を印加することを更に含む得る。かかるパルスは、小滴媒体(例えば、水性媒体)がプリントノズルの先端から徐々に出てこないことや、油中に漏出しないこと(水性チャンバが通常、油の容器より高く配置され、それゆえ、ノズル先端において油よりも大きな静水圧を発揮するため)を有利に確保し得る。これらの低い電圧パルスの印加が小滴を放出することなく、ノズル先端にお

いて平面的配列に対して水-油の接触面を戻し得る。

【0243】

通例、小滴は、 0.01 から 100 s^{-1} の速さ、例としては、 0.01 から 50 s^{-1} の速さで吐出される。通常、小滴は、 0.01 から 10 s^{-1} の速さ、例としては、 0.5 から 5 s^{-1} の速さで吐出される。いくつかの実施の態様では、小滴は、約 1 s^{-1} の速さで吐出される。

【0244】

通常、本発明の方法において装置は、2以上の前記小滴発生器を含む。上述のように、異なる小滴発生器は、異なる直径を有する小滴または異なる水性媒体を含む小滴を吐出し得る。

【0245】

いくつかの実施の態様では、小滴媒体が、水性媒体であり、大量の媒体が、疎水性媒体であり、複数の吐出ステップが、疎水性媒体中に第1領域の前記小滴を全体で作製する第1セットの吐出ステップを含み、第1領域における各小滴が、第1領域における少なくとも1の他の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、また、複数の吐出ステップが、疎水性媒体中に第2領域の前記小滴を全体で作製する第2セットの吐出ステップを含み、第2領域における各小滴が、第2領域における少なくとも1つの他の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成する。

【0246】

当業者が理解するであろうように、全体の領域は、通常、連続してプリントされない。実際には、既定の層のために、その特定の層のための第1領域の小滴がしばしば一斉にプリントされ、その特定の層における第2領域の全ての小滴がこれに続く。別の層のプリントが、その後、開始し得、該別の層のプリントが、第1領域のための追加的な小滴、及び第2領域のための追加的な小滴のプリントに関与し得る(必ずしもこの順序ではない)。従って、第1セットの吐出ステップは、必ずしも全て連続的に行われるわけではなく、同様に、第2セットの吐出ステップは、全て連続的に行われるわけではない。また、第2セットの吐出ステップは、第1セットにおける吐出ステップ後に必ずしも全て行われるわけではなく、逆の場合も同じである。

【0247】

第1及び第2領域は、実質的には、本発明の方法を用いる小滴から作製される任意の2次元または3次元構造であり得る。

通例、第1領域及び/または第2領域は、少なくとも100の小滴、例としては少なくとも500の小滴を含む。いくつかの実施の態様では、第1領域及び/または第2領域は、少なくとも1,000の小滴、例えば、少なくとも5,000の小滴を含む。

【0248】

それぞれの第1及び第2領域における小滴の数は、非常に大きくなり得、例としては、少なくとも100,000であり得る。各第1及び第2領域における小滴の数は、少なくとも1,000,000、例えば、少なくとも10,000,000であり得る。例えば、各第1及び第2領域における小滴の数は、少なくとも1,000,000,000であり得る。いくつかの実施の態様では、各第1及び第2領域における小滴の数は、少なくとも10,000,000,000、例としては、少なくとも50,000,000,000であり得る。

【0249】

通常、本発明の方法において、装置が、第1小滴発生器及び第2小滴発生器を含み、前記第1セットの吐出ステップにおいて吐出される小滴は、第1小滴発生器から疎水性媒体中へ吐出され、前記第2セットの吐出ステップにおいて吐出される小滴は、第2小滴発生器から疎水性媒体中へ吐出される。上述のように、異なる小滴発生器は、異なる直径を有する小滴、及び/または異なる水性媒体を含む小滴を吐出し得る。

【0250】

また、上述のように、全体の領域が、常に連続的にプリントされるわけではない。従って、既定の層のために、その特定の層のための第1領域の小滴がしばしば一斉にプリント

10

20

30

40

50

され、その特定の層における第2領域の全ての小滴がそれに続く。別の層のプリントが、その後、開始され得、この別の層のプリントは、第1領域のための追加的な小滴のプリント、及び第2領域(必ずしもその順序ではない)のための追加的な小滴のプリントに関与し得る。従って、上述された本発明の実施の態様では、第1セットの吐出ステップは、必ずしも全て連続的に行われるのではなく、同様に第2セットの吐出ステップは、必ずしも全て連続的に行われるのではない。また、第2セットの吐出ステップは、必ずしも全て第1セットの吐出ステップの後に行われるのではなく、逆の場合も同じである。

【0251】

第1領域における小滴が、第2領域における小滴に接触して、隣接する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成するように、通例、第2領域における小滴が、第1領域における小滴に隣接して配置される。

10

通常いくつかの、しかしすべてではない、第2領域における小滴は、第1領域における小滴に隣接して配置される。従って、通常、第1領域における小滴の一部のみが、第2領域における小滴に接触して、2重層を形成する。このことは、第1及び/または第2領域が、複数の小滴の層から作り上げられた3次元構造である場合にしばしば当てはまるであろう。いくつかの場合には、第1領域の表面上の小滴のみが、第2領域における小滴に接触可能だろう。

【0252】

通例、第1領域の小滴は、1列の小滴、1列の小滴の一部、複数列の小滴、複数列の小滴の一部、小滴の層、小滴の層の一部、小滴の複数の層、または小滴の複数の層の一部を含む。また、第2領域の小滴は、1列の小滴、1列の小滴の一部、複数列の小滴、複数列の小滴の一部、小滴の層、小滴の層の一部、小滴の複数の層、または小滴の複数の層の一部を含む。

20

【0253】

第1及び第2領域は、本明細書中に上述されたように、第1及び第2列であり得る。

追加としてまたは別の実施の態様として、第1及び第2領域は、本明細書中に上述された通り、第1及び第2層であり得る。

いくつかの実施の態様では、第1領域の小滴は、第2領域の小滴を経由して、小滴の経路を形成する。このことは、図12に示される。

【0254】

30

いくつかの実施の態様では、前記第1セットの吐出ステップにおいて疎水性媒体中に吐出された小滴の水性媒体は、膜タンパク質を更に含み、前記第2セットの吐出ステップにおいて疎水性媒体中に吐出された小滴の水性媒体は、前記膜タンパク質を含まない。

【0255】

膜タンパク質は、任意のタイプであり得る。膜タンパク質は、例えば、(i)集合内の個々の小滴の間及び(ii)小滴集合と外部媒体との間において物質の交換、及び電氣的通信の正確な制御を可能にするための膜ポンプ、チャネル及び/または膜孔であり得る。膜タンパク質は、例えば、HL膜孔であり得る。しかしながら、2つの主要なクラス、すなわち、 α -バレルまたは α -ヘリックス束からの1つを含む、任意の適切な膜タンパク質を使用し得る。タンパク質膜孔またはチャネルに加えて、追加的な考えられる膜タンパク質としては、受容体、輸送体または、細胞認識もしくは細胞間相互作用をもたらすタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。チャネルは、電位依存性チャネル、バクテリオロドプシン等の感光性チャネル、リガンド依存性チャネルまたは機械受容チャネルであり得る。通常、膜タンパク質は、 α -溶血素(HL)膜孔である。

40

【0256】

他の適切な膜タンパク質は、細菌性ペプチド及びイオノフォアを含むがこれらに限定されない。膜タンパク質は、別の方法として、改変膜タンパク質または合成膜タンパク質を含み得る。改変膜タンパク質は、例えば、遺伝的な改変タンパク質、または共有結合性または非共有結合性の化学的な改変タンパク質を含み得る。合成膜タンパク質は、例えば、ペプチドまたは有機分子であり得る。

50

【0257】

通例、第1領域において接触する小滴間に形成される両親媒性分子の2重層は、前記膜タンパク質を更に含む。

いくつかの実施の態様では、第2領域において接触する小滴間に形成された両親媒性分子の2重層は、前記膜タンパク質を含まない。

【0258】

他の実施の態様では、前記第1セットの吐出ステップにおいて疎水性媒体中に吐出される小滴の水性媒体は、前記第2セットの吐出ステップにおいて疎水性媒体中に吐出される小滴の水性媒体よりも高濃度の膜タンパク質を含む。第1領域において接触する小滴間に形成された両親媒性分子の2重層は、例えば、前記膜タンパク質を含み得る。更に、第2領域において接触する小滴間に形成された両親媒性分子の2重層は、前記膜タンパク質を含み得ず、または第1領域における接触する小滴間に形成された両親媒性分子の2重層よりも低濃度の前記膜タンパク質を含み得る。

10

【0259】

膜タンパク質は、任意のタイプであり得る。膜タンパク質は、例えば、(i)集合内の個々の小滴の間及び(ii)小滴集合と外部媒体との間において物質の交換、及び電気的通信の正確な制御を可能にする膜ポンプ、チャンネル及び/または膜孔であり得る。膜タンパク質は、例えば、HL膜孔であり得る。しかしながら、2つの主要なクラス、すなわち、 α -バレルまたは α -ヘリックス束からの1つを含む任意の適切な膜タンパク質が使用可能である。タンパク質膜孔またはチャンネルに加えて、追加的な考えられる膜タンパク質としては、受容体、輸送体、または細胞認識もしくは細胞間相互作用をもたらすタンパク質が挙げられる。チャンネルは、電位依存性イオンチャンネル、バクテリオロドプシン等の感光性チャンネル、リガンド依存性チャンネルまたは機械受容チャンネルであり得る。

20

【0260】

他の適切な膜タンパク質としては、細菌性ペプチド及びイオノフォアが挙げられるが、これらに限定されない。膜タンパク質は、別の方法として、改変膜タンパク質または合成膜タンパク質であり得る。改変膜タンパク質は、例えば、遺伝的な改変タンパク質、または共有結合性または非共有結合性の化学的な改変タンパク質であり得る。合成膜タンパク質は、例えば、ペプチドまたは有機分子であり得る。

【0261】

通常、膜タンパク質は、 α -溶血素(HL)膜孔である。

上記の通り、小滴集合は、浸透作用の結果として折り畳まれ得る。折り畳みの方法は、これまで互いに接触していない小滴を互いに接触させ得る。折り畳みの方法は、例えば、両親媒性分子の新たな2重層の形成をもたらし得る。

30

【0262】

いくつかの実施の態様では、本発明の方法において、前記第1セットの吐出ステップにおいて疎水性媒体中へ吐出された小滴の水性媒体が、第1のオスモル濃度を有し、前記第2セットの吐出ステップにおいて疎水性媒体中に吐出された小滴の水性媒体が第2のオスモル濃度を有し、第1のオスモル濃度が第2のオスモル濃度よりも大きい;また、第1領域における小滴が第2領域における小滴に接触して、接触する小滴間の接触面として前記両親媒性分子の2重層を形成するように、第2領域における小滴が、第1領域における小滴に隣接して配置される。

40

【0263】

通常、前記第1セットの吐出ステップにおいて疎水性媒体へ吐出される小滴の水性媒体が、塩の水溶液であり、該水溶液が第1のオスモル濃度を有し、前記第2セットの吐出ステップにおいて疎水性媒体に吐出された小滴の水性媒体が塩の水溶液であり、該水溶液が前記第2のオスモル濃度を有する。いくつかの実施の態様では、前記第1セットの吐出ステップにおいて疎水性媒体へ吐出される小滴の水性媒体が、第1の塩の水溶液であり、該水溶液が前記第1のオスモル濃度を有し、前記第2セットの吐出ステップにおいて疎水性媒体に吐出される小滴の水性媒体が、第2の塩の水溶液であり、該水溶液が前記第2のオスモル濃

50

度を有する。第1及び第2の塩が、例えば、異なる塩または同一の塩であり得る。第1の塩は、例えば、塩化カリウム等の塩化物であり、第2の塩は、炭酸カルシウム等の炭酸塩であり得る。

【0264】

第2水性媒体のオスモル濃度に対する第1水性媒体のオスモル濃度の比は、2: 1から50: 1であり、好ましくは5: 1から20: 1であり得る。いくつかの実施の態様では、第2水性媒体のオスモル濃度に対する第1水性媒体のオスモル濃度の比は、5: 1から15: 1である。

【0265】

小滴集合が折り重なる程度は、通常、既定の配列に対するオスモル濃度比率及び小滴ネットワークの配列によって決定される。例えば、2つの小滴タイプ間でより高いオスモル濃度比率を有するネットワークは、2つの小滴タイプ間でより低いオスモル濃度比率を有するネットワークよりも迅速に折り重なり得る。

10

【0266】

小滴集合が折り重なる速さは、通例、オスモル濃度の違いによって決定される。通常、折り重なる速さは、2つの小滴のオスモル濃度における違いに比例する。例えば、10: 1等のオスモル濃度の既定の比率に対し、オスモル濃度が1 M及び100 mMであるネットワークは、濃度が100 mM及び10 mMであるものに比べて約10倍、素早く折り重なるだろう。

従って、小滴集合の折り重なる速さ及び折り重なり程度 (extend) は、調整され得る。

【0267】

20

小滴ネットワークが折り重なる速さを調整することができることは、プリント方法のために重要である。ネットワークをプリントするためにかかる時間がそれが折り重なる時間と同程度である場合、その後、ネットワークの部品 (parts) がプリント中に移動し、それゆえ、対象物 (object) が不正確にプリントされるだろう。いくつかの実施の態様では、大きな濃度比率 (大きなゆがみを達成するため) だが、小さな濃度差のものが使用される。このことが、折り重なり時間をプリント時間よりも有意に遅くする。

【0268】

折り重なり速さは、小滴のサイズによって決定される。既定の配列に対し、より大きな小滴からなるネットワークは、通常、より遅く折り重なるだろう。折り重なり速さは、通常、小滴直径に反比例する。

30

【0269】

いくつかの実施の態様では、前記第1セットの吐出ステップにおいて疎水性媒体に吐出される小滴の水溶性媒体は、塩の水溶液であり、該塩は、水溶液において第1の濃度を有し、前記第2セットの吐出ステップにおいて疎水性媒体に吐出される小滴の水溶性媒体は、同じ塩の水溶液であり、該塩は、水溶液において第2の濃度を有し、第1の濃度は、第2の濃度よりも大きい。

第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度に対する第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度の比は、2: 1 から50: 1であり、好ましくは5: 1から20: 1であり得る。

【0270】

通常、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、100 mMから1,000 mMであり、第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、0.1 mMから100 mMである。通常、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、150 mMから750 mMであり、第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、0.5 mMから75 mMである。より一般的には、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、150 mMから500 mMであり、第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、5 mMから25 mMである。例えば、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、約250 mMであり、第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、約25 mMであり得る。

40

【0271】

通例、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度、及び第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、塩化カリウム等のアルカリ金属ハロゲン化物塩の濃度である。例えば、

50

緩衝溶液が、例としては、トリス-HCl及び/またはKClを含み得る。

【0272】

方法は、例えば、第2領域から第1領域へ水を移動させて、小滴集合の変形を引き起こすことを更に含み得る。通常、移動は、第1及び第2領域を湾曲させ、または折り重ならせる。

変形は、例えば、これまで互いに接触していない小滴が互いに接触することをもたらし得る。変形は、例えば、両親媒性分子の新たな2重層の形成をもたらし得る。

【0273】

通常、例えば、接触する小滴間の2重層を通して、1つの小滴から別のものへ移動が生じる。例えば、第2領域における少なくとも1つの小滴から第1領域における少なくとも1つの小滴へ移動が生じ得る。

10

通常、第1及び第2領域の小滴は、本明細書中に上述されたように、それぞれ第1及び第2層の小滴を含み、第1及び第2層は略矩形であり、移動は、第1及び第2層を略環状構造に折り重ならせる；第1層は略矩形であり、第2層は、小滴の平行な細長い断片 (parallel strips) を含み、移動は、第1及び第2層を略円筒状に折り重ならせる；または第1及び第2層は、前記花弁状の領域を含み、前記移動は、花弁状の領域を内向きに折り重ならせ、中空の小滴集合を共に形成させる。

