

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4493496号
(P4493496)

(45) 発行日 平成22年6月30日(2010.6.30)

(24) 登録日 平成22年4月16日(2010.4.16)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 37/00 (2006.01)

GO 1 N 37/00 1 O 2

GO 1 N 27/416 (2006.01)

GO 1 N 27/46 3 3 6 B

請求項の数 33 (全 47 頁)

(21) 出願番号	特願2004-523347 (P2004-523347)	(73) 特許権者	505025036
(86) (22) 出願日	平成15年7月22日(2003.7.22)		シナテム コーポレーション
(65) 公表番号	特表2005-534010 (P2005-534010A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(43) 公表日	平成17年11月10日(2005.11.10)		10, バーリンゲーム, ミッテン ロ
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/023030		ード 863, スイート ビー
(87) 国際公開番号	W02004/010074	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成16年1月29日(2004.1.29)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成18年7月4日(2006.7.4)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	10/200,682		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成14年7月22日(2002.7.22)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
前置審査		(72) 発明者	ヤマザキ ミキ (ヴィッキー)
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
			65, レッドウッド ショアーズ, ポ
			ートワーク プレイス 883
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオセンサのアレイおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

表面検出器アレイデバイスを組立てする方法であって、該方法は、

1 つ以上の二重層バリア領域によって分離された複数の異なった二重層適合性面領域を規定している表面を有する基体であって、前記二重層適合性面領域と前記二重層バリア領域とが異なった材料から形成される基体を提供する工程と；

第 1 の組成物を有する脂質二重層ベシクルの第 1 の懸濁液を提供する工程と；

第 2 の組成物を有する脂質二重層ベシクルの第 2 の懸濁液を提供する工程であって、前記第 1 の組成物が、前記第 2 の組成物とは異なる、工程と；

前記第 1 の懸濁液を 100n1 未満自動操作によって、前記複数の異なった二重層適合性面領域のうち第 1 の領域へ移動させる工程と；

前記第 2 の懸濁液を 100n1 未満自動操作によって、前記複数の異なった二重層適合性面領域のうち第 2 の領域へ移動させる工程と；

前記第 1 の異なった二重層適合性面領域上に安定に局在化した第 1 の脂質二重層空間および前記第 2 の異なった二重層適合性面領域上に安定に局在化した第 2 の脂質二重層空間を形成するために第 1 および第 2 の懸濁液と共に前記基体をインキュベートする工程であって、前記二重層空間の各々が、隔離されたままで他の前記二重層空間と混合せず、前記各脂質二重層空間と、前記各二重層適合性面領域との間で共有結合することなく、前記各空間が、前記各表面領域上に局在化しており、前記二重層適合性面領域と、対応する前記脂質二重層空間との間に挟まれた水性膜によって前記各表面領域から分離されているもの

10

20

とする前記工程と；

前記脂質二重層空間上に大量の水相を確立する工程と、
を含んでなる方法。

【請求項 2】

前記基体が、約 10 個から約 100 個の間の異なった二重層適合性面領域を含んでなる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記基体が、少なくとも約 2500 個の異なった二重層適合性面領域を含んでなる請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記基体が、少なくとも約 25,000 個の異なった二重層適合性面領域を含んでなる請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記基体が、少なくとも約 250 万個の異なった二重層適合性面領域を含んでなる請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記二重層適合性面領域が、約 1 μm から約 10 μm の間の幅の二重層バリア領域によって互いに分離されている請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記第 1 の組成物が、さらに生体分子を含んでなる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記生体分子が、膜貫通型レセプターおよびイオンチャンネルよりなる群から選択される請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記生体分子が、脂質分子に共有結合している請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記移動工程が、前記第 1 および前記第 2 の懸濁液の小滴を生成させること、および前記小滴を前記第 1 および前記第 2 の二重層適合性面領域各々に接触させることを含んでなる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記各小滴が、90 n l 未満を含んでなる請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記各小滴が、15 n l 未満を含んでなる請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記移動工程が、前記第 1 および前記第 2 の懸濁液のアリコート、空隙を通して前記第 1 および第 2 の二重層適合性面領域各々の上に射出することを含んでなる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記射出された各アリコートが、90 n l 未満を含んでなる請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記射出された各アリコートが、15 n l 未満を含んでなる請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

請求項 1 から 15 のいずれかに記載の方法によって製造された表面検出器アレイ装置。

【請求項 17】

表面検出器アレイデバイスを組立てする装置であって、

1 つ以上の二重層バリア領域によって分離された複数の異なった二重層適合性面領域を規定している面を有する基体を受ける台であって、前記二重層適合性面領域と前記二重層バリア領域とが、異なった材料から形成される、台；

第 1 の組成物を有する脂質含有ベシクルまたはリポソームの第 1 の懸濁液の供給源；

第 2 の組成物を有する脂質含有ベシクルまたはリポソームの第 2 の懸濁液の供給源であ

10

20

30

40

50

って、前記第 1 の組成物が、前記第 2 の組成物とは異なる、供給源；

前記第 1 の懸濁液を 100n1 未満、前記複数の異なった二重層適合性面領域のうちの第 1 の領域へ移動させ、および前記第 2 の懸濁液を 100n1 未満、前記複数の異なった二重層適合性面領域のうちの第 2 の領域へ移動させる自動手段であって、前記アリコート
を隔離されたままで互いに混合しないように移動させる、自動手段；および

前記の組立てられた表面検出器アレイデバイスを覆うために使用される大量の水相の供給源、

を含んでなる装置。

【請求項 18】

前記基体表面の近傍における 1 つ以上の環境パラメータを制御するためのチャンバーをさらに含んでなる請求項 17 に記載の装置。

【請求項 19】

前記パラメータが、温度、相対湿度、圧力および照明よりなる群から選択される請求項 18 に記載の装置。

【請求項 20】

前記台と前記移動手段との間の相対的運動を制御するために、操作可能にプログラム化されたマイクロプロセッサをさらに含んでなる請求項 17 に記載の装置。

【請求項 21】

複合アッセイであって、以下：

表面検出器アレイデバイスを提供する工程であって、前記デバイスは、

1 つ以上の二重層バリア領域によって分離された複数の異なった二重層適合性面領域を規定している表面を有する基体であって、前記二重層適合性面領域と前記二重層バリア領域とが異なった材料から形成される基体、

第 1 の組成物を 100n1 未満有し、前記複数の異なった二重層適合性面領域のうちの第 1 の領域の上に安定に局在化されている第 1 の脂質二重層空間、

前記第 1 の組成物とは異なる第 2 の組成物を 100n1 未満有し、前記複数の異なった二重層適合性面領域のうちの第 2 の領域の上に安定に局在化されている第 2 の脂質二重層空間、

