

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4489949号
(P4489949)

(45) 発行日 平成22年6月23日 (2010. 6. 23)

(24) 登録日 平成22年4月9日 (2010. 4. 9)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 M
C 1 2 M 1/34 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 E
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 M 1/34
GO 1 N 37/00 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A
請求項の数 46 (全 42 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2000-560457 (P2000-560457)	(73) 特許権者	501014810
(86) (22) 出願日	平成11年7月14日 (1999. 7. 14)		ザヨミックス, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2002-520621 (P2002-520621A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 945
(43) 公表日	平成14年7月9日 (2002. 7. 9)		45, ハイワード, トラスト ウェイ
(86) 国際出願番号	PCT/US1999/015969		3912
(87) 国際公開番号	W02000/004390	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成12年1月27日 (2000. 1. 27)		弁理士 青木 篤
審査請求日	平成18年7月13日 (2006. 7. 13)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	09/115, 397		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成10年7月14日 (1998. 7. 14)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100108903
			弁理士 中村 和広
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 生体分子をスクリーニングするための微小デバイス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

基板表面中または基板表面上に形成された囲まれた微小チャンネルを含むサンプル検出デバイスであって、該微小チャンネルは入口ポートおよび出口ポートを有し、該入口ポートおよび該出口ポートは該微小チャンネルの端部を含み、該微小チャンネルは反応部位を含み、該部位は、以下：

(a) 該微小チャンネル中の該基板の表面の少なくとも一部上に化学吸着または物理吸着した有機薄膜；および

(b) 該有機薄膜上に固定化した生物学的部分、ここで、該生物学的部分は、該サンプルの成分と相互作用することができる、
を備える、前記デバイス。

【請求項 2】

前記微小チャンネルが前記基板表面上にある、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 3】

前記微小チャンネルが、基板材料と化学的に異なる壁を含む、請求項 2 に記載のデバイス。

【請求項 4】

前記微小チャンネルが、半透明又は透明のカバーを含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 5】

前記カバーが検出装置の一部を形成する、請求項 4 に記載のデバイス。

【請求項 6】

前記微小チャンネルが、5 ナノリットル～300 ナノリットルの容量を有する、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 7】

前記微小チャンネルが、10 ナノリットル～50 ナノリットルの容量を有する、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 8】

前記微小チャンネルが、10 μm ～500 μm の深さを有する、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 9】

前記微小チャンネルが、50 μm ～200 μm の深さを有する、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 10】

前記微小チャンネルが、10 μm ～500 μm の幅を有する、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 11】

前記微小チャンネルが、50 μm ～200 μm の幅を有する、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 12】

複数の囲まれた微小チャンネルを含み、前記反応部位の各々が、前記有機薄膜を有さない前記基板の領域によって、互いに分離している、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 13】

複数の並行な囲まれた微小チャンネルを含み、前記反応部位の各々が、前記有機薄膜を有さない前記基板の領域によって、互いに分離している、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 14】

少なくとも 2 個の並行微小チャンネル反応部位を含む、請求項 13 に記載のデバイス。

【請求項 15】

少なくとも 10 個の並行微小チャンネル反応部位を含む、請求項 13 に記載のデバイス。

【請求項 16】

少なくとも 100 個の並行微小チャンネル反応部位を含む、請求項 13 に記載のデバイス。

【請求項 17】

100～500 個の並行微小チャンネルを含む、請求項 13 に記載のデバイス。

【請求項 18】

前記微小チャンネルが、10 μm ～5 mmの距離に分離する、請求項 14～17 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

【請求項 19】

1 cm^2 あたり 2～500 個の並行微小チャンネルを含む、請求項 14～17 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

【請求項 20】

前記生物学的部分がタンパク質である、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 21】

前記生物学的部分が抗体である、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 22】

少なくとも 10 個の異なる固定された生物学的部分を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 23】

少なくとも 100 個の異なる固定された生物学的部分を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

10

20

30

40

50

【請求項 24】

請求項 1 ～ 23 のいずれか 1 項に記載のデバイスを用いて、固定生物学的部分を、液体サンプル内に含まれる成分と相互作用するその能力についてスクリーニングする方法。

【請求項 25】

前記微小チャンネルが、前記基板表面中にある、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 26】

少なくとも 10 個の異なるタンパク質を含む、請求項 22 に記載のデバイス。

【請求項 27】

少なくとも 100 個の異なるタンパク質を含む、請求項 23 に記載のデバイス。

【請求項 28】

前記タンパク質が、同一タンパク質ファミリーの少なくとも 10 個の異なるメンバーを含む、請求項 26 に記載のデバイス。

【請求項 29】

前記タンパク質が、同一タンパク質ファミリーの少なくとも 100 個の異なるメンバーを含む、請求項 26 に記載のデバイス。

【請求項 30】

前記タンパク質ファミリーが、レセプターファミリー、リガンドファミリー、酵素ファミリー、又は転写因子ファミリーである、請求項 28 または 29 に記載デバイス。

【請求項 31】

前記タンパク質が、増殖因子レセプター、カテコールアミンレセプター、アミノ酸誘導体レセプター、サイトカインレセプター、レクチン、ホルモンレセプター、神経伝達物質レセプター、または細胞外マトリクスレセプターである、請求項 30 に記載のデバイス。

【請求項 32】

前記タンパク質が、サイトカインまたはセルピンである、請求項 30 に記載のデバイス。

【請求項 33】

前記タンパク質が、ステロイドホルモンレセプター、熱ショック転写因子、亜鉛フィンガータンパク質、ロイシンジッパータンパク質、ホメオドメインタンパク質、DNA 結合タンパク質、DNA 合成因子、DNA 修復因子、または DNA 組換え因子である、請求項 30 に記載のデバイス。

【請求項 34】

前記タンパク質が、プロテアーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、GTPase、またはヒドロラーゼである、請求項 30 に記載のデバイス。

【請求項 35】

前記タンパク質が、キナーゼである、請求項 34 に記載のデバイス。

【請求項 36】

前記タンパク質が、同一タンパク質の改変体である、請求項 26 または 27 に記載のデバイス。

【請求項 37】

前記タンパク質が、組換え融合タンパク質である、請求項 26 または 27 に記載のデバイス。

【請求項 38】

前記組換え融合タンパク質が、パラレルプロセッシングを用いて製造される、請求項 37 に記載のデバイス。

【請求項 39】

前記組換え融合タンパク質が、酵母細胞、バキュロウイルス系、または哺乳動物細胞を用いて製造される、請求項 37 に記載のデバイス。

【請求項 40】

前記タンパク質が、少なくとも 10 個のアポトーシス関連因子を含む、請求項 26 または 27 に記載のデバイス。

10

20

30

40

50

【請求項 4 1】

前記タンパク質が、親和性タグによって前記有機薄膜に固定される、請求項 2 6 または 2 7 に記載のデバイス。

【請求項 4 2】

前記親和性タグが、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、アビジン、またはストレプトアビジンである、請求項 4 1 に記載のデバイス。

【請求項 4 3】

前記タンパク質がインビトロで合成される、請求項 2 6 または 2 7 に記載のデバイス。

【請求項 4 4】

前記有機薄膜が、ヒドロゲルを含む、請求項 1 に記載のデバイス。

10

【請求項 4 5】

前記ヒドロゲルが、デキストランを含む、請求項 4 4 に記載のデバイス。

【請求項 4 6】

前記反応部位が、前記生物学的部分と前記成分との相互作用を直接的または間接的に検出することができる検出器を更に含む、請求項 1～2 3 および 2 5～4 5 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

【発明の詳細な説明】

(発明の背景)

(a) 発明の分野)

本発明は、一般に、複数の生体分子-被分析物相互作用の並行化インビトロスクリーニングのための微小デバイスおよびそのデバイスを使用する方法に関する。より具体的には、本発明は、薬物の開発、機能的プロテオミクスおよび臨床診断のためのデバイスの使用に関する。

20

【0001】

(b) 関連する技術の記載)

非常に多数の新規の薬物標的が、現在、ゲノミクス、バイオインフォマティクス、遺伝学、および高スループット生化学の組み合わせを使用して同定されている。ゲノミクスは、遺伝的組成および生物の遺伝子の活性についての情報を提供する。バイオインフォマティクスは、コンピュータアルゴリズムを使用して、DNA およびタンパク質の構造パターンを認識および予測し、関連する遺伝子およびタンパク質のファミリーを規定する。これらのアプローチの組み合わせから得られる情報は、薬物標的（通常、タンパク質）の数を、大量に増加させることが予測される。

30

【0002】

可能性のある薬物としてスクリーニングするために利用可能な化合物の数は、コンビナトリアルケミストリー（迅速な並行化かつ自動化した合成を介する大多数の有機化合物の産生）の最近の進歩に起因して、劇的に増加している。生成されるコンビナトリアルライブラリーにおいて産生される化合物は、伝統的な手動の手段によって調製される化合物、天然の産物の抽出物、または大規模な製薬企業の歴史的な化合物のファイル中の化合物よりも、数で非常に勝っている。

【0003】

40

新規の薬物標的の迅速な増加、および化合物の多量なライブラリーが利用可能であることの両方は、スクリーニングプロセスを改善する新規の技術に対する莫大な要求をもたらす。この必要性への取り組みを試みる現在の技術的アプローチとしては、マルチウェルプレートベースとするスクリーニング系、細胞をベースとするスクリーニング系、微小流体（microfluidics）をベースとするスクリーニング系、および固相合成された薬物成分に対する可溶性標的のスクリーニングが挙げられる。

【0004】

自動化マルチウェルフォーマットは、開発された最良の高スループットスクリーニング系である。自動化 96 ウェルプレートベースとするスクリーニング系は、最も広範に使用される。プレートベースとするスクリーニング系の現在のトレンドは、さらに反応ウェ

50

ルの容量を減少し、それによってプレートあたりのウェルの密度を増加することである（プレートあたり96ウェル～384ウェルおよび1536ウェル）。反応容量の減少は、スループットの増加を生じ、生物試薬の費用を劇的に減少し、そして自動制御によって操作される必要のあるプレートの数を減少する。

【0005】

しかし、プレートあたりのウェルの数の増加が、高スループット効率に望ましいが、ウェル形式での1マイクロリットル未満の容量の使用は、エバポレーション、調製時間、タンパク質の不活性化、およびアッセイの適合についての顕著な問題を生じる。タンパク質は、反応チャンバー表面の物理的特性および化学的特性に対して非常に敏感である。タンパク質は、液体／固体および液体／気体界面において、変性し易い。1マイクロリットル未満の容量への、アッセイの小型化は、容量に対する表面の比を実質的に増加する。（1マイクロリットルから10ナノリットルへの容量の変化は、表面比率を460%にまで増加し、増加したタンパク質不活化をもたらす。）さらに、マイクロリットル容量未満の溶液は、空気と接触すると、迅速に、数秒から数分内にエバポレートする。従って、開放系において微小容量を維持することは、非常に困難である。

10

【0006】

他のタイプの高スループットアッセイ（例えば、小型化された、細胞をベースとするアッセイ）もまた、開発されている。小型化された、細胞をベースとするアッセイは、そのインビボの性質に起因して、優れた質と正確なスクリーニングデータを生じる可能性を有する。しかし、薬物化合物と、所望の標的以外のタンパク質との相互作用は、擬陽性の結果を高い確率でもたらす、このアプローチに関連する重大な問題である。

20

【0007】

液体中でのインビトロ反応を測定する、微小流体をベースとするスクリーニング系は、10～数百マイクロリットルの幅のチャンネルを利用する。微小ポンプ、電気浸透流、一体型バルブおよび混合デバイスは、チャンネルネットワークを通る液体の移動を制御する。微小流体ネットワークは、大きな表面－容量比率に起因して、エバポレートを防ぐが、顕著なタンパク質変性をもたらす。生体分子スクリーニングにおける微小流体ネットワークの首尾よい使用は、まだ示されていない。

【0008】

固相合成された薬物成分に対する可溶性標的の薬物スクリーニングは、その本来の性質として、限定されている。固体状態の有機合成に必要な表面は、化学的に多様であり、そしてしばしばタンパク質の不活性化または非特異的結合を生じ、高い割合の擬陽性結果をもたらす。さらに、薬物化合物の化学的多様性は、界面で化合物を生成するために使用されるコンビナトリアル合成アプローチによって制限される。このアプローチの別の主な不利な点は、固定化薬物候補物に対する、可溶性標的タンパク質の結合部位の限定された接近可能性より生じる。

30

【0009】

微小化DNAチップ技術が開発され（例えば、米国特許第5,412,087号、同第5,445,934号、および同第5,744,305号を参照のこと）、そして現在、核酸ハイブリダイゼーションアッセイのために利用されている。しかし、DNAバイオチップ技術は、タンパク質アッセイに移転可能ではない。なぜなら、DNAバイオチップについて使用される化学および材料は、タンパク質を用いる使用には、容易に移転可能ではないからである。核酸は、活性を失うことなく、100℃までの温度に耐え、乾燥され得、そして再水和され得、そしてその活性を維持しながら、ガラスのような物質によって支持される有機付着層に、直接結合し得る。対照的に、タンパク質は、水和されたままで、周囲温度に維持維持されなければならない、そして支持物質の物理的特性および化学的特性に対して、非常に感受性である。従って、液体－固体界面でタンパク質の活性を維持することは、核酸について使用される戦略とは全く異なる固定化戦略を必要とする。さらに、界面でのタンパク質の適切な配向は、相互作用する分子に対するその活性部位の接近可能性を確実にするために所望される。非接近可能抗体に対する接近可能抗体の比が、チップの

40

50

微小化および造作サイズが減少するにつれ、ますます関連するようになる。

【0010】

可能性のある薬物リードを同定するための、標的に対する化合物の高スループットスクリーニングを達成するゴールに加え、研究者はまた、薬物発見プロセスの初期に、高度に特異的なリード化合物を同定し得る必要がある。タンパク質ファミリーの多数のメンバー、または多型タンパク質の形態の並行した分析（複数標的のスクリーニング）は、高度に特異的なリード化合物の迅速な同定を可能にする。構造的ファミリー内のタンパク質は、類似の結合部位および触媒機構を共有する。しばしば、ファミリーの1つのメンバーの活性を効果的に妨げる化合物は、同一のファミリーの他のメンバーも妨げる。標準的な技術を使用して、そのようなさらなる相互作用を発見することは、時間と費用において多大なる努力を必要とし、結果として単純にはなされない。

10

【0011】

しかし、薬物と、関連するタンパク質との交差反応性は、患者における低い効力の原因となり得、または副作用の原因でさえあり得る。例えば、AIDSの主要な処置であるAZTは、ウイルスポリメラーゼをブロックするばかりでなく、ヒトポリメラーゼもまたブロックし、有害な副作用を生じる。密接に関連するタンパク質との交差反応性はまた、非ステロイド性の抗炎症薬物（NSAID）およびアスピリンでも、問題である。これらの薬物は、シクロオキシゲナーゼ2（疼痛および炎症を促進する酵素）を阻害する。しかし、これら同一の薬物は、関連する酵素であるシクロオキシゲナーゼ1（胃の内壁および腎臓の健康を維持する原因である）もまた強力に阻害し、胃の痛みを含む一般的な副作用をもたらす。

20

【0012】

複数のタンパク質相互作用の微小化された、並行スクリーニングはまた、高スループット薬物スクリーニングの他に、多数の適用のために有用であり、そして必要である。例えば、新規に発見されたタンパク質の機能は、既知のタンパク質ファミリーの、多数の可能性のあるリガンドまたは可能性のある基質を用いる並行形式において効果的にアッセイされ得る。抗体のようなタンパク質に対する被分析物の結合による複数の被分析物の分析を可能にする微小化診断デバイスもまた、所望される。

【0013】

上記の理由により、複数の生体分子相互作用、特にタンパク質と被分析物または他のタンパク質との相互作用の、並行したインビトロでのスクリーニングのための、微小化デバイスおよびそのデバイスを使用する方法が必要である。

30

【0014】

（発明の要旨）

本発明は、複数の生体分子相互作用、特にタンパク質と被分析物または他のタンパク質との相互作用の、並行したインビトロでのスクリーニングについての必要性を満たす、デバイスおよびそのデバイスを使用する方法に関する。

【0015】

本発明の1つの実施態様は、液体サンプルの成分を分析するためのデバイスを提供する。このデバイスは、複数の非隣接反応部位を含む。反応部位の各々は、基板、その基板の表面の部分に、化学吸着または物理吸着した有機薄膜、およびその有機薄膜上に固定化した生物学的部分を包含し、ここで、その反応部位の各々は、その液体サンプルの成分と独立して反応し得、そしてその有機薄膜を有さない基板の領域によって、お互いに分離する。

40

【0016】

このデバイスの特定の好ましい実施態様において、本発明のデバイスにおける反応部位の各々が、そのデバイスにおける他の反応部位の微小チャンネルに並行に向けられた微小チャンネル中にあり、ここで、この微小チャンネルが、その基板中またはその基板上に微小製作される。

【0017】

本発明の代替的な実施態様は、基板、その基板中またはその基板上に微小製作された複数

50

の並行微小チャンネル、および生物学的部分が液体サンプルの成分と相互作用し得る様式において並行微小チャンネルの少なくとも1つの中に固定化された生物学的部分を備える、液体サンプルの成分の分析のためのデバイスを提供する。好ましい実施態様において、生物学的部分は、タンパク質である。

【0018】

本発明のデバイスを使用する方法もまた、本発明によって提供される。1つの実施態様において、本発明は、複数の生物学的部分を、液体サンプルの成分と相互作用するその能力について、並行してスクリーニングする方法を提供する。この方法は、液体サンプルを本発明のデバイスの反応部位に送達する第1の工程を包含し、ここで、異なる生物学的部分の各々が、デバイスの異なる反応部位に固定化され、各反応部位における固定化された生物学的部分と成分との相互作用を、直接的または間接的のいずれかで検出する。アッセイされる相互作用は、結合相互作用、触媒、または脂質二重層を通る膜タンパク質によるトランスロケーションであり得る。