【0274】

より一般的には、第1及び第2領域の小滴は、本明細書中に記述されるように、それぞれ第1及び第2層の小滴を含み、第1及び第2層が略矩形であり、移動が、第1及び第2層を略環状構造に折り重ならせる。または第1及び第2層は、花弁状の領域を含み、前記移動は、前記花弁状の領域を内向きに折り重ならせ、中空の小滴集合を共に形成させる。

20

【0275】

第1層が略矩形であり、第2層が小滴の平行な細長い断片を含む場合、以前は直線状の平行な断片であったものが、通常、円柱内に輪(または複数の輪)を形成する。

いくつかの実施の態様では、第1及び第2領域の小滴は、本明細書中において上述されたように、第1及び第2層の小滴をそれぞれ含み、第1及び第2層は、平面的な花状の領域を含み、前記移動は、前記平面的な花状の領域を内向きに折り重ならせ、共に中空の小滴集合を形成させる。

【0276】

通常、形成された中空の小滴集合は、球状である。

30

通例、第1領域は、本明細書中に上述された通りの第1層の小滴と、少なくとも1つの他の層の小滴とを含む。

通常、第2領域は、本明細書中に上述された通りの第1層の小滴と、少なくとも1つの他の層の小滴とを含む。

【0277】

中空という用語は、小滴を含まない小滴集合内の容積のことをいう。この容積は、材料または薬剤、例としてはプロドラッグ等の治療薬、または造影剤等の診断薬、または酵素を含み得る。いくつかの実施の態様では、容積は、例えば、再生医療における使用のための生きている細胞(または複数の細胞)を含む。容積は、無機化合物又は材料を含み得る。

40

中空の小滴集合は、例えば、略球状であり得る。

作製された小滴集合は、例としては、小滴を含まない集合内に容積を含み得る。

【0278】

いくつかの実施の態様では、本発明の方法において、小滴媒体は、水性媒体であり、大量の媒体は、疎水性媒体であり、装置は、第1小滴発生器及び第2小滴発生器を含み、複数の吐出ステップは、少なくとも1つの吐出ステップを含み、該少なくとも1つの吐出ステップが、両親媒性分子の存在下において第1小滴発生器から疎水性媒体へ第1水性媒体の小滴を吐出し、それによって疎水性媒体において前記小滴を形成することを含み、該小滴は、(i)前記第1水性媒体及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、また、複数の吐出ステップは、少なくとも1つの吐出ステップを含み、該少なくとも1つの吐出ステッ

50

ブが、両親媒性分子の存在下において第2小滴発生器から疎水性媒体に第2水性媒体の小滴を吐出し、それによって疎水性媒体において前記小滴を形成することを含み、該小滴は、(i)前記第2水性媒体及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、第1水性媒体及び第2水性媒体は、同一または異なる。

【0279】

例えば、水性媒体が、純水、もしくは水性緩衝溶液、または1以上の塩の水溶液、あるいはアガロース及び水を含む水溶液であり得る。通例、緩衝溶液は、トリス-HCl及び/またはKClを含む。別の方法としては、水性媒体が、ヒドロゲルを含み得る。

【0280】

通常、複数の吐出ステップは、第1の複数の前記吐出ステップを含み、該第1の吐出ステップは、第1小滴発生器から疎水性媒体への第1水性媒体の小滴の吐出を含み、また、複数の吐出ステップは、第2の複数の前記吐出ステップを含み、該第2の複数の前記吐出ステップは、第2小滴発生器から疎水性媒体へ第2水性媒体の小滴を吐出することを含む。

10

【0281】

通例、第1水性媒体は、第2水性媒体と異なる。

通常、第1及び第2水性媒体は、異なるオスモル濃度を有し、または、第1及び第2水性媒体は、異なる濃度の塩または緩衝剤を有する。

例えば、第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度に対する第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度の比は、2:1から50:1、好ましくは5:1から20:1であり得る。

【0282】

20

通常、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、100 mMから1,000 mMであり、第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、0.1 mMから100 mMである。通常、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、150 mMから750 mMであり、第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、0.5 mMから75 mMである。より一般的には、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、150 mMから500 mMであり、第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は5 mMから25 mMである。例えば、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、約250 mMであり、第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、約25 mMであり得る。

【0283】

通例、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度、及び第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、塩化カリウム等のアルカリ金属ハロゲン化物塩の濃度である。例えば、緩衝溶液は、トリス-HCl及び/またはKClを含み得る。

30

【0284】

いくつかの実施の態様では、第1水性媒体は膜タンパク質を含み、第2水性媒体は前記膜タンパク質を含まない。別の態様によれば、第1及び第2水性媒体が異なる濃度の膜タンパク質を有し得る。

【0285】

いくつかの実施の態様では、第1小滴発生器によって吐出される第1水性媒体の小滴または複数の小滴が、第2小滴発生器から吐出される第2水性媒体の小滴または複数の小滴とは異なるサイズを有する。他の実施の態様では、第1小滴発生器から吐出される第1水性媒体の小滴または複数の小滴が、第2小滴発生器から吐出される第2水性媒体の小滴または複数の小滴と同じサイズを有する。

40

【0286】

当業者が理解するであろうように、本発明の方法によって作製される小滴集合が、自己-折り畳み小滴集合である場合、集合の小滴が全て吐出される前に集合が折り重なる速さが、個々の小滴の位置に影響を及ぼし得る。プリント過程中的集合の折り畳みは、通常、最小化される必要がある。例えば、異なる小滴における塩または緩衝剤の濃度差を減少させることにより、または小滴のサイズを増加させることにより、折り重なり時間が長くなり得る。このことは、追加的な考察で実施例において更に説明される。

【0287】

50

本発明の装置のために記述されるように、また、図10に示すように、小滴の直径が、電圧パルスの振幅及び持続時間を変更することによって調整され得る。これらのパラメータを変更することにより、小滴の直径が適切な直径に調整され得る。直径は、例えば、約10及び200 μm の間において調整され得る。

【0288】

例えば、圧電性素子に電圧パルスを印加することにより、水性媒体が1またはそれぞれの小滴発生器から吐出される場合、電圧パルスは、5 Vから100 V、例としては、10 Vから80 Vのの頂点間振幅を有し得る。頂点間振幅は、例えば、20 Vから60 Vであり得る。通常、各パルスが、10 から1,500 μs 、例としては、50から1,000 μs の持続時間を有する。より一般的には、各パルスが100から800 μs の持続時間を有する。通例、電圧パルスが、矩形の電圧パルスである。

10

【0289】

小滴発生器が、小滴サイズを制御するようにも構成され得る。1またはそれぞれの小滴発生器は、通常、本発明の装置のために上述された通りの小滴発生器である。通常、1またはそれぞれの小滴発生器の吐出口が、500 μm よりも小さい直径、例としては、250 μm よりも小さい直径を有する。より一般的には、1またはそれぞれの小滴発生器の吐出口が、200 μm よりも小さい直径、例としては、150 μm よりも小さい直径を有する。例えば、1またはそれぞれの小滴発生器の吐出口が通常、20 μm から200 μm 、例としては60 μm から120 μm の直径を有する。1またはそれぞれの小滴発生器の吐出口は、例えば、約100 μm の直径を有する。

20

【0290】

通常、1またはそれぞれの小滴発生器がチャンバに取り付けられた毛細管を更に含み、毛細管の先端が前記吐出口である。毛細管の先端は、通常、150 μm よりも小さい直径を有する。例えば、毛細管の先端は、20 μm から200 μm 、例としては60 μm から120 μm の直径を有し得る。毛細管の先端は、例えば、約100 μm の直径を有し得る。

【0291】

上述したように、本発明の方法において、小滴媒体は、通常、水性媒体であり、大量の媒体は、通常、疎水性媒体である。いくつかのかかる実施の態様では、前記疎水性媒体は、疎水性媒体の液滴である。

疎水性媒体の液滴は、例えば、水性媒体である第2の大量の媒体内であり得、装置の容器が、水性媒体である前記第2の大量の媒体と、疎水性媒体の液滴とを含む。

30

【0292】

通常、疎水性媒体の液滴が、液滴と水性媒体である第2の大量の媒体との間の接触面としての液滴の表面周囲の両親媒性分子の周辺層を更に含む。両親媒性分子が、水性小滴媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層における両親媒性分子と同じ両親媒性分子であり、または異なる両親媒性分子であり得る。通常、両親媒性分子の2重層が、液滴の表面において形成される。それゆえ、(i)小滴間における小滴接触面の2重層及び(ii)小滴と液滴表面との間における2重層があり得る。これらの2重層は、(i)小滴集合内の小滴間及び(ii)小滴集合内の小滴及び外部環境の間における通信を可能にする。

【0293】

通常、疎水性媒体の液滴における少なくとも1つの小滴が、疎水性媒体の液滴表面と接触する。2重層は、通常、接点において形成される。このことが、水性媒体である第2の大量の媒体から小滴を分離する。

40

いくつかの実施の態様では、小滴集合が、疎水性媒体の液滴内において作製されて、小滴封入物を作製し、該小滴封入物が、疎水性媒体の前記液滴、液滴の表面周囲の両親媒性分子の前記周辺層、及び周辺層内の前記小滴集合を含む。

【0294】

液滴は、例えば、水性媒体である第2の大量の媒体において浮遊し得る。例えば、液滴は、ワイヤーフレーム等のフレーム上に浮遊され得る。通常、ワイヤーフレームは、疎水性コーティングで表面を覆われる。

50

通常、ワイヤーフレームは、銀等の金属を含む。

【0295】

ワイヤーフレーム上の疎水性コーティングは、通例、ポリ(メチルメタクリレート)等の高分子を含む。コーティングは、全てのワイヤーフレームを覆い得、またはワイヤーフレームの一部を覆い得る。コーティングは、例えば、疎水性媒体の液滴に接触するワイヤーフレームの一部を覆い得る。

ワイヤーフレームは任意の形状であり得る。例えば、ワイヤーフレームは、円形ループを含み得る。

【0296】

小滴封入物は、例えば、少なくとも1週間、例としては、少なくとも2週間、安定であり得る。小滴封入物の安定性により、膜孔を通してその周囲と通信する等の目的のために、及びpHまたは温度誘発性の内容物の放出のために、小滴が機能化及び使用され得るということになる。

【0297】

通例、前記疎水性媒体が疎水性媒体の液滴である場合に、小滴集合が作製されるとすぐに過剰な疎水性媒体を除去することを方法が更に含む。通常、過剰な疎水性媒体は、1またはそれぞれの小滴発生器を用いて除去される。より一般的には、過剰な疎水性媒体は、1またはそれぞれの小滴発生器を通して吸引によって除去される。過剰な疎水性媒体の除去は、通常、少なくとも半分の疎水性媒体、例としては、少なくとも75%の疎水性媒体を除去する。

【0298】

いくつかの実施の態様では、過剰な疎水性媒体が、その一部を大量の親水性相(bulk hydrophilic phase)に溶解可能にすることによって除去され得る。例えば、短鎖炭化水素等の揮発性媒体が、疎水性媒体に加えられ得る。

【0299】

封入物は、2以上の区画(すなわち、多区画の小滴集合)を有する小滴集合を含み得る。小滴集合は、例えば、第1の区画及び第2の区画を含み得る。小滴集合内の第1の区画が、膜タンパク質を介して第2の区画と通信し得る。第1及び/または第2の区画が、膜タンパク質を介して外部環境と通信し得る。原則として、小滴集合は、多数の異なる区画を含み得、それゆえに建築上(architecturally)規定された構造が作製され得る。

【0300】

封入物は、2以上の小滴集合を含み得る。各小滴集合は、例えば、本明細書中において記述される通りであり得る。

いくつかの実施の態様では、個々の小滴集合(3次元の小滴集合等)は、全体でゲル状となって新たな小滴集合を形成し得る。このようにして、個々の小滴集合は、例えば、複雑な構造を形成するための組み立てブロックとして使用され得る。形成された新たな小滴集合は、例えば、封入物の一部であり得る。

本発明の方法は、大量の媒体から前記小滴集合を回収することを更に含み得る。大量の媒体が疎水性媒体であれば、本発明の方法は、疎水性媒体から前記小滴集合を回収することを更に含み得る。

【0301】

本発明の方法の実施態様では、小滴封入物を作製するために、疎水性媒体の液滴内に小滴集合が作製され、本発明の方法は、水性媒体である第2の大量の媒体から前記小滴封入物を回収することを更に含み得る。

通常、本発明の方法では、装置は、本発明の装置のために本明細書中において上述された通りである。

また、本発明は小滴集合に関し、該小滴集合は、本明細書において上述された通りの方法によって取得することができる。

【0302】

本発明によって更に提供されるのは、複数の小滴を含む小滴集合であり、それぞれの前

10

20

30

40

50

記小滴は、(i)水性媒体、及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、それぞれの前記小滴は、別の前記小滴と接触して、接触する小滴間の接触面として前記両親媒性分子の2重層を形成し、複数の小滴が第1領域の前記小滴及び第2領域の前記小滴を含み、第1領域の各小滴が第1領域における少なくとも1の他の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、第2領域における各小滴が第2領域の少なくとも1の他の小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、第1領域における小滴の水性媒体が第1のオスモル濃度を有し、第2領域における小滴の水性媒体が、第2のオスモル濃度を有し、第1のオスモル濃度が第2のオスモル濃度と異なる。

【0303】

10

上述したように、第1のオスモル濃度及び第2のオスモル濃度の間のオスモル濃度の違いは、異なるオスモル濃度の小滴間の水の移動を引き起こし、小滴集合の自己-折り畳みをもたらす得る。小滴集合は、例えば、予測可能な方法において折り重なるように設計され得る。かかる自己-折り畳み小滴集合は、再生医療等の分野において応用され得る。人工組織を作り上げることにより、生きている細胞を使用する不利益の多くは除去され、例えば、体内において無制御な複製または細胞の移動がなく、材料の拒絶が制限されるだろう。

【0304】

水性媒体は、任意の適切な水性媒体であり得る。例えば、水性媒体は、純水、もしくは水性緩衝溶液、または1以上の塩の水溶液であり得る。別の方法として、水性媒体は、ヒドロゲルを含み得る。水性媒体がヒドロゲルを含み得る場合、水性媒体は、例えば、アガロース及び水を含み得る。水中のアガロース濃度は、通常、10%以下のw/vアガロースである。例えば、前記水中のアガロース濃度は、0.25から5%のw/vアガロースであり得る。アガロース以外のヒドロゲルも使用され得る。例えば、水性媒体は、メチルセルロース、ポリエチレングリコールジアクリレート、ポリアクリルアミド、マトリゲル、ヒアルロンン、ポリエチレンオキシド、ポリAMPS(ポリ(2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸))、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ナトリウム、アクリレート重合体またはポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を含み得る。別の方法としては、水性媒体本体が、シリコーンヒドロゲルまたはLB(ルリア培地)寒天を含み得る。

20

【0305】

30

水性媒体の1の重要な特性は、pHであり、これは、広い範囲において変更され得る。いくつかの実施の態様では、例えば、水性小滴または複数の小滴内の水性媒体のpHは、より高いpH値及びより低いpH値も可能であるが、5から9(または例えば、6から8の範囲)の範囲であり得る。水性媒体は、それゆえ、水性緩衝溶液であり得る。任意の適切な緩衝剤が、望ましいpHに応じて使用可能である。緩衝溶液は、例えば、トリス-HCl及び/またはKClを含み得る。いくつかの実施の態様では、水性緩衝溶液のpHは、5から9、または例えば、6から8である。溶質の特質及び濃度は、溶液の特性を変更するために変更され得る。