を含んでなるものとし、

前記第 1 の組成物が、前記第 2 の組成物とは異なり；

前記二重層空間の各々が、隔離されたままで他の前記二重層空間と混合せず、前記各脂質二重層空間と、前記各二重層適合性面領域との間で共有結合することなく、前記各空間が、前記各表面領域上に局在化しており、前記二重層適合性面領域と、対応する前記脂質二重層空間との間に挟まれた水性薄膜によって前記の各表面領域から分離されているものとする、工程と；

前記デバイスを、試験物質を含んでなる大量の水相に接触させる工程と；

前記試験物質と前記第 1 の組成物との相互作用および前記試験物質と前記第 2 の組成物との相互作用をアッセイする工程と、

を含んでなる複合アッセイ。

【請求項 22】

前記第 1 の組成物が、第 1 の生体分子を含んでなり、前記第 2 の組成物が、第 2 の生体分子を含んでなる請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記生体分子が、膜貫通型レセプターおよびイオンチャンネルよりなる群から選択される請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記第 1 と第 2 の生体分子が、レセプタータンパク質ファミリーの異なったメンバーである請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記第 1 の組成物が、第 1 の脂質を含んでなり、前記第 2 の組成物が、第 2 の脂質を含ん

10

20

30

40

50

でなる請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記第 1 の脂質二重層空間と前記第 2 の脂質二重層空間の各々が、5 μ g 未満を含んでなる請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記第 1 の脂質二重層空間と前記第 2 の脂質二重層空間の各々が、1 μ g 未満を含んでなる請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記第 1 の脂質二重層空間と前記第 2 の脂質二重層空間の各々が、0.5 μ g 未満を含んでなる請求項 2 7 に記載の方法。

10

【請求項 2 9】

前記基体が、約 10 個から約 100 個の間の異なった二重層適合性面領域を含んでなる請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記基体が、少なくとも約 2500 個の異なった二重層適合性面領域を含んでなる請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記基体が、少なくとも約 25,000 個の異なった二重層適合性面領域を含んでなる請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

20

前記基体が、少なくとも約 250 万個の異なった二重層適合性面領域を含んでなる請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記二重層適合性面領域が、約 1 μ m から約 10 μ m の間の幅の二重層バリア領域によって互いに分離されている請求項 1 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願に対する引用)

本出願は、1996 年 11 月 29 日出願の米国仮特許出願第 60/032,325 号に対する優先権を主張している 1997 年 11 月 26 日出願の米国特許出願第 08/978,756 号の一部継続である 2000 年 8 月 4 日出願の米国特許出願第 09/631,906 号の一部継続である 2002 年 7 月 22 日出願の米国特許出願第 10/200,682 号に対する優先権を主張し、その各々は、参照として、その全体が本明細書で援用される。

30

【0002】

本出願は、さらに 2000 年 5 月 18 日出願の米国仮特許出願第 60/205,604 号および 1999 年 10 月 8 日出願の米国仮特許出願第 60/158,485 号に関連しており、双方とも参照として、その全体が本明細書で援用される。

【0003】

40

発明の分野

本発明は一般に、支持流動性二重層およびそれらを選択された領域に限定する方法に関する。より具体的に、本発明は、独立して処理できる支持流動性二重層膜のミクロ組立てアレイ、それらの使用および製造法に関する。

【0004】

連邦政府後援研究に関する供述

申請できず。

【背景技術】

【0005】

発明の背景

50

この数年来、数百万とまでは行かなくても、数千種の化合物の所望の1つの活性または複数の活性に関するスクリーニングを促進するための多量原料スクリーニング法が多数開発されている。このような方法は、典型的にはレセプターに対する潜在的に有効な化合物の結合検出に基づいている。これらの結合アッセイは、所望の活性を有し得る化合物の領域を制限する点では有効であるが、この活性をいくらかでも詳細に評価するためには、一般に十分に好適というわけではない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

潜在的に活性化化合物の生物学的活性は、効率は低いが、より情報量の得られる「二次的スクリーン」または典型的には熟練した技術者または科学者による相当な時間投入を要するアッセイを用いて一般に評価される。レセプターやイオンチャネルなどの内在性膜タンパク質に影響を与える候補となる化合物の評価では、1つの化合物に要する時間量は、アッセイが電気生理学的活性に及ぼす作用を含む場合は、数時間または数日であり得る。したがって、さらに詳細な分析理由となる、このような内在性膜タンパク質および他の膜成分または膜会合成分の活性に影響を与えるこれら少数の化合物を同定するために、それらのより効率的な「二次的スクリーン」に対する必要性が存在している。

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の簡単な概要

一態様において、本発明は、表面検出器アレイデバイスを含む。前記デバイスは、1つ以上の二重層バリア領域によって分離された複数の異なった二重層適合性面領域を規定している表面を有する基体、前記基体表面を覆っている大量の水相、各二重層適合性面領域上に維持された脂質二重層空間、および各二重層適合性面領域と、対応する脂質二重層空間との間に挟まれた水性薄膜を含む。一般的な好ましい実施形態において、二重層適合性面領域と二重層バリア面領域とは、異なる材料から形成される。

【0008】

前記二重層適合性面領域は、 SiO_2 、 MgF_2 、 CaF_2 、および雲母、ならびにポリアクリルアミドまたはデキストランフィルムなどのポリマーフィルムなど、そのような二重層適合性面特性を有する任意の種々の材料から形成できる。 SiO_2 は、二重層適合性面領域の形成にとって特に効果的な材料である。

【0009】

前記二重層バリア面領域は、金、ポジティブホトレジスト、酸化アルミニウムおよび酸化インジウムスズなど、そのような二重層バリア面特性を有する任意の種々の材料から形成できる。

【0010】

一般的な実施形態において、前記脂質二重層空間は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、およびスフィンゴミエリンよりなる群から選択される少なくとも1つの脂質を含有する。

【0011】

一実施形態において、前記装置は、約10個から約100個の間の、異なった二重層適合性面領域を含有する。他の実施形態において、前記装置は、少なくとも約2500個の異なった二重層適合性面領域を含有する。さらに他の実施形態において、前記装置は、少なくとも約25,000個の異なった二重層適合性面領域を含有する。さらに他の実施形態において、前記装置は、少なくとも約250万個の異なった二重層適合性面領域を含有する。