10

【0019】

本発明の代替的な実施態様において、本発明のデバイスを使用して、複数の成分（各々が別々の液体サンプル中にある）を、生物学的部分と相互作用するその能力についてスクリーニングする。この実施態様の方法は、異なる液体サンプルの各々を、本発明のデバイスの別々の反応部位に送達する第1の工程を包含し、ここで、このデバイスの別々の反応部位の各々は、固定化された生物学的部分を含む。次の工程は、各反応部位で固定化された生物学的部分と、その反応部位に送達された成分との相互作用について、直接的または間接的のいずれかで、検出する工程を包含する。再度、アッセイされる相互作用は、結合相互作用、触媒、または脂質二重層を通る膜タンパク質によるトランスロケーションであり得る。

20

【0020】

本発明の別の実施態様において、類似の方法を使用して、複数の被分析物の存在または量について（並行して）、液体サンプルをスクリーニングする。この方法は、診断における可能性のある適用を有する。この方法は、液体サンプルを本発明のデバイスの複数の反応部位に送達する工程を包含し、ここで反応部位の各々が、その複数の被分析物の1つと、反応するか、結合するか、そうでなければ相互作用するかのいずれかであり得る固定化された生物学的部分を含む。この方法はまた、被分析物と、各反応部位の固定化された生物学的部分との相互作用を検出する最終工程を包含する。

30

【0021】

本発明の別の実施態様において、デバイスを使用して、複数の結合候補物を、生物学的部分に結合するその能力についてもまた、並行してスクリーニングし得る。この実施態様の方法において、試験をされる異なる液体サンプル（各々が異なる結合候補物を含む）（または結合候補物の異なる混合物）が、本発明のデバイスの別々の反応部位に送達され、ここで、別々の反応部位の各々が、固定化された生物学的部分を含む。この方法の次の工程は、結合候補物の存在または量について、直接的または間接的のいずれかで検出する工程を包含する。

40

【0022】

本発明はまた、共通のリガンドに対する結合か、または共通の基質に対する反応性のいずれかに基づき、複数のタンパク質の各々が特定のタンパク質ファミリーに属するか否かについて並行して決定する方法を提供する。これらの方法は、既知のタンパク質ファミリーのリガンドまたは基質を含む液体サンプルを、本発明のデバイスの反応部位（各々がアッセイされる異なるタンパク質の1つを含む）に送達する工程、次に、そのタンパク質ファミリーに特徴的な既知のリガンドとの結合または反応について、直接的または間接的のいずれかで検出する工程を包含する。

【0023】

（発明の詳細な説明）

本発明によって、薬物開発、プロテオミクス、および臨床診断にとって有用な種々のデバ

50

イスおよび方法が提供される。

【0024】

((a) 定義)

用語「生物学的部分」および「生体分子」は、互換可能に使用され、そして各々は、生理学的機能を有するか、または有することが疑われるかのいずれかの、任意の実体をいう。この生物学的部分は、単一の分子であっても、高分子複合体であってもよい。生物学的部分の一例は、ポリヌクレオチドである。好ましい生物学的部分は、タンパク質である。タンパク質は、任意の細胞内タンパク質または細胞外タンパク質であり得、任意の膜タンパク質または分泌タンパク質を含む。他の可能な生物学的部分としては、酵素のインヒビターとして作用し得る低分子化合物、または他の生体分子に結合し得る低分子化合物を含む。例えば、生物学的部分は、必要に応じて、タンパク質捕獲剤であり得る。

10

【0025】

用語「ポリヌクレオチド」とは、1本鎖または2本鎖形態のいずれかにおける、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドポリマーを意味し、そして他に限定しなければ、天然に生じるヌクレオチドと同様の様式において機能し得る、天然のヌクレオチドの公知のアナログを含む。ポリヌクレオチドは、天然の供給源から得られ得るか、または酵素合成または化学合成によってインビトロまたはインビボで産生され得る。本明細書において、核酸、ポリヌクレオチド、およびオリゴヌクレオチドは、区別されない。好ましくは、ポリヌクレオチドは、少なくとも16ヌクレオチドを含有する。

20

【0026】

「タンパク質」とは、ペプチド結合でお互いに連結したアミノ酸残基のポリマーを意味する。本明細書において使用する場合、この用語は、任意のサイズ、構造、または機能の、タンパク質、ポリペプチド、およびペプチドをいう。しかし、代表的には、タンパク質は、少なくとも約6アミノ酸長である。好ましくは、タンパク質が短いペプチドの場合、少なくとも約10アミノ酸残基長である。タンパク質は、天然に生じるか、組換えか、または合成であるか、あるいはこれらの任意の組み合わせである。タンパク質はまた、天然に存在するタンパク質またはペプチドの単なるフラグメントでもあり得る。タンパク質は、単一の分子であっても、複数の分子の複合体であってもよい。用語タンパク質は、1つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然に生じるアミノ酸の人工の化学アナログである、アミノ酸ポリマーにも適用され得る。1つ以上のアミノ酸残基が「非天然」アミノ酸であり、任意の天然のアミノ酸に対応しないアミノ酸ポリマーもまた、本明細書において、用語「タンパク質」の使用によって包含される。

30

【0027】

「タンパク質のフラグメント」とは、別のタンパク質の部分であるタンパク質を意味する。例えば、タンパク質のフラグメントは、培養細胞から単離された全長タンパク質の消化を行うことによって得られるポリペプチドであり得る。タンパク質のフラグメントは、代表的には少なくとも6アミノ酸を含む。より代表的には、フラグメントは、少なくとも10アミノ酸を含む。好ましくは、フラグメントは、少なくとも16アミノ酸を含む。

【0028】

用語「抗体」とは、天然の、あるいは全体的または部分的に合成的に産生された免疫グロブリンを意味する。特異的結合能を保持するその全ての誘導体もまた、この用語に含まれる。この用語はまた、免疫グロブリンの結合ドメインに相同か、または高度に相同な結合ドメインを有する任意のタンパク質を含む（キメラ抗体およびヒト化抗体を含む）。これらのタンパク質は、天然の供給源に由来し得るか、あるいは全体的または部分的に合成的に産生され得る。抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり得る。抗体は、任意の免疫グロブリンクラスのメンバーであり得、任意のヒトのクラス（IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgE）を含む。しかし、IgGクラスの誘導体为本発明において好ましい。

40

【0029】

用語「抗体フラグメント」とは、全長未満の抗体の任意の誘導体をいう。好ましくは、抗

50

体フラグメントは、少なくとも、全長抗体の特異的結合能力の重要な部分を保持する。抗体フラグメントの例としては、F a b、F a b'、F (a b')₂、s c F v、F v、d s F v ダイアボディー、および F d フラグメントが挙げられるがこれらに限定されない。抗体フラグメントは、任意の手段によって産生され得る。例えば、抗体フラグメントは、酵素的または化学的に、インタクトな抗体のフラグメント化によって産生され得るか、あるいは部分抗体配列をコードする遺伝子より組換え的に産生され得る。あるいは、抗体フラグメントは、全体的にまたは部分的に合成的に産生され得る。抗体フラグメントは、必要に応じて、単鎖抗体フラグメントであり得る。あるいは、フラグメントは、例えば、ジスルフィド結合によってともに連結される複数の鎖を含み得る。フラグメントはまた、必要に応じて、複数の分子の複合体であり得る。機能的な抗体フラグメントは、代表的には、少なくとも約 50 アミノ酸を含み、より代表的には少なくとも、約 200 アミノ酸を含む。

10

【0030】

単鎖 F v (s c F v) は、ポリペプチドリンカーによってお互いに共有結合される可変軽鎖 (V_L) および可変重鎖 (V_H) のみからなる組換え抗体フラグメントである。V_L または V_H のいずれかが、NH₂ 末端ドメインであり得る。ポリペプチドリンカーは、2つの可変ドメインが重篤な立体障害をとまなわずに架橋される限り、長さおよび組成が変化し得る。代表的には、リンカーは、もっぱらグリシン残基およびセリン残基のストレッチ (可溶性のために、いくつかのグルタミン酸残基およびリジン残基が点在する) からなる。

【0031】

20

「ダイアボディー」はダイマーの s c F v である。ダイアボディーの成分は、代表的には、ほとんどの s c F v よりも短いペプチドリンカーを有し、そしてダイマーとしての会合についての優先性を示す。

【0032】

「F v」フラグメントは、非共有結合的相互作用によってともに保持される、1つの V_H ドメイン 1つの V_L ドメインからなる抗体フラグメントである。用語「d s F v」は、本明細書において使用され、V_H-V_L 対を安定化させるために操作された分子間ジスルフィド結合を有する F v をいう。

【0033】

「F (a b')₂」フラグメントは、酵素ペプシンを用いて p H 4. 0 ~ 4. 5 で消化されることにより免疫グロブリン (代表的には I g G) から得られる抗体フラグメントと実質的に等価な抗体フラグメントである。このフラグメントは、組換え的に産生され得る。

30

【0034】

「F a b'」フラグメントは、F (a b')₂ フラグメント中のジスルフィド架橋、または 2つの重鎖種を結合する架橋を還元することにより得られる抗体フラグメントと実質的に等価な抗体フラグメントである。F a b' フラグメントは、組換え的に産生され得る。

【0035】

「F a b」フラグメントは、酵素パパインをを用いて免疫グロブリン (代表的には I g G) の消化から得られる抗体フラグメントと実質的に等価な抗体フラグメントである。F a b フラグメントは、組換え的に産生され得る。F a b フラグメントの重鎖セグメントは、F d 部分である。

40

【0036】

用語「タンパク質捕獲剤」とは、それ自体にタンパク質を結合し得る分子または複数分子の複合体を意味する。タンパク質捕獲剤は、好ましくは、実質的に特異的な様式においてその結合パートナーと結合する。約 10⁻⁶ 未満の解離定数 (K_D) を有するタンパク質捕獲剤が、好ましい。抗体または抗体フラグメントは、タンパク質捕獲剤として高度に適切である。抗原もまたタンパク質捕獲剤として作用し得る。なぜなら、抗体に結合し得るからである。タンパク質リガンドに結合するレセプターは、可能性のあるタンパク質捕獲剤の別の例である。タンパク質捕獲剤は、非共有結合相互作用を介してその結合パートナーと相互作用のみをする薬剤に限定されないことが理解される。タンパク質捕獲剤はまた、

50

必要に応じて、それが結合するタンパク質と共有結合的に付着されるようになり得る。例えば、タンパク質捕獲剤は、結合後に、その結合パートナーと光架橋され得る。

【0037】

用語「結合パートナー」とは、特定のタンパク質捕獲剤によって、好ましくは実質的に特異的な様式において、結合されるタンパク質を意味する。いくつかの場合、結合パートナーは、タンパク質捕獲剤であるタンパク質によって、インビボにおいて通常結合されるタンパク質であり得る。しかし、他の実施態様において、結合パートナーは、タンパク質捕獲剤が選択された（インビトロまたはインビボ選択を通して）か、または惹起された（抗体の場合）、タンパク質またはペプチドであり得る。結合パートナーは、1つより多いタンパク質捕獲剤によって共有され得る。例えば、種々のポリクローナル抗体によって結合される結合パートナーは、多数の異なるエピトープを有し得る。1つのタンパク質捕獲剤はまた、多数の結合パートナーに結合し得る（例えば、結合パートナーが同一のエピトープを共有する場合）。

10

【0038】

「タンパク質結合に適切な条件」とは、溶液中で、タンパク質捕獲剤とその結合パートナーとの間で結合が生じるのを可能にする条件（塩濃度、pH、界面活性剤、タンパク質濃度、温度などに関する）を意味する。好ましくは、この条件は、顕著な量の非特異的タンパク質結合が生じるほどは、寛大ではない。

【0039】

「体液」は、生物または生物の組織から、抽出、排出、または分泌された任意の液体の物質であり得る。必ずしも細胞を含む必要はない。本発明に関連する体液としては、全血、血清、尿、血漿、脳髄液、涙、滑液、および羊水が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0040】

用語「基板」とは、本発明のデバイスの、バルクの、基礎をなし、そして中心となる物質である。

【0041】

用語「マイクロマシン加工」および「微小製作」の両方は、微小構造（ミリメートル未満のスケールの造作サイズを有する構造）の生成において有用な、任意の多数の技術をいう。そのような技術としては、レーザー切除、電着、物理的および化学的蒸着、フォトリソグラフィー、および湿式化学エッチングおよびドライエッチングが挙げられるがこれらに限定されない。注入成形およびLIGA（X線リソグラフィー、電着、および成形）のような関連する技術もまた挙げられる。これらの技術のほとんどは、半導体、マイクロエレクトロニクス、およびマイクロエレクトロメカニカルシステム（MEMS）における使用のために最初は、開発されたが、本発明にも同様に適用可能である。

30

【0042】

用語「コーティング」とは、基板の表面上に形成されるか、または基板の「表面」に適用される、天然または合成のいずれかの層を意味する。例えば、シリコンのような基板の空気への曝露は、曝露された表面の酸化を生じる。シリコンから作製される基板の場合、酸化シリコンコーティングが、空気へ曝露される際に、表面に形成される。他の場合において、コーティングは、基板由来ではなく、機械的、物理的、電氣的、または化学的手段を介して表面に配置され得る。このタイプのコーティングの例は、シリコン基板またはポリマー基板に適用される金属コーティングか、あるいはシリコン基板に適用される窒化シリコンコーティングである。コーティングは、任意の厚さであり得るが、代表的には、コーティングは、基板の厚みよりも薄い厚さを有する。

40

【0043】

「中間層」は、第1のコーティングと基板との間に位置するさらなるコーティングまたは層である。複数の中間層が、必要に応じて、ともに使用され得る。代表的な中間層の主な目的は、第1のコーティングと基板との間の付着を助けることである。1つのそのような例は、シリコンまたはガラス表面に金コーティングを付着するのを助ける、チタンまたは

50

クロム中間層の使用である。しかし、中間層の他の可能性のある機能もまた、予想される。例えば、いくつかの中間層は、デバイスの検出系において、役割を担い得る（例えば、ナノ伝導性基板とナノ伝導性コーティングとの間の半導体または金属層）。

【0044】

「有機薄膜」は、基板に適用されるか、または基板上のコーティング（存在する場合）に適用される有機分子の薄層である。代表的に、有機薄膜は、約20nm未満の厚さである。必要に応じて、有機薄膜は、約10nm未満の厚さであり得る。有機薄膜は、無秩序であっても、整列されていてもよい。例えば、有機薄膜は、アモルファス（例えば、化学吸着されたポリマーまたはスピン塗布（spin-coated）されたポリマー）であり得るか、または高度に組織化され得る（例えば、ラングミュアー・ブロッジェット膜または自己組織化単層）。有機薄膜は、不均一であっても、均一であってもよい。単層である有機薄膜が、好ましい。脂質二重層または単層が、好ましい有機薄膜である。必要に応じて、有機薄膜は、有機薄膜の1つより多い形態の組み合わせを含み得る。例えば、有機薄膜は、自己組織化単層の上表面に脂質二重層を含み得る。ヒドロゲルもまた、有機薄膜を構成し得る。有機薄膜は、代表的には、その表面に曝露された官能基（functionality）を有し、任意の多数の方法において、基板の表面状態または基板上のコーティングを増強するために作用する。例えば、有機薄膜の曝露された官能基は、代表的に、デバイスへの生物学的部分の結合または共有結合的固定化において有用である。あるいは、有機薄膜は、表面に対する生体分子および他の被分析物の非特異的結合を減少する官能基（例えば、ポリエチレングリコール（PEG））を有し得る。他の曝露された官能基は、薄膜を、基板表面またはコーティングに繋ぎ止める作用をする。有機薄膜の特定の官能基はまた、表面とともに使用される特定の検出技術を可能にするために設計され得る。あるいは、有機薄膜は、デバイス上に固定化された生物学的部分の不活化が、基板表面または基板表面上のコーティングとの接触の際に生じることを防ぐために役立ち得る。

【0045】

「単層」は、単分子厚の有機薄膜である。単層は、不規則であっても、整列されていてもよい。単層は、必要に応じて、ポリマー性化合物（例えば、ポリ非イオン性ポリマー、ポリイオン性ポリマー、またはブロックコポリマー）であり得る。例えば、単層は、ポリリジンのようなポリ（アミノ酸）から構成され得る。しかし、自己組織化単層である単層が最も好ましい。自己組織化単層の一方の面は、代表的には、基板表面上または基板上のコーティング（存在する場合）に、化学吸着または物理吸着した有機分子の末端の化学的官能基から構成される。単層の適切な官能基の例としては、負に荷電した表面での使用のためのポリ-L-リジンの陽に荷電したアミノ基、および金表面での使用のためのチオールが挙げられる。代表的には、自己組織化単層の他の面は曝露され、そして任意の数の化学的官能基（末端基）を有し得る。好ましくは、自己組織化単層の分子は、高度に整列されている。

【0046】

「自己組織化単層」は、分子の自発的な組織化によって生成される単層である。自己組織化単層は、整列されていれも、無秩序でも、短い範囲から長い範囲の整列を示してもよい。

【0047】

「親和性タグ」は、有機薄膜の曝露された官能基上に生物学的部分を直接的または間接的に固定化し得る官能部分である。好ましくは、親和性タグは、部位特異的固定化を可能にし、従って、有機薄膜上への生物学的部分の配向を増強する。いくつかの場合、親和性タグは、単純な化学的官能基であり得る。他の可能性としては、アミノ酸、ポリ（アミノ酸）タグ、または全長タンパク質が挙げられる。さらに他の可能性としては、糖質および核酸が挙げられる。例えば、親和性タグは、有機薄膜上で官能基として作用する別のポリヌクレオチドか、またはアダプターとして作用する別のポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドであり得る。親和性タグはまた、合成化学部分であり得る。各部位の有機薄膜が脂質二重層または単層を含むならば、膜のアンカーは、適切な親和性タグで