【0306】

小滴集合における各小滴の水性媒体は、同一または異なり得る。

両親媒性分子は、任意の適切な両親媒性分子であり得る。通常、両親媒性分子は、本発明の装置のために上述された通りの両親媒性分子である。

40

小滴集合は、例えば、疎水性媒体に配置され得る。疎水性媒体は、例えば、本発明の装置のために本明細書中に記述される通りの疎水性媒体であり得る。

【0307】

通常、小滴集合は、少なくとも100個の前記小滴を含み、それぞれの前記小滴は、(i)水性媒体及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含む。より一般的には、小滴集合は、少なくとも1,000個の前記小滴を含み、それぞれの前記小滴は、(i)水性媒体及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含む。更により一般的には、小滴集合は、少なくとも10,000個の前記小滴を含み、それぞれの前記小滴が、(i)水性媒体及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含む。

50

【0308】

通例、第1領域及び/または第2領域は、少なくとも100個の小滴、例としては少なくとも500個の小滴を含む。いくつかの実施の態様では、第1領域及び/または第2領域が、少なくとも1,000個の小滴、例としては少なくとも50,000個の小滴を含む。

【0309】

第1及び第2領域のそれぞれにおける小滴の数は、非常に大きく、例としては、少なくとも100,000であり得る。第1及び第2領域のそれぞれにおける小滴の数は、少なくとも1,000,000、例としては、少なくとも10,000,000であり得る。例えば、第1及び第2領域のそれぞれにおける小滴の数は、少なくとも1,000,000,000であり得る。いくつかの実施の態様では、第1及び第2領域のそれぞれにおける小滴の数は、少なくとも10,000,000,000、例としては、少なくとも50,000,000,000であり得る。

10

【0310】

第1領域における小滴が、第2領域における小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成するように、通例、第2領域における小滴が、第1領域における小滴に隣接して配置される。

通常、第2領域における小滴の一部は、全部ではないが、第1領域における小滴に隣接して配置される。従って、通常、第1領域における小滴の一部のみが、第2領域における小滴に接触して、2重層を形成する。このことは、第1及び/または第2領域が、複数の層の小滴で構成されている3次元構造である場合に、しばしば当てはまるだろう。かかる場合には、第1領域の表面における小滴のみが、第2領域における小滴に接触することができるだろう。

20

通例、第2のオスモル濃度に対する第1のオスモル濃度の比は、2:1から50:1であり、好ましくは5:1から20:1である。

【0311】

いくつかの実施の態様では、第1領域における小滴の水性媒体は、塩の水溶液であり、該塩は、水溶液において第1の濃度を有し、第2領域における小滴の水性媒体は、同じ塩の水溶液であり、該塩が、水溶液において第2の濃度を有し、第1の濃度が第2の濃度とは異なる。任意の適切な塩、例としては、塩化カリウム等のアルカリ金属ハロゲン化物が使用され得る。他の実施の態様では、第1領域における小滴の水性媒体が、第1の塩の水溶液であり、該塩が、水溶液において第1の濃度を有し、第2領域における小滴の水性媒体が、第2の塩の水溶液であり、該塩が、水溶液において第2の濃度を有し、第1の濃度が第2の濃度とは異なる。第1及び第2の塩は、異なる塩であり得る。第1の塩が、例としては、塩化カリウム等の塩化物であり、第2の塩は、炭酸カリウム等の炭酸塩であり得る。

30

通常、第2の濃度に対する第1の濃度の比は、2:1から50:1、好ましくは5:1から20:1である。

【0312】

いくつかの実施の態様では、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、100 mMから1,000 mMであり、第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、0.1 mMから100 mMである。通常、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、150 mMから750 mMであり、第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、0.5 mMから75 mMである。より一般的には、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、150 mMから500 mMであり、第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、5 mMから25 mMである。例えば、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、約250 mMであり、第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、約25 mMであり得る。

40

通例、第1水性媒体における塩または緩衝剤の濃度、及び第2水性媒体における塩または緩衝剤の濃度は、塩化カリウム等のアルカリ金属ハロゲン化物塩の濃度である。例えば、緩衝溶液は、トリス-HCl及び/またはKClを含み得る。

【0313】

本発明の小滴集合では、通常、第1領域における小滴が、1列、複数の列、層または複数の層に配置され、第2領域における小滴が、1列、複数の列、層または複数の層に配置され

50

る。

【0314】

第1及び第2領域は、本発明の方法のために上述された通りの第1及び第2列であり得る。別の方法として、第1及び第2領域は、本発明の方法のために、上述された通りの第1及び第2層であり得る。

【0315】

例えば、第1領域の小滴が、1列の小滴、1列の小滴の一部、複数列の小滴、複数列の小滴の一部、層の小滴、層の小滴の一部、複数層の小滴、または複数層の小滴の一部を含み得る;及び/または第2領域の小滴は、1列の小滴、1列の小滴の一部、複数列の小滴、複数列の小滴の一部、層の小滴、層の小滴の一部、複数層の小滴、または複数層の小滴の一部を含み得る。

10

【0316】

いくつかの実施の態様では、第1領域の小滴が、第2領域の小滴の中に小滴の経路を形成する。このことは、図12に図示される。

いくつかの実施の態様では、第1領域において接触する小滴間に形成される両親媒性分子の2重層が、前記膜タンパク質を更に含む。

いくつかの実施の態様では、第2領域において接触する小滴間に形成される両親媒性分子の2重層が、前記膜タンパク質を含まない。

【0317】

他の実施の態様では、前記第1セットの吐出ステップにおいて疎水性媒体に吐出される小滴の水性媒体が、前記第2セットの吐出ステップにおいて疎水性媒体へ吐出される小滴の水性媒体よりも高濃度の膜タンパク質を含む。第1領域において接触する小滴間に形成される両親媒性分子の2重層が、例えば、前記膜タンパク質を含み得る。更に、第2領域において接触する小滴間に形成される両親媒性分子の2重層は、前記膜タンパク質を含まず、または、第1領域において接触する小滴間に形成される両親媒性分子の2重層よりも低濃度の前記膜タンパク質を含み得る。

20

【0318】

膜タンパク質は、例えば、(i)集合内の個々の小滴間及び(ii)小滴集合と外部溶液との間における物質の交換、及び電気的通信の正確な制御を可能にするための膜ポンプ、チャンネル及び/または膜孔であり得る。膜タンパク質は、例えば、HL膜孔であり得る。しかしながら、適切な膜タンパク質が、2つの主要なクラス、すなわち、 α -バレルまたは β -ヘリックス束からの1つを含んで使用され得る。タンパク質膜孔またはチャンネルに加えて、追加的な考えられる膜タンパク質としては、受容体、輸送体、または細胞認識または細胞間相互作用をもたらすタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。チャンネルは、電位依存性イオンチャンネル、バクテリオロドプシン等の感光性チャンネル、リガンド依存性チャンネルまたは機械受容チャンネルであり得る。

30

【0319】

他の適切な膜タンパク質としては、細菌性ペプチド及びイオノフォアが挙げられるが、これに限定されない。別の方法としては、膜タンパク質が、改変膜タンパク質または合成膜タンパク質であり得る。改変膜タンパク質は、例えば、遺伝的改変タンパク質、または共有性または非共有性の化学的改変タンパク質であり得る。合成膜タンパク質は、例えば、ペプチドまたは有機分子であり得る。

40

【0320】

通常、膜タンパク質は、 α -溶血素(HL)膜孔である。

上述の様に、小滴集合は、浸透作用の結果として折り重なり得る。

いくつかの実施の態様では、第1領域における小滴が、層または複数の層に配置され、第2領域における小滴は、層または複数の層に配置され、第1層における小滴が、第2層における小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成するように、第2層または複数の層における小滴が、第1層または複数の層における小滴に隣接配置される。

50

【0321】

いくつかの実施の態様では、例えば、第1領域中の小滴が、層または複数の層に配置され、第2領域における小滴が、層または複数の層に配置され、第1層における小滴が、第2層における小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成するように、第2層または複数の層における小滴が、第1層または複数の層における小滴上に吐出される。

【0322】

第1及び第2層、または複数の層が、例えば、花卉状の領域を含み得る。

通例、花卉状の領域は、内向きに折り重なって、中空の小滴集合を共に形成することができる。中空の小滴集合は、球状であり得る。

10

1の実施の態様では、第1及び第2層、または複数の層が、花形の領域を含む。花形の領域は、例えば、内向きに折り重なり、中空の小滴集合を共に形成することができ得る。中空の小滴集合は、球状であり得る。

中空の小滴集合は、略球状であり得る。

【0323】

上述の様に、中空という用語は、小滴を含まない小滴集合内の容積のことをいう。この容積が、材料または薬剤を含み得、例えば、プロドラッグ等の治療薬、または造影剤等の診断用薬、あるいは酵素を含み得る。容積は、生きている細胞、または生きている複数の細胞を含み得る。容積は、無機化合物または材料を含み得る。

【0324】

20

中空の小滴集合は、例えば、略球状であり得る。

作製される小滴集合は、例えば、小滴を含まない集合内の容積を含み得る。

【0325】

また、本発明は、複数の小滴を含む小滴集合に関し、それぞれの前記小滴は、(i)水性媒体、及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含み、それぞれの前記小滴は、別の前記小滴に接触して、接触する小滴間の接触面としての前記両親媒性分子の2重層を形成し、複数の小滴は、前記小滴を含まない小滴集合内の容積の周囲のシェルの輪郭を示す。

【0326】

水性媒体は、適切な水性媒体であり得る。例えば、水性媒体は、純水、もしくは水性緩衝溶液、または1以上の塩の水溶液であり得る。別の方法としては、水性媒体は、ヒドロゲルを含み得る。水性媒体がヒドロゲルを含み得る場合、水性媒体は、例えば、アガロース及び水を含み得る。水中のアガロース濃度は、通常、10% w/vアガロース以下である。例えば、前記水中のアガロース濃度は、0.25から5% w/vアガロースであり得る。アガロース以外のヒドロゲルも使用され得る。例えば、水性媒体は、メチルセルロース、ポリエチレングリコールジアクリレート、ポリアクリルアミド、マトリゲル、ヒアルロナン、ポチエチレンオキシド、ポリAMPS(ポリ(2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸))、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ナトリウム、アクリレート重合体またはポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を含み得る。

30

別の方法として、水性媒体本体は、シリコーンヒドロゲルまたはLB(ルリア培地)寒天を含み得る。

40

【0327】

水性媒体の1の重要な特性は、pHであり、これは、広範囲において変化し得る。いくつかの実施の態様では、例えば、水性小滴または複数の小滴内の水性媒体のpHは、より高いpH値またはより低いpH値も可能であるが、5から9の範囲であり得る(または例えば、6から8の範囲である)。それゆえ、水性媒体は、水性緩衝溶液であり得る。望ましいpHに応じて、任意の適切な緩衝剤が使用し得る。緩衝溶液は、例えば、トリス-HCl及び/またはKClを含み得る。いくつかの実施の態様では、水性緩衝溶液のpHが、5から9、または例えば、6から8である。溶質の特質及び濃度は、溶液の特性を変化させるために変更され得る。

【0328】

50

小滴集合における各小滴の水性媒体は、同一または異なり得る。

両親媒性分子は、任意の適切な両親媒性分子であり得る。通常、両親媒性分子は、本発明の装置のために上述される通りの両親媒性分子である。

小滴集合は、例えば、疎水性媒体中に吐出され得る。疎水性媒体は、例えば、本発明の装置のために本明細書中に記載される通りの疎水性媒体であり得る。

【0329】

通常、小滴集合は、少なくとも100の前記小滴を含み、各小滴が、(i)水性媒体及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含む。より一般的には、小滴集合が、少なくとも1,000の前記小滴を含み、各小滴が、(i)水性媒体及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含む。更により一般的には、小滴集合が少なくとも10,000の前記小滴を含み、それぞれの前記小滴が、(i)水性媒体及び(ii)水性媒体の表面周囲の両親媒性分子の外層を含む。

10

【0330】

小滴を含まない容積は、シェルによって完全に包み込まれ得、または部分的に露出され得る。

小滴集合内の容積は、生物活性剤を含み得る。例えば、プロドラッグ等の治療用、及び/または造影剤等の診断用薬剤、または酵素を含み得る。容積は、生きている細胞、または生きている複数の細胞を含み得る。

【0331】

通常、前記小滴によって輪郭を示されるシェルは、曲面構造である。

20

通例、前記小滴によって輪郭を示されるシェルは、略円筒状、略環状、略球状、または略半球状である。

いくつかの実施の態様では、前記小滴によって輪郭を示されるシェルが、小滴集合内の前記容積を囲う。

前記小滴によって輪郭を示されるシェルは、例えば、略球状であり得る。

【0332】

通常、本発明の小滴集合では、複数の小滴における前記小滴の数が、少なくとも100、例えば、少なくとも500である。いくつかの実施の態様では、複数の小滴における前記小滴の数が、少なくとも1000、例えば、少なくとも5000である。例えば、複数の小滴における前記小滴の数が、少なくとも10000または少なくとも30000であり得る。例えば、複数の小滴における前記小滴の数が、約35000であり得る。

30

【0333】

複数の小滴における小滴の数は、原則として非常に大きくなり得、例えば、百万の次数になり得る。原則として数百万の小滴を含み得るかかかるネットワークは、例えば、原型組織(すなわち、原細胞の集合体)の作製のために有用であり得る。いくつかの実施の態様では、それゆえ、整数nは、数百万に達し、例えば最大約10,000,000、または例えば最大約5,000,000に達し得る。

【0334】

また、本発明は、合成生物学において本明細書中に記述された通りの小滴集合の使用にも関する。例えば、原細胞または原細胞の集合体の作製における使用に関する。

40

また、本発明は、再生医療において本明細書中に記述された通りの小滴集合の使用に関する。小滴集合は、例えば、衰えつつある組織または器官を補強または交換するために使用され得る。小滴集合の小滴または複数の小滴は、生きている細胞を含み得る。例えば、細胞は、プリンティング後に小滴内において成長させること、及び/またはプリント後に小滴間の2重層を解体することを可能にし得る。

【0335】

また、薬物送達ビヒクルとして本発明の小滴集合のために本明細書中に記述された通りの小滴集合の使用が、本発明によって提供される。

また、本発明は、材料科学及び材料工学において本発明の小滴集合のために本明細書中に記述された通りの小滴集合の使用を提供する。

50

【0336】

固形物のパターンニングのための鋳型として本発明の小滴集合のために本明細書中に記述された通りの小滴集合の使用が本発明によって更に提供される。固形物は、例えば、電子工学、光学、光通信学、または他の材料科学的応用において使用され得る。小滴、または複数の小滴は、例えば、特定の小滴間において拡散し得る無機材料を含み得る。無機材料は、その後、硫化カドミウム等の無機固体を形成すべく反応し得る。

本発明は、以下の実施例において更に説明される：

【実施例】

【0337】

一般的方法

以下に説明する全実施例において脂質は、 $0.2\text{--}0.5\text{ mg ml}^{-1}$ の1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(Avanti Polar Lipids)であった。油は、ヘキサデカン及びシリコーン油 AR 20 (いずれもSigma Aldrich)の1 : 1 (v/v)混合物であった。全実験における緩衝剤は、折り畳み実験 (folding experiments) を除き、25 mM トリス-HCl、1 M KCl、 $100\text{ }\mu\text{M}$ EDTA、pH8.0であった。折り畳み実験では、この溶液が、図15までの図の節の簡潔な説明において示された塩濃度を得るために希釈された。使用された染料は、追加的な方法において以下に示された濃度のキシレンシアノールFF、オレンジG及びピラニン(いずれもSigma-Aldrich)である。

【0338】

圧電変換器(7BB-20-6L0, Murata)からなる各小滴発生器が接着性のエポキシ樹脂を微細加工されたポリ(メチルメタクリレート)(PMMA)チャンバ(図3及び追加的方法)に取り付けられる。ノズルは、ガラス毛细管(追加的方法)から形成され、シリコーンゴムアダプター(Drummond)を用いてチャンバに取り付けられる。大量の油及び大量の水溶液においてプリントのために使用される容器は、追加的方法において以下に説明される。