【0012】

前記二重層適合性面領域は、1つの一般的な実施形態において、約1 μm から10 μm の間の幅の二重層バリア領域によって、互いに分離されている。

【 0 0 1 3 】

異なった二重層適合性面領域上の脂質二重層空間は、異なった組成物を有し得、さらに選択された生体分子を含み得、異なった空間は、膜貫通型レセプターまたはイオンチャネルなどの異なった生体分子を有する。前記生体分子は、脂質分子に共有結合または非共有結合し得る。非共有相互作用の例としては、静電的相互作用およびビオチン/スト렙トアビジン相互作用などの特異的分子相互作用が挙げられる。生体分子の例としては、リガンドおよびレセプターなどのタンパク質、ならびにポリヌクレオチド類および他の有機化合物が挙げられる。

【 0 0 1 4 】

他の態様において、本発明は、複数の独立して処理できる脂質二重層領域を有する表面検出器デバイスの形成法を含む。前記方法は、(i) 平面基体を処理して、1つ以上の二重層バリア領域によって分離された複数の異なった二重層適合性面領域を規定している基体表面を形成する工程および(i i) 脂質二重層ベシクルの懸濁液を、二重層適合性面領域上に支持された二重層を形成する上で都合の良い条件下で、複数の異なった二重層適合性面領域に適用する工程を含む。前記ベシクルの適用により、二重層適合性面領域上に支持された二重層膜の形成が生じる。

10

【 0 0 1 5 】

他の態様において、本発明は、表面検出器アレイデバイスの形成法を含む。前記方法は、(i) 1つ以上の二重層バリア領域によって分離された複数の異なった二重層適合性面領域を規定している表面を有する基体を提供する工程、(i i) 第1の組成を有する脂質二重層ベシクルの第1の懸濁液を、前述の複数の別個の二重層適合性面領域に適用する工程、(i i i) 第2の組成を有する脂質二重層ベシクルの第2の懸濁液を、前述の複数の別個の二重層適合性面領域に適用する工程、(i v) 第1の異なった二重層適合性面領域上に安定に局在化した第1の脂質二重層空間および第2の異なった二重層適合性面領域上に安定に局在化した第2の脂質二重層空間を形成するために第1および第2の懸濁液と共に前記基体をインキュベートする工程および(v) 前記脂質二重層空間上に、大量の水相を確立する工程を含む。

20

【 0 0 1 6 】

ある好ましい実施形態において、上記方法の適用工程は、例えば、中空セラミックチップ、中空金属チップ、マイクロピペット、ピンなどの移動装置の上および末端に第1および/または第2の懸濁液の小滴を生成させ、前記小滴を、第1および第2の二重層適合性領域(1つまたは複数)に接触させることを含んでなる。一定の実施形態において、前記小滴は、100 n l未満、75 n l未満、50 n l未満、25 n l未満、15 n l未満、10 n l未満、または5 n l未満を含んでなる。

30

【 0 0 1 7 】

他の好ましい実施形態において、上記方法の適用工程は、例えば、中空セラミックチップ、中空金属チップ、マイクロピペット、圧電プリントヘッド、インクジェットプリントヘッドなどの移動装置の末端から、前記移動装置の末端を二重層適合性面領域から分離している空間を越えて、二重層適合性面領域(1つまたは複数)上に、第1および/または第2の懸濁液のアリコート射出することを含んでなる。一定の実施形態において、射出アリコートは、100 n l未満、75 n l未満、50 n l未満、25 n l未満、15 n l未満、10 n l未満、または5 n l未満を含んでなる。

40

【 0 0 1 8 】

さらに他の態様において、本発明は、リガンドの混合物中、選択されたリガンドを検出する方法を含む。前記方法は、(i) 前記混合物を、上記のようなバイオセンサー表面検出器アレイデバイスに接触させる工程、および(i i) 選択されたリガンドに特異的に結合するレセプターに対するこのリガンドの結合を検出する工程を含む。

【 0 0 1 9 】

他の態様において、本発明は、試験物質と組成物との間の相互作用をアッセイする方法を含む。前記方法は、(i) 第1の組成物を有する第1の脂質二重層空間および第1の組

50

成物とは異なった第2の組成物を有する第2の脂質二重層空間を含んでなるバイオセンサー表面検出器アレイデバイスを提供する工程、(i i) 前記デバイスを、試験物質を含む大量の水相と接触させる工程、(i i i) 試験物質と第1の組成物との相互作用および試験物質と第2の組成物との相互作用をアッセイする工程を含む。

【 0 0 2 0 】

好ましい実施形態において、前記脂質二重層空間は、各々、5 μ g 未満の物質、または1 μ g 未満の物質または0.5 μ g 未満の物質を含んでなる。

【 0 0 2 1 】

他の好ましい実施形態において、第1の組成物は、第1の生体分子を含んでなり、第2の組成物は、第2の生体分子を含んでなる。他の好ましい実施形態において、第1の生体分子と第2の生体分子は、レセプタータンパク質ファミリーの異なったメンバーである。さらに、他の好ましい実施形態において、第1の組成物と第2の組成物とは異なった脂質を含有する。

【 0 0 2 2 】

さらに他の態様において、本発明は、バイオセンサーにおける使用のための表面検出アレイデバイスを含む。このような装置は、(i) 1つ以上の二重層バリア領域によって分離された複数の異なった二重層適合性面領域を規定している表面を有する基体、(i i) 前記基体表面を覆っている大量の水相、(i i i) 各二重層適合性面領域上に維持された脂質二重層空間、および(i v) 各二重層適合性面領域と、対応する脂質二重層空間との間に挟まれた水性薄膜を含む。各二重層空間は、レセプターまたは生体分子の一種を含有し、異なった二重層空間は、レセプターまたは生体分子の異なった種類を含有する。

【 0 0 2 3 】

本発明の他の態様は、1つ以上の二重層バリア領域によって分離された複数の異なった二重層適合性面領域を規定している表面を有する基体、前記基体表面を覆っている大量の水相、各二重層適合性面領域上に維持された脂質二重層空間、および各二重層適合性面領域と、対応する脂質二重層空間との間に挟まれた水性薄膜を含んでなり、前記二重層適合性面領域と、前記二重層バリア面領域とは異なった材料から形成され、また、各二重層適合性面領域上に維持された各二重層空間が、隣接した二重層空間とは組成的に異なっている表面検出器アレイデバイスを提供する。本発明の他の実施形態は、前記二重層適合性面領域の複数の群をさらに含み、前記群は、各々、前記二重層空間が組成上同じ区域および異なった群内の二重層空間が組成上異なる区域を規定する。