ある。親和性タグは、生物学的部分に、共有結合しても、非共有結合してもよい。例えば、親和性タグがタンパク質である生物学的部分に共有結合する場合、化学的結合を介して付着し得るか、または融合タンパク質であり得る。親和性タグはまた、切断可能な連結を介して生物学的部分に付着し得る。あるいは、親和性タグは、生物学的部分と直接接触しなくてもよい。そのかわり、親和性タグは、アダプターによって生物学的部分から分離され得る。親和性タグは、非共有的相互作用を介してか、または共有連結を介してかのいずれかで、生物学的部分を有機薄膜に固定化し得る。

【0048】

本発明の目的のために、「アダプター」は、親和性タグを、デバイスの固定化された生物学的部分に連結する任意の実体である。アダプターは、親和性タグおよび生物学的部分の両方に非共有結合的に付着した別個分子であってもよいが、必ずしもそうである必要はない。そのかわり、アダプターは、親和性タグまたは生物学的部分あるいはその両方に共有結合し得る（例えば、化学結合を介してか、または融合タンパク質として）。全長タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドのようなタンパク質が、代表的なアダプターである。他の可能なアダプターとしては、糖質および核酸が挙げられる。

10

【0049】

用語「融合タンパク質」とは、その天然の状態において代表的には結合していないが、ペプチド結合を介してそれぞれのアミノ末端およびカルボキシ末端によって結合し、単一の連続するポリペプチドを形成する、2つ以上のポリペプチドから構成されるタンパク質をいう。2つ以上のポリペプチド成分が、ペプチドリンカー／スペーサーを介して、直接的または間接的に結合され得ることが理解される。

20

【0050】

用語「通常の生理条件」とは、生きている生物または細胞の内部において典型的な条件を意味する。いくつかの生物（単数または複数）は、極端な条件を提供することが認識されるが、生物内および細胞内の環境は、通常pH7付近（すなわち、pH6.5～pH7.5）で変化し、主要な溶媒として水を含み、そして0℃を超えて、50℃未満の温度で存在する。種々の塩濃度は、器官、生物、細胞、または参照として使用される細胞成分に依存することが理解される。

【0051】

「プロテオミクス (proteomics)」とは、プロテオーム (proteome) またはプロテオームのいくつかの画分のいずれかの特徴付けまたは研究を意味する。「プロテオーム」は、細胞または細胞の集団の細胞内タンパク質、および細胞または細胞の集団によって分泌されるタンパク質全体の集合である。この特徴付けとして最も代表的には、細胞によって発現されたタンパク質の存在（通常は量）の測定を含む。タンパク質の機能、構造的な特徴付け（例えば、翻訳後修飾）、および細胞内局在もまた、研究され得る。「機能的プロテオミクス」とは、細胞または細胞の集団のタンパク質発現産物の、機能的特徴、活性レベル、および構造的な特徴の研究をいう。

30

【0052】

（（b）本発明のデバイス）

1つの局面において、本発明は、液体サンプルの成分を分析するためのデバイスを提供する。このデバイスは、複数の非隣接の反応部位を含み、この各々は、以下を含む：基板；基板の表面の一部分に、化学吸着または物理吸着した有機薄膜；および有機薄膜上に固定化した生物学的部分。ここで、この部位の各々は、液体サンプルの成分と独立して反応し得、そして有機薄膜を有さない基板の領域によって、お互いに分離される。

40

【0053】

好ましい実施態様において、デバイスは、少なくとも約10個の反応部位を含有する。特に好ましい実施態様において、デバイスは、少なくとも約100個の反応部位を含有する。

【0054】

本発明の好ましい実施態様において、デバイスは、マイクロマシン加工されたデバイスま

50

たは微小製作されたデバイスを含む。このデバイスは、必要に応じて、ミリメートルからセンチメートルのスケールの大きさの微小デバイスである。

【0055】

本発明の好ましい実施態様において、デバイスの反応部位の各々が、デバイスにおける他の反応部位の微小チャンネルに並行に向けられた微小チャンネル中にある。そのようなデバイスの微小チャンネルは、必要に応じて、デバイスの基板中または基板上に微小製作されているか、またはマイクロマシン加工されている。反応部位は、必要に応じて、微小チャンネルの内部表面全体を覆うか、あるいは、微小チャンネルの内部表面の一部のみを覆う。

【0056】

別の実施態様において、本発明は、基板、基板中または基板上に微小製作された、複数の並行微小チャンネル、および並行微小チャンネルの少なくとも1つの中に固定化された生物学的部分を含む液体サンプルの成分を分析するためのデバイスであって、ここで生物学的部分が該液体サンプルの成分と相互作用し得る、デバイスを提供する。好ましくは、多数の並行微小チャンネルは、固定化された生物学的部分を含む。各微小チャンネルの固定化された生物学的部分が微小チャンネルの内部表面の少なくとも一部の上で有機薄膜に固定化されることもまた、好ましい。

【0057】

図1は、バルク基板材料中に製作された、微小チャンネル1のアレイを示す、本発明の1つの実施態様を説明する。特定の示されたデバイスにおいて、48個の並行微小チャンネル1が、基板3中に微小製作されている。ガラスカバー2は、微小チャンネルアレイの一部を覆う。

【0058】

本発明の1つの実施態様において、デバイスは、少なくとも2個の並行微小チャンネル反応部位を含む。本発明の別の実施態様において、デバイスは、少なくとも10個の並行微小チャンネル反応部位を含む。本発明の好ましい実施態様において、デバイスは、少なくとも100個の並行微小チャンネル反応部位を含む。特定の好ましい実施態様において、デバイスは、約100個～約500個の並行微小チャンネルを含む。微小チャンネルは、代表的には、約10 μm ～約5 mmでお互いに離れる。デバイスは、必要に応じて、基板1 cm^2 あたり約2個～約500個の並行微小チャンネルを含み得る。

【0059】

微小チャンネルの大きさは、変化し得る。しかし、好ましい実施態様において、この大きさは、微小の液体サンプル容量のみを必要とするように、十分小さい。本発明のデバイスの各微小チャンネルの幅および深さは、代表的には、約10 μm と約500 μm との間である。デバイスの好ましい実施態様において、各微小チャンネルの幅および深さは、約50と200 μm との間である。各微小チャンネルの長さは、約1から約20 mm長である。好ましい実施態様において、各微小チャンネルの長さは、約2から約8 mm長である。任意のチャンネルの横断面幾何学（台形、長方形、V型、半円など）が、デバイスにおいて使用され得る。幾何学は、当該分野において公知のように、微小チャンネルを作製するために使用される微小製作プロセスまたはマイクロマシン加工プロセスのタイプによって決定される。台形または長方形の横断面幾何学は、微小チャンネルにとって好ましい。なぜなら、これらは、標準的な蛍光検出方法と容易に適応するからである。

【0060】

多数の異なる材料が、本発明のデバイスの基板として使用され得る。基板は、有機または無機、生物学的または非生物学的、あるいはこれらの材料の任意の組み合わせであり得る。基板は、必要に応じて、透明または半透明であり得る。マイクロマシン加工または微小製作のために適切な基板が、好ましい。本発明の基板は、必要に応じて、シリコン、シリカ、石英、ガラス、孔径の制御された多孔質ガラス（controlled pore glass）、炭素、アルミナ、チタニア、酸化タンタル、ゲルマニウム、窒化シリコン、ゼオライト、およびガリウムヒ素からなる群から選択される物質を含み得る。金、プラ

10

20

30

40

50

チナ、アルミニウム、銅、チタン、およびその合金のような多くの金属もまた、基板のための選択肢である。さらに、多くのセラミクスおよびポリマーがまた、基板として使用され得る。基板として使用され得るポリマーとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：ポリスチレン；ポリ（テトラ）フルオロエチレン（PTFE）；ポリビビニリデンジフルオリド；ポリカーボネート；ポリメチルメタクリレート；ポリビニルエチレン；ポリエチレンイミン；ポリ（エーテルエーテル）ケトン；ポリオキシメチレン（POM）；ポリビニルフェノール；ポリラクチド；ポリメタクリルイミド（PMI）；ポリアルケンスルホン（PAS）；ポリプロピレン；ポリエチレン；ポリヒドロキシエチルメタクリレート（HEMA）；ポリジメチルシロキサン；ポリアクリルアミド；ポリイミド；およびブロックコポリマー。デバイスのための好ましい基板としては、シリコン、シリカ、ガラス、およびポリマーが挙げられる。基板はまた、上記の基板材料の任意の組み合わせであり得る。

10

【0061】

複数の反応部位（例えば、微小チャンネルの並行アレイ）を生成するために、第1に、基板材料を洗浄し、溶媒の汚染、ほこり、または有機残留物のような混入物を取り除く必要がある。種々の洗浄手順を、基板材料および混入物の起源に依存して使用し得る。これらとしては、湿式浸漬（wet immersion）プロセス（例えば、RCA1+2、「ピラニア（pyranha）」、溶媒）、乾燥気相洗浄（dry vapor phase cleaning）、熱処理、プラズマ放電またはグロー放電技術、研磨化合物を用いて磨く、短波長光曝露、超音波攪拌および超臨界流体での処理が挙げられる。

20

【0062】

次に、チャンネルは、以下のいずれかによって基板表面上に形成され得る（1）バルクマイクロマシン加工、（2）犠牲マイクロマシン加工、（3）LIGA（高アスペクト比メッキ）または（4）他の技術、あるいはこれらの任意の組み合わせ。そのような技術は、半導体およびマイクロエレクトロニクス工業の分野で周知であり、そして例えば、Ghandi、VLSI Fabrication Principles、Wiley（1983）およびSze、VLSI Technology、第2版、McGraw-Hill（1988）；WolfおよびTaube、Silicon Processing for the VLSI Era、第1巻、Lattice Press（1986）、およびMadou、Fundamentals of Microfabrication、CRC Press（1997）に記載される。

30

【0063】

バルクマイクロマシン加工において、基板の大部分が取り除かれ、微小チャンネルの最終的な大きさを含む長方形またはV型の溝を形成する。このプロセスは、通常、標準的なフォトリソグラフィ技術（レジスト材料のスピンコーティング、リソグラフィーマスクを通しての照射、その後の湿式化学現像ならびにディスカム（descumming）およびポストバークングのような処理後の工程を含む）によって行われる。次に、生じるレジストのパターンを、バルク材料のその後の湿式エッチングまたはドライエッチングのためのエッチレジスト材料として使用して、所望の形状構造を形成する。代表的なレジスト材料としては、陽性および陰性有機レジスト（例えば、Kodak747、PR102）、無機材料（例えば、ポリシリコン、窒化シリコン）および生物学的エッチレジスト（例えば、ラングミュアー・プロジェクト膜およびSulfolobus acidocladariusのS層のような2次元タンパク質結晶）が挙げられる。基板およびレジストストリッピングへのパターンの転写は、湿式化学エッチング技術およびドライエッチング技術（プラズマエッチング、反応性イオンエッチング、スパッタリング、イオンビームに補助された化学エッチング、および反応性イオンビームエッチングを含む）を介して生じる。

40

【0064】

本発明の1つの実施態様において、例えば、フォトレジストを洗浄した4インチSi（110）ウェーハ上にスピン塗布し得る。次に、フォトマスクを通しての、フォトレジスト

50

への紫外光曝露は、フォトリジストにおけるチャンネルのパターンを生じ、下層にあるシリコンのストリップのパターンを曝露する。次に、湿式化学エッチング技術を、シリコン中にチャンネルパターンをエッチングするために適用し得る。次に、チタンの薄層を、表面にコートし得る。次に、金の薄層を、熱エバポレーションまたは電子ビームエバポレーションを用いて、表面にコートする。標準的なレジストストリッピングが続く。（あるいは、ストリップレジストの後に、金コーティングを行い得る）。

【0065】

図2は、バルクマイクロマシン加工によって製作された微小チャンネルアレイの1例の横断面図を示す。基板3の中の微小チャンネル1を、カバーガラス2で覆う。微小チャンネルの底面では、基板3の表面を、中間層6によって分離されたコーティング5で覆う。

10

【0066】

犠牲マイクロマシン加工において、基板は、実質的には処理しないままである。他の材料の種々の厚みの層が、蒸着、プラズマ増強化学蒸着（PECVD）またはスパインコーティングによって構築され、そして次のプロセッシング工程によって、選択的に後ろに残されるか、または取り除かれる。従って、生じるチャンネル壁は、チャンネルの底部とは化学的に異なり、そしてレジスト材料は、微小デバイスの一部として残る。犠牲マイクロマシン加工のための代表的なレジスト材料は、直線の側壁を有する高アスペクト比造作の形成を可能にする、窒化シリコン（ Si_3N_4 ）、ポリシリコン、熱成長酸化シリコン、およびSU-8のような有機レジストおよびポリイミドである。

【0067】

20

図3は、犠牲マイクロマシン加工によって製作された微小チャンネルアレイの1例の横断面図を示す。微小チャンネル1は、フォトリジスト4からなる壁、ならびにコーティング5および中間層6によって覆われる基板3を備える床を備える。カバーガラス2は、微小チャンネル1を覆う。

【0068】

高アスペクト比メッキまたはLIGAにおいて、三次元金属構造を、X線レジストで覆われた材料上への高エネルギーX線照射曝露によって作製する。引き続いての電着およびレジストの除去は、精密プラスチック注入成形のために使用され得る金属構造を生じる。これらの注入成形されたプラスチック部分は、最終的な微小デバイスとして、またはロストモールド（lost mold）のいずれかとして使用され得る。LIGAプロセスは、Beckerら、Microelectron Engineering（1986）4：35～56およびBeckerら、Naturwissenschaften（1982）69：520～523によって記載されている。

30

【0069】

微小チャンネルアレイ製作のための代替的な技術としては、集束イオンビーム（FIB）ミリング、静電破壊機械加工（EDM）、超音波ドリリング、レーザーアブレーション（米国特許第5,571,410号）、機械的ミリングおよび熱成形技術が挙げられる。当業者は、微小作製またはマイクロマシン加工技術における多くの改変を使用して、本発明のデバイスを構築し得ることを理解する。

【0070】

40

1つの実施態様において、透明または半透明なカバーが、アノード性結合または付着性コーティングを介して、基板に付着され、入口および出口ポートを有する微小チャンネルアレイを生じる。好ましい実施態様において、微小チャンネルカバーは、ガラス、特にバイレックスまたは石英ガラスである。代替的な実施態様において、透明でも半透明でもないカバーが、基板に結合され得るか、そうでなければ、付着され得、微小チャンネルを囲み得る。他の実施態様において、カバーは、チャンネル内に固定化された生物学的部分と被分析物との間の相互作用をモニターする検出系の一部であり得る。あるいは、ポリマー性のカバーが、他の手段（例えば、圧力をともなう熱の適用によってか、または溶媒ベースの結合を介する）によって、ポリマー性基板チャンネルアレイに付着され得る。

【0071】

50

覆われた微小チャンネルアレイの1つの特定の実施態様を、図1において説明する。このデバイスにおいて、透明なカバーガラス2は、アレイの並行化微小チャンネルの各々の長さの、全てではないにしてもほとんどを覆う。この特定の実施態様において、微小チャンネルは、基板の端まで完全には広がらないので、チャンネルの長さの不完全な覆いが、微小チャンネルの各々について、入口および出口のポートを提供する。

【0072】

微小チャンネルアレイに対するカバーの付着は、反応部位上の有機薄膜の形成に先立ち得る。この場合には、有機薄膜の成分を含む溶液（代表的には有機溶媒）を、一体型微小キャピラリーおよび適切な入口／出口ポートを有する、微細作製された分配系を介して、チャンネルの内部に適用し得る。あるいは、有機薄膜を、微小チャンネルを囲む前に微小チャンネル中に沈着し得る。これらの実施態様のために、単層のような有機薄膜を、必要に応じて、単純な浸漬を介してか、またはマイクロ接触プリンティング（PCT公報WO96/29629を参照のこと）を介して、内部の微小チャンネル表面に転写し得る。もっとも好ましい実施態様において、全ての微小チャンネル中の有機薄膜は、同一である。そのような場合、微小チャンネルアレイの単純な浸漬、または薄膜成分を含有する同一の液体と全ての微小チャンネル内部のインキュベーションで十分である。

10

【0073】

各囲まれた微小チャンネルの容量は、必要に応じて、約5ナノリットルから約300ナノリットルであり得る。好ましい実施態様において、本発明のデバイスの囲まれた微小チャンネルの容量は、10と50ナノリットルとの間である。

20

【0074】

流体の容量は、当業者に公知の多数の標準的手段によって、各微小チャンネルを通して移動し得る。微小流体デバイスを通して流体を移動させるため、およびマイクロタイタプレート中での混合のために必要とされる精巧な手段は、本発明の微小チャンネルアレイには必要ではない。キャピラリー技術を用いて一般に使用される単純な液体交換技術で十分である。例えば、流体は、標準的なポンプを使用して、チャンネルを通して移動され得る。あるいは、電気浸透のような、微小チャンネルを通しての流体移動のより精巧な方法が、使用され得る（例えば、米国特許第4,908,112号を参照のこと）。

【0075】

本発明の1つの実施態様において、バルクーローディング分配デバイスを使用して、同一の流体を、一度にデバイスの微小チャンネルの全てにロードし得る。あるいは、一体型微小キャピラリー分配デバイスは、ガラスまたは他の基板から微小製作され得、デバイスの各微小チャンネルに別々に流体をロードし得る。

30

【0076】

次に、微小チャンネルの形成後、側面、底面または微小チャンネルのカバーまたはこれらの任意の部分またはその組み合わせが、さらに化学的に改変され、所望の生物反応特性および生体適合特性を達成し得る。