【0339】

マイクロマニピュレータ(PatchStar, Scientifica)は、コンピュータによって制御された。同じコンピュータが、1つのアルドゥイーノウノ(Arduino Uno)マイクロコントローラボード(SmartProjects)を介して2つの小滴発生器を制御した。該コントローラボードは、デジタルアナログコンバータ(AD5504, Analog Devices)及び演算増幅器(OPA551, Texas Instruments)を用いて、 -30 V から $+30\text{ V}$ の範囲において出力電圧を作り出す。出力電圧は、一度に2つの変換器のうちの1つにリレー(NRP-04, NCR)を介して印加される(追加的方法も参照)。電圧パルスは、通常、 $100\text{--}800\text{ }\mu\text{s}$ の持続時間及び $20\text{--}60\text{ V}$ の頂点間振幅を有した。大量の油及び大量の水溶液においてネットワークをプリントするために使用されるコンピュータプログラムは、追加的方法において以下に記述される。

【0340】

電氣的経路試験に使用される7量体 HLが記述された通りに作製され(Maglia, G. et al., Nano Lett. 9, 3831-3836 (2009))、100倍希釈液の水性小滴に加えられた。Ag/AgCl電極が、直径 $100\text{ }\mu\text{m}$ の銀のワイヤ(Sigma Aldrich)を25%次亜塩素酸ナトリウム溶液で1時間より長く処理することによって作製された。電流は、パッチクランプ増幅器(Axopatch 200B, Axon Instruments)及び16ビットデジタイザ(1322A, Molecular Devices)を用いることにより、電極で測定された。信号は、5 kHzローパスベッセルフィルタで処理し、 20 kHz を得た。

【0341】

結果

実施例1-小滴発生器

小滴ネットワークの自動作成は、制御可能なサイズの小滴の信頼性のあるソースを必要とする。本発明者らは、圧電性の小滴発生器を作り上げ、該小滴発生器が、ノズル(以下の一般的方法参照)としての先細りのガラス毛细管を使用する。装置は、水性緩衝剤で満たされ、ノズル先端は、油中の脂質溶液に浸された。圧電性素子(追加的方法)に電圧を印加することによって、油へ放出される小滴の直径は、電圧パルスの振幅及び持続時間を変

10

20

30

40

50

更することによって約10 μm 及び200 μm の間で調整され得る(図10、追加的考察)。

【0342】

実施例2-2つの小滴発生器を用いる小滴のネットワークのプリント

異種の小滴のネットワークが、2つの小滴発生器を用いてプリントされる。

2つのノズルがすぐ近くに配置され、電動マイクロマニピュレータ(図2a)上に取り付けられた脂質含有油の溶液層に浸された。小滴発生器及びマニピュレータは、コンピュータによって制御された。デザインされた3次元ネットワークが自動的にプリントされることを可能にするプログラムが記述された(追加的方法)。ネットワークは、小滴1つ分の厚さの水平横断面を示す一連の画像として、ユーザによって記述される。これらの画像に基づいて、プログラムは、油槽の運動を2つのノズルからの小滴の放出と同期させて、水平層においてネットワークを作り上げる(図2b、追加的方法)。

10

【0343】

実施例3-ミリメートルサイズのネットワークのプリント

小滴ネットワークのプリントにおいて、本発明者らは、ほとんどの2次元及び3次元のプリント技術(追加的考察も参照)には生じない課題に直面した。これらは、小滴が脂質単分子層を取得し、意図した位置まで沈み、かつ他の小滴と2重層を形成するのに比較的長時間が必要であることに起因する。それぞれのこれらの方法に必要な時間は、1秒の次数である。プリント基質(printing substrate)、または大きくなるネットワークとともに形成された2重層に接着していない小滴は、追加的な小滴の放出と油中のノズルの運動によって引き起こされる粘性の引っ張りとの両方によって、意図された位置から移動され得る。流体、ノズル配置、小滴サイズ及びプリントアルゴリズムの適切な選択にもかかわらず(追加的考察、追加的方法)、本発明者らは、約1 s^{-1} 以内の速さで放出される最大約50 μm の直径の最大約35,000個の非相同の小滴からなる数ミリメートルのサイズの正確に規定されたネットワークをプリントした(図2c-f)。

20

【0344】

プリントされた小滴ネットワークは、自己支持的であり(例えば、図2f参照)、また、システムの熱力学解析により、安定なネットワークが、少なくとも数千の層とともにプリントされ得ることを示す。脂質2重層の格子により、小滴ネットワークが穏やかな摂動下においてその形状を保つことも可能になり、各2重層は、約25 Paの引っ張り強度とともに常に約4 mN/mの有効弾力を結合する小滴へ加える。本発明者らは、材料のヤング係数が、実験の条件のためには約100~200 Paの次数であると見積もる。この範囲の剛性は、脳、脂肪及び他の柔らかい組織の弾性係数と重なる(Levental, I, Georges, P. C. and Janmey, P. A. *Soft Matter* 3, 299-306 (2007))。

30

【0345】

実施例4-油滴内のプリント

本発明者らは、合成生物学及び医学において予想される応用のために、小滴ネットワークが、油の小さな液滴内に封入することによって大量の水溶液において安定化し得るということを先に示した(Villar, G., et al, *Nature Nanotech.* 6, S0S-S0S (2011))。以前に封入されたネットワークは、手動で作り出され、それゆえ、複雑性において制限されていたが、ここでは、本発明者らは、複雑な封入されたネットワークのプリントを実証する。このことは、水溶液中に浮遊する油滴内においてプリントすることによって達成された(図11a)(追加的方法、追加的考察)。プリントが完成した時点で、過剰な油が1つのプリントノズルを介した吸引によって除去され得る。封入されたプリントネットワーク(図11b-d)は、少なくとも数週間安定であって、それゆえ、膜孔を介した水性環境との通信、及びpHまたは温度誘発性の内容物の放出を含め、単純な封入されたネットワークで先に実証された機能を拡張することに貢献するだろう(Villar, G., et al, *Nature Nanotech.* 6, 803-808 (2011))。

40

【0346】

実施例5-通信経路を含む小滴集合

小滴ネットワークが大量の水溶液において安定化され得ることを実証したが、本発明者

50

らは、特定の接触面2重層において膜タンパク質とともにネットワークをプリントすることによって機能的な組織の最小限の類似物 (minimal analogues) として、小滴ネットワークを更に発展させることを目標とした。この目的のために、本発明者らは、ネットワークをプリントし、このネットワークでは、既定された経路に沿った小滴のみが、ブドウ球菌 - 溶血素 (HL) を含んだ (図12a, b)。本発明者らは、タンパク質膜孔が、経路に沿って2重層に挿入されたか否かを電氣的記録によって決定した。非破壊の方法においてネットワークを電氣的に調べるために、HLを含む直径約500 μm の緩衝剤の液滴が、それぞれ2つのAg/AgCl電極に手作業によってピペットでとられた。ネットワーク表面に小滴との2重層を形成するように、その後、液滴がネットワークの異なる部位に接触した (図12a)。

【0347】

10

2つの大きな液滴が、HL含有経路 (図12b) の両端に配置された場合、本発明者らは、新たな2重層へのHL膜孔の導入によって引き起こされたイオン電流の段階的増加を、印加された電位 (図12c) 下において測定した。1つの液滴が分離された後、HL含有経路から離れたネットワークに接触し (図12d)、過渡電流のみが観察された (図12e)。この液滴は、ネットワークから再度分離され、その元の位置と置き換えられ、電流の段階的増加が再度観察される (データは示されず)。小滴が全くHLを含まない小滴ネットワークは、ごく少量の電流を示すが、全ての小滴がHLを含む小滴ネットワークにわたって測定された電流は、図12c (図13) に示されるものと同様であった。

【0348】

これらの結果の解釈を容易にするため、複雑な小滴ネットワークの電氣的動作の計算機によるシミュレーションのための定式化 (formalism) が進展された (以下の追加的方法参照)。経路に沿った2重層の大多数がいくつかのHL膜孔を含み、ネットワークにおける他の2重層が何も含まず、ネットワークの残りと比較して無視できるほどの電気抵抗を経路が示す場合には、電氣的モデルが、図12c, eに例示される測定電流と一致することが分かった (追加的考察)。図12cにおける電流の段階的増加は、それゆえ、経路の小滴及び大きな液滴の間の2重層において膜孔の挿入によって最も引き起こされやすい (追加的考察)。図12eにおける電流スパイクは、ネットワークにおいて経路から離れて配置される液滴及び絶縁性の小滴の間の2重層における膜孔の挿入に相当する (追加的考察)。これらの2重層の1つにおける各膜孔の挿入が、2重層の抵抗を減少させ、このことが、今度はその2重層を通過するイオン電流を増加させる。しかしながら、絶縁性の各小滴が、この他の2重層を通過するイオン電流のためのルートを提供しないことから、正味のイオン電荷は、小滴に蓄積する。小滴の絶縁層のこの容量性の電荷は、イオン電流を除去するために作用する電圧を生み出す。電流は、それゆえ、過渡的スパイクとして測定される

【0349】

これらの知見に基づいて、本発明者らは、小滴ネットワークがタンパク質膜孔とともに特定の2重層においてプリントされ、それで印加された電位下において規定された経路に沿ったイオン電流が流れることを可能にし得ることを示した。2つの部位間の経路に沿った急速な電氣的通信を可能にすることにおいて、本明細書中に示されたネットワークは、神経に不可欠な機能を模倣するが、その信号伝播機構を模倣しない。機能的な膜チャネルまたは膜孔を有するより洗練されたネットワークは、より複雑な動作を示し得る (Maglia, G. et al, Nature Nanotech. 4, 437-440 (2009))。例えば、ネットワークは、その長さに沿って活動電位を生成及び送信するために、電位依存性イオンチャネルを使用し、または網膜の機能を模倣するために、バクテリオロドプシン等の感光性チャネルを使用し得る (Holden, M. A., et al, J. Am. Chem. Soc. 129, 8650-8655 (2007))。

【0350】

実施例6-折り重なるネットワーク

プリントされた小滴ネットワークを3D構造に折り重ねる方法も調査された。該方法は、プリントすることのみによっては容易に得られない。水は、タンパク質チャネルまたは膜孔がない状態であっても、本研究条件下では $27 \pm 5 \mu\text{ms}^{-1}$ の透過係数 (平均 \pm 標準偏差 (s.d.), $n = 6$) において小滴の接触2重層を通過して容易に浸透し (図16、追加的方法)

50

、この透過係数は、小滴の接触面2重層の他の透過性測定結果(Dixit, S. S., et al, Langmuir 28, 7442-7451 (2012) and Xu, J., et al, Adv. Mater. 22, 120-127 (2010))及び別の脂質2重層システム(Boroske, E., et al, Biophys. J. 34, 95-109 (1981))の他の透過性測定結果と一致する。その結果として、DIBによって結び付けられた(joined)より高いオスモル濃度及びより低いオスモル濃度の2つの小滴は、これらのオスモル濃度が等しくなるまで、それぞれ膨張及び縮小するだろう(図15a)。伸張により、異なるオスモル濃度の小滴からなるネットワークにおける小滴間の水の移動は、小滴間の接着が維持される限り、ネットワークの自発変形を引き起こすだろう(図15b)。小滴ネットワークが予測可能な方法において折り重なるためのいくつかの必要条件が見出された(追加的考察も参照)。第1に、ネットワークにおいて誤った位置に小滴がプリントされることを抑制するために、ネットワークは、プリント時間に比べてゆっくり折り重なる必要がある。第2に、2つの小滴タイプの膨張及び縮小が、結合された小滴の領域間の長さの不一致を引き起こし、誘発されたストレスが、制御されていない方法においてネットワークの湾曲を引き起こし得る。このことは、特定の葉(Nath, U., et al, Science 299, 1404-1407 (2003) and Sharon, E., et al, Phys. Rev. E 75 (2007))及び花びら(Liang, H. Y. & Mahadevan, L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 5516-5521 (2011))等の不均一な速さで大きくなる組織、並びにいくつかの合成システム(Klein, Y., et al, Science 315, 1116-1120 (2007) and Sharon, E., et al, Nature 419, 579-579 (2002))における湾曲の不安定性に類似する。ある例では、ストレスが、その代わりに結び付けられた小滴を分離させ、これによって破砕帯(fracture zone)の周囲のネットワークの更なる折り重なりを抑制する。

【0351】

これらの多様な問題は、プリント速度、塩濃度及び小滴サイズ、及びネットワーク配置の調製の思慮深い選択によって解決され得る(追加的考察参照)。最終的なネットワーク配置が、その後、その初期配置、2タイプの小滴の分配、及びこれらのオスモル濃度の比率によって制御される方法において決定される。本発明者らは、単純なモデルを考案した。このモデルは、既定の小滴ネットワークの折り重なり動作を定性的に予測することを可能にし(以下の追加的方法参照)、このモデルが、うまく折り重なる小滴ネットワークを設計するために使用された。

【0352】

1の実験では、本発明者らは、異なる塩濃度を有する2つの小滴の細長い断片を含むネットワークをプリントし、これらの断片が長さ方向に結合される(図15c)。ネットワークの反対側の端における小滴が閉じた輪状の2重層を形成するまで、ネットワークが約3時間で水平面において自発的に折り重なった。本発明者らは、ネットワークが水平面外において自発的に折り重なって、直接的にプリントすることが困難であろう配置を実現するようにネットワークを調整もした。4枚の花弁を有する花状のネットワークがプリントされ、このネットワークでは、より低い層が上部の層に比べて高いオスモル濃度を有する。より上部から低い層への水の透過により、ある植物によって示される傾性運動に類似する方法において花弁を起こし、内向きに折り曲げる湾曲が誘発される(Forterre, Y., et al, Nature 433, 421-425 (2005) and Skotheim, J. M. & Mahadevan, L., Science 308, 1308-1310 (2005))。折り畳まれたネットワークは、元々は上側の層が元々はより低い層(図15d、e)によって形成されたシェル内に包含される略球状配置を有する。ネットワーク配置の変化(evolution)は、同様の初期状態(図15f)を有するシミュレートされた折り重なるネットワークのそれと定性的によく一致する。

【0353】

不均一な容積の変化によって変形する他の材料が存在する。例えば、バイメタルの細長い断片の機能は、不均質な温度膨張係数に依存する。また、ヒドロゲルシステムは、溶媒濃度または温度の作用としての不均一な容積の変化に耐えるべく、空間的にパターン化される(Kim, J., et al., Science 335, 1201-1205 (2012)及びHu, Z. B., et al, Science 269, 525-527 (1995))。これらのシステムは、外部刺激によって動作するが、小滴ネッ

トワークは、ネットワーク内の全体的な水の移動の結果として折り重なり、それゆえ、外部の駆動力を必要としない。

【 0 3 5 4 】

追加的方法

1 染料濃度

この節は、図2、11、12及び15に示す各ネットワークの染料濃度について詳述する。

図2d: 濃灰色の小滴は、1 mMキシレンシアノールFFを含む。

図2f: 濃灰色の小滴は、1 mMキシレンシアノールFFを含み、薄灰色の小滴は、10 mMオレンジGを含む。

図11b: 薄灰色の小滴は、900 μ キシレンシアノールFF、及び100 μ ピラニンを含み、濃灰色の小滴は、10 mMオレンジGを含む。

10

図12b-e: 薄灰色の小滴及び大きな濃灰色の液滴は、10 mMピラニンを含み、他の小滴は、50 μ キシレンシアノールFFを含む。

図15c: 濃灰色の小滴は、320 μ キシレンシアノールFFを含み、薄灰色の小滴は、2.5mMオレンジGを含む。

図15d: 濃灰色の小滴は、160 μ キシレンシアノールFFを含み、薄灰色の小滴は、800 μ オレンジGを含む。

【 0 3 5 5 】

2 容器

大量の油中においてプリントされるネットワーク

20

大量の油中においてプリントされるネットワークのための容器は、片面のガラス観察窓を有してポリ(メチルメタクリレート)から適切に微細加工された。油を充填された容積は、水平方向に約15 x 10 mmであり、深さ約5 mmであった。自発的に折り重なるネットワークは、ウェルの底面に直接的にプリントされ、一方、大量の油中の他の全てのネットワークは、ウェルに配置されたガラスのカバースリップの部品上にプリントされた。