【 0 0 2 4 】

本発明は、

- ・ 複数の脂質二重層適合性領域を有し、各適合性領域が1つ以上の二重層バリア領域によって包囲されてバイオセンサーアレイを提供する工程、
 - ・ 2つ以上の異なる、脂質二重層組成物を担持し、表面上にスポットを形成するためのスポット形成装置と流体連絡しているグラジエント形成装置を提供工程、
 - ・ バイオセンサーアレイ製品を保持し、移動するための多軸移動テーブルを提供する工程、
 - ・ 1つ以上のバリア領域に包囲された複数の二重層適合性領域を有するバイオセンサーアレイ製品を配置する工程、および
 - ・ グラジエントを形成しているグラジエント形成装置から生じる混合脂質二重層組成物のスポットを形成し、そのような組成物の混合物がそれによって形成される際に、それを分配しながら、少なくとも1本の軸で前記テーブルを移動し、異なった連続的な位置に各脂質二重層組成物の異なった比率で分配する工程、
- を含んでなるバイオセンサー領域のアレイを形成する方法を提供し、各領域は異なった公知の脂質二重層組成物を有する。

【 0 0 2 5 】

本発明は、混合チャンバを通して流れる間、2つの異なった組成物の層流特性を実質的に保持する1つの混合チャンバ内へ2つの異なった供給源からの2つの異なった組成物を

実質的に層流において流入させることによって、第1および第2の供給源からの、含まれている第1と第2の異なった脂質二重層形成組成物を一緒に混合する工程を含んでなり、異なった各組成物の面している端が、第1の端と第2の端を有するグラジエントを形成するように混合され、このグラジエントがさらに、第1の組成物に面するグラジエントの第1の端から始まり、他方の第2の組成物に面するグラジエントの第2の端で終わっている異なった比率の組成物の組合わせをさらに含んでなり、また、混合チャンバを、アレイ面を越えて、実質的に層流においてグラジエントを分配するように適合させ、また、グラジエントに含まれた前記組成物が、前記アレイの二重層適合性領域による最初の接触時に捕捉され、保持されるグラジエントバイオセンサーアレイを作製する方法をさらに提供する。

10

【0026】

本発明のこれら、および他の目的ならびに特徴は、添付の図面と組合わせて、以下の詳細な説明を読まれるならば、より十分に明らかになるであろう、

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

好ましい実施形態の詳細な説明

I. 定義

全ての用語は、下記で特に定義されない限り、当業者によって理解されている通常の意味を有することが意図されている。請求された質量と用量は、本発明の実施に適合する言明された量における変量を包含することが意図されている。このような変量は、例えば、言明された量の約 $\pm 10 \sim 20$ パーセントの範囲内にあると考えられる。本節に含まれる特定の定義と当業者によって理解されている通常の意味との間に矛盾がある場合は、下記に供された定義が規定するものとする。

20

【0028】

用語の「水性」とは、脂質に対して有害ではない、水基材の液体媒体を言う。

【0029】

「レセプター」とは、リガンド分子と特異的に相互作用することのできる高分子である。細胞においてレセプターは典型的には、細胞外膜、ゴルシ膜または核膜などの脂質二重層膜と会合している。インビトロの脂質空間（例えば、支持二重層）内に組み込むレセプターは、細胞から精製されるか、組み換え発現させるか、または小型レセプターの場合は、化学合成されるかのいずれかであり得る。

30

【0030】

「リガンド」とは、レセプターに特異的に結合することのできる分子である。レセプターに対するリガンド結合は、典型的には、高結合親和性、すなわち、 $K_d > 10^5$ を特徴とし、レセプターの機能（例えば、レセプターまたはレセプターの部分と会合したイオンチャンネルの開通）における変化として、または、レセプターの隣接環境における変化（例えば、表面プラスモン共鳴による結合の検出）として検出できる。インビトロの脂質空間（例えば、支持二重層）内に組み込むリガンドは、細胞から精製されるか、組み換え発現させるか、または小型リガンドの場合は、化学合成されるかのいずれかであり得る。

【0031】

結合は、それがレセプターに対するリガンドの「非特異的」接着によるよりも、むしろレセプター上の結合部位とリガンドとの間の分子相互作用から生じる場合は、「特異的」である。リガンドが、可逆的様式でレセプターと結合する場合、結合の特異性は、公知の方法により、過剰の未標識リガンドを標識リガンドと競合させて追い出すことによって確認できる。非特異的相互作用は、リガンドに対してもレセプターに対しても結合部位を持たないタンパク質（例えば、BSA）を過剰に含めることによって最少化できる。

40

【0032】

「流動膜」とは、天然または天然様の二重層構造を有する膜である。当業者により認識されるように、幾つかの「流動膜」（すなわち、高比率の飽和脂質類および/またはステロール類を有するもの）は、明らかな流動性を有さない場合もあるが、それにもかかわら

50

ず、本発明の目的にとっては「流動膜」と考えられる。

【0033】

「脂質二重層ベシクル」とは、本発明の表面検出器アレイデバイスの二重層適合性面領域に融合することができ、「流動膜」を形成するベシクルである。「脂質二重層ベシクル」は、脂質成分の他に、場合によっては、タンパク質類（このようなベシクル類を本明細書では、「プロテオベシクル類」または「プロテオリポソーム類」と称す）、糖タンパク質類、糖脂質類などの他の膜会合を含有し得る。

【0034】

「試験物質と組成物との間の相互作用のアッセイ」とは、試験物質が、組成物と作用するかどうかを決定することを意味する。「試験物質と組成物との間の相互作用のアッセイ」は、現在、当業者に知られているか、または後に開発される任意の方法を用いて、試験物質と組成物との相互作用を検出することによって行うことができ、直接的結合および置換アッセイ、電気生理学的アッセイ、代謝的アッセイなどの結合アッセイを包含することが意図されている。

10

【0035】

「試験物質」とは、本発明の方法と合わせて使用し得る有機、無機、生物学的および非生物学的分子の全ての様式を包含することが意図されている。

【0036】

「膜貫通型レセプター」とは、細胞膜に存在する場合、膜の細胞外の側に生じる結合事象を、細胞内シグナルへと変換する内在的膜タンパク質である。

20

【0037】

「レセプタータンパク質ファミリーメンバー」とは、生物内または生物間で構造および/または機能において関連する2つ以上のタンパク質を言う。タンパク質が、「レセプタータンパク質ファミリーメンバー」であることの決定は、当業者に公知のコンピュータ演算を用いて、一次、二次、三次または四次構造の配列を実施することによって行うことができる。BLASTやVASTなどの代表的演算法は、米国20894メリーランド州ベセスダ、ロックビルパイク8600、国立予防衛生研究所、バイオテクノロジー情報国立センター、コンピュータバイオロジー支部より入手でき、バイオテクノロジー情報国立センターウェブサイト、www.ncbi.nlm.nih.govから直接操作できる。