【0077】

デバイスの反応部位は、必要に応じて、基板とその有機薄膜との間のコーティングをさらに含み得る。このコーティングは、基板上に形成され得るか、または基板上に適用され得るかのいずれかである。基板は、薄膜技術をベースとする、例えば、物理蒸着（PVD）、熱プロセッシング、またはプラズマ増強化学蒸着（PECVD）を使用することによるコーティングを用いて改変され得る。あるいは、プラズマ曝露を使用して、直接活性化するか、または基板を改変して、コーティングを作製し得る。例えば、プラズマエッチング手順を使用して、ポリマー性表面（すなわち、ヒドロキシル、カルボン酸、アルデヒドなどのような極性官能基を曝露するポリスチレンまたはポリエチレン）を酸化し得る。

40

【0078】

コーティングは、必要に応じて、金属膜である。可能な金属膜としては、アルミニウム、クロム、チタン、タンタル、ニッケル、ステンレス鋼、亜鉛、鉛、鉄、銅、マグネシウム、マンガン、カドミウム、タングステン、コバルト、ならびにそれらの合金および酸化物

50

が挙げられる。好ましい実施態様において、金属膜は、貴金属膜である。コーティングのために使用され得る貴金属としては、金、プラチナ、銀および銅が挙げられるがこれらに限定されない。特に好ましい実施態様において、コーティングは、金または金合金を含む。電子ビームエバポレーションを使用して、基板の表面上に金の薄いコーティングを提供し得る。好ましい実施態様において、金属膜は、約50 nmから約500 nmの厚さである。別の実施態様において、金属膜は、約1 nmから約1 μmの厚さである。

【0079】

代替的な実施態様において、コーティングは、シリコン、酸化シリコン、チタニア、酸化タンタル、窒化シリコン、水素化シリコン、酸化スズインジウム、酸化マグネシウム、アルミナ、ガラス、ヒドロキシル化表面、およびポリマーからなる群から選択される組成を含む。

10

【0080】

もし反応部位が、基板と有機薄膜との間のコーティングを含むならば、コーティングは有機薄膜上の適切な官能基が利用可能である材料から構成されなければならないことが理解される。もしそのようなコーティングが存在しないならば、基板は有機薄膜上の適切な官能基が利用可能である材料から構成されなければならないことが理解される。

【0081】

多くのコーティングが少なくとも1つの付着層、またはコーティングと基板との間のメディエーターの追加を必要とすることが予想される。例えば、チタンまたはクロムの層は、シリコンウェハと金コーティングとの間に望ましくあり得る。代替的な実施態様において、Epo-te k 377（登録商標）、Epo-te k 301-2（登録商標）（Epoxy Technology Inc.、Billerica、Massachusetts）のようなエポキシ接着剤が、基板へのコーティングの付着を助けるために好ましくあり得る。付着層に如何なる材料が使用されるべきかの決定は、一旦、基板およびコーティングの両方について材料が選択されると、当業者にとって自明である。他の実施態様において、さらなる付着メディエーターまたは中間層が、デバイスの光学特性（例えば、検出目的のための導波路において）の改善のために必要であり得る。

20

【0082】

基板上へのコーティングの沈着または形成（そのようなコーティングが所望される場合）は、基板上への有機薄膜の形成前に生じなければならない。

30

【0083】

デバイスの反応部位の有機薄膜は、基板自体の上か、または基板を覆うコーティングの上のいずれかに、層を形成する。生物学的部分が固定化される有機薄膜は、好ましくは、約20 nm未満の厚さである。本発明のいくつかの実施態様において、各部位の有機薄膜は、約10 nm未満の厚さであり得る。

【0084】

種々の異なる有機薄膜が、本発明の使用のために適切である。有機薄膜の形成方法としては、表面からのインサイチュでの成長、物理吸着による沈着、スピンコーティング、化学吸着、自己組織化、またはプラズマが開始する気相からの重合が挙げられる。例えば、デキストランのような材料から構成されるヒドロゲルは、デバイスの部位上の適切な有機薄膜として作用し得る。本発明の1つの好ましい実施態様において、有機薄膜は、脂質二重層または脂質単層である。別の好ましい実施態様において、デバイスの各部位の有機薄膜は、単層である。負に荷電した基板またはコーティング上に吸着されたポリアルギニンまたはポリリジンの単層は、有機薄膜の1つの選択肢である。別の選択肢は、つなぎとめられたポリマー鎖の無秩序な単層である。特定の好ましい実施態様において、有機薄膜は、自己組織化単層である。ポリリジンの単層は、有機薄膜についての1つの選択肢である。この有機薄膜は、最も好ましくは、式X-R-Y（ここで、Rは、スペーサーであり、Xは、Rを表面に結合させる官能基であり、そしてYは、タンパク質を単層に結合させるための官能基である）の分子を含む自己組織化単層である。代替的な好ましい実施態様において、自己組織化単層は式(X)_aR(Y)_bの分子から構成され、ここで、aおよびbは

40

50

、独立して少なくとも1に等しい整数であり、X、R、およびYは以前に定義したとおりである。代替的な好ましい実施態様において、有機薄膜は、式X-R-Yの分子の自己組織化単層の表面に固定化された脂質二重層の組み合わせのような有機薄膜の組み合わせを含む。別の例として、ポリリジンの単層もまた、必要に応じて、式X-R-Yの分子の自己組織化単層と組み合わせられ得る（米国特許第5,629,213号を参照のこと）。

【0085】

種々の化学的部分が、本発明のデバイスにおいて、式X-R-Yの単層分子として機能し得る。しかし、3つの主要なクラスの単層形成が、好ましくは使用され、デバイスの反応部位上に高密度の反応性オメガ官能部分を曝露する：(i) ヒドロキシル化および非ヒドロキシル化表面上のアルキルシロキサン単層（「シラン」）（例えば、米国特許第5,405,766号、PCT公報WO96/38726、米国特許第5,412,087号および米国特許第5,688,642号に教示されるように）；(ii) 貴金属（好ましくはAu(III)）上のアルキルチオール／ジアルキルジスルフィド単層（例えば、Allaraら、米国特許第4,690,715号；Bamdadら、米国特許第5,620,850号；Wagnerら、Biophysical Journal、1996、70:2052~2066に記載されるように）；ならびに(iii) 酸化物を含まない不動態化シリコン上のアルキル単層形成（例えば、Linfordら、J. Am. Chem. Soc.、1995、117:3145~3155、Wagnerら、Journal of Structural Biology、1997、119:189~201、米国特許第5,429,708号に教示されるように）。しかし、当業者は、基板、コーティングおよび親和性タグの選択に主に依存して、多くの可能な部分がX、R、および／またはYの代わりとなり得ることを理解する。単層の多くの例が、Ulman、An Introduction to Ultrathin Organic Films: From Langmuir-Blodgett to Self Assembly, Academic press (1991)に記載される。

【0086】

1つの実施態様において、単層は、式 $(X)_aR(Y)_b$ の分子を含み、ここで、aおよびbは、独立して、1と約200との間に等しい整数である。好ましい実施態様において、aおよびbは、独立して、1と約80との間に等しい整数である。より好ましい実施態様において、aおよびbは、独立して、1または2に等しい整数である。最も好ましい実施態様において、aおよびbは、両方とも1に等しい（式X-R-Yの分子）。

【0087】

本発明のデバイスの部位が、式 $(X)_aR(Y)_b$ の分子の自己組織化単層を含むならば、Rは、必要に応じて、約1から約400の炭素長の直鎖状または分岐炭化水素鎖を含む。炭化水素鎖は、アルキル基、アリール基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アルカリール(alkaryl)基、アラルキル基、またはこれらの任意の組み合わせを含み得る。もしaとbの両方が1に等しければ、Rは、代表的には約3から約30炭素長のアルキル鎖である。好ましい実施態様において、aとbの両方が1に等しければ、Rは、約8から約22炭素長のアルキル鎖であり、必要に応じて、直鎖アルカンである。しかし、代替的な実施態様において、Rが容易に約2から約400炭素長の直鎖状または分岐炭水化物鎖を含み得、そして少なくとも1つのヘテロ原子によって中断されることもまた意図される。中断するヘテロ基としては、-O-、-CONH-、-CONHCO-、-NH-、-CSNH-、-CO-、-CS-、-S-、-SO-、-(OCH₂CH₂)_n-（ここでn=1~20）、-(CF₂)_n-（ここでn=1~22）などが挙げられ得る。あるいは、Rの1つ以上の水素部分が、ジュウテリウムによって置換され得る。代替的な、より好ましくない実施態様において、Rは、約400炭素長を超え得る。

【0088】

Xは、基板表面上（または、存在する場合はコーティング）に単層の化学吸着または物理吸着をもたらす任意の基として選択され得る。例えば、基板またはコーティングが金属または金属合金の場合、少なくとも単層への取り込み前のXは、好ましくは対称または非対

称の、ジスルフィド、スルフィド、ジセレニド、セレニド、チオール、イソニトリル、セレノール (selenol)、三価のリン化合物、イソチオシアネート、イソシアネート、キサントレート、チオカルバメート、ホスフィン、アミン、チオ酸、およびジチオ酸である。この実施態様は、基板（または、使用される場合はコーティング）が、金、銀またはプラチナのような貴金属の場合は、特に好ましい。

【0089】

デバイスの基板が、シリコン、酸化シリコン、酸化スズインジウム、酸化マグネシウム、アルミナ、石英、ガラスまたはシリカのような材料ならば、本発明の1つの実施態様のデバイスは、この単層への取り込み前に、モノハロシラン、ジハロシラン、トリハロシラン、トリアルコキシシラン、ジアルコキシシラン、またはモノアルコキシシランであるXを含む。これらのシランの中で、トリクロロシランおよびトリアルコキシシランが、特に好ましい。

10

【0090】

本発明の好ましい実施態様において、基板は、シリコン、二酸化シリコン、酸化スズインジウム、アルミナ、ガラスおよびチタニアからなる群から選択され；そして、その単層中への取り込み前に、Xが、モノハロシラン、ジハロシラン、トリハロシラン、トリクロロシラン、トリアルコキシシラン、ジアルコキシシラン、モノアルコキシシラン、カルボン酸、およびリン酸からなる群から選択される。

【0091】

本発明の別の好ましい実施態様において、デバイスの基板は、シリコンであり、Xはオレフィンである。

20

【0092】

なお別の好ましい実施態様において、コーティング（コーティングが存在しない場合は、基板）は、チタニアまたは酸化タンタルであり、そしてXは、リン酸である。

【0093】

他の実施態様において、基板表面（または基板表面上のコーティング）は、酸化チタン、酸化タンタル、酸化スズインジウム、酸化マグネシウム、またはアルミナのような金属から構成され、ここで、Xは、カルボン酸またはアルキルリン酸である。あるいは、デバイスの基板表面（または基板表面上のコーティング）が銅であるならば、Xは、必要に応じて、ヒドロキサム酸であり得る。

30

【0094】

本発明において使用される基板が、ポリマーであるならば、多くの場合において、銅コーティングのような基板上のコーティングが、デバイスに含まれる。次に、コーティングのための適切な官能基Xを、このデバイスにおける使用のために選択する。ポリマー基板を含む代替的な実施態様において、ポリマーの表面は、プラズマ修飾され、単層形成のために所望の表面の官能基を曝露し得る。例えば、EP 780423は、プラズマで曝露された表面上にアルケンX官能基を有する単層分子の使用を記載する。ポリマーから構成される本発明のデバイスのなお別の可能性は、単層が形成されるポリマーの表面が適切に官能化された前駆体分子の共重合に起因して官能化されるということである。

【0095】

別の可能性は、単層への取り込み前に、Xがフリーラジカル生成部分であり得るということである。この官能基は、単層が形成される表面が水素化されたシリコン表面である場合、特に適切である。可能なフリーラジカル生成部分としては、ジアシルペルオキシド、ペルオキシド、アゾ化合物であるが、これらに限定されない。あるいは、Xを用いる反応が、紫外線、赤外線、可視光線、またはマイクロ波照射によって達成される場合、非置換型アルケン、アルキン、シアノ化合物、およびイソニトリル化合物のような不飽和部分がXについて使用され得る。

40

【0096】

代替的な実施態様において、単層への取り込み前に、Xは、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ビニル基、スルホニル基、ホスホリル基、水素化シリコン基、またはアミノ基であ

50

り得る。

【0097】

単層の成分Yは、単層上への生物学的部分の結合の原因である。本発明の好ましい実施態様において、Y基は、生物学的部分（またはその親和性タグ）に対して高度に反応性（活性化）であるか、またはそのような活性化形態に容易に変換されるかのいずれかである。好ましい実施態様において、Yと生物学的部分との結合は、生物学的部分の生物学的活性に有害でない通常の生理学的条件下で容易に生じる。官能基Yは、生物学的部分（または存在する場合、その親和性タグ）と、共有結合または非共有結合のいずれかを形成し得る。好ましい実施態様において、官能基Yは、生物学的部分、またはその親和性タグとの共有結合を形成する。生物学的部分（親和性タグを有するかまたは有さない）のYへの付着の後、Yの化学的性質が変化し得ることが理解される。生物学的部分への付着の際に、Yは、有機薄膜から除去すられ得る。

10

【0098】

本発明の1つの実施態様において、Yは、生物学的部分への付着の前に、インサイチュで活性化される官能基である。このタイプの官能基の可能性としては、ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基、カルボニル基、メチル基、メチレン基、アルケン基、アルキン基、カーボネート基、ヨウ化アリール基、またはビニル基のような単純な部分が挙げられるがこれらに限定されない。これらの単純な官能基の活性化の適切な様式は、当業者に公知である。あるいは、Yは、生物学的部分を捕獲するのに十分に活性化される前に、光活性化を必要とする官能基を含み得る。

20

【0099】

本発明のデバイスの特定の好ましい実施態様において、Yは、単層形成と適合性の高度に反応性の官能部分であり、そして生物学的部分またはその親和性タグとの反応前にインサイチュでの活性化を必要としない。Yについてのそのような可能性としては、マレイミド、N-ヒドロキシスクシンイミド（Wagnerら、Biophysical Journal、1996、70：2052～2066）、ニトリロトリ酢酸（米国特許第5,620,850号）、活性化ヒドロキシル、ハロアセチル、ブロモアセチル、ヨードアセチル、活性化カルボキシル、ヒドラジド、エポキシ、アジリジン、スルホニルクロライド、トリフルオロメチルジアジリジン、ピリジルジスルフィド、N-アシルーイミダゾール、イミダゾールカルバメート、ビニルスルホン、スクシンイミジルカーボネート、アリールアジド、無水物、ジアゾアセテート、ベンゾフェノン、イソチオシアネート、イソシアネート、イミドエステル、フルオロベンゼン、およびビオチンが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0100】

図4は、基板3上の単層の一例を示す。この例において基板3は、ガラスを含む。この単層は、チオ反応性である、なぜなら、マレイミジル官能基Yを有するからである。

【0101】

図5は、シリコンである基板3上の単層の別の例を示す。しかし、この場合、金薄膜コーティング5は、基板3の表面を覆う。この実施態様において、チタン付着中間層6もまた使用され、コーティング5を基板3に付着させる。この単層は、アミノ反応性である。なぜなら、これは、N-ヒドロキシスクシンイミジル官能基Yを有するからである。

40

【0102】

代替的な実施態様において、Yは、単純な官能部分から選択される。可能なY官能基としては、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{COOR}$ 、 $-\text{RSR}$ 、 $-\text{PO}_4^{-3}$ 、 $-\text{OSO}_3^{-2}$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{SOO}-$ 、 $-\text{CONR}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NR}_2$ などが挙げられるがこれらに限定されない。

【0103】

本発明の単層分子は、必要に応じて、ある程度表面上で組織化し得る。すなわち、単層は、基板（またはコーティング）表面への、式 $\text{X}-\text{R}-\text{Y}$ の分子の化学吸着または物理吸着によって構築されることが必ずしも必要ではない。そのかわり、1つの実施態様において

50

、Xは、まず、単独で基板（またはコーティング）表面へ化学吸着または物理吸着され得る。次に、RまたはRの個々の成分のみでさえもが、適切な化学反応を介して、Xに付着し得る。表面に既に固定化されたX部分へのスペーサーRの添加の完了の際に、Yは、適切な共有結合を介して単層分子の末端に付着し得る。

【0104】

所定の反応部位で、全ての単層分子が同一である必要はない。いくつかは、混合した単層からなり得る。例えば、個々の反応部位の単層は、必要に応じて、少なくとも2つの異なるX-R-Y分子を含み得る。この第2のX-R-Y分子は、同一かまたは異なる生物学的部分を固定化し得る。さらに、反応部位の多くの単層分子X-R-Yは、任意の生物学的部分を付着し損なってもよい。

10

【0105】

本発明の別の代替物として、個々の反応部位の単層は、式X-R-V（Rは、スペーサーであり、Xは、Rを表面に結合させる官能基であり、Vは、生体分子の非特異的結合に抵抗する部分である）である第2の有機分子を含み得る。当業者は、Vの可能性がデバイスのその部位について選択された生物学的部分の性質に応じて変化することを認識する。例えば、デバイスの固定化された生物学的部分がタンパク質を含む場合、非特異的タンパク質結合に抵抗性の官能基Vが使用される。Vの性質は、使用されるタンパク質および溶液のタイプに、いくぶん依存する。例えば、Vは、ヒドロキシル部分、糖類部分、またはオリゴ／ポリエチレングリコール部分を含み得る（EP公報780423）。

【0106】

本発明のデバイスのなおさらなる代替物として、デバイスは、式X-R-V（Rは、スペーサーであり、Xは、Rを表面に結合させる官能基であり、Vは、生体分子の非特異的結合に抵抗する部分である）の分子の単層を含む、任意の生物学的部分を有さない少なくとも1つの非反応部位をさらに含み得る。この実施態様において、非反応部位は、式X-R-Yの分子の単層を含まない。

20

【0107】

単層分子の性質にかかわらず、いくつかの場合、単層の分子間に架橋を提供することが所望され得る。一般に、このことは、単層にさらなる安定性をもたらす。そのような単層の架橋方法は、当業者に公知である（Ullman, An Introduction to Ultrathin Organic Films: From Langmuir-Blodgett to Self-Assembly, Academic Press (1991)を参照のこと）。