【 0 3 5 6 】

大量の水溶液中にプリントされたネットワーク

大量の水溶液中にプリントされたネットワークのための容器は、共焦点顕微鏡法によってネットワークを撮像する場合には、ガラスのカバースリップの底面を有するポリスチレンキュベットであった。

30

【 0 3 5 7 】

大量の水溶液中のプリントは、ワイヤーフレーム上にぶら下げられた油滴内で行った。

該ワイヤーフレームを以下の通りに作製した。ポリ(メチルメタクリレート)削りくず(savings)を100 mg ml⁻¹クロロホルムに溶解した。直径100 μ mの銀色のワイヤ(Sigma-Aldrich)の一端が薄い疎水性皮膜を得るように、これを最大5回この溶液につけた。その後、輪がちょうどポリマーで皮膜されたワイヤの長さになるように、ピンセットを用いて皮膜されたワイヤの一端を輪状に成形した。皮膜されていない一端を、エポキシ系接着剤を用いてポリスチレン容器に取り付けた。

【 0 3 5 8 】

プリントノズルを油滴に挿入するため、最初、ノズルに大量の水性層を通過させる必要があった。ノズル内容物の大量の水溶液への漏出を抑制するため、マイクロピペットを有する各小滴発生器の吸気口への吸引を用いることにより、油滴のために使用される同じ油混合物のプラグが各ノズルの先端に吸いこまれた。ノズルの先端が水溶液における油滴内に配置されるとすぐに、マイクロピペットを用いて各吸気口に正の圧力をかけることにより、油のプラグが吐出される。

40

【 0 3 5 9 】

3 小滴発生器

ノズル

各小滴発生器のためのプリントノズルが、それぞれ1.4 mm及び1.0 mmの外径及び内径を有するガラス毛细管(Drummond)から形成された。毛细管を引っ張り(PC- 10、 Narishige)

50

、その引っ張られた端に対して別の引っ張られた毛細管の先端を通過させることにより、引っ張られた端の形を穏やかに整え(Oesterle, A. P-1000 & P-97 Pipette Cookbook (rev. G). Sutter Instrument Co., Novato (2011))、直径約60 μm 及び120 μm の間の平坦な先端とした。その後、引っ張られた端から約15 mmにおいてフレーム上で毛細管を90°曲げた。最後に、引っ張られた端から約35 mmにおいて毛細管の形を整えた(図3)。

【0360】

充填

ゲルローディングチップ(gel-loading tip)を有するマイクロピペットを使用して、装置の上面の吸気口を経由してチャンバを約400 μm の水溶液で充填した。ノズルは、毛細管作用を介してこの溶液を自発的に充填された。

10

【0361】

プリントに必要な水溶液の容積は、約5 μl に減少し得、このことが、HLを使用したこの実験において溶液の消耗を最小限にした。このことを実行すべく、小滴発生器を、最初に水で充填した。その後、ヘキサデカンを充填されたウェルに発生器のノズルが浸され、約5 μl のヘキサデカンがノズルに吸い込まれるように、発生器の吸気口においてマイクロピペットを用いることにより吸引がかけられた。ノズルを、その後、水性の試料を含む別のウェルに浸し、水溶液の同じ容積を充填するために吸引をかけた。ヘキサデカンは、ノズル内のプラグを形成し、該プラグが、ノズル先端における水性試料がより大容積の水と混合することを抑制した。顕著に少ない水性試料を充填することに関し、放出された小滴のサイズが、ノズルに残る水性試料の容積によって異なることが見出された。

20

【0362】

4小滴発生器のための電子機器の駆動

小滴発生器を駆動するために構築された電子回路が、図4に概略的に示される。回路は、コンピュータからの指示を解釈して、特定の持続時間及び振幅の矩形電圧パルスを作り出し、この電圧を2つの小滴発生器のいずれかにおいて圧電変換器または圧電性物質に印加する。この節は、回路がどのように電圧パルスを生成するかについて詳述する。

【0363】

圧電性物質の選択

最初に、コンピュータが、所望の圧電性物質を示す一連のメッセージをアルドゥイーノマイクロコントローラ基板に送信する。マイクロコントローラは、このメッセージを解釈し、所望の圧電性物質が回路の電圧出力を受信するように、トランジスタを介するリレーを活性化する。圧電性物質は、このようにして選択されるとすぐに、-30 Vの最大負電圧において保持される。負電圧が圧電性物質の圧縮を引き起こすように、電圧出力に接続された圧電性端子が選択される。

30

【0364】

電圧出力

コンピュータは、その後、一連のメッセージをマイクロコントローラに送信し、該マイクロコントローラが、電圧パルスを生成すべく指示をする。パルスの持続時間及び振幅は、一連のメッセージにおいて指定されるか、または前もってマイクロコントローラにプログラムされ得るかのいずれかである。マイクロコントローラは、このメッセージを解釈し、デジタルアナログ変換器(DAC)へ一連の周辺インターフェース(SPI)バスを介して電圧パルスの振幅を符号化する値を記述するメッセージを送る。DACは、12ビットの分解能で0 V及び+30 Vの間の対応する電位を出力する。DAC出力は、電流バッファとして機能する演算増幅回路へ入り、また、-30 Vから+30 Vの出力電圧範囲を弱め、また増加させる。この回路の出力が、リレーによって先に選択された圧電物質に印加される。電圧パルスの指定された持続時間の後、マイクロコントローラは、圧電物質を最大の負電圧に再びセットする。

40

【0365】

5 グラフィカルユーザインターフェース

小滴プリンタのリアルタイム制御を可能にするグラフィカルユーザインターフェースが

50

、PRO-CESSINGプログラミング言語において記述された(図5)。インターフェースは、各小滴発生器に印加される電圧パルスの振幅及び持続時間の正確な制御をもたらす。小滴の放出は、ユーザが規定した小滴の数及び多数の小滴間の時間遅延を伴って、要求に応じて引き起こされ得る。この特性により、各発生器のために、特定のサイズの小滴を作製するために必要な条件をユーザが素早く決定することが可能になる。インターフェースは、ユーザによる電動式マイクロマニピュレータの直接的な制御ももたらす。該マイクロマニピュレータは、既定サイズの小滴間の正確な配置、及び2つのノズルの相対的変位を決定するために使用される。後者は、2タイプの小滴間の系統的な移動を阻害するためのプリントソフトウェアにおいて補正された。インターフェースは、コンピュータキーボードまたはマウスを介して制御され得る。

10

【0366】

6 プリントアルゴリズム

小滴ネットワークが、PROCESSINGプログラミング言語で記述されたアルゴリズムに従ってプリントされ、2つの小滴発生器及び電動式マイクロマニピュレータを制御するコンピュータによって実行される。ネットワークがプリントされる全体的なパターンを最初に詳述し、続いて、プリントアルゴリズムを詳述する。

【0367】

6.1 プリントパターン

層

アルゴリズムは、同時に1の水平層をプリントすることにより、小滴ネットワークを構築する。プリントされるネットワークは、一連の画像、またはマップによって記述され、これらのいずれかが、ネットワークにおける1以上の層を示す(図2c)。各マップによって示される層の数が、ユーザによって指定される。マップにおける各ピクセルが3色のうちの1つを有し得る。その色に応じて、各ピクセルは、2つの小滴発生器の1つからの小滴、または小滴が存在しないことを示し、これらは、A、B及び空ピクセルとして本明細書中にそれぞれ言及された。

20

【0368】

経路

各層は、2つの経路においてプリントされる。第1の経路では、層のAの小滴のみがプリントされ、第2の経路では、Bの小滴のみがプリントされる。各経路は、同時に1列をプリントされ、各列は、横寸法xに平行である。

30

【0369】

目標

プリントノズルが既定の経路においてたどるように指示される通路は、座標(coordinate)または目標の順序集合によって規定され、それぞれの座標または目標は、小滴が放出されるべき位置を示す。各層のために、対応するマップにおいて各ピクセルに対して目標がセットされる。目標の順序は、最小限のx及びyにおいて開始し、偶数列においてxに沿って左から右に増加し、yに沿って増加し、奇数列において右から左に増加する(図6)。

【0370】

マージン

40

図6bにおける矩形パターンを立方体状にデザインされたネットワークをプリントするために使用した場合、もたらされるネットワークが、しばしば傾斜した壁及び凸の上面(図7a,b)を有した。プリント過程の観察により、これらの変形は、2つの小滴が接触後に2重層を形成するために必要な有限の時間の結果、生じることが明らかになった(追加的考察)。ネットワークの最外縁において放出される小滴は、それゆえネットワークに組み入れられる前に外壁を所定距離、転がり落ちる傾向がある。第1の数枚の層において小滴は時々、ネットワークの中心から離れる代わりに、ネットワークの中心に向けて転がったが、このことは、その後と同じ位置にプリントされた小滴が、外側へ転がる可能性を増大させた。

【0371】

小滴が外壁を転がり落ちる傾向は、ネットワークの上層の最外縁部において小滴の枯渇

50

(depletion)、及びより低い層の最外縁部の周囲における小滴の過剰を引き起こす。しかしながら、少数のケースでは、同じ方法においてプリントされたネットワークは、同じゆがみを示さなかった(図7c)。これらのケースでは、小滴が側面を転がり落ちる前に、油中を通るノズルの移動が、ネットワーク中心に向けて小滴を引きずった。

【0372】

ネットワークがプリントされる正確さを大幅かつ確実に改善するために、プリントパターンがわずかに修正され得ることが分かった。修正は、(i)1または2ピクセルの外側の縁をネットワークマップに付加すること、及び(ii)各列における小滴の通常の放出に加えて、小滴が縁の目標のそれぞれに追加的に n 回放出されるように、プリントアルゴリズムを修正することからなった。約2または3の n は、プリントされるネットワークに依存する。各層における第1の縁の小滴が、通常、2から3の層にわたってネットワークの外壁を転がり落ちたが、次の縁の小滴は、これらの上部においてネットワークに組み入れられる傾向があった。このようにして、プリントアルゴリズムは、ネットワークの速度(pace)において大きくなる縁の小滴の障壁を形成し、内側的小滴がこれらの意図された境界から転がり得ることを抑制する。

【0373】

6.2アルゴリズム:初期設定

プリントアルゴリズム(図8)は、1度実行される初期化段階において開始され、その後、プリントが完成するまで継続する指示段階が続く。初期化段階において、ユーザは、最初に表1に示すパラメータを入力する。パラメータのうちの2つ、目標スキップ閾値及びインターフェースリセット期間は以下に詳細に説明される。その後、プログラムが、プリントされるべきネットワークを規定する全てのマップをメモリにロードする。上述のパターンに従って一連の目標として符号化されたプリントノズルのための通路が、第1層の第1の経路のために確立される。最終的には、マニピュレータが第1の目標への移動することを指示される。目標が果たされるとすぐに、プログラムが、それに続くマニピュレータの移動のためにより低い速度をセットする。

【0374】

目標スキップ閾値

既定の経路において、一般に、全ての目標が、経路に相当する色の小滴を示すわけではない;例えば、A及びBの小滴の両方を含む層において、Aの経路は、Bの小滴のための目標を含むだろう。このことは、マニピュレータに小滴が全く作製されない目標への移動において多大な時間を費やさせ得る。このことは、進行中の通路において小滴を必要としない全ての目標を単純にスキップすることによって解決され得る(すなわち、プリント通路を省略すること)。しかしながら、油中を通るノズルの移動は、直近に作製された小滴の移動を引き起こし得る(追加的考察)。それゆえ、進行中の経路に相当しない全ての目標をスキップすることは、プリント経路に沿ったこれらの位置に応じて、ネットワークにおける小滴を他のものと異なって配置させるだろう。

【0375】

アルゴリズムは、先の n 個の目標のいずれにおいても小滴が放出されなかった場合のみに、進行中の経路において小滴を必要としない次の目標をマニピュレータがスキップすることを認めることにより、この問題を回避し、 n は、目標スキップ閾値である。目標スキップ閾値は、ネットワークに組み込まれるための十分な時間を直近に放出された小滴に割り当て、それで、プリントノズルの移動によって影響されないように選択される。

【0376】

インターフェースリセット期間

ウェルの油剤液面の上方において小滴発生器チャンバが高すぎた場合、水溶液からの静水圧により、プリントノズルがその内容物を自発的に油中へ漏出した。油の上方約1 cmのチャンバ、及び先端直径約80 μm の通常のノズルでは、この漏出は、2つの段階において起きた:水性容積が徐々にノズルから出て、数分間にわたって略半球状の突出を形成する初期段階と、それに続く、水性チャンバの内容物が数秒にわたって油中に注がれる急速段階

である。

【 0 3 7 7 】

より遅い漏出の初期段階の間、小滴の放出により、ノズルにおける水-油接触面がその元々の平面構造 (planar geometry) に戻った。既定の経路において使用される小滴発生器は、それゆえ、その内容物の漏出を抑制される、というのは約 1 s^{-1} の比較的高速で小滴を放出するからである。しかしながら、各通路は、最大数分かったため、既定の通路において使用されない発生器は、漏出の急速段階に至ってその内容物を出し得た。

【 0 3 7 8 】

小滴発生器にある電圧波形を加えることにより、小滴の放出を引き起こすことなく、そのノズルにおける水-油境界面が平面構造に戻るだろうということが分かった。接触面をリセットするために使用される電圧波形は、通常、その間に 20 ms の間隔を有する 3 つの矩形波と、それぞれ 40 μs の持続時間と、約 12 V の振幅とからなった。各経路では、この波形が、その経路において使用されない小滴発生器に対する全 n 個の目標に割り当てられ、 n は、インターフェースのリセット期間である。

【 0 3 7 9 】

【表 1】

パラメータ	標準値
x 及び y の小滴間間隔	50 μm
交互層のための x オフセット	25 μm
交互層のための x 及び y オフセット	25 μm
プリント中のマニピュレータ速度	200 $\mu\text{m s}^{-1}$
各小滴放出後の遅延	200 ms
各列プリント後の遅延	2 s
目標スキップ閾値	4
インターフェースリセット期間	10

【 0 3 8 0 】

6.3 アルゴリズム: 方向

方向段階では、コンピュータが、図8におけるアルゴリズムに従って、2つの発生器からの小滴の放出に油槽の移動を同期させる。マニピュレータがその直近の目標に到達した場合に、目標の色が直近の経路における色に一致すれば、小滴が放出される。もし目標が直近の経路において最後であれば、経路の番号及び層の番号が更新される。目標が全ネットワークにおける最後であれば、漏出を抑制するためにノズルが油から持ち上げられる。そうでなければ、マニピュレータが、次のゴールへ移動するように指示される。

【 0 3 8 1 】

7 複雑な小滴ネットワークの電氣的シミュレーション

7.1 課題の表明

本発明者らは、1セット N 個の小滴を考慮し、これらの小滴の一部が、既定の構造において 2 重層によって対に結合する。2 重層は、異なる領域を有し、いくつものタンパク質膜孔を含み得、2 重層の領域及び膜孔の数が経時的に変化し得る。 N 個の小滴のうちの 2 つ、標識された a 及び b は、電極を挿通され、それぞれ公知電圧 u_a 及び u_b において平衡状態となると考えられた。システムは図9の通りにモデルされ、システムが含む各 2 重層及び膜孔は、並列接続のコンデンサ及び抵抗によって表される。公知の接続性の小滴ネットワーク、及び公知のコンダクタンス及び電気容量の 2 重層が与えられれば、本発明者らは、小滴 a 及び b における電極によって測定される電流を算出したいと考えている。

【 0 3 8 2 】

7.2数学的定式化

電位 V_j の小滴 j から電位 V_i の小滴 i への電流は、

$$I_{ij} = I_{ij}^r + I_{ij}^c$$

によって与えられ、式中、

$$\begin{aligned} I_{ij}^r &= g_{ij} (V_i - V_j), \\ I_{ij}^c &= c_{ij} (\dot{V}_i - \dot{V}_j), \end{aligned} \quad (1)$$