30

【0038】

「アリコートの移動」とは、大量の液体から大量の液体の一部を分離し、その分離した部分を、他の場所へ移すことを言う。アリコートの移動は、中空セラミックチップ、中空金属チップ、マイクロピペット、ピン、圧電プリントヘッド、インクジェットプリントヘッドなどの、当業者に現在公知の、または後に開発された任意の流体移動装置を用いて達成できる。「アリコートの移動」は、大量の溶液が混合され、一緒に表面検出器アレイデバイス基体へ移される、本明細書に記載された層流グラジエント法を包含することは意図されていない。

【0039】

II. 表面検出器アレイデバイス

40

図1は、本発明による表面検出器アレイデバイス(SDAD)20の一部の斜視図である。前記デバイスは、酸化シリコン、または溶融シリカウエーハなどの基体22から組立てられる。前記基体の寸法は、典型的には、一面当たり約0.1cmから約10cmの間であり、厚さが約0.01mmから約1cmである。

【0040】

前記基体表面は、1つ以上の二重層バリア領域26によって分離された複数の異なった二重層適合性面領域24を含有する。二重層バリア領域26(1つまたは複数)は、二重層適合性面領域24を形成する材料22とは異なった材料28から形成されることが好ましい。

【0041】

50

脂質二重層空間 30 は、各二重層適合性面領域 24 上に維持されている。各二重層適合性面領域 24 と、相当する脂質二重層空間 30 との間に、厚さが、約 5 から 15 の間（典型的には約 10）の水性薄膜 32 が挟まれている。幾つかの配置において、1 ミクロンまでの分離が達成できる（参照として本明細書で援用される Wong & Grove、2001 年）。前記基体表面と脂質空間を覆っているのは、大量の水相 34 である。

【0042】

前記二重層バリア領域は、二重層適合性面領域 24 に関して、へこんでいるか、同一平面にあるか、または高くし得る（図 1 の 26 に示されるように）。高くしたバリアを有する実施形態において、バリアの高さは、数十オングストロームから数マイクロメートル以上の範囲であり得る。前記バリアの幅は、典型的には、約 100 nm から約 250 μ m の間である。前記幅は、約 1 μ m から 100 μ m の間であることが好ましい。

10

【0043】

本発明を支持して実施された実験結果によると、脂質バリア領域は、隣接した脂質二重層領域の単に機械的または物理的分離によっては機能しない。そうではなく、表面が二重層バリア領域として作用することを可能にする特徴は、前記表面を作成している材料に固有の化学的 / 静電的性質であることを前記実験は示している。このような化学的 / 静電的性質の例としては、疎水性、誘電透過性、伝導性および表面電荷密度が挙げられる。

【0044】

同様に、選択された表面の「二重層適合性」の程度は、その形よりむしろ、その材料固有の性質の働きである。膜と表面との間の相互作用は、静電気力および水和力ならびに長距離ファンデルワールス力からの引力的寄与に関係する。好適な二重層適合性表面においては、支持表面から、約 5 から 15 の間（典型的には約 10）離れ、相当する厚さの水性薄膜によって支持表面から分離されている二重層膜を、最小のエネルギーが捕捉する。二重層適合性面は、典型的には親水性である。

20

【0045】

機能的に、二重層バリア面領域または二重層適合性面領域として使用される材料の好適性は、以下の簡便な「光退色後の蛍光回復 (FRAP)」試験における材料の性能によって評価できる。

【0046】

材料の小サンプル（例えば、約 1 cm^2 の平面を有する部分）を本明細書に記載されるとおり洗浄し、処理する（例えば、アルゴンプラズマへの曝露を用いて、または、忍容できる材料では、酸洗浄を用いて）。次に、前記表面を濯ぎ、蛍光マーカ含有する脂質ベシクル懸濁液（材料と方法で記載されたとおりに調製）の選択された量（例えば、50 μ l）を、前記表面に適用する。前記懸濁液を数分間（例えば 5 分間）、前記表面に接触させたままにする。次に、前記表面を水性媒体中に浸漬して濯ぐか、または前記懸濁液を相当に希釈し（例えば、約 100 ml の蒸留水または PBS を加えることにより）、前記表面を標準的な蛍光顕微鏡の台に移す。次に、前記表面の一部を、明光に曝露されたりポーターの蛍光部分を退色させる上で十分（例えば、約 1 分、蛍光発色団による）、明光（例えば、100 W 水銀アーク灯）に曝露し、前記表面を顕微鏡下、約 10 分間（退色した箇所のサイズによる）、モニターして、蛍光の回復を評価する。

30

40

【0047】

二重層適合性面を形成することのできる材料を用いて上記の試験を実施すると、前記懸濁液中のベシクルは、蛍光レポーターを含有している支持二重層を形成している表面と融合し、光退色光への局所的曝露により、光退色光が集められた表面領域に対応する二重層領域が退色することになる。モニタリング期の間、前記二重層の退色領域の蛍光は、支持二重層の流動性により、回復することになる。

【0048】

それとは対照的に、二重層バリア面を形成する材料を用いて前記試験を実施すると、前記懸濁液中のベシクルは、前記表面と融合して流動性二重層を形成することにはならない。このような条件下では、ベシクルが、濯ぎ工程時に濯ぎ落とされるか、または前記面に

50

接着し、固定されたままのいずれかとなる。ベシクルが濯ぎ落とされる場合は、蛍光はほとんど、または全く観測されない。ベシクルが前記面に接着はするが、流動性二重層を形成しない場合、光退色後の退色領域における蛍光は回復しないことになる。どちらの場合も、前記材料は、有効な二重層バリア材料である。しかし、上記F R A P試験後に、固定化された脂質材料または膜材料を含有するものを使用するよりもベシクルが、接着しない材料を使用することが好ましいことは理解されるであろう。

【0049】

上記試験は、本発明の実施者が、手近に有し得る多数の異なった材料で並行して実施することができる。このようにして、せいぜい数時間のうちに、実施者は、ある特定の材料が二重層適合性の、または二重層バリアとして働く表面を形成する上で有効となるかどうかを容易に決定することができる。

10

【0050】

本発明による装置のミクロ組立て製造における使用に好適な、本質的に全ての材料は、洗浄すれば二重層適合性面領域または二重層バリア面領域を提供することは理解されるであろう。したがって、上記の簡便なF R A P試験を適用することにより、各試験材料と共に、本発明の実施に有用な材料が典型的に得られるであろう。

【0051】

脂質二重層バリアにとって好適にする性質を有する物質の例としては、一定のポリマー類（例えば、ホトレジスト）および種々の金属塩（例えば、金）ならびに鉱物類（例えば、酸化アルミニウムおよび酸化インジウムスズ）が挙げられる。ホトレジストの利点は、光マスクにより比較的パターンをつけ易く、非伝導性であることである。酸化アルミニウムは、非伝導性であり、かつたいの洗浄操作に耐えられて再利用できるという利点を有する。