30

【0108】

基板への生物学的部分の結合の促進に加え、有機薄膜を有する基板の官能化もまた、他の理由のために所望される。多くの生物学的部分および特にタンパク質は、表面界面において、その生物学的活性の破壊を受けやすい。タンパク質は、固体／液体界面において、変性および所望されない非特異的結合の両方をしやすい。低分子リガンドのような他の生物学的部分は、基板表面界面においてさほど問題のある相互作用を有さないかもしれないが、アッセイにおいて、低分子への生物学的結合パートナー（おそらくタンパク質）の接近の際に、不活化の問題が、非常に関係してくる。高度に整列された有機単層が、基板またはコーティングの表面を効果的に「一面に覆い」得、表面との接触から生物学的部分を保護し得る。これらの高度に整列された自己組織化単層が、本発明において好ましい。さらに、スペーサーRは、固定化された生物学的部分と表面との間の距離を作る。

40

【0109】

本発明のデバイスの反応部位上の有機薄膜の形成後に、生物学的部分を単層に固定化する。固定化する生物学的部分を含む溶液を、一体型の微小キャピラリーおよび入口／出口ポートを有する微小製作されたアダプター系を用いて溶液を分配することにより、生体反応性である、有機薄膜で覆われた微小デバイスの部位に曝露し得る。そのような分配機構は、例えば、デバイスの反応部位が、覆われた並行マイクロチャンネル中にある場合、適切である。あるいは、生物学的部分は、当該分野において周知であり、市販すらされている

50

キャピラリー分配系ベースのアレイヤー (arrayer) の1つを用いることにより、デバイスの覆われていない部位に移され得る。これらの分配系は、好ましくは、自動化され、そしてコンピュータに補助される。自動化キャピラリー系を含むマイクロアレイヤーの例についての記載および組み立て指示書は、<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/array.html> および <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html> において、インターネットで見出され得る。他のプリンティング技術の使用もまた、予想される。単層に生物学的部分を付着した後、未反応のY官能基は、好ましくは、デバイスの使用前にクエンチされる。

【0110】

本発明の代替的な実施態様において、デバイスの反応部位は、微小チャンネル内に含まれない。例えば、そのかわりに、本発明のデバイスの反応部位は、同時係属の米国特許出願「Arrays of Protein-Capture Agents and Methods of Use Thereof」、1999年7月14日出願、識別番号24406-0006、発明者Peter Wagner、Steffen Nock、Dana Ault-Riche、およびChristian Itin、ならびに「Arrays of Proteins and Methods of Use Thereof」、1999年7月14日出願、識別番号 (identifier) 24406-0004 P1、発明者Peter Wagner、Dana Ault-Riche、Steffen Nock、およびChristian Itin (この両方が、その全体が本明細書において参考として援用される) に記載されるいくつかのような反応部位のアレイを形成し得る。

【0111】

((c) 親和性タグおよび生物学的部分の固定化)

好ましい実施態様において、デバイスの反応部位は、有機薄膜上への生物学的部分の固定化を増強する親和性タグをさらに含む。生物学的部分を固定化する親和性タグの使用は、いくつかの利点を代表的に提供する。有機薄膜が上記のX-R-Y単層の場合、親和性タグは、有機薄膜上のYのような官能基との生物学的部分の増強した結合または反応をもたらし得る。この増強効果は、速度論的か、または熱力学的のいずれかであり得る。デバイスの反応部位において使用される親和性タグ/薄膜の組み合わせは、好ましくは、生物学的部分の安定性または機能に不都合な、激しい反応条件を必要としない様式において、生物学的部分の固定化を可能にする。ほとんどの実施態様において、水溶液の生物学的緩衝液中での有機薄膜への固定化が理想的である。

【0112】

親和性タグはまた、好ましくは、生物学的部分の指定された部位または位置に特異的な有機薄膜の固定化 (部位特異的固定化) を提供する。このことを生じるために、生物学的部分に対する親和性タグの付着は、部位特異的でなければならない。部位特異的固定化は、固定化された生物学的部分の活性部位または結合部位 (例えば、抗体の抗原結合部位) が、溶液中のリガンドに接近可能のままであることを確実にすることを助ける。親和性タグを介する固定化の他の利点は、複数の異なる生物学的部分について、共通の固定化戦略が使用されることを可能にするということである。

【0113】

親和性タグは、生物学的部分に対して、必要に応じて直接的に、共有結合または非共有結合のいずれかで付着する。しかし、代替的な実施態様において、親和性タグは、生物学的部分に共有結合または非共有結合のいずれかで付着するアダプターに対して、共有結合または非共有結合のいずれかで付着する。

【0114】

好ましい実施態様において、親和性タグは、少なくとも1つのアミノ酸を含む。親和性タグは、有機薄膜の官能基と反応性の少なくとも2つのアミノ酸を含むポリペプチドであり得る。あるいは、親和性タグは、有機薄膜と反応性の単一のアミノ酸であり得る。有機薄

膜と反応し得る可能なアミノ酸の例としては、システイン、リジン、ヒスチジン、アルギニン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トリプトファン、セリン、スレオニン、およびグルタミンが挙げられる。固定化される反応部位の生物学的部分が、タンパク質ならば、ポリペプチドまたはアミノ酸の親和性タグが、好ましくは、生物学的部分を有する融合タンパク質として発現される。アミノ酸親和性タグは、有機薄膜の官能基（例えば、自己組織化単層分子のY官能基）と相互作用し得る単一のアミノ酸または一連のアミノ酸のいずれかを提供する。アミノ酸親和性タグは、組換えタンパク質に容易に導入され得、単層のY官能基または代替的な有機薄膜上の官能基への共有結合による配向性固定化を促進する。

【0115】

親和性タグは、必要に応じて、ポリ（アミノ酸）タグを含み得る。ポリ（アミノ酸）タグは、単一のアミノ酸の約2～約100残基（必要に応じて他のアミノ酸によって中断される）を含むポリペプチドである。例えば、親和性タグは、ポリーシステイン、ポリリジン、ポリーアルギニン、またはポリーヒスチジンを含み得る。アミノ酸タグは、好ましくは、2～20残基の単一のアミノ酸（例えば、ヒスチジン、リジン、アルギニン、システイン、グルタミン、チロシン）、またはこれらの任意の組み合わせから構成される。好ましい実施態様に従って、1～20アミノ酸のアミノ酸タグは、少なくとも、チオエーテル結合のための1～10個のシステインを含むか；またはアミド結合のための1～10個のリジン；または隣接したジカルボニル基と結合するための1～10個のアルギニン、を含む。当業者は、適切な親和性タグと、有機薄膜上の所定の官能基とを、容易に対にし得る。

【0116】

アミノ酸タグの位置は、生物学的部分の活性部位または結合部位が、リガンド相互作用のために接近可能な位置のままである限り、タンパク質である反応部位の生物学的部分のアミノ末端またはカルボキシ末端、あるいは、その間のどこかに存在し得る。選択されたタンパク質に適合性の場合、タンパク質精製のために導入された親和性タグが、好ましくは、組換えタンパク質のC末端に位置し、タンパク質精製の間に全長タンパク質のみが単離されることを確実にする。例えば、インタクトな抗体が、反応部位において使用されるならば、抗体における親和性タグの付着点は、好ましくは、抗体のエフェクター（Fc）領域のC末端に位置する。scFvが反応部位で使用されるならば、親和性タグの付着点はまた、好ましくは、その分子のC末端に位置する。

【0117】

親和性タグはまた、1つ以上の非天然アミノ酸を含み得る。非天然アミノ酸は、終止コドン（すなわち、アンバー）を認識するサプレッサーtRNAを使用して導入され得る（Norenら、Science、1989、244：182～188；Ellmanら、Methods Enzym.、1991、202：301～336；Cloadら、Chem. Biol.、1996、3：1033～1038）。tRNAは、化学的にアミノアシル化されて、特定のカップリング化学（すなわち、ケトン修飾、光反応性基）との使用のための化学的に改変された（「非天然」）アミノ酸を含む。

【0118】

代替的な実施態様において、親和性タグは、限定されないがグルタチオンS-トランスフェラーゼ、抗体、アビジン、またはストレプトアビジンのようなインタクトなタンパク質を含み得る。

【0119】

当該分野において公知の他のタンパク質結合体化技術および固定化技術が、生物学的部分に親和性タグを付着する目的のために適応され得る。例えば、デバイスの代替的な実施態様において、親和性タグは、目的の生物学的部分に化学的に結合した、有機生物結合体であり得る。バイオチンまたは抗原は、生物学的部分に、化学的に架橋され得る。あるいは、チオールまたはアミンのような単純な官能部分を、デバイスの反応部位上に固定化される生物学的部分の表面に付着する化学的架橋剤が、使用され得る。あるいは、当業者に公知のタンパク質合成技術またはタンパク質連結技術を使用して、親和性タグを、タンパク質

である生物学的部分に付着し得る。例えば、インテイン (i n t e i n) 媒介性タンパク質連結を、必要に応じて使用して、親和性タグを生物学的部分に付着し得る (M a t h y s ら、Gene 231: 1~13、1999; Evans ら、Protein Science 7: 2256~2264、1998)。

【0120】

本発明の代替的な実施態様において、各反応部位の有機薄膜は、少なくとも部分的に、脂質単層または二重層を含み、そして親和性タグは、膜アンカーを含む。必要に応じて、脂質単層または二重層は、自己組織化単層上に固定化される。

【0121】

図6は、基板3上の単層7上に固定化された生物学的部分10を示す。親和性タグ8は、生物学的部分10を単層7に連結する。単層7は、基板3の表面から中間層6によって分離されたコーティング5の上に形成される。

10

【0122】

図7は、微小チャンネルアレイデバイスの1つの実施態様の、生体分子コーティングされた微小チャンネルの横断面図を示す。微小チャンネル1は、カバーガラス2で覆われる。微小チャンネルの壁は、第1に中間層6、次にコーティング5、次に有機単層7、そして最後に親和性タグ8を介して生物学的部分10でコーティングされた基板3から構成される。

【0123】

本発明の代替的な実施態様において、有機薄膜上に生物学的部分を固定化するために、親和性タグを用いない。そのかわりに、生物学的部分自体に本来備わっているアミノ酸、ヌクレオチド、または他の部分 (例えば、糖質部分) を使用して、タンパク質を、有機薄膜の反応基につなぎとめる。好ましい実施態様において、生物学的部分上の固定化部位の位置に関して、固定化は、部位特異的である。例えば、抗体のペプシン消化、その後の1価Fab'フラグメントの間のジスルフィドの選択的還元によって生成されるFab'フラグメントの重鎖部分のC末端領域上のスルフヒドリル基を、親和性タグとして使用し得る。あるいは、インタクトな抗体のFc部分の糖質部分を、温和な条件下で、単層上のヒドラジド活性化Y基との反応を介する単層上への抗体の固定化に適切なアルデヒド基まで酸化し得る。親和性タグを全く使用しないタンパク質の固定化の例は、Wagner ら、Biophys. J.、70: 2052~2066、1996に見出され得る。

20

30

【0124】

((d) アダプター)

本発明のデバイスの別の実施態様は、親和性タグを、固定化された生物学的部分に連結するアダプターを含む。アダプターの使用によってもたらされる、基板 (またはコーティング) 表面からのタンパク質のさらなる間隔は、特に有利である。なぜなら、いくつかの生物学的部分 (例えば、タンパク質) は、表面の不活化をしやすいたことが公知であるからである。必要に応じて、アダプターは、いくつかのさらなる利点もまたもたらし得る。例えば、アダプターは、親和性タグへの生物学的部分の付着の促進を助け得る。別の実施態様において、アダプターは、本デバイスとの特定の検出技術の使用を促進するのを助け得る。当業者は、所定の親和性タグについて適切なアダプターを選択し得る。例えば、もし親和性タグがストレプトアビジンならば、アダプターは、固定化されるタンパク質と化学的に結合したビオチン分子であり得る。

40

【0125】

好ましい実施態様において、アダプターは、タンパク質である。好ましい実施態様において、親和性タグ、アダプター、および生物学的部分はともに、融合タンパク質を構成する。そのような融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技術を使用して、容易に発現され得る。タンパク質であるアダプターは、目的のタンパク質の溶解度を増加し、そして基板またはコーティングの表面と目的のタンパク質との間の距離を増加するために、特に有用である。タンパク質であるアダプターの使用はまた、デバイスへの固定化前の、親和性結合によるタンパク質の調製スケールでの精製工程を促進することにおいて、非常に有用で

50

あり得る。タンパク質である可能なアダプターの例としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、マルトース結合タンパク質、キチン結合タンパク質、チオレドキシン、グリーン蛍光タンパク質 (GFP) が挙げられる。GFPはまた、表面結合の定量化のために使用され得る。デバイスの反応部位上に固定化された生物学的部分が、抗体またはFc領域を含む抗体フラグメントであるならば、アダプターは、必要に応じて、プロテインG、プロテインA、または組換えプロテインG/A (プロテインA由来の4つのFc結合ドメインおよびプロテインG由来の2つのFc結合ドメインを含む、Bacillusの非病原性形態から分泌される遺伝子融合産物) であり得る。

【0126】

図8は、親和性タグ8およびアダプター分子9の両方を介する、単層7上に固定化された生物学的部分10を示す。単層7は、基板3上のコーティング5上に形成されている。中間層6はまた、コーティング5と基板3との間に使用される。

10

【0127】

(e) 固定化された生物学的部分およびその調製)

本発明の1つの実施態様において、1つの反応部位の生物学的部分は、同一のデバイス上の第2の反応部位の生物学的部分と異なる。好ましい実施態様において、デバイスは、少なくとも10の異なる固定化された生物学的部分を含む。特に好ましい実施態様において、デバイスは、少なくとも100の異なる固定化された生物学的部分を含む。

【0128】

好ましい実施態様において、本発明のデバイスの部位に固定化された生物学的部分は、タンパク質である。タンパク質は、本発明の好ましい生物学的部分であるが、そのかわりに、固定化された生物学的部分は、必要に応じて、ポリヌクレオチド、ペプチド核酸、ホルモン、抗原、エピトープ、または生理学的機能を有するか、もしくは有することが疑われる任意の低有機分子を含み得る。

20

【0129】

本発明の別の実施態様において、1つの反応部位の生物学的部分は、別の反応部位の生物学的部分とは異なるが、2つの生物学的部分は、関連する。好ましい実施態様において、生物学的部分は、同一のタンパク質ファミリーのメンバーである。異なる生物学的部分は、機能的に関連し得るか、または機能的に関連することが少しは疑われ得る。しかし、別の実施態様において、生物学的部分の機能は、完全には既知でなくてもよい。これらの場合において、異なる生物学的部分は、構造または配列において類似性を共有し得るか、あるいは構造または配列において類似性を共有することが疑われ得るかのいずれかである。1つの実施態様において、異なる固定化された生物学的部分は、同一のタンパク質ファミリーの異なるメンバーの単なるフラグメントであり得る。別の実施態様において、生物学的部分は、公知のアイソザイムであり得る。

30

【0130】

タンパク質ファミリーの例としては、レセプターファミリー (例: 増殖因子レセプター、カテコールアミンレセプター、アミノ酸誘導体レセプター、サイトカインレセプター、レクチン)、リガンドファミリー (例: サイトカイン、セルピン)、酵素ファミリー (例: プロテアーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、ras様GTPase、ヒドロラーゼ)、および転写因子 (例: ステロイドホルモンレセプター、熱ショック転写因子、亜鉛フィンガータンパク質、ロイシンジッパータンパク質、ホメオドメインタンパク質) が挙げられるがこれらに限定されない。1つの実施態様において、異なる固定化タンパク質は、全て、HIVプロテアーゼまたはC型肝炎 (HCV) プロテアーゼである。本発明の他の実施態様において、本発明のデバイスの反応部位上の固定化タンパク質は、全て、ホルモンレセプター、神経伝達物質レセプター、細胞外マトリクスレセプター、抗体、DNA結合タンパク質、細胞内シグナル伝達モジュレーターおよびエフェクター、アポトーシス関連因子、DNA合成因子、DNA修復因子、DNA組換え因子、または細胞表面抗原である。

40

【0131】

代替的な好ましい実施態様において、本発明のデバイスの部位の生物学的部分は、タンパ

50

ク質捕獲剤である。別の好ましい実施態様において、デバイスの反応部位または微小チャンネルの生物学的部分は、全て、抗体または抗体フラグメントである。

【0132】

本発明のデバイスの代替的な実施態様において、デバイス上の異なる反応部位の生物学的部分は、お互いに同一である。

【0133】

デバイス上に固定化された生物学的部分は、当業者に公知の任意の種々の手段によって、産生され得る。

【0134】

本発明のデバイスの部位に対する固定化のための調製において、タンパク質である生物学的部分は、必要に応じて、インビボまたはインビトロのいずれかにおいて、組換えDNAより発現され得る。デバイス上に固定化されるタンパク質のcDNAは、発現ベクター（多くの例が市販されている）中にクローニングされ、そして発現に適切な生物の細胞中に導入される。広範囲の宿主細胞および発現系を使用して、デバイス上に固定化されるタンパク質を産生し得る。タンパク質のインビボ発現のために、cDNAを市販の発現ベクター（例えば、Qiagen、Novagen、Clontech）中にクローニングし、そして発現に適切な生物中に導入し得る。インビボ発現は、細菌（例えば、Escherichia coli）、植物（例えば、Nicotiana tabacum）、下等真核生物（例えば、Saccharomyces cerevisiae、Saccharomyces pombe、Pichia pastoris）、または高等真核生物（例えば、バキュロウイルス感染昆虫細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞）において、行われ得る。インビトロ発現のために、PCR増幅されたDNA配列を、組み合わせたインビトロ転写／翻訳系（例えば、T7 RNAポリメラーゼ発現株（好ましくは、プロテアーゼ欠損株）由来のEscherichia coli S30ライセート；コムギ胚ライセート；網状赤血球ライセート（Promega、Pharmacia、Panvera））において、直接使用する。最適な発現のための生物の選択は、所望される翻訳後修飾（すなわち、グリコシル化、脂質修飾）の程度に依存する。当業者は、固定化されるタンパク質および所望される適用に最も適切な宿主細胞のタイプを、容易に選択し得る。