10

かつ $g_{ij} = 1/\tau_{ij}$ は、小滴 i 及び j 間のコンダクタンス、及び c_{ij} は、小滴 i 及び j 間の電気容量である。 i 番目の小滴への正味電流は、ネットワークにおける全小滴からの寄与の合計によって与えられる：

$$I_i = \sum_{j \neq i} I_{ij}, \quad (2)$$

【 0 3 8 3 】

20

式中、総和 (sum) は、全体のネットワークにわたって広がり、小滴 i 及び j が2重層によって結合されなければ、本発明者らは、 $g_{ij} = 0$ 及び $c_{ij} = 0$ を定義する。方程式(1)を方程式(2)へ置換することは、

$$I_i = \sum_{j \neq i} (g_{ij} (V_i - V_j) + c_{ij} (\dot{V}_i - \dot{V}_j))$$

を与え、この式は、

$$\begin{aligned} I_i &= V_i \sum_{j \neq i} g_{ij} - \sum_{j \neq i} g_{ij} V_j \\ &\quad + \dot{V}_i \sum_{j \neq i} c_{ij} - \sum_{j \neq i} c_{ij} \dot{V}_j \end{aligned} \quad (3)$$

30

として再整理され得る。この点において行列 G 及び C を以下のように定義することは使い勝手が良い：

$$\begin{aligned} G_{ij} &= \begin{cases} -g_{ij}, & i \neq j, \\ \sum_{k \neq i} g_{ik}, & i = j, \end{cases} \\ C_{ij} &= \begin{cases} -c_{ij}, & i \neq j, \\ \sum_{k \neq i} c_{ik}, & i = j. \end{cases} \end{aligned}$$

40

【 0 3 8 4 】

これらの行列とともに、方程式(3)は、

50

$$\vec{I} = G\vec{V} + C\dot{\vec{V}}, \quad (4)$$

のように簡潔に記述され得、

$$\vec{I}$$

及び

$$\vec{V}$$

10

は、各小滴に起因する電流及び各小滴の電位をそれぞれ示すN次元ベクトルである。

【 0 3 8 5 】

最終的には、小滴が電荷のソースまたはシンクとしての機能を果たすことはできないと考えられた。各小滴への電流は、それゆえゼロであるが、電極によって2つの小滴が挿通され、該電極が同じ電流Iをソースし、シンクしなければならないという例外を有する。

$$|I_i| = \begin{cases} I, & i \in \{a, b\}, \\ 0, & \text{otherwise.} \end{cases} \quad (5)$$

20

【 0 3 8 6 】

7.3初期状態

システムは定常状態において開始すると考えられた。このとき、

$$\dot{\vec{V}} = \vec{0}$$

であり、それで方程式(4)から本発明者らは：

30

$$G\vec{V} = \vec{I}. \quad (6)$$

を得る。

$$\vec{V}$$

に対して解くべく、2つの末端の小滴が電圧固定的 (voltage-clamped) であることが思い出される。それゆえ、小滴a及びbに相当する2つの方程式を消去し、方程式(5)を使用し

40

$$\tilde{G}\vec{V} = \vec{0}, \quad (7)$$

を得ることは可能である。式中、

$$\tilde{G}$$

は、小滴a及びbに相当する2つの列を伴わない行列Gを示す。

【 0 3 8 7 】

方程式(7)は、N個の変数におけるN-2方程式を示す。このシステムを解くために必要な2

50

つの付加的な方程式は、末端の小滴の既知の電圧を表し、 $V_a = u_a$ かつ $V_b = u_b$ である。本発明者らは、

$$\tilde{G}$$

を形成するために消去されたGにおける列を、列ベクトル

$$\vec{x}$$

及び

$$\vec{y}$$

10

で置き換えることによって定義された更なる行列

$$\tilde{G}'$$

を構成することにより、これらの方程式を含める。該列ベクトル

$$\vec{x}$$

20

及び

$$\vec{y}$$

は、それぞれ $x_i = \delta_{ia}$ かつ $y_i = \delta_{ib}$ によって定義され、式中、 δ_{ij} はクロネッカーのデルタである。

$$\tilde{G}'$$

30

は、それゆえ：

$$\tilde{G}'_{ij} = \begin{cases} \delta_{ai}\delta_{aj} + \delta_{bi}\delta_{bj}, & i \in \{a, b\} \\ -g_{ij}, & i \notin \{a, b\} \text{ and } i \neq j, \\ \sum_{k \neq i} g_{ik}, & i \notin \{a, b\} \text{ and } i = j. \end{cases}$$

40

【 0 3 8 8 】

のように定義される。

$$\tilde{G}'$$

を

$$\vec{V}$$

でかけることは、次に

$$\tilde{G}'\vec{V} = \vec{v}$$

を与える。

式中、 $v_i = u_{a-i a} + u_{b-i b}$ である。N個の変数におけるN個の方程式のこのシステムは、
計算的に容易に解かれ、各小滴の初期電圧を得る。初期電流は、その後、方程式(6)から
直接に取得される。

【 0 3 8 9 】

7.4時間変化

システムの時間変化は、初期状態と同様の方法において計算され得る。本発明者らは、
再び、方程式(4)とともに開始し、小滴a及びbに相当するG及びCの2つの列を除いて、

$$\tilde{G}$$

及び

$$\tilde{C}$$

を作り出し、式中

$$\tilde{C}$$

は、

$$\tilde{G}$$

に類似して定義される。方程式(4)は、その結果：

$$\tilde{G}\vec{V} + \tilde{C}\dot{\vec{V}} = \vec{0}$$

となる。

$$\tilde{G}$$

及び

$$\tilde{C}$$

から除去される2つの列は、

\vec{x}
及び

\vec{y}

で置き換えられて、

\tilde{G}'

及び

\tilde{C}'

を作り出し、式中：

$$\tilde{C}_{ij} = \begin{cases} \delta_{ai}\delta_{aj} + \delta_{bi}\delta_{bj}, & i \in \{a, b\} \\ -c_{ij}, & i \notin \{a, b\} \text{ and } i \neq j, \\ \sum_{k \neq i} c_{ik}, & i \notin \{a, b\} \text{ and } i = j. \end{cases} \quad (20)$$

【 0 3 9 0 】

電圧 $V_a = u_a$ 及び $V_b = u_b$ が一定であることを思い起こせば、以下が得られる：

$$\tilde{G}'\vec{V} + \tilde{C}'\dot{\vec{V}} = \vec{v}. \quad (8)$$

【 0 3 9 1 】

時間経過に伴う

\vec{V}

の変化は、通常異なる方程式の解法であるMATLABのode45を用いて以下の通り計算された：

1. 各時間ポイント t において、 $G(t)$ は、膜孔の挿入をシミュレートする最後の時間ポイントから生じたコンダクタンスの変化を反映するべく更新される。膜孔の挿入は、このステップにおける $C(t)$ も更新することによって容易にシミュレートされ得たが、2重層のサイズには変化がなく、新たな2重層は全く形成されていないと考えられた。

2.

$\vec{V}(t)$

及び更新された $G(t)$ 及び $C(t)$ は、

$\dot{\vec{V}}(t)$

を計算するために方程式(8)において使用される。

3.

$$\vec{V}(t)$$

及び

$$\dot{\vec{V}}(t)$$

10

は、次の時間ポイントの電圧、

$$\vec{V}(t + \delta t)$$

を計算するために使用される。間隔 δt は、ode45解法によって決定される。

$$\vec{V}(t)$$

が興味のある時間について計算された時点で、電流 $I(t)$ が方程式(4)から直接的に得られる。

20

【 0 3 9 2 】

8小滴の接触面2重層の水の透過性

領域Aの2重層によって結合され、標識された小滴1及び2のペアが考慮された。小滴の初期容積を V_1 及び V_2 として、時間 t における塩濃度は、 $C_1(t)$ 及び $C_2(t)$ である。小滴1から小滴2へ2重層を超えて単位時間あたりに流れる水の容積は、

$$-\frac{dV_1}{dt} = iPA\bar{V}\phi(C_2(t) - C_1(t)), \quad (9)$$

30

として表され得る(Dixit, S. S., et al, Langmuir 28, 7442-7451 (2012) 及び Cass, A. & Finkelstein, A. J. Gen. Physiol. 50, 1765{1784(1967))。式中、 P は、透過係数であり(単位時間あたりの長さの寸法を有する)、

$$\bar{V}$$

は、水のモル容積であり、 ϕ は、浸透係数であり、 i は、塩のファントホッフの係数である。方程式(9)は、実験的な測定結果から透過性 P を推定するための単純な方法を提案する：

40

$$P = [iA\bar{V}\phi(C_1(0) - C_2(0))]^{-1} \left. \frac{dV_1}{dt} \right|_{t=0}, \quad (10)$$

【 0 3 9 3 】

式中、 $C_1(0)$ 及び $C_2(0)$ は、それぞれ C_1 及び C_2 の初期値である。水の容積が保存されるため、

$$P = [iA\bar{V}\phi(C_2(0) - C_1(0))]^{-1} \frac{dV_2}{dt} \bigg|_{t=0}. \quad (11)$$

と同等に記述し得る。1 M KClを含む単純な小滴を作製して、250 mM KClを含む小滴とペアで2重層を形成し、3つのかかるペアを、顕微鏡を介して2時間より長い期間にわたって2分間隔で撮影した(図16)。小滴及び2重層の直径を、イメージJソフトウェアパッケージを用いて測定し、各小滴が球状のキャップの配置を有すると仮定することによってこれらの直径から小滴の容積を計算した。各ペアのための V_1 及び V_2 の変化の初期の速さを、最初の2つの容積の測定結果とは独立に計算した。その後、透過性を、方程式(10)または方程式(11)に従って、計算し、文献から

$$\bar{V} = 18.0 \text{ ml mol}^{-1}$$

、KClに対する $i = 2$ 、かつ $\phi = 0.90$ (Hamer, W. J. et al, J. Phys. Chem. Ref. Data 1, 1047-1100 (1972))と仮定した。

【0394】

9ネットワークの折り畳みモデル

9.1モデルの構築

自発的に折り重なるネットワークの定性的動作は、2つの結合した構成要素からなる単純なモデルによって再現され得る:ネットワークにおける小滴の動きをモデルする機械的部分、及び小滴間の水の移動をモデルする浸透性部分である。

【0395】

機械的構成要素

小滴は、関連した半径を有する点の質量として扱われる。半径 R_i 及び R_j の小滴のペアが、距離 $R_i + R_j$ 以内に互いに接近すれば、これらは、自然長 $L(R_i + R_j)$ のフック的なスプリング(Hookean spring)によって結合される。スプリングは、2つの小滴間に形成された2重層を示し、パラメータ $L < 1$ は、これらの接着によって引き起こされる小滴の変形を概算する。

【0396】

実験において折り重なりの特徴的な時間スケールが、分から時間の次数であれば、折り重なり中のレイノルズ数は、 10^{-5} の次数であると見積もられた。小滴は、それゆえ、ストークスの法則に従うと予想され得、けん引力は、その速さに比例する各小滴に課される。従って、各小滴 i における正味の力は、

$$\vec{F}_i = \sum_{j \in C_i} k(r_{ij} - L) \hat{r}_{ij} - \gamma \vec{v}_i, \quad (12)$$

によって与えられ、 C_i は、 i 番目の小滴に結合される小滴のセットとして定義され、

$$\vec{r}_{ij}$$

は、大きさ r_{ij} を有する小滴 i から小滴 j へのベクトルであり、 k は、ばね定数、 γ は、減衰係数、 v_i は、 i 番目の小滴の速度である。時間経過に伴う各小滴 i の位置、

$$\vec{r}_i(t)$$

は、その後、

$$\vec{F}_i = m \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2}, \quad (13)$$

を用いて計算され、 m は、小滴の質量である。後述の理由により、本発明者らは、質量、ばね定数及び減衰係数が全ての小滴に対して一定かつ同一であると仮定する。

【 0 3 9 7 】

浸透性構成要素

浸透性構成要素は、フィックの第一法則に従って、異なるオスモル濃度の小滴間の水の交換をシミュレートする。オスモル濃度 C_i を有する小滴 i からオスモル濃度 C_j を有する小滴 j へ単位時間あたりに移動する水の容量は、

10

$$J_{ij} = A_{ij} D (C_j - C_i), \quad (14)$$

として計算され、 A_{ij} は、2つの小滴間の2重層の領域であり、パラメータ D は、全ての2重層に対して一定及び同一であると仮定される透過係数を示す。

【 0 3 9 8 】

9.2パラメータ値

表2は、モデルにおいて使用されたパラメータの大きさのない値をリストする。水の移動及び機械的緩和（mechanical relaxation）の過程のために実験的に観察された時間スケールが、それぞれ、数十分及び数秒であったため、 D 、 m 及び k の値は、機械的緩和の時間スケールに比べて水の移動の時間スケールを遅くするように選択された。小滴が接着時に振動することは実験的に観察されないため、 γ の値が、比較的短い機械的緩和の時間を維持しつつ、ばねの振動を抑制するために選択された。 C_{low} 及び C_{high} は、ネットワークにおける小滴の低いオスモル濃度及び高いオスモル濃度を示す。割合 C_{high}/C_{low} は、実験的なオスモル濃度の割合を近似するように選択された。残りの変数は数値安定性を維持しつつ、計算時間を減少させるために選択された。機械的準平衡状態において折り重なりが起こるように、機械的緩和及び水の移動の時間スケールが、選択されたため、全ての小滴に対する m 及び γ の変数、及び全ての2重層に対する k の変数が同一及び一定であるという仮定を単純化することは、シミュレーションにおいて重要な影響を与えないと予想される。

20

30

【 0 3 9 9 】

【表 2】

パラメータ	記号	値
水の移動速度	D	2×10^{-3}
低オスモル濃度	C_{low}	1
高オスモル濃度	C_{high}	10
初期小滴体積	V_0	10
小滴質量	m	0.2
ばね定数	k	10^3
時間ステップ	Δt	10^{-2}
減衰 (Damping)	γ	1.1

40

【 0 4 0 0 】

9.3方程式を解くこと

コンピュータプログラムは、以下のようにシステムの動作をシミュレートするために記

50

述べた。プログラムは、プリントプログラムと同様に、シミュレートされるべきネットワークを規定する一連の画像を読み取る。小滴は、当初、六角形の密集配置における画像に従って配置され、該六角形の密集配置が、プリントされたネットワークにおける観察された小滴の充填を近似する。その次にシミュレートされたいかなる動作も初期配置からの小滴の機械的平衡に起因しないことを確実にするために、その後、水を交換することなく、小滴が機械的に平衡化してもよい。この平衡が完成した時点で、モデルの浸透性構成要素がアクティブにされる。各時間ポイント t において、プログラムは、以下の計算を実行する：

1. 距離 $R_i + R_j$ 以内に近づいた任意の2つの小滴 i 及び j を、自然長 $L(R_i + R_j)$ のばねによって結合する。
2. 浸透性構成要素がアクティブであれば、2重層によって結合された各ペアの小滴間において移動した水の容積を、方程式(14)に従って計算し、各小滴のサイズを、それに応じて更新した。
3. 時間 $t + \Delta t$ における各小滴の位置を、四次ルンゲクッタ法を用いて方程式(12)及び(13)に従って計算する。
4. 各小滴の位置を、ステップ3における計算結果に従って更新する。

【0401】

9.4可視化

ネットワークの時間変化を可視化するため、シミュレーション中の各時間ポイントにおいて、可視分子動態ソフトウェアパッケージ(Humphrey, W., et al., J. Molec. Graphics 14, 33-38 (1996))を用いて読み取られ得るようにフォーマットされたテキストファイルに対して、プログラムが、全ての小滴の位置を記述した。各小滴の位置及びサイズを示すことに加えて、可視化により、そのオスモル濃度に従って各小滴が色分けされた。カラースケールは、青から白、白から赤を補間し、青及び赤は、それぞれシミュレーションの開始時における最も低いオスモル濃度及び最も高いオスモル濃度に相当し、白は、2つの平均値に相当する。