20

【0052】

二重層適合性面にとって好適にする性質を有する物質の例としては、酸化シリコン（ SiO_2 ）、 MgF_2 、 CaF_2 、雲母などの種々のガラス類、シリコンの酸化物および薄型ポリアクリルアミドまたはデキストランフィルムなどの種々のポリマーフィルム類（例えば、E l e n d e r ら、1996年；K h u e n e r ら、1994年）を参照、双方とも参照として本明細書で援用される）が挙げられる。ポリマーフィルムの双方とも水和して、ポリマーフィルムと支持二重層膜との間に水性のフィルムを提供する好適な二重層適合性面を形成する。

30

【0053】

「二重層適合性」の基体表面を生成させるために、前記表面を典型的には、表面不純物（ごみ、油類など）を除去するために洗浄し、および/または処理する。好適な処理は、本発明の装置の作製または構成に関して下記で検討される。

【0054】

支持二重層それ自体は、典型的にはベシクル形成脂質分子の2つの向かい合った葉状部から構成された自己集合性の二次元流動性システムである。2つの向かい合った葉状部は、天然または天然様配置においてヒドロフィックな尾部を二重層の内側に向け、親水性の頭部を二重層の外側に向けて集合する。しかし、前記支持二重層は、下記のとおり、タンパク質および非脂質などの任意の好適な膜形成両親媒性物質から構成することができる。

40

【0055】

たいのベシクル形成脂質は、(i) 脂肪酸鎖（1本または複数）および(ii) リン酸エステル基などの荷電部分または極性部分によってエステル化されたグリセロールのヒドロキシル基を有するグリセリド類などの長鎖カルボン酸類である。ベシクル形成脂質は、2本の炭化水素鎖、典型的にはアシル鎖および極性の頭部基を有するものであることが好ましい。ホスフェート基を有する長鎖カルボン酸またはリン脂質は、本発明の使用に特に、十分好適である。ホスファチジルコリン（PC）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、ホスファチジルセリン（PS）、ホスファチジン酸、ホスファチジルイニシトール（PI）、ホスファチジルグリセロール（PG）、およびスフィンゴミエリンなど

50

のリン脂質を含む種々の合成ベシクル形成脂質および天然ベシクル形成脂質があり、2本の炭化水素鎖は、典型的には長さが、約14～22個の炭素原子で、種々の不飽和度を有している。アシル鎖が種々の飽和度を有する上記の脂質およびリン脂質は、商品として入手できるか、または公表された方法に従って調製できる。他の好適な脂質としては、糖脂質類およびコレステロールなどのステロール類が挙げられる。

【0056】

本発明の使用にとって好ましいジシアル鎖脂質としては、ジアシルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルグリセロール (PG) が挙げられる。これらの脂質は、ベシクル形成脂質、主要リポソーム成分としての使用に、また、下記の誘導脂質における使用にとって好ましい。これらのリン脂質の全ておよび他のリン脂質は、リン脂質の専門的供給元 (例えば、Avanti Polar Lipids社、アラバマ州アラバスター) ならびにSigma Chemical社 (ミズーリ州セントルイス) などの一般的な化学物質供給元から入手できる。

【0057】

前記水性薄膜および大量水相は、緩衝生理食塩水溶液 (例えば、PBS) などの任意の好適な水溶液であり得る。前記大量溶液は、例えば、異なった組成を有する溶液による流出濯ぎによって容易に取り替えることができる (もちろん、前記支持二重層を常に沈めた状態に保つことに注意して)。

【0058】

上記のとおり、図1は、前記デバイスの二重層適合性面を形成する材料のウェーハからマイクロ組立て製造された支持格子を示している。しかし、前記デバイスの二重層バリア面領域を形成する材料のウェーハから、デバイスをマイクロ組立てすることもできる。そのようなデバイスの一実施形態が図4に示されている。ここで領域56のような各領域が複数の異なった二重層適合性面領域の1つに相当する二重層適合性材料から構成されている領域54などの領域を含有するように二重層バリア材料52 (例えば、酸化アルミニウム) のウェーハをマイクロ組立てすることにより、本発明のデバイスの構造部分50が製造される。一実施形態において、領域54は電導性であり、膜電位、膜電流または容量性過渡電流の変化を記録するために使用できる導線58に接続されている。電導性の二重層適合性材料の一例は、前記表面を二重層適合性にするために、シリコン酸化物またはポリマー材料の薄いフィルムで被覆した金などの金属である。シリコン酸化物の薄いフィルムは、導電体ではないが、効果的に容量性電流を通すことができる。他の好適な基質は、その電導性および直接的膜沈着を支持する能力のため、酸化インジウムスズ (ITO) である (SackmannおよびTanaka、2000年; Hillebrandtら、1999年; Salafsky, J., Groves, J. T. およびBoxer、1996年、各々参照として本明細書で援用される)。他に、またはそれに加えて、二重層適合性面を有する電極を、標準的なドーブ (例えば、ホウ素ドーブ) シリコンウェーハから生成できる。シリコン酸化物層を、そのようなウェーハ基体上に形成でき、下に半導体 (ドーブシリコン) 電極が存する二重層適合性面を提供できる。この半導体電極は、その電極に対応する二重層膜の区画からの情報処理を促進または増強させるために、もちろん任意の種々の他の要素、例えば、基体自体の中の、または所望の別個のチップ中の半導体要素とインターフェイスで接続することができる。

【0059】

本発明に従って多数の異なったデバイスが製造された。それらには、以下のものが挙げられる: (i) 2500個の同じ200 μm 正方形の囲いまたは領域からなる1 cm^2 アレイを含有するデバイス、(ii) 10,000個の同じ100 μm 正方形の領域からなる1 cm^2 アレイを含有するデバイス、(iii) 2 μm のホトレジストのバリアで分離された凡そ37,000個の同じ50 μm 正方形の領域からなる1 cm^2 アレイを含有するデバイス、および(iv) 1 μm 幅のホトレジストのバリアで分離された凡そ280万個の5 μm 正方形の囲いまたは領域からなる1 cm^2 アレイを含有するデバイス。

【0060】

本発明の例示的实施形態として、前記二重層脂質空間が、レセプタータンパク質分子、リガンドタンパク質分子、他のタンパク質分子または他の内在性膜または膜会合分子などの異なった生体分子を含有するデバイスが挙げられる。このようなデバイスは、本明細書の適用の節でより十分に記載されているバイオセンサーにおいて特に有用であり、下記のとおり、プロテオリポソームを二重層適合性面に融合することによって作製される。