【0135】

アミノ酸親和性タグおよびアダプタータンパク質配列をコードするDNA配列を、目的の遺伝子が、インフレーションで、親和性タグおよびアダプターをコードするDNA配列の5'または3'のいずれかにクローニングされ得るように、発現ベクター中に操作する。

【0136】

発現されるタンパク質を、市販の樹脂を使用して、親和性クロマトグラフィーによって精製する。

【0137】

好ましくは、関連するタンパク質のファミリーの産生は、クローニングからタンパク質発現およびタンパク質精製までの並行したプロセスを含む。目的のタンパク質についてのcDNAを、テンプレートとしてcDNAライブラリーまたはEST（expressed sequence tag）クローンを使用するPCRによって増幅する。次に、上記の任意のインビトロまたはインビボ発現系を、デバイス上に固定化されるタンパク質の発現に使用し得る。

【0138】

Escherichia coliベースのタンパク質発現は、一般に、活性のために広範な翻訳後修飾を必要としない可溶性タンパク質のためのえり抜きの方法である。膜タンパク質の細胞外ドメインまたは細胞内ドメインは、発現および精製のためにタンパク質アダプターに融合される。

【0139】

全体のアプローチは、96ウェルアッセイプレートを使用して行われ得る。PCR反応を、標準の条件化で行う。オリゴヌクレオチドプライマーは、発現ベクターへの容易なクロ

10

20

30

40

50

ーニングのために、独特の制限部位を含む。あるいは、TAクローニング系 (Clontech) を使用し得る。発現ベクターは、親和性タグおよびタンパク質アダプターのための配列を含む。PCR産物を発現ベクター (誘導性プロモーターの下) 中に連結し、適切なコンピテント *Escherichia coli* 株中に、カルシウム依存性形質転換によって導入する (株として含まれるもの: XL-blue、BL21、SG13009 (lon-))。形質転換された *Escherichia coli* 細胞を、プレティングし、個々のコロニーを96アレイブロックに移す。培養物を中期対数期まで増殖させ、発現のために誘導し、そして細胞を遠心分離によって収集する。細胞をリゾチウムを含む溶液に再懸濁し、そして迅速な凍結/融解サイクルまたは超音波処理によって膜を破壊する。細胞の破片を遠心分離によって取り除き、上清を96チューブアレイに移す。適切な親和性マトリクスを添加し、目的のタンパク質を結合させ、そして非特異的に結合したタンパク質を12~96ピンの吸上げデバイスおよび遠心分離を使用する洗浄工程の繰り返しによって取り除く。あるいは、磁気親和性ビーズおよび濾過デバイスを使用し得る (Qiagen)。タンパク質を溶出し、そして新たな96ウェルアレイに移す。タンパク質濃度を決定し、そして各タンパク質のアリコート、ニトロセルロースフィルター上にスポットし、親和性タグに対して指向する抗体を使用するウェスタン分析によって確認する。各サンプルの精製を、SDS-PAGEおよび銀染色または質量分析計によって評価する。タンパク質を素早く凍結し、そして-80℃で保存する。

10

【0140】

Saccharomyces cerevisiae は、タンパク質のコアのグリコシル化および脂質修飾を可能にする。*Escherichia coli* についての上記のアプローチを、形質転換および細胞溶解についてのわずかな改変を用いて使用し得る。*Saccharomyces cerevisiae* の形質転換は、酢酸リチウムにより、そして細胞溶解は、細胞壁のリティカーゼ (lyticase) 消化とその後の凍結-融解、超音波処理によるか、またはガラスビーズ抽出によるかのいずれかである。翻訳後修飾の改変は、異なる酵母株によって得られ得る (すなわち、*Saccharomyces pombe*、*Pichia pastoris*)。

20

【0141】

バキュロウイルス系または哺乳動物細胞の利点は、得られ得る豊富な翻訳後修飾である。バキュロ系は、ウイルスのクローニング、高力価ストックを得ることおよび液体昆虫細胞懸濁液の感染を必要とする (細胞は、SF9、SF21である)。哺乳動物細胞ベースの発現は、トランスフェクションおよび細胞株のクローニングを必要とする。可溶性タンパク質は、培地から収集されるが、細胞内タンパク質または膜結合タンパク質は、細胞の溶解 (界面活性剤の可溶化、凍結-融解のいずれか) を必要とする。次に、タンパク質は、*Escherichia coli* について記載されたものと類似の手順で精製され得る。

30

【0142】

インビトロ翻訳のためのえり抜きの系は、プロテアーゼ欠損およびT7 RNAポリメラーゼ過剰発現株より得られる *Escherichia coli* ライセートである。*Escherichia coli* ライセートは、効果的なタンパク質発現 (30~50 µg/ml ライセート) を提供する。全体のプロセスを、96ウェルアレイにおいて行う。目的の遺伝子を、T7 RNAポリメラーゼプロモーターおよび結合部位、ならびに親和性タグをコードする配列を含有する遺伝子特異的配列を含むオリゴヌクレオチドを使用するPCRによって増幅する。あるいは、PCRによって、アダプタータンパク質を、目的の遺伝子に融合し得る。増幅されたDNAを、短時間の分析のために、予めのクローニングをせずに、*Escherichia coli* ライセート中で直接、転写および翻訳し得る。次に、タンパク質を、親和性マトリクスへの結合によって単離し、そして上記のようにプロセスする。

40

【0143】

使用され得る代替的な系としては、コムギ胚抽出物および網状赤血球抽出物が挙げられる

50

。膜タンパク質のインビトロ合成および／または翻訳後修飾タンパク質は、ミクロソームと組み合わせた網状赤血球ライセートを必要とする。

【0144】

本発明の1つの好ましい実施態様において、デバイスの部位に固定化されたタンパク質は、抗体である。必要に応じて、固定化されたタンパク質は、モノクローナル抗体であり得る。特定のタンパク質標的に対するモノクローナル抗体の産生は、標準的なハイブリドーマ技術を使用して、慣用的である。実際に、大多数のモノクローナル抗体が、市販されている。

【0145】

細胞融合によって産生されるか、または連続した細胞株から産生される抗体または抗体フラグメントを得るための代替物として、抗体部分が、バクテリオファージ中で発現される。そのような抗体ファージディスプレイ技術は、当業者にとって周知である。バクテリオファージ発現系は、重鎖配列および軽鎖配列のランダムな組み合わせを可能にし、それによって、所望の抗原に対して選択され得る抗体配列のライブラリーを作製する。発現系は、バクテリオファージ入ベースまたはより好ましくは、繊維状ファージベースであり得る。バクテリオファージ発現系を使用して、F a bフラグメント、V_H-V_L対を安定化するために操作された分子間ジスルフィド結合を有するF v (d s F v)、s c F v、またはダイアボディーフラグメントを発現し得る。

10

【0146】

ファージディスプレイライブラリーの抗体遺伝子は、免疫前のドナー由来であり得る。例えば、ファージディスプレイライブラリーは、タンパク質の混合物（例えば、ヒトT細胞のライセート）で以前に免疫されたマウスの脾臓より調製されたディスプレイライブラリーであり得る。免疫は、必要に応じて、特定の一群のタンパク質（例えば、ヒトT細胞において見出されるタンパク質）に対して反応性な、より多数の組換え抗体を含むようにライブラリーを片寄せさせるために使用され得る。あるいは、ライブラリー抗体は、天然または合成ライブラリー由来であり得る。天然ライブラリーは、外来の抗原と接触していないマウスの脾臓から構築されている。合成ライブラリーにおいて、抗体配列の部分（代表的には相補性決定領域（C D R）ループ）が、変異誘発またはランダム化されている。

20

【0147】

ファージディスプレイ方法は、抗体遺伝子ライブラリーの、ファージゲノム中への、ファージコートタンパク質の1つをコードする遺伝子（p I I I、p V I、またはp V I I I）との融合物としてのバッチクロニングを含む。p I I Iファージタンパク質遺伝子が、好ましい。融合産物が発現される場合、融合産物は、成熟ファージコートに組み込まれる。結果として、抗体は、ファージ表面に融合物としてディスプレイされ、そして結合のために利用可能であり、従って、標的タンパク質における選択のために利用可能である。一旦、ファージ粒子が標的タンパク質に対する所望の親和性を有する抗体ーコートタンパク質融合物を有するとして選択されると、ディスプレイされた抗体に対応するファージ粒子内の遺伝物質を、増幅および配列決定し得るか、またはそうでなければ分析し得る。

30

【0148】

好ましい実施態様において、ファージミドを、ファージディスプレイ手順において、発現ベクターとして使用する。ファージミドは、適切なクロニング部位を有する遺伝子I I Iおよびファージパッケージングシグナルを保有し、そして宿主複製起点およびファージ複製起点の両方を含む、小さなプラスミドベクターである。遺伝子I I I融合物は、ファージミドによってコードされている唯一のファージ遺伝子であるので、ファージミドは、完全なファージを産生し得ない。生存可能なファージは、ファージミドを含む細胞に、欠損した複製起点を有するヘルパーファージを感染させることにより、産生され得る。全てのヘルパーファージタンパク質および遺伝子I I Iーr A b融合物を含むハイブリッドファージが生じる。生じたファージは、ファージミドDNAのみを含む。

40

【0149】

本発明の好ましい実施態様において、本発明のデバイスのための抗体フラグメントを調製

50

するファージディスプレイ方法において使用される組換え抗体が、ファージミドベクター上のバクテリオファージ遺伝子 I I I タンパク質との遺伝子融合物として発現される。例えば、単鎖 F_v フラグメントをコードする抗体の可変領域を、ファージミド上の遺伝子 I I I タンパク質のアミノ末端と融合し得る。あるいは、抗体フラグメント配列を、最初の 2 つの N 末端ドメインを欠く短縮型 p I I I 配列のアミノ末端と融合し得る。抗体-p I I I 融合物をコードするファージミド DNA は、好ましくは、全てのファージ構造タンパク質を供給するヘルパーファージ（例えば、M13KO7 または VCS-M13）を使用して、ファージ粒子中にパッケージングされる。

【0150】

Fab フラグメントをファージ上にディスプレイするために、軽鎖または重鎖（Fd）のいずれかが、その C 末端を介して p I I I と融合する。パートナーの鎖を、p I I I と融合せずに発現し、その結果、両方の鎖が、インタクトな Fab フラグメントを形成するように会合し得る。

【0151】

標的タンパク質に結合しないファージ粒子から、標的タンパク質に結合するファージ粒子を分離する任意の選択方法を、使用し得る。選択方法はまた、選択されたファージの回収を可能にしなければならない。最も代表的には、ファージ粒子を、固定化された標的タンパク質において、選択する。当業者に公知であるいくつかのファージ選択の戦略としては、以下が挙げられる：固定化抗原でのパニング；特異的溶出を使用する、固定化抗原でのパニング；ビオチン化抗原の使用、次にストレプトアビジン樹脂、またはストレプトアビジンでコートした磁気ビーズにおける選択；親和性精製；ウェスタンブロットでの選択（未知の抗原または精製することが困難な抗原について特に有用である）；インビボ選択；および草分け的な選択。選択されたファージ粒子が選択の回の間で増幅される場合、選択の複数の反復する回が、必要に応じて、行われ得る。

【0152】

溶出技術は、選択された選択プロセスに依存して変化するが、代表的な溶出技術としては、以下の溶液の 1 つを用いる洗浄が挙げられる：HCl またはグリシン緩衝液；トリエチルアミンのような塩基性溶液；カオトロピック剤；イオン強度を増加する溶液；またはビオチンがジスルフィド結合によって抗原に結合する場合は DTT。溶出の他のタイプの方法としては、抗体と遺伝子 I I I との間に操作されたプロテアーゼ部位の酵素的切断、または過剰の抗原または抗原に対する過剰の抗体を用いる結合の競合が挙げられる。

【0153】

タンパク質がファージミドベクターまたは代わりのベクター中へ取り込まれるのに適切なサイズであり、そしてバクテリオファージコートタンパク質との融合物として発現する限り、本発明のデバイスの調製において、抗体フラグメントについて使用されるものと類似のファージディスプレイ法を、本発明のデバイス上に固定化する他のタンパク質について使用し得る。非抗体ライブラリーを使用するファージディスプレイ技術は、代表的には、可変領域を支持する宿主の足場構造タンパク質のあるタイプを利用する。例えば、 β -シートタンパク質、 α -ヘリックスハンドル（handle）タンパク質、および他の高度に束縛されたタンパク質構造が、宿主の足場として使用されている。

【0154】

代替的なディスプレイベクターもまた使用して、デバイスの部位に固定化されたタンパク質を産生し得る。ポリソーム（安定なタンパク質-リボソーム-mRNA 複合体）を使用して、組換え抗体フラグメントまたは他のタンパク質のためのディスプレイベヒクルとして、生バクテリオファージの替わりとして使用し得る（Hanes および Pluckthum、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、94:4937~4942、1997）。ポリソームは、新たに合成されそして正確に折り畳まれたタンパク質の、リボソームからの発光を妨げることにより形成される。ポリソームライブラリーの選択は、抗体フラグメントまたはポリソームにおいてディスプレイされる他のタンパク質の、標的タンパク質に対する結合に基づく。次に、ディスプレイされたタンパク質をコードする mR

NA、または所望の親和性を有する抗体を、単離する。より大きなライブラリーは、ファージディスプレイよりも、ポリソームディスプレイを用いて、使用され得る。

【0155】

((e) デバイスの使用)

本発明のデバイスの使用方法が、本発明の他の局面によって提供される。本発明のデバイスは、高スループット薬物スクリーニングのような薬物開発における使用のために、特に適切である。他の使用としては、医学的診断およびバイオセンサーが挙げられる。本発明のデバイスはまた、機能的プロテオミクスのために有用である。各々の場合において、複数の生物学的部分または薬物候補または被分析物を、可能性のある生物学的相互作用について、並行してスクリーニングし得る。

10

【0156】

本発明の1つの局面において、複数の異なる生物学的部分を、液体サンプルの成分と相互作用するその能力について並行してスクリーニングする方法が提供される。この方法は、液体サンプルを本発明のデバイスの1つの反応部位（異なる生物学的部分の各々がデバイスの異なる部位に固定化されている）に送達する工程、次に、その成分と、各反応部位において固定化された生物学的部分との相互作用を検出する工程を包含する。好ましい実施態様において、反応部位の各々は、デバイスの他の反応部位の微小チャンネルに、並行して向けられた微小チャンネル中にあり、ここで、この微小チャンネルが、基板中または基板上に微小作製される。

【0157】

20

本発明のデバイスは、酵素の触媒反応、結合事象のアッセイに適切であり、または膜タンパク質による脂質二重層を通過する移動のアッセイにさえも適切である。本発明が指向する可能な相互作用としては、抗体／抗原、抗体／ハプテン、酵素／基質、キャリアタンパク質／基質、レクチン／糖質、レセプター／ホルモン、レセプター／エフェクター、タンパク質／DNA、タンパク質／RNA、核酸の相補鎖、リプレッサー／インデューサーなどが挙げられるが、これらに限定されない。アッセイされる相互作用は、可能性のある薬物候補と複数の可能性のある薬物標的との間であり得る。例えば、合成有機化合物を、固定化されたレセプターのファミリーに対するインヒビターとして作用するその能力について試験し得る。このデバイスはまた、一般的なタンパク質－タンパク質相互作用についてのアッセイのために非常に適切である

30

本発明の1つの実施態様は、液体サンプルの成分と反応するその能力について、複数の生物学的部分を並行してスクリーニングする方法を提供し、この方法は、液体サンプルを本発明のデバイスの反応部位に送達する工程を包含し、ここで、異なる生物学的部分の各々が、デバイスの異なる反応部位に固定化され、各反応部位に固定化された生物学的部分とその成分との反応産物の形成を、直接的または間接的のいずれかで検出する。

【0158】

本発明の別の実施態様は、複数の生物学的部分を、液体サンプルの成分と結合するその能力について、並行してスクリーニングするための方法を提供する。この方法は、以下の工程を包含する：液体サンプルを、本発明のデバイスの反応部位に送達する工程であって、ここで異なる生物学的部分の各々が、デバイスの異なる反応部位に固定化される、工程；必要に応じて、反応部位の洗浄が、サンプルの非結合成分または非特異的結合成分を、反応部位から取り除く；および各反応部位で保持されたこの成分の存在または量を、直接的または間接的のいずれかで検出する工程。

40

【0159】

複数の生物学的部分を、液体サンプルの成分に結合するその能力についてスクリーニングするための代替的な方法は、第1に生物学的部分の既知のリガンドを、液体サンプルに添加する工程、次に、本発明のデバイスの反応部位に液体サンプルを送達する工程を包含し、ここで、異なる生物学的部分の各々が、デバイスの異なる部位に固定化される。必要に応じての次の工程として、既知のリガンドおよび成分（またはサンプル由来の別の成分）の非結合分子または非特異的結合分子をデバイスの反応部位から溶出するために、反応部

50

位を、公知のリガンドまたは成分のいずれかを含まない液体で洗浄し得る。この方法の最終工程は、各反応部位に保持された既知のリガンドの存在または量を検出する工程、および各反応部位での既知のリガンドの保持を、成分が存在しない同一の反応部位での既知のリガンドの保持と比較する工程を包含する。