【0402】

追加的考察

1小滴作製

電圧パルスの振幅及び持続時間以外の多数の要因が、小滴発生器による小滴作製に有意な影響を与えることが見出された。

【0403】

液面

小滴放出は、小滴発生器のチャンバにおける水性相の液面と、ウェルにおける油剤液面との間の高さの違い h に強く依存し(図1)、このことが、ノズルにおいて水-油境界面上に正味の力を生み出した。一般に、高さ h が大きくなるにつれて、より大きな小滴が生成される。放出された小滴のサイズが約6時間だけ一定のままであるように、チャンバからの水溶液の蒸発が、徐々に水性液面を変化させた。チャンバにおいて水性層の上面に油の薄層を加えることによって蒸発が抑制され得る。

【0404】

水性容積

小滴の放出は、油面(図1)の上方の高さとは無関係に、小滴発生器チャンバにおける水溶液 V の容積にも依存する。一般に、水性チャンバが完全に満杯である場合には、それが不完全に充填された場合に比べて、放出された小滴のサイズがより容易に制御された。これは、おそらく圧電変換器への電圧パルスの印加時に、チャンバへの充填が少ないことが、変換器からノズル中の液体への振動をより少なくすることにつながり、このことが放出される小滴のサイズを制限するからである。

【0405】

脂質濃度

既定サイズの小滴を放出するために必要な電圧パルスの振幅は、より高濃度の油中の脂

質濃度ではより低くなった。このことは、ノズル中の水-油接触面における脂質の吸着が、その接触面の張力を減少させ、それによって小滴形成のために必要な範囲で接触面を變形させるために必要なエネルギーを減少させるということであると予想される。

【0406】

ノズル配置

ノズル長 L が長すぎ、その内径 D が小さすぎ、またはその先端直径 d が大きすぎまたは小さすぎた場合には、小滴は、利用可能な電圧の範囲において確実に作製可能であるわけではない(図1)。図3に定められた寸法により、利用可能な電圧範囲内において信頼性のある小滴の作製が可能になった。ノズルをガラス毛细管から手作業で作製したため、そうでなければほぼ同一条件下において2つの発生器は、通常、異なるサイズの小滴を作製した。しかしながら、2つの発生器は、それぞれのために異なる電圧パルスを使用することによって、同一の小滴を放出すべく作製され得る。

10

【0407】

2プリントネットワーク

使用される油混合物の動的粘性は、水の約10倍大きかった。このことは、小滴ネットワークのプリントのために、空気中または水溶液中で動作する大部分の他の2次元及び3次元のプリント技術においては生じない、いくつかの課題をもたらした：

1. 圧電変換器の電圧パルスの印加後に、ノズルにおいて引き起こされた圧力パルスが、油相への水性相の約50-150 μm 長の短期間の突出を引き起こし、これが、数十ms以内に中断して単独の小滴を作り出す。ノズルが障害物から

20

$\leq 150 \mu\text{m}$

に配置された場合、障害物が水性の突出を變形させ、移動されるべき小滴の放出を引き起こす。障害物から

$\leq 100 \mu\text{m}$

にノズルを配置することにより、小滴形成が完全に不可能になる。従って、各小滴は、その最終的な位置の

30

$\geq 200 \mu\text{m}$

上方において放出された。しかしながら、小滴は、その後、ネットワークにおいて放出位置から意図された位置へ沈むために約1~5秒を必要とした。

2. 小滴は、ネットワークとの接触直後には接着せず、2重層を形成しない。これはおそらく落ちる小滴の重さで2つの小滴間の油層が薄くなるために必要な有限時間に起因する。小滴は、通常、ネットワークとの最初の接触後約1~3秒でネットワークと2重層を形成する。

3. ネットワークにまだ組み込まれていない小滴は、油中を通るノズルの移動によって引き起こされる粘性のずれ(viscous shear)によって移動された。

40

4. ネットワークにまだ組み込まれていない小滴は、それに続く近くの放出によって移動された。

【0408】

約1 s^{-1} の速さにおいて正確な位置に小滴をプリントするために、本発明者らは、一連の最適化における問題に対処した。

【0409】

ノズル配置

ノズルの運動によって引き起こされる小滴の移動を、比較的小さい外径約100 μm のノズルを用いて最小化した。ノズルを追加的方法において記述された通りの先細のガラス毛细

50

管から形成した。同じ内径を有するが、1.5 mmの外形を有するように成形された毛細管を用いた場合、ノズルの運動は、有意に長い距離だけ小滴を移動させた。

【0410】

列の遅延

各小滴を放出した後の代わりに、各列の小滴をプリントした後に遅延を用いることは、プリント品質の重大な損失を伴うことなく、プリント時間の有意な減少を可能にした。各列における小滴が、その後、ノズルの運動及びそれに続くその列における放出によって移動されたにもかかわらず、小滴がその列内において正確な相対位置に配置されるように、全ての小滴が略同一の移動をさせられた。ノズルの配置 (orientation) に応じて、交互の列のためのプリント通路の方向を互い違いにすることにより、交互の列の不均衡をもたらした。しかしながら、不均衡は、交互の列のための補正(offset)をプログラムすることにより、容易に修正された。

10

【0411】

(追加的方法)。

沈降速度

小滴の移動を抑制するために必要な列の遅延を減少させるため、本発明者らは、2つの方法において油中を通して小滴が沈降する速度を増加させた。第1に、本発明者らは、水性相において1 M KClの塩濃度を使用し、この塩濃度が、油剤と比べて小滴の密度を増加させた。第2に、大きな小滴は、その重さに比例的により小さな粘性抵抗を受けるため、直径において

20

$\geq 30 \mu\text{m}$

の小滴を使用した。

【0412】

脂質濃度

油中における既定の脂質濃度のため、小滴が小さくなるほど、脂質単分子層を得るために必要な時間はより短くなる(Kankare, J. et al., Langmuir 15, 5591-5599 (1999))。これは、小滴表面上への脂質の吸着が小滴の周囲に脂質を失った領域を作り出し、小滴がより小さければ、この失われた容積が脂質槽 (lipid bath) からの移動による補充をより利用しやすいからである。小滴直径は、それゆえ、高い沈降速度(大きな小滴で起こる)と短いインキュベーション時間(より小さな小滴を必要とする)の間の折衷案である。実験では、約30-60 μm の範囲の小滴直径がまずまずの折衷案であることが見出された。

30

【0413】

3大量の水溶液におけるプリント

プリント方法

大量の油中においてプリントされたネットワークと対照的に、特注されたグラフィカルユーザインターフェース(追加的方法)を用いてプリントする間に、小滴発生器及びマニピュレータを制御することにより、大量の水溶液中のネットワークをプリントした。大量の水溶液においてプリントするため使用される受容油滴 (recipient oil drop) が、湾曲した下面を有したため、油滴内に放出された小滴が、その重力エネルギーを最小化するために表面を転がり落ちた。それゆえに、大量の水溶液中において規定されたネットワークの正確なプリントは、油滴表面の配置の知識を必要とする。更に、小滴ネットワークデザイン及びプリント通路は、この配置に適合する必要がある。例えば、これらの実施例において使用された配置を有する油滴のために、水性小滴は、ほぼ最小点 (minimum point) を中心として外側に大きくなるらせんパターンにおいて各層をプリントすることにより、意図された位置から転がっていくことを抑制され得る。

40

【0414】

ワイヤースケーム及びネットワークの配置

油滴の配置は、大量の水溶液中の液滴をつるすために使用されるワイヤースケームによ

50

って部分的に決定される。しかしながら、油滴の配置は、水性の小滴が油滴内に放出されるにつれて変化し、一方、油の容積は一定のままである。油滴中にプリントされたネットワークは、それゆえ、油滴の初期配置とは異なる配置を有し、油滴の容積よりも大きな容積を有し得る。

【0415】

更に、図11dにおける第3の顕微鏡写真から明らかである通り、油滴とは異なり、プリントされたネットワークの配置は、最小境界表面領域 (minimal bounding surface area) を有する必要がない。このことが起こり得るのは、第1に、最小境界領域を有する配置へのネットワークの再配置は、エネルギー的に好ましくなく、それゆえ動力学的な障壁 (kinetic barrier) を提示する単分子層への2重層の分離を伴うであろうからである (Villar, G., et al., Nature Nanotech. 6, 803-808 (2011))。第2に、2つの封入された小滴間の2重層の界面張力は、封入された小滴と、大量の水溶液との間の2重層の界面張力と同一または略同一であるからであり ((Villar, G., et al., Nature Nanotech. 6, 803-808 (2011))、それで、ネットワークの外側領域を最小化することによって得られるであろう熱力学的安定性は、おそらく無視できる。大量の水溶液中にプリントされたネットワークの配置は、それゆえフレームによって十分に決定されるわけではない。単純な円形の輪以外の多様な形状におけるフレームを用いてネットワークをプリントすることも可能であるはずであり、このことは、水溶液中にプリントされたネットワークのあり得る配置を更に広げる。

【0416】

油の容積における上限

既定の輪に安定的に静止され得る油の容積は、輪の直径によって決まった。輪によって境界を示された球の容積の

$\geq 50\%$

の油の容積を輪にのせた場合、油滴は、数分の間に散らばるまで変形して、水性相において上向きに浮かぶ液滴を形成し、残りの油は、輪に付着したままだった。油滴の配置における遅い変化は、おそらくその表面における脂質吸着によって引き起こされる表面張力の漸進的減少に起因する。

【0417】

最大限につるされる油の容積も、ノズルの配置によって決まった。2つのノズルが互いに略平行に油滴に挿入されて

$\leq 200 \mu\text{m}$

だけ離された場合、大部分の油は、ノズル間の空間において自発的に上昇した。より大きなフレームは、それゆえ、油滴が不安定に分解すること及び毛細管現象によるノズル間における上昇を抑制するため、細かいメッシュとしてデザインされるのが最もよいかもしれない。

【0418】

4電気的記録

図12cのもののように、測定された電流ステップが、(i) ネットワークにおける小滴間、または(ii) ネットワークと電極端子によって挿通された大きな液滴との間における2重層への HLの挿入に相当したか否かを電気的記録から直接的に決定することは可能ではない。しかしながら、後者は、以下の通り、2つの理由のためにより起こりやすい。

【0419】

HL挿入の割合

小滴接触面2重層への HL挿入の割合は、経時的に減少した。電気的記録実験において使用される濃度の HLを含む小滴では、数時間後に小滴が無視できるほどの割合に形成さ

れた数分後に、膜孔挿入の割合が約 0.5 s^{-1} から減少した。膜孔挿入の割合は、2つの寄与 (contribution) に帰属しそうである。第1に、小滴が、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)で可溶化された HL7量体の濃縮貯蔵液を希釈することによって作製された。希釈液は、タンパク質からのSDSの分離を促進しやすく、このことは、7量体を不安定化するだろう。更に、HLの貯蔵液及び希釈液は-80 及び0 でそれぞれ冷凍されたのに対し、実験システムは室温であり、このことも、7量体の分解の割合を増加させただろう。

【0420】

導電性経路上の小滴は、新たに希釈されて電氣的記録の前に約2時間、プリント中に室温であった溶液から形成された。一方、電極上に静止された液滴を、電氣的記録の約15分だけ前に形成した。電氣的記録中に2重層に挿入されたいかなる膜孔も、それゆえ、経路 10
における小滴よりも大きな液滴にあった可能性が高い。

【0421】

電氣的モデルと測定電流の一致

ネットワークにおける HL膜孔のありそうな配置を、実験的に測定された電流を小滴ネットワークの電氣的挙動のシミュレーションと比較することによって推定した(図14)(追加的方法)。計算時間を減少させるため、図12におけるネットワークの一部のみをシミュレートした。シミュレーション結果は、ネットワークの残りの含めることで有意には変更しないと予想される。図12c中などの測定電流は、3つの条件が満たされた場合にのみ、シミュレーションと一致した:

1. 単独の膜孔の抵抗に比べて、経路が無視できるほどの抵抗であるように、導電性経路 20
における大部分の2重層が少なくともいくつかの HL膜孔を含んだ。比較的高濃度の HLが使用され、膜孔を経路における2重層に挿入することが比較的長時間可能であるとすれば、これは理にかなっている。
2. 経路間の大部分の2重層、及び電極を挿通された液滴の1つ(図14aにおける液滴a)が少なくとも1つの HL膜孔を含んだが、膜孔は、他方の電極を挿通された液滴への経路に加わったどの2重層にも提示されなかった(図14aにおける液滴b)。大きな液滴の一つが他方の約数十秒前にネットワークに配置されたとすれば、これはもっともらしい。
3. 経路に接続すべき第2の電極を挿通された液滴によって形成された2重層(図14aにおける液滴b)は、当初 HL膜孔を含まず、第1の電流ステップは、この液滴及び経路間の任意の 30
2重層における膜孔の挿入に対応した。各後続のステップは、これらの2重層における追加的な膜孔の挿入に起因した。この状態は妥当である、というのは、第2の電極を挿通された液滴が経路に加えられた直後に、実験的な電氣的記録が開始したからである。

【0422】

これらの条件下では、シミュレートされた電流ステップは、ステップ振幅及び緩和の時間スケールの両方における測定電流に厳密に一致した(図14b)。

同様に、上記状態に加えて、1の電極を挿通された液滴及びネットワークの残りの間に電流が流れることを可能にしない小滴の薄層が加えられた場合には、経路上及び経路外の液滴において測定された過渡電流のピーク(図12d)が、シミュレーションと一致した。これらの絶縁性小滴は、HLを含まなかった図12dにおけるネットワーク中の小滴を表す。この絶縁性の層に隣接するように選択された大きな液滴は、図14cにおける液滴bであり、 40
該液滴は、図12dにおいてネットワークから除去され、経路から置換された液滴を表す。これらの条件下では、シミュレーションにおけるピーク電流の振幅及び緩和の時間依存性の両方(図14d)は、実験的に測定された過渡電流と一致した(図12e)。

【0423】

5自己折り畳みネットワーク

この節は、小滴ネットワークの折り畳みの成功を可能にすることが見出された条件を詳述する。

【0424】

プリント基質

大量の油における静的ネットワークは、ガラス上にプリントされ、このガラスは、プリ 50

ント中のネットワークの望ましくない移動を抑制するべく、水性小滴に接着性である。逆に、自由に変形する小滴ネットワークのためには、小滴に接着性でないポリ(メチルメタクリレート)の表面上にプリントされる必要があることが見出された。この表面にネットワークをプリントする場合、大きくなりつつあるネットワークがプリント中に表面に沿って横滑りすることを抑制するために、必ずプリント表面が略水平である必要がある。小滴の放出がネットワークを移動させることを抑制するために、ノズルもプリント基質から約150 μm 高く配置した。

【0425】

プリント及び折り畳みの時間スケール

プリントが完成する前にネットワークが有意に折り重なれば、もっと後の小滴は、誤った位置においてネットワークに組み込まれ得る。プリント時間を減少させ、かつ折り畳みの時間スケールを増大させることにより、プリント中にネットワークが折り重なる程度が最小化され得る。より前の節において記述されるように、各小滴の後ではなく各列の後に遅延を含め、かつより大きな小滴を用いることにより、プリント時間が短縮され得る。

【0426】

折り畳みの時間スケールは、2つの方法において増加し得る：

1. 2つの小滴間の水の移動の速さは、塩濃度の違いに比例する；塩濃度の比率は、移動された水の全体の容積を部分的に決定し、ひいては、折り畳まれたネットワークの平衡配置を決定する。本発明者らは、それゆえ、初期の塩濃度の高い比率を維持しつつ、2つの小滴タイプ間の塩濃度における初期の違いを減少させることにより、折り畳み過程を遅くした。