【0061】

プロテオリポソームベシクルは、平面の支持膜を創製するために、ガラス表面に融合できる(BrianおよびMcConnell、1984年)。この方法は、多くの状況において好結果で適用された。一実施例において、H-2K^kタンパク質を卵ホスファチジルコリン-コレステロールベシクル内で、洗浄剤透析によって再構成し、ガラス上に平面膜を創製した(BrianおよびMcConnell、1984年)。H-2K^k含有膜は、細胞と接触させた際に、特異的な細胞毒性応答を引き出すことができた。

【0062】

Chanら(1991)は、5-グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)を固定させた膜レセプターが、プロテオリポソーム融合によって形成された平面膜内を横に移動でき、この可動性が、膜に対する細胞接着を増強することを証明した。他の適用では、支持膜を調製するためにベシクル融合、Langmuir-Blodgett方法論および誘導体化表面の組合せが用いられた(Suiら、1988年;Plantら、1995年、双方とも参照として本明細書で援用される)。

【0063】

二重層膜内へのレセプターまたはイオンチャンネルの組み込みに加えて、所望の性質を有する表面を創製するために、多数の基または化合物のいずれかによって、前記二重層を誘導体化できる。例えば、リポソームは表面脂質成分への接着により、脂質表面に結合したリガンドを含有し得る。一般に、このようなリガンドは、ベシクル形成脂質の極性頭部基に結合している。このような結合を達成する例示的方法は下記にある。

【0064】

III. 独立に処理可能な脂質二重層領域による表面検出器デバイスの構成

本発明の表面検出器デバイスは、ミクロ組立てと、例えば実施例1に記載されるような脂質ベシクル技術との組合わせを用いて簡便に製造できる。

【0065】

A. パターンづけされた支持格子のミクロ組立て

1つ以上の二重層バリア領域によって分離された複数の異なった二重層適合性面領域を有する基体表面を製造するための基体のパターンづけは、本明細書の利益を受けるミクロ組立て技術における熟練者によって理解される多数の異なった方法で実施できる。例えば、当業界で周知のミクロ機械作製法としては、スパッタリング、スピンコーティングおよび化学蒸着などのフィルム蒸着法、レーザー組立てまたはフォトリソグラフィ法または、湿式化学的方法またはプラズマ法のいずれかによって実施し得るエッチング法が挙げられる。これら、および他のミクロ機械作製法は、例えば、参照として本明細書に組み込んであるPetersen(1982)に要約されている。当業界で公知の一般的なシリコン処理法は、例えば、参照として本明細書に組み込んでいるWolfおよびTauber(1986)に記載されている。

【0066】

装置は典型的には、先ず基体材料を選択し、パターンづけした支持格子(本発明の表面検出器アレイデバイスの構造部分)を製造することによって製造される。前記支持格子は、本発明による基体表面を、パターンづけされた側に維持する。前記基体は、典型的には二重層適合性材料または二重層バリア材料のいずれかが片方の性質を有するように選択された材料からなり、二重層適合性材料または二重層バリア材料の他方の性質を有する材料細片を有する。一般的な一実施形態において、二重層適合性基体材料を、二重層バリア材料の細片によってパターンづける。他の一般的な実施形態において、基体材料は二重層バリア材料であり、その表面を、二重層適合性材料の領域によってパターンづける。しかし

、前記基体材料は、元の基体材料がパターンづけされた基体表面に表れないように、二重層適合性材料の領域と二重層バリア材料の領域、双方によってパターンづけできることが理解される。前記基体表面を形成する材料は、表面洗浄および／または処理後に、一方が二重層適合性面領域を生じ、他方が二重層バリア面領域を生じるように選択される。

【 0 0 6 7 】

ホトレジストは、本発明に関して、少なくとも2つの利用法が可能である。上記で検討したように、ポジのホトレジストは、もちろん、有効な二重層バリア材料であるが、ホトレジストはまた、本発明のミクロ組立て製造装置作製のために、引き続いてのリソグラフィに関する伝統的な意味における基体のパターンづけにも使用できる。好適なネガまたはポジのレジスト材料は周知である。一般的なネガレジスト材料としては、2成分ビスアリアルアジド／ゴムレジストが挙げられ、ポジレジスト材料としては、2成分ジアゾキノ

10

ン／フェノール性樹脂材料が挙げられる。やはり好適であり得る電子ビームレジストの例としては、ポリメチルメタクリレート（PMMA）が挙げられる。例えば、Thompsonら（1983）を参照されたい。

【 0 0 6 8 】

上述のとおり、シリコンはその精確で効率的な組立てを可能にしている十分に開発された技術のため好ましい基体材料であるが、ポリテトラフルオロエチレン類などのポリマーを含む他の材料も使用できる。基体ウェーハ（例えば、シリコンウェーハ）は、典型的には標準的RCA洗浄（KernおよびPuotinen、1970年；WolfおよびTauber、1986年）を用いて洗浄される。次に、前記ウェーハを公知の方法（WolfおよびTauber、1986年）を用いて、蒸気中、約800 から1000 の間の温度で、酸化物層（好ましくは、厚さが約0.5 μm）が形成されるまで酸化する。次に、前記酸化物層を好ましくは約1 μmの厚さに、ホトレジスト層で被覆する。本明細書に記載されているように、この方法は、本発明の例示的な表面検出器アレイデバイスの構造部分を製造するために使用でき、二重層空間を生成させるためにこれをベシクル懸濁液に曝露する前にここで必要となるのは、下記のとおり洗浄されることだけである。あるいは、ホトレジスト以外に、二重バリア領域を形成する材料によって表面検出器アレイデバイスを製造するために、前記ホトレジストパターンづけ基体を、標準的なホトリソグラフィに供することができる。この場合、被覆ラミネートを、所望のパターンのサイズとレイアウトに相当するパターンで刻印したホトマスクを通して照射する。所望のホトマスクパターンを有するホトマスクを形成する方法は周知である。例えば、石英プレートを標準的方法を用いて、電子ビーム機および電子ビームレジスト（例えば、PBS）によりクロムでパターンづけできる。あるいは、マスクを、例えば、Align-Rite（カリフォルニア州バーバンク）などの多数の供給元のいずれから、商品として入手できる。曝露は、Karl Sussコンタクトリソグラフィ機などの標準的なコンタクトマスク整列機上で実施される。クリア・フィールドまたはダーク・フィールドホトマスクによって、従来のポジまたはネガのホトレジストを用いることができる。このパターンを、引き続きエッチングまたはリフトオフ加工によって、前記基体に移すことができる。