【0160】

広範な検出方法が、本発明に適用可能である。所望される場合、検出は、定量的または定性的のいずれかであり得る。本発明のデバイスは、光学的検出法（例えば、可視光範囲または赤外光範囲の吸収、化学発光、および蛍光（寿命時間、偏光、蛍光相関分光法（FCS）、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET））とインターフェースで連結され得る。さらに、光導波路（PCT公開WO96/26432および米国特許第5,677,196号）、表面プラズモン共鳴、表面荷電センサー、および表面力センサーに基づくような他の様式の検出が、本発明の多くの実施態様と適合可能である。あるいは、Brewster角顕微鏡（Brewster angle microscopy）（Schaafら、Langmuir、3:1131~1135（1987））および楕円偏光法（米国特許第5,141,311号および同5,116,121号；Kim、Macromolecules、22:2682~2685（1984））を、本発明のデバイスと組み合わせて使用し得る。クリスタルクォーツマイクロバランスおよび脱着過程（例えば、米国特許第5,719,060号を参照のこと）は、本発明のデバイスの少なくともいくつかの実施態様に適切な、なお他の代替的な検出手段を提供する。本発明のいくつかのデバイスおよび種々の非標識検出原理に適合可能な光学バイオセンサーシステムの例（表面プラズモン共鳴、全反射蛍光（total internal reflection fluorescence）（TIRF）、Brewster角顕微鏡（Brewster angle microscopy）、光導波路光モード（light mode）分光法（OWLS）、表面電荷測定、および楕円偏光法を含む）が、米国特許第5,313,264号に見出され得る。

【0161】

図9は、微小チャンネルアレイの固定化された生物学的部分と、被分析物との相互作用をモニターするために使用され得る蛍光検出ユニットの1つのタイプの模式図を示す。図示された検出ユニットにおいて、微小チャンネルアレイデバイス21は、ベースプレート20の上に位置する。100Wの水銀アーク灯25からの光は、励起フィルター24を通過して、ビームスプリッター23上に向けられる。次に、光は、レンズ22（例えば、Micro Nikkor 55mm 1:2.8レンズ）を通過して、デバイス21の微小チャンネルに向けられる。デバイスからの蛍光発光光は、レンズ22およびビームスプリッター23を通過して、戻る。発光フィルター26をも通過した後、発光光は、冷却されたCCDカメラ27（例えば、Slowscan TE/CCD-1024SF&SB（Princeton Instruments））によって受け取られる。このカメラは、作動可能にCPU28と連結され、次に、VCR29およびモニター30と作動可能に連結される。

【0162】

薬物候補の特異性を試験するために、タンパク質ファミリーの複数のメンバーとの相互作用を測定する。タンパク質ファミリーのメンバーを、微小チャンネル中に別々に固定化する。次に、タンパク質活性（例えば、結合、触媒変換、または脂質二重層を通過するリガンドの移動）を妨げる薬物候補の能力を、測定する。

【0163】

別の実施例において、タンパク質結合事象を妨げる薬物候補の能力を試験するために、薬物候補、および化学的に結合した蛍光部分によって標識される、タンパク質ファミリーのメンバーの既知のリガンドを、デバイスの各微小チャンネル中の液体サンプル中に送達する。短時間のインキュベーションの後、微小チャンネルを薬物候補およびリガンドの両方を含まない液体で流す。次に、微小チャンネルの各々に残った蛍光リガンドの量（およびその微小チャンネルのタンパク質分子に結合したと推定される蛍光リガンドの量）を、透

明または半透明のカバーまたは基板のいずれかを通して、反応部位への光学的アクセスを有する蛍光検出器／蛍光定量器を使用することにより、検出し得る。

【0164】

薬物候補がリガンドの触媒的変換を妨げる能力を試験するために、薬物候補およびリガンドを、液体サンプル中の微小チャンネル中へ送達し、そして色素生産特性または蛍光特性を、透明または半透明のカバーまたは基板のいずれかを通して、反応部位への光学的アクセスを有する光学検出器／光学定量器を使用することにより検出し得る。

【0165】

より一般的には、本発明は、薬物候補がタンパク質ファミリーの複数のメンバーとその基質との反応を阻害する能力をスクリーニングする方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：液体サンプル中で薬物候補と基質を組み合わせる工程；液体サンプルを、本発明のデバイスの反応部位に送達する工程であって、ここで、タンパク質ファミリーの異なるメンバーの各々が、異なる反応部位に固定化される、工程；そして直接的または間接的のいずれかで、各反応部位での産物形成の阻害を検出する工程。

10

【0166】

薬物候補が脂質二重層を通過するリガンドの移動を妨げる能力を試験するために、薬物候補およびリガンドを、液体サンプル中で、各微小チャンネルへ送達する。短時間のインキュベーションの後、微小チャンネルを、リガンドを含まない液体で流し、そして脂質二重層を通るリガンドの通過の任意の阻害を、蛍光、吸収または電気的な荷電の変化を測定することによって決定する。

20

【0167】

本発明の代替的な実施態様において、本発明のデバイスを使用して、各々が別々の液体サンプル中にある複数の成分を、生物学的部分と相互作用するその能力について、スクリーニングする。この実施態様の方法は、第1に、異なる液体サンプルの各々を、本発明のデバイスの別々の反応部位に送達する工程であって、ここで、デバイスの別々の反応部位がそれぞれ、固定化された生物学的部分を含む工程、を包含する。次の工程は、直接的または間接的のいずれかで、各反応部位において固定化された生物学的部分と、その反応部位に送達された成分との相互作用を検出する工程を包含する。好ましくは、反応部位の各々は、デバイスの他の反応部位の微小チャンネルに対して、並行に向けられた微小チャンネル中にあり、ここで、この微小チャンネルは、基板中または基板上に微小作製される。上記のように、本方法によってアッセイされる相互作用は、生物学的部分について通常観察される任意のタイプの相互作用（酵素の触媒反応、結合事象または、膜タンパク質による、脂質二重層を通過する移動）であり得る。

30

【0168】

本発明の1つの実施態様は、複数の異なるタンパク質を、特定のタンパク質と相互作用するその能力について、並行してスクリーニングする方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：各々が少なくとも1つの異なるタンパク質を含有する異なる液体サンプルを、本発明のデバイスの別々の反応部位に送達する工程であって、ここで特定のタンパク質が、別々の反応部位の各々に固定化される、工程；および各反応部位における、特定のタンパク質と異なるタンパク質との相互作用を、直接的または間接的のいずれかで検出する工程。

40

【0169】

本発明の代替的な実施態様は、複数の薬物候補を、酵素とその基質との反応を阻害するその能力について、並行してスクリーニングする方法を提供する。この方法は、第1に、酵素基質を複数の液体サンプルに添加する工程を包含し、ここで液体サンプルの各々が少なくとも1つの目的の薬物候補を含む。次に、液体サンプルの各々を、本発明のデバイスの反応部位（好ましくは微小チャンネルアレイ）に送達する。この実施態様において、デバイスの各反応部位が、固定化された酵素を特徴付ける。最後に、各反応部位での産物形成の阻害（液体中の薬物候補の存在に起因する）をモニターする。

【0170】

50

本発明の別の局面は、複数の結合候補物を、生物学的部分に結合するそれらの能力について、並行してスクリーニングするための方法を提供する。この方法は、第1に、各々が少なくとも1つの結合候補物を含有する異なる液体サンプルを、本発明のデバイスの反応部位に送達する工程であって、ここで別々の反応部位の各々が、固定化された生物学的部位を含む、工程を包含する。必要に応じての次の工程は、非結合の結合候補物または非特異的結合した結合候補物を溶出するための、結合候補物を含まない液体を用いる反応部位の洗浄工程、および各反応部位で保持されたその結合候補物の存在または量を、直接的または間接的に検出する工程を包含する。

【0171】

本発明によってまた提供される、複数の結合候補物を生物学的部分に結合するそれらの能力について並行してスクリーニングするための代替的な方法は、以下を包含する：生物学的部分の既知のリガンドを、複数の液体サンプルに添加する工程であって、液体サンプルの各々が、少なくとも1つの結合候補物を含む、工程；本発明のデバイスの反応部位の各々に異なる液体サンプルを送達する工程であって、ここで、デバイスの別々の反応部位の各々が、固定化された生物学的部分を含む、工程；必要に応じて、反応部位の各々から非結合の分子を溶出するために、既知のリガンドも結合候補物も含まない液体でその反応部位を洗浄する工程；各反応部位で保持された既知のリガンドの存在を検出する工程；および、結合候補物の存在下の既知のリガンドの保持を、結合候補物が存在しない場合の既知のリガンドの保持と比較する工程。

【0172】

本発明はまた、複数の異なるタンパク質をその基質と対形成させる方法を提供する。この方法において、既知の酵素ファミリーの基質を含有する液体サンプルを、第1に、本発明のデバイスの反応部位に送達する工程であって、ここでデバイスの反応部位の各々が、その部位に固定化された異なるタンパク質を含有する。次に、任意の適切な検出手段を使用して、各反応部位において、基質とタンパク質との反応によって形成された産物の存在を、直接的または間接的に検出し得る。本方法は、機能が未知である多数のタンパク質の機能の同定のために有用である。

【0173】

本発明の別の局面において、複数の異なるタンパク質をそれらのリガンドと対形成させる方法が提供される。この方法は、既知のタンパク質のファミリーのリガンドを含む液体サンプルを、本発明のデバイスの反応部位に送達する工程であって、ここで、デバイスの各反応部位は、異なる固定化タンパク質を含む、工程；必要に応じて、デバイスの反応部位から非結合のリガンドを取り除くために、リガンドを含まない液体でその反応部位を洗浄する工程；および、各反応部位で保持されたリガンドの存在または量を、直接的または間接的にいずれかで検出する工程、を包含する。この方法は、未知の機能のタンパク質が、どのタンパク質ファミリーに属し得るのか同定するために有用である。

【0174】

本発明のなお別の実施態様は、液体サンプル中で、複数の被分析物の存在を検出する方法を提供する。この方法の工程は、液体サンプルを、本発明のデバイスの反応部位に送達する工程であって、ここで少なくとも1つの被分析物と反応する生物学的部分が、反応部位の各々に固定化される工程、および各反応部位における、被分析物と固定化生物学的部分との相互作用を検出する工程、を包含する。

【0175】

液体サンプル中で、複数の被分析物の存在を検出する別の方法は、以下の工程を包含する：液体サンプルを、本発明のデバイスの反応部位に送達する工程であって、ここで少なくとも1つの被分析物と結合する生物学的部分が、反応部位の各々に固定化される工程；必要に応じて、各反応部位から非結合の被分析物または非特異的結合の被分析物を取り除くために、被分析物を含まない液体でその反応部位を洗浄する工程；および各反応部位において保持された被分析物の存在または量を、直接的または間接的にいずれかで検出する工程。

【0176】

複数の被分析物の並行した検出方法は、種々の診断での使用に適用可能である。被分析物は、必要に応じて、その存在または量が生物における疾患状態の指標である、体液中のまたは細胞抽出物中の化合物であり得る。1つの例において、被分析物の起源は、生物に感染する病原体であり得る。あるいは、被分析物は、生物中の細胞または細胞集団の発現産物であり得る。そのような方法は、生物の組織における腫瘍または他の疾患状態の評価に有用であり得る。

【0177】

(c) 実施例)

以下の特定の実施例は、本発明を説明することを意図されるが、特許請求の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0178】

(実施例1. バルクマイクロマシン加工による、微小チャンネルアレイの作製)

好ましい実施態様において、微小チャンネルアレイは、標準的なマイクロステオリソグラフィ (microstereolithography) を介して、デバイス材料中に作製される (バルクマイクロマシン加工)。代替的な技術としては、表面マイクロマシン加工およびLIGA (注入成形) が挙げられる。通常、コンピュータで補助された設計パターン (最終的なチャンネルの幾何学を反映する) を、標準的な技術を使用してフォトマスクに転写し、次に、これを使用して、フォトレジストでコートされたシリコンウェーハ上にこのパターンを転写する。

【0179】

代表的な例において、側面の大きさが $50 \times 15 \text{ mm}$ であるデバイス (「チップ」) は、 $250 \mu\text{m}$ の間隔で隔たれた、一連の100の並行チャンネルを含む。各チャンネルは、 5 mm 長であり、そして $100 \times 100 \mu\text{m}$ の横断面を有する。チャンネル容量は、 50 nl である。 $4''$ の直径のSi (100) ウェーハ (Virginia Semiconductor)。Si (100) ウェーハを、まず濃 H_2SO_4 : 30% H_2O_2 の3:1混合液で洗浄し (90°C 、10分)、脱イオン水 ($18 \text{ M}\Omega\text{cm}$) でリンスし、最後に1%のHF水溶液で不動態化し、 150°C で30分間表面を焼く。ウェーハを陽性のフォトレジストとしてのポリメチルメタクリレートPMMAでスピン塗布した後、25分間 90°C で前焼き (prebake) し、Karl Sussコンタクトプリンターを使用して露光し、標準的なプロトコールに従って現像する。次に、ウェーハを乾燥して、 110°C で25分間、後焼き (postbake) する。ディープシリコンリアクティブイオンエッチング法 (RIE) を使用して、バルク材料中にチャンネル造作を異等方性ドライエッチングし、シリコン中に高アスペクト比の垂直サイドウォール造作を生じる (エッチング速度 $2.5 \mu\text{m}/\text{分}$)。次の工程において、ウェーハを、 20 nm 厚のチタン層で下塗りし、次に 200 nm 厚の金層を下塗りし、両方の層を電子ビームエバポレーション ($5 \text{ \AA}/\text{秒}$) を用いて沈着する。レジストのストリッピング (アセトン) および短時間のプラズマ処理の後、低温場アシストガラスーシリコン結合形成を使用して、 $50 \mu\text{m}$ の薄いカバーガラス (pyrex 7740) でデバイスを覆い、そしてシールし、入口および出口を有する多チャンネルのアレイを生じる。次に、金コートしたチャンネル壁を、さらに化学的に修飾し、所望の生物反応特性および生体適合特性を達成し得る (下記の実施例3を参照のこと)。

【0180】

これらの手順のさらなる詳述は、以下の参考文献において見出され得る: Madou、Fundamentals of Microfabrication、CRC Press (1997); WolfおよびTauber、Silicon Processing for the VLSI Era、第1巻: Process Technology、Lattice Press、(1986); ならびにThomsonら、Introduction to Microlithography、American Chemical Society、(1994)。

【0181】

(実施例2. 犠牲マイクロマシン加工による微小チャンネルアレイの作製)

犠牲マイクロマシン加工において、バルク材料は、実質的に処理されないままである。他の材料の種々の厚みの層を、物理的蒸着(PVD)、プラズマ増強化学蒸着(PECVD)またはスピン塗布のいずれかによって構築し、そして選択的に、後に残すか、またはその後のプロセス工程によって除去する。従って、生じるチャンネル壁は、チャンネルの底部とは化学的に異なり、そしてレジスト材料が微小デバイスの一部として残る。犠牲マイクロマシン加工のための代表的なレジスト材料は、窒化シリコン(Si_3N_4)、ポリシリコン、熱成長酸化シリコンならびにエポキシベースのSU-8およびポリイミドのような有機レジストであり、直線状の側壁を有する高アスペクト比の造作の形成を可能とする。

10

【0182】

代表的な例において、側面の大きさが $50 \times 15 \text{ mm}$ であるデバイス(「チップ」)は、 $250 \mu\text{m}$ の間隔で隔たれた、一連の100の並行チャンネルを含む。各チャンネルは、 5 mm 長であり、そして $100 \times 100 \mu\text{m}$ の横断面を有する。チャンネル容量は、 50 nl である。 $4''$ の直径のSi(100)ウェーハ(Virginia Semiconductor)。Si(100)ウェーハを、まず濃 $\text{H}_2\text{SO}_4:30\% \text{ H}_2\text{O}_2$ の3:1混合液で洗浄し(90°C 、10分)、脱イオン水($18 \text{ M}\Omega\text{cm}$)でリンスし、最後に1%のHF水溶液で不動態化し、 150°C で30分間表面を焼く。EPON SU-8を用いるウェーハのスピン塗布は、上記の実施例1と類似の露光される $100 \mu\text{m}$ 厚の膜を生じ、プロピレングリコールモノメチルエーテルアセテート(PGMEA)溶液中で現像し、高アスペクト比の垂直側壁を有する多チャンネル構造を生じる。金属膜の沈着(20 nm Ti 、 200 nm Au)を、上記の実施例1に記載のように行う。このデバイスを、 $50 \mu\text{m}$ の薄い接着性カバーガラスで覆う。次に、金コートしたチャンネル壁を、さらに化学的修飾して、所望の生物反応特性および生体適合特性を達成し得る(下記の実施例3を参照のこと)。

20

【0183】

犠牲マイクロマシン加工プロセスさらなる詳述は、Lorenzら、Proceedings of MME '96(Micro Mechanics Europe)、Barcelona, Spain、1996年10月、32~35頁において見い出され得る。

【0184】

(実施例3. アミノ反応性単層分子の合成(Wagnerら、Biophys. J. 1996、70:2052~2066に概説される手順に従う))

(一般)

^1H -および ^{13}C -NMRスペクトルを、Bruker器械において記録する($100 \sim 400 \text{ MHz}$)。化学シフト(δ)を、内部標準($(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ 、 $\delta=0.00$ (^1H -および ^{13}C -NMR))に対する相対的なppmにおいてレポートする。FAB-質量スペクトルを、VG-SABSEQ器械(Cs^+ 、 20 keV)で記録する。透過赤外線スペクトルを、FTIR Perkin-Elmer 1600シリーズ器械において、KBrの散乱として得る。薄層クロマトグラフィー(TLC)を、予めコートしたシリカゲル60 F254プレート(MERCK, Darmstadt, FRG)上で行い、そして NH_3 気相下で、 Cl_2 /トルイジン、 PdCl_2 およびUV検出を用いて、検出を行う。中圧液体クロマトグラフィー(MPLC)を、Merckからのシリカゲル60(粒子サイズ $15 \sim 40 \mu\text{m}$)を充填したBuechiカラム($460 \times 36 \text{ mm}$; BUECHI, Flawil, Switzerland)を用いて、Labomatic MD-80(LABOMATIC INSTR. AG, Allschwil, Switzerland)において行う。

40

【0185】

(11, 11'-ジチオビス(スクシンイミジルウンデカノエート)(DSU)の合成)
チオ硫酸ナトリウム(55.3 g 、 350 mmol)を、50% 1, 4-ジオキサン水溶液中の11-ブロモウンデカン酸(92.8 g 、 350 mmol)の懸濁液(100

50

0 ml) に添加する。この混合液を、中間体ブンテ (Bunte) 塩までの反応が完了するまで (透明な溶液)、還流中 (90 °C) で 2 時間加熱する。対応するジスルフィドまでの酸化を、溶液が黄色から茶色を保ち続けるまで、ヨウ素の一部を添加することによりインサイチュで行う。ヨウ素の残りを、15 % のピロ亜硫酸ナトリウム水溶液で、再滴定する。ロータリーエバポレーションによる 1, 4-ジオキサンの除去の後、クリーム状の懸濁液を、濾過して、産物 11, 11' - ジチオビス (ウンデカン酸) を生じる。エチル酢酸 / THF からの再結晶化によって、白色固体を提供する

【0186】

【化1】

10

(73.4 g, 96.5 %):

融点 94 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 / CD_3OD 95 : 5): δ 2.69 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 2.29 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 1.76-1.57 (m, 4H), ~~また~~ 1.40-1.29 (m, 12H); FAB-MS (Cs^+ , 20 keV): m/z (相対強度) 434 (100, M^+). $\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{O}_4\text{S}_2$ についての計算値 : C, 60.79; H, 9.74; S, 14.75. 結果: C, 60.95; H, 9.82; S, 14.74.