2. 折り畳みの時間スケールを、より大きな小滴でプリントすることにより、更に増加させた。2重層によって結合された小滴のペアを両方の初期容積 V とともに考慮し、ただしそれぞれ異なる初期オスモル濃度は考慮しない。水の移動の初期の速さは、2重層領域 A に比例する。 $A \propto V^{2/3}$ であるため、より大きな小滴間においてより早く水が輸送される。しかしながら、小滴容積の比率としての水の移動の速さは、 $A/V \propto V^{-1/3}$ である。従って、これらの初期容積に比例して、より大きな小滴が、容積においてよりゆっくり変化し、延長線上で考えると、より大きな小滴からなるネットワークは、よりゆっくり折り重なるだろう。

【0427】

曲がること (Buckling)

自発的に折り重なるネットワークにおいてより高いオスモル濃度の小滴が膨張し、より低いオスモル濃度の小滴が縮小するにつれて、長さのミスマッチ (length mismatch) が、異なるオスモル濃度を有するネットワークの接続領域間において発達し得る。1の次元において薄いネットワークは、この次元に曲がることによって重大なエネルギー的な損失を伴うことなく、このミスマッチを解消し得る。追加的な鉛直層とともにプリントされた場合、水平面において折り重なるように設計されたネットワークが、この平面から屈曲しにくいことが分かった。このことは、おそらく厚いネットワークを平面から曲げることは、より多くの単分子層領域または全表面領域の好ましくない露出を伴うであろうからである。

【0428】

裂け目 (Fracture)

軸に沿って厚いネットワークでは、該軸の周りに折り重なりが起こり(例えば、図15cにおけるページに対し垂直な軸)、上述した接続領域間の長さのミスマッチが、隣接する縮小しつつある小滴を互いに引き離す緊張を生み出し得る(図17)。自発的に折り重なるネットワークのゆがみにより、ある点のネットワークの裂け目がこの点の周囲の更なる変形を不可能にし得るように、ネットワークの膨張及び縮小しつつある部分が、互いに接続し、それらの内部においても接続することが必要になる。ネットワークの縮小しつつある領域が、膨張及び縮小しつつある領域間の接触面に垂直な軸に沿ってより厚くされた場合(例えば、図15dにおける縦軸、及び図17a,bにおけるページ上の横軸)、このタイプの裂け目

10

20

30

40

50

が生じないことが分かった。この追加的な厚みがおそらく、縮小しつつある互いに接続された小滴のペアにおける力がもはや小滴を離すために十分でなくなるように、より多数の2重層間の折り重なりにより誘導された緊張を分配する。

【0429】

結論

本発明者らは、小滴集合を作成するために本発明の装置を使用し得ることを示した。上述された結果及び方法が、必要な小滴集合を作製するためにどのように装置が適用し得るかを示す。更に、本発明の方法が正確かつ制御されて小滴集合を作製することを結果が示す。ミリメートルサイズのネットワークがプリントされ得ることを結果が実証する。より大きなネットワークも作製され得る。更に、集合を機能的にし得る。本発明者らは、予測可能な方法において自己折り畳みを行うようにネットワークをプリントし得ることも実証した。

10

【0430】

アクアポリンまたはイオンチャネル等の膜タンパク質の使用は、小滴ネットワーク内の水の流れをよりうまく制御することを可能にするために、小滴集合において用いられ得る。更に、浸透圧性の形状変化は、例えば、加熱または照明に反応するオスモライトを用いることによって可逆にされ得る。かかる小滴ネットワークは、筋肉組織の水圧模倣体 (hydraulic mimic) として開発され得、及び移動することができ的小滴ネットワークの構築を可能にし得る。

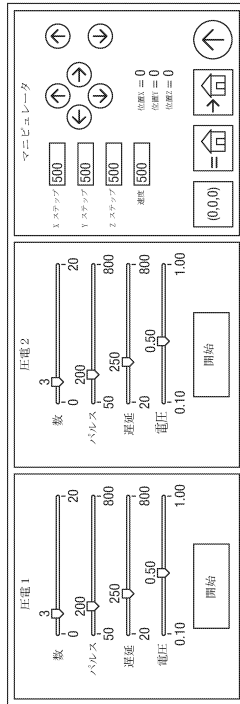
【0431】

20

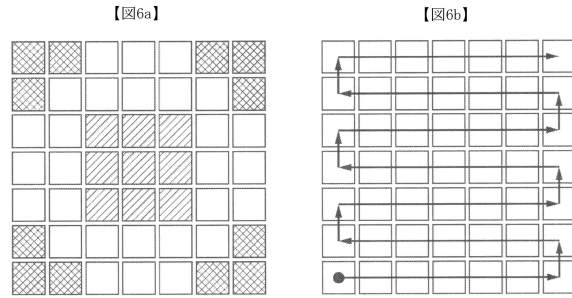
生きている組織における隣接する細胞は2つの膜によって分離されるため、協力するためにギャップ結合等の特殊化した膜タンパク質を介して通信する必要がある (Nakagawa, S., et al., Curr. Opin. Struc. Biol. 20, 423-430 (2010))、それで独立に機能する細胞の集合体 (collection) と組織を区別する創発特性 (emergent property) を作り出す必要がある。本願発明のシステムでは、単層 (単独の脂質2重層等) が隣接する水性区画を分離し、該システムが、より単純な環境において創発する集合体特性を可能にする。本明細書中に提示された自動化されたプリント過程は、他の膜タンパク質及びオスモライトを使用するネットワークの構築が、精緻な動作を再現することを可能にするだろう。かかる小滴ネットワークは、例えば、薬物送達のためのプラットフォームとして、または疾患を有する組織または器官を補強または交換するために、生きた組織内において自律的に機能し、または組織と相互作用し得る。

30

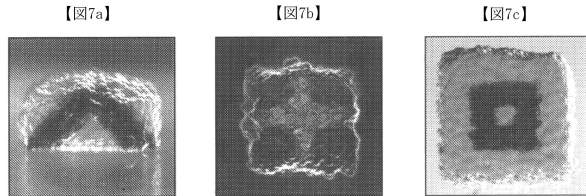
【図 5】



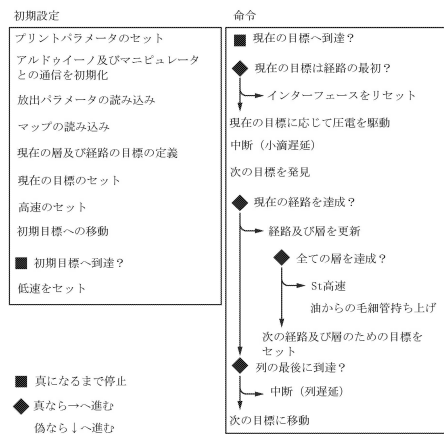
【図 6】



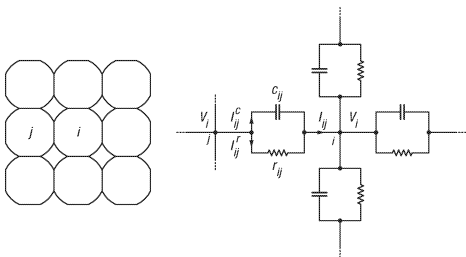
【図 7】



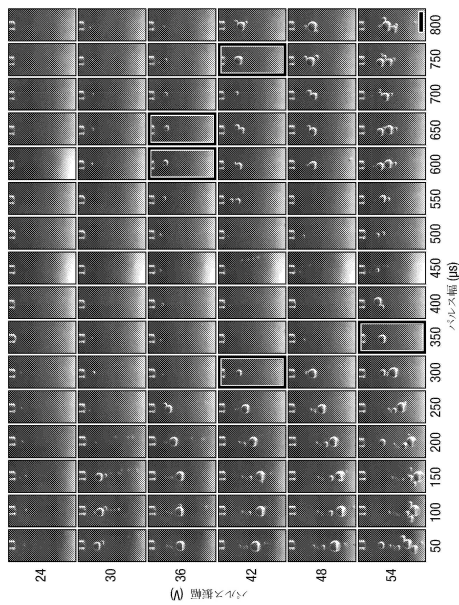
【図 8】



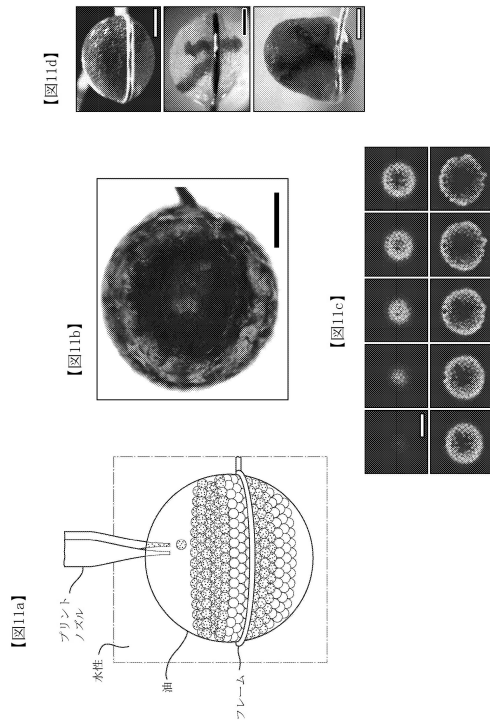
【図 9】



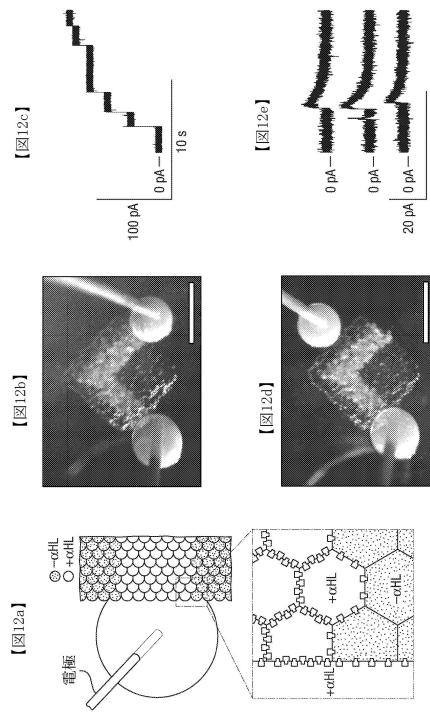
【図 10】



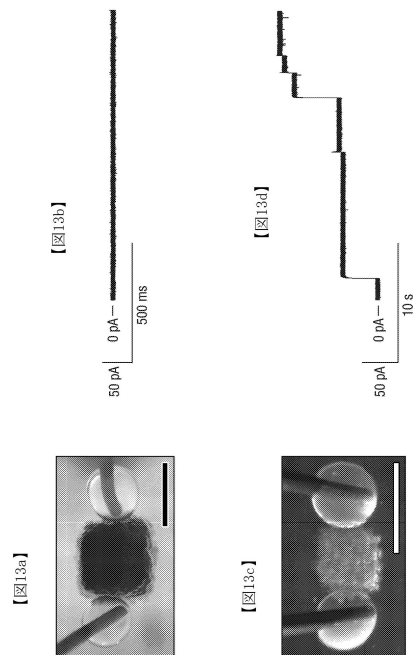
【図 1 1】



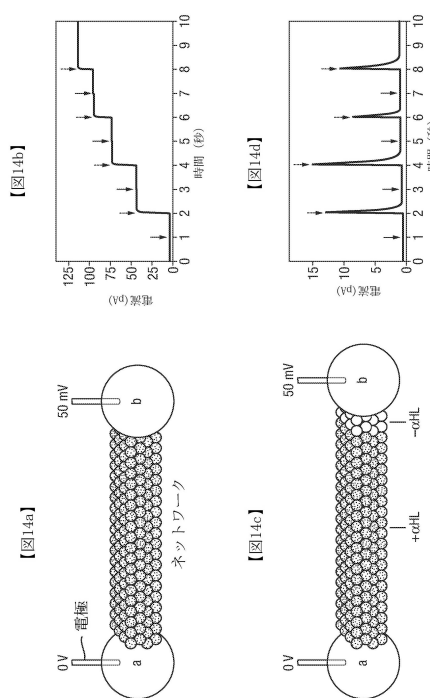
【図 1 2】



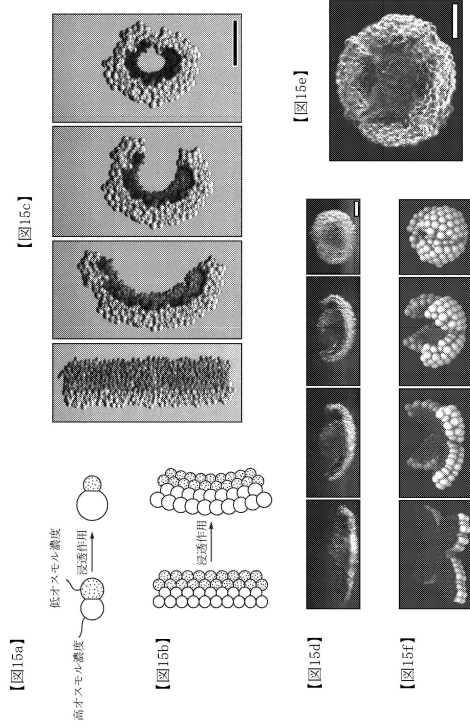
【図 1 3】



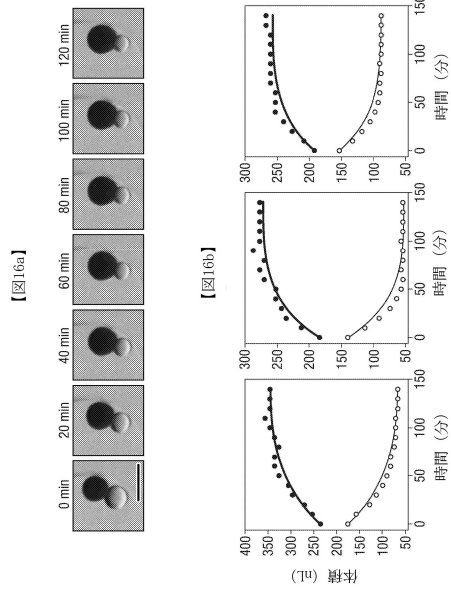
【図 1 4】



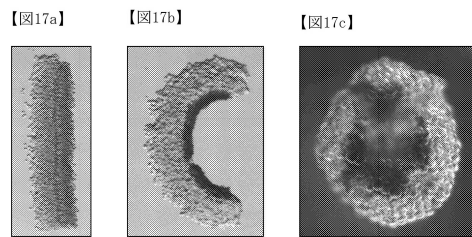
【図15】



【図16】



【図17】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
B 3 3 Y	80/00	(2015.01)	B 3 3 Y 80/00
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M 1/00 A
C 0 7 K	2/00	(2006.01)	C 0 7 K 2/00

(74)代理人 100117743
弁理士 村田 美由紀

(74)代理人 100163658
弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文

(72)発明者 ベイリー、ジョン ヘーガン ブライス
イギリス国、オーエックス1 3ティーエー オックスフォード オックスフォードシャー、マン
スフィールド ロード 12、ケミストリー リサーチ ラボラトリー、ユニヴァーシティー オ
ブ オックスフォード

(72)発明者 ヴィラー、ガブリエル
イギリス国、オーエックス1 3キューユー オックスフォード オックスフォードシャー、サウ
ス パークス ロード、レックス リチャーズ ビルディング、ドクトラル トレーニング セン
ター(エムピーエルエス)、ユニヴァーシティー オブ オックスフォード

(72)発明者 グラハム、アレクサンダー ディー
イギリス国、オーエックス1 3ティーエー オックスフォード オックスフォードシャー、マン
スフィールド ロード 12、ケミストリー リサーチ ラボラトリー、ユニヴァーシティー オ
ブ オックスフォード

審査官 中村 泰三

(56)参考文献 特表2010-536551(JP,A)
国際公開第2012/054195(WO,A1)
特表2010-503517(JP,A)
米国特許出願公開第2009/0074988(US,A1)
米国特許出願公開第2012/0116568(US,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

B 2 9 C 6 7 / 0 0
A 6 1 K 9 / 1 2 7
B 0 1 J 1 3 / 0 2
B 3 3 Y 1 0 / 0 0
B 3 3 Y 3 0 / 0 0
B 3 3 Y 8 0 / 0 0
C 1 2 M 1 / 0 0