20

【0187】

THF (50 ml) 中の 11, 11' - ジチオビス (ウンデカン酸) (1.0 g, 2.3 mmol) の溶液に対して、N-ヒドロキシスクシンイミド (0.575 g, 5 mmol)、次に DCC (1.03 g, 5 mmol) を 0 °C で添加する。反応混合液を 23 °C まで暖め、そして室温で 36 時間攪拌した後、ジシクロヘキシルウレア (DCU) を濾過する。減圧下での溶媒の除去、そしてアセトン / ヘキサンからの再結晶化によって、11, 11' - ジチオビス (スクシンイミジルウンデカノエート) を白色固体として生成する。シリカゲルおよびエチル酢酸とヘキサンの 2 : 1 の混合液を使用する中圧液体クロマトグラフィー (9 バール) によって、最終精製を達成する。有機相を濃縮し、真空中で乾燥して、11, 11' - ジチオビス (スクシンイミジルウンデカノエート) を得る。

30

【0188】

【化2】

(1.12 g, 78 %): 融点 95 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 2.83 (s, 4H), 2.68 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 2.60 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 1.78-1.63 (m, 4H), ~~また~~ 1.43-1.29 (m, 12H); FAB-MS (Cs^+ , 20 keV): m/z (相対強度) 514 (100), 628 (86, M^+). $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$ についての計算値 : C, 57.30; H, 7.69; N, 4.45; S, 10.20. 結果: C, 57.32; H, 7.60; N, 4.39; S, 10.25.

40

【0189】

(実施例 4. 金上でのアミノ反応性単層の形成 (Wagner ら、Biophys. J. 1996, 70 : 2052 ~ 2066 の手順に従う))
11, 11' - ジチオビス (スクシンイミジルウンデカノエート) (DSU) ベースの単層を、クロロホルム中の 1 mM の DSU 溶液中に室温で 1 時間浸漬することにより、実施例 1 および 2 に記載される微小デバイスの Au (111) 表面に沈着させる。10 容量の溶媒でリンスした後、N-ヒドロキシスクシンイミドが末端をなす単層を、窒素蒸気下で

50

乾燥し、直ちにタンパク質固定化のために使用する。

【0190】

(実施例5. HIVプロテアーゼ改変体の発現および精製)

HIVプロテアーゼ (Gene bank HIVHXB2CG) は、HIVの生活環の必須の成分であり、抗ウイルス治療の主要な標的である。HIVプロテアーゼは、gagおよびgag-pol遺伝子産物を、機能的タンパク質にタンパク質分解性プロセッシングするために必要とされる。HIVプロテアーゼの阻害は、感染性のウイルス子孫の産生を妨げ、従って、さらなる感染の回を妨げる。HIVプロテアーゼは、アスパラギン酸プロテアーゼのファミリーに属し、そして2つの99アミノ酸長のサブユニットの接触面に形成される活性部位を有する対称のホモダイマーである。活性部位のコア残基は、保存された3ペプチドモチーフからなる (Asp-Thr-Gly) (Robertsonら、Science、1990、248:358)。HIVプロテアーゼの耐性改変体は、現在使用される全てのインヒビターに対して生じている。個々にまたは組み合わせで耐性を生じる最も関係のある変異は: L10R、D30N、M46I、L63P、A71V、V82F (Kaplanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1994、91:5597; Hoら、J. Virol. 1994、68:2016; Condraら、Nature、1995、374:569; Schockら、J. Biol. Chem.、1996、271:31957; KorantおよびRizzo、Adv. Exp. Med. Biol.、1997、421:279) である。プロテアーゼ活性を保持するさらなる変異が、系統立てて生成されている (Loebら、Nature、1989、340:397)。

【0191】

変異型プロテアーゼは、PCR変異誘発によって生成され (Weinerら、Gene、1994、151:119)、そして2つのアプローチを用いて *Escherichia coli* において発現されている: (i) N-末端ヒスチジンタグ (H_6 ; Hochuliら、Biotechnology 1988、6:1321) とその後続く第Xa因子切断部位を含む *Escherichia coli* 発現ベクター中へ、変異型プロテアーゼ cDNA および野生型プロテアーゼ cDNA をクローニングし、一方、HIVプロテアーゼの終止コドン、リジンタグ (K_6) とその後続く終止コドンをコードする配列で置換する。生じる融合タンパク質を、Wondrak および Louis、Biochemistry、1996、35:12957 に記載されるように封入体から精製し、そして Wuら、Biochemistry、1998、37:4518 に記載されるように、ヒスチジンタグを第Xa因子によって除去する; あるいは (ii) *Escherichia coli* 発現ベクター中へ、変異型プロテアーゼ cDNA および野生型プロテアーゼ cDNA をクローニングし、HIVプロテアーゼ、3個のグリシンのリンカー、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) およびリジンタグの融合物 (HIV-GST- K_6) を作製する。HIVプロテアーゼのカルボキシ末端の自己プロセッシング部位 F^*P を、 F^*I に変えて、融合タンパク質の自己切断を防ぐ (Louisら、Eur. J. Biochem.、1991、199:361)。生じるタンパク質 HIV-GST- K_6 を、グルタチオンアガロースビーズでの標準的なクロマトグラフィーによって、*Escherichia coli* ライセートから精製し、そしてアミンを含まない緩衝液中 (25mM HEPES、pH 7.5、150mM NaCl) で、 -80°C で保存する。

【0192】

(実施例6. アミノ反応性単層上への融合タンパク質の固定化)

HIV-GST- K_6 形態の HIVプロテアーゼ改変体および GST- K_6 を、微小チャンネルデバイスのアミノ反応性単層表面に固定化する (上記の実施例4を参照のこと)。HIV-GST- K_6 および GST- K_6 を、150mM NaCl を含有する 25mM HEPES 緩衝液 (pH 7.5) 中に $1\mu\text{g/ml}$ の濃度に希釈する。第1に、 $50\mu\text{l}$ のタンパク質を含まない緩衝液を、チャンネルを通して移し、単層表面を水和する。5分間のインキュベーションの後、 $10\mu\text{l}$ の対応するタンパク質溶液を、チャンネルを通して

流し、タンパク質含有溶液での完全な置換を保証する。室温での30分後に、固定化は完了する。チャンネルを50 μ lの固定化緩衝液でリンスし、そして分析に供する。各微小チャンネルは、異なるHIV-GST-K₆改変体またはコントロール(GST-K₆)を、ディスプレイする。18 M Ω cmの抵抗の超純粋水を、全ての水性緩衝液について、一般に使用する(Barnstead Nanopure (登録商標)システムを通過して精製する)。

【0193】

(実施例7. 微小チャンネル内でのプロテアーゼ活性アッセイ)

HIVプロテアーゼは、少なくとも7ペプチドの基質を必要とする(Mooreら、Biochem. Biophys. Res. Commun.、1989、159:420)。異なるHIV改変体の活性を分析するために、分子内蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に基づく連続的アッセイを使用する。ウイルスgagタンパク質のp17-p24切断部位(Skalika、Cell、1989、56:911)に対応するペプチド基質を、エネルギー移動対の添加により修飾する(Geogheganら、FEBS Lett.、1990、262:119): Dns-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Trp (Dns-SSQNYPIVW)において、Dns (ダンシル) およびTrp基が、それぞれN末端およびC末端伸長である(Geogheganら)。Trpの励起は290 nm、およびDnsの発光は575 nm。Tyr-Pro結合でのペプチドの切断は、Dnsの発光を減少し、360 nmでのTrpの発光を増加する。修飾された7ペプチドDns-SSQNYPIVWを記載されたように調製し(Geogheganら)、アミノ酸分析、核磁気共鳴および質量分析法によって分析する。純度を、Vydac C-4カラムおよび0.1% TFA中のアセトニトリル勾配を使用するHPLC分析によって調べる。上記の全てのHIV改変体の活性を試験するために、固定化HIV改変体を有する各微小チャンネル(実施例6を参照のこと)を、50 mM 酢酸ナトリウム、pH5.5、13% グリセロール、10 mM DTT中の20 μ MのDns-SSQNYPIVWで満たす。固定化タンパク質に対する基質の添加は、蛍光発光スペクトルの、経時的な強度変化をもたらす。360 nmのTrp発光ピークは、その初期の強度の約2.5倍まで、漸次的に増加するが、その一方、Dns基の発光バンド(575 nm)は、強度が低下する。この強度変化は、HIV改変体の活性形態を含有する全てのチャンネルにおいて観察される。バックグラウンド蛍光変化のコントロールとして、GST-K₆融合タンパク質を、並行して測定する。

【0194】

HIV改変体によるタンパク質分解の特異性を試験するために、競合アッセイを行い得る。1つのアッセイにおいて、薬物としてのその可能性について試験されるDns-SSQNYPIVWおよび小有機分子を、50 mM 酢酸ナトリウム、pH5.5、13% グリセロール、10 mM DTT溶液中で、各チャンネルに送達する。広範囲のHIVプロテアーゼ改変体についてインヒビターとして作用する有機分子は、多数の微小チャンネル中のプロテアーゼとペプチド基質との反応に付随する、Trp発光ピークの増加およびDns発光バンド減少を小さくする。他方、さほど所望されない薬物候補は、選択された微小チャンネル内のみにあって、HIVプロテアーゼとペプチド基質との反応を阻害する(または全く阻害しない)。

【0195】

プロテアーゼインヒビターであるシクイナビル(Sequinavir)(Roche)、リトナビル(Ritonavir)(Abbott)またはインディナビル(Indinavir)(Merck)もまた、反応緩衝液に添加して、阻害の特異性のための陽性コントロールとして使用し得る。シクイナビルは、G48VまたはL90M変異のいずれかを含むHIV改変体以外の全てのHIV改変体を阻害する。対照的に、リトナビルは、M46I、L63P、A71V、V82FおよびI84V改変体の活性をブロックし得ない。インディナビルは、A71V改変体が影響されない以外は、リトナビルと類似の阻害パターンを有する。さらに、インディナビルは、L10R HIVプロテアーゼ改変体の活

性を減少し得ない。

【0196】

これらの実験は、H I V改変体微小チャンネルデバイスをどのように使用して、H I Vプロテアーゼ活性に対する小有機分子の阻害的影響を試験し得るかを、実証する。

【0197】

上記の明細書において引用された全ての文献は、本明細書において参考として援用される。本発明の種々の変更および変形は、本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく、当業者に明らかである。本発明は、特定の好ましい実施態様と関連して記載されているが、特許請求の範囲に記載される本発明は、そのような特定の実施態様に不当に限定されるべきではないことが、理解されるべきである。実際、当業者に明らかである、本発明を行うために記載された様式の種々の変更が、特許請求の範囲内にあることが意図される。

10

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、カバーを付けた微小チャンネルアレイデバイスの平面図を示す。

【図2】 図2は、バルクマイクロマシン加工によって製作された、カバーを付けた微小チャンネルアレイの断面図を示す。

【図3】 図3は、犠牲マイクロマシン加工によって製作された、カバーを付けた微小チャンネルアレイの断面図を示す。

【図4】 図4は、基板上のチオール反応性単層を示す。

【図5】 図5は、コートされた基板上のアミノ反応性単層を示す。

【図6】 図6は、親和性タグを介して、単層でコートされた基板上に固定化された生物学的部分を示す。

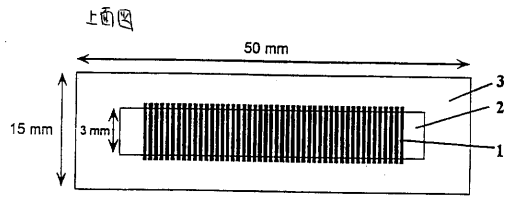
20

【図7】 図7は、微小チャンネルアレイデバイス中の生体分子でコートされた微小チャンネルの断面図を示す。

【図8】 図8は、親和性タグおよびアダプター分子を介して、単層でコートされた基板上に固定化された生物学的部分を示す。

【図9】 図9は、微小チャンネルアレイの固定化された生物学的部分と、被分析物との相互作用をモニターするために使用され得る、蛍光検出ユニットの模式図を示す。

【図 1】



【図 2】

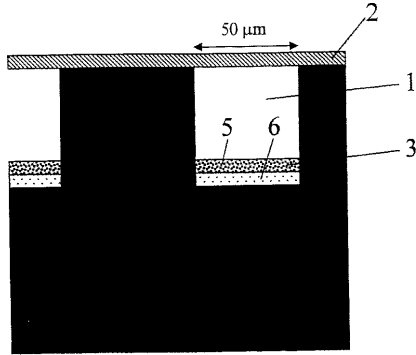


Fig. 2

【図 3】

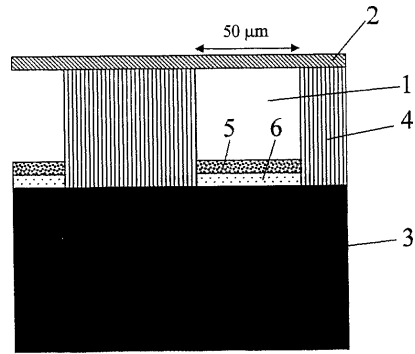


Fig. 3

【図 4】

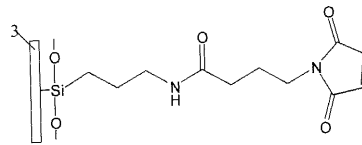


Fig. 4

【図 5】

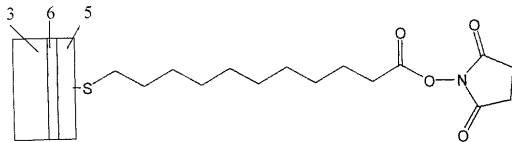


Fig. 5

【図 6】

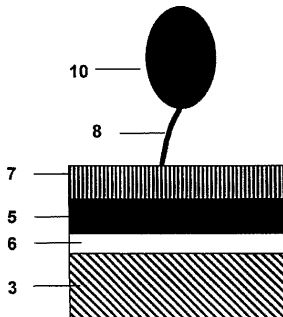


Fig. 6

【図 7】

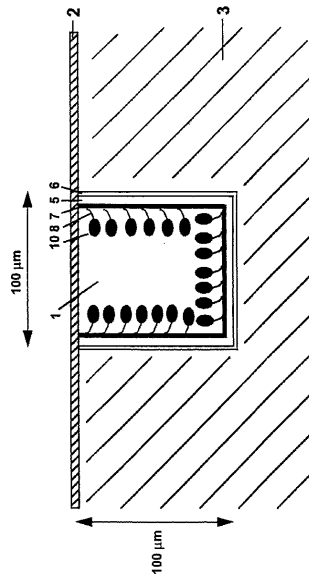


Fig. 7

【図 8】

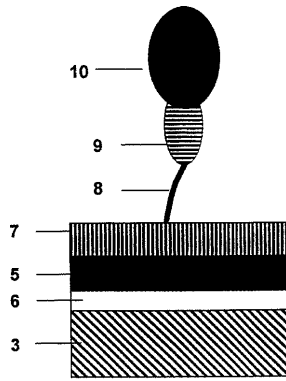


Fig. 8

【図 9】

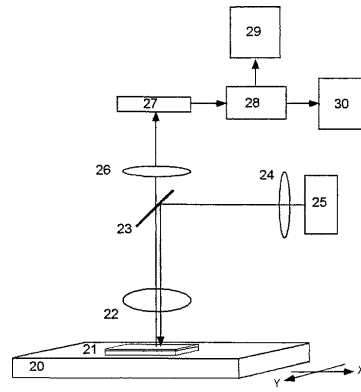


Fig. 9

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

G 0 1 N 37/00 1 0 1

G 0 1 N 37/00 1 0 2

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 ワグナー, ピーター

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002, ベルモント, ビレッジ コート ナンバー
7 2211

(72)発明者 オルトーリシェ, ダナ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94303, パロ アルト, ケイジョン ウェイ 972

(72)発明者 ノック, ステファン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94062, レッドウッド シティ, グレンウッド アベ
ニュー 3629

(72)発明者 アイティン, クリスティアン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94025, メンロ パーク, ウエバーレー ストリート
ナンバー3 315

審査官 山村 様子

(56)参考文献 国際公開第98/023948 (WO, A1)

米国特許第05688642 (US, A)

米国特許第05629213 (US, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-98

C12M 1/34

C12Q 1/68

G01N 37/00