20

30

【 0 0 6 9 】

所望のパターンで基質に薄い金属コーティングを適用するために、利用できる種々の多数の方法のいずれかを用いて、電極をデバイス内に組立てできる。これらは、例えば、Krutenat、1986年；およびWolfおよびTauber、1986年において調べられ、双方とも、参照として本明細書に組み込んでいる。ミクロ電極の組立て製造に用いられる簡便で一般的な方法としては、真空蒸着、蒸発、スパッタリング、およびめっきが挙げられる。ドーブシリコンおよび白金、金または銀などの金属を含む種々の伝導性材料が電極に使用できる。デバイスの選択された領域への電極適用のためには蒸着領域の精確な制御を可能にする蒸着法が好ましい。このような方法は、例えば、上記のKrutenat、およびWolfおよびTauberに記載されている。それらには、原子が、バーチャル点源から基体へとライン・オブ・サイト上に送達される電子ビームを用いる物理蒸着が含まれる。レーザーコーティングにおいては、レーザーが基体上の目標点に集

40

50

められ、溶解した粒子が基体に向かって加速されるように、担体ガスが粉末化したコーティング材料をビーム中へ発射する。

【0070】

精確な標的化を可能にする他の方法では、従来の電子ビームレジスト（例えば、PMM A）、他の材料の薄層（例えば、金属塩）、単層などの予め蒸着させた基質の選択的分解を誘導する電子ビームを用いる（例えば、Tiberioら、1993年を参照）。この方法は、ミクロン下の回路を製造するために用いられている（例えば、Ballantyneら、1973年）。ナノメータスケールで膜パターンを生成させ、画像にするために近傍野走査顕微鏡法と共に、電子ビームリソグラフィを使用できることから、種々の領域の寸法を、極めて小さくすることができることが解されよう。さらに、二重層バリア特性を有する一定の非古典的なミクロ組立て材料を、標準的な技術を用いてパターンづけできる。例えば、酸化アルミニウムを SiO_2 基体ウェーハ上に、蒸着およびリフトオフによってパターンづけできる（WolfおよびTauber、1986年、p. 535参照）。

10

【0071】

このようなスパッタリングならびに上記の一般的なミクロ組立て製造は、その作業を、MCNC（ノースカロライナ州リサーチトライアングルパーク）、IC Sensors（カリフォルニア州ミルピタス）およびSilica-Source Technology（アリゾナ州テンペ）などのミクロ組立て製造サービスを提供している会社に請け負わせることによって、簡便に行うことができる。

20

【0072】

B. パターンづけした支持格子の洗浄

パターンづけした支持格子の作製後、表面に隣接する脂質二重層の形成を妨げる恐れのある基体表面上に存在する不純物または汚染物を剥がし、削り取るためにそれを洗浄し、および/または処理する。洗浄法は、二重層バリア領域の機能性を実質的に損なわないように選択される。例えば、前記バリア領域がホトレジストから作製されている実施形態では、酸が二重層バリア領域を剥ぎ取る恐れがあるため、伝統的なピランハ（piranha）溶液酸洗浄液（3 : 1 H_2SO_4 : H_2O_2 ）を用いて洗浄すべきではない。ホトレジストを損傷させない例示的洗浄/処理法では、アルゴンまたは酸素のプラズマに対するパターンづけした格子の数分間曝露が用いられる。前記プラズマは、ホトレジストをいくらかは削り取るが、それは、ホトレジスト層を実質的に損傷させる前に基体（例えば、 SiO_2 基体）の表面層から汚染物質を剥ぎ取る。

30

【0073】

多数の好適な削り取りおよび/または洗浄法が当業界に知られている。下記にそのような方法を4つまとめている。それらには、上記のものが含まれ、別々にまたは組合わせて使用できる。第1の方法では、前記デバイスの構造部分（支持格子）を500 で数時間焼き付ける。この方法は、金またはホトレジストには適合しない。第2の方法では、前記支持格子をピランハ（piranha）溶液酸洗浄液（3 : 1 H_2SO_4 : H_2O_2 ）中で洗浄する。この方法は、金および白金では好結果で用いることができるが、ホトレジストおよび多くの金属には適合しない。第3の方法では、支持格子を洗浄液（例えば、ICN Biomedicals社（オハイオ州アウロラ）の7X洗浄液、1 : 4に希釈）中で煮沸する。この方法は、ホトレジストには適合せず、また、単独使用ではあまり効果的ではない。第4の方法では、支持格子を気体プラズマ（例えば、アルゴンまたは酸素）中で削る。この方法は、第3の方法と組合わせた場合に最も効果的であるが、単独で用いることができ、本明細書に記載された方法でホトレジストとの使用に好適な唯一の方法である。

40

【0074】

C. 支持二重層空間の作製

このような洗浄/削り取り/処理工程の後に、前記格子をチャンバーに入れ、選択された脂質から形成され、また（場合によっては）選択されたタンパク質または他の生体分子

50

を含有するベシクルまたはリポソームの懸濁液を、各二重層適合性面領域に接触させる。懸濁液中のベシクルは一般に、二重層適合性面領域と1分以下で融合して、支持二重層膜を形成する(Xiaら、1996年; Grovesら、1996年)。二重層が形成し、前記格子が大量の水性物質で満たされる前に、実質的な蒸発を可能にするほど脂質懸濁液の小滴容量が、十分に小さい(例えば、 $< 5 \mu\text{l}$)適用においては、加湿チャンパーを用いることが好ましい。

【0075】

リポソームは、Szoka, Jr.ら(1980)に詳述されているものなどの種々の方法によって調製できる。本発明の作製に有用なリポソームの形成に用いられる脂質成分は、少なくとも70パーセントのベシクル形成脂質を含有することが好ましい。一般的な一実施形態において、前記二重層は、実施例1に記載されているとおりに形成される。

【0076】

上記で検討したように、前記支持二重層は、前記支持二重層膜に付着した、またはその中に組み込まれたペプチド、核酸、因子などの他の生体分子のレセプターを含有し得る。

「誘導体化」リポソームまたはタンパク質などの付加部分を含有するリポソームを用いて、このような「修飾」二重層を製造する方法は周知である(例えば、Zalipsky, 1995年; Allenら、1995年、ならびに米国特許第6,605,630号、米国特許第4,731,324号、米国特許第4,429,008号、米国特許第4,622,294号および米国特許第4,483,929号を参照)。下記で幾つかの例を検討する。

【0077】

このような誘導体化リポソームの調製に好適な方法の1つは、前形成リポソーム内へのポリマー脂質結合体の拡散に関係する。この方法では、リポソームを前記のように、ベシクル形成脂質から調製し、前形成リポソームを、ポリマー脂質結合体のミセルの濃縮分散液を含有する溶液へ加える。次にこの混合物を前形成リポソーム内へのミセル脂質の挿入達成に効果的な条件下でインキュベートする。

【0078】

他の方法において、生体分子を下記の結合反応により脂質に結合させて、生体-脂質結合体を形成する。この結合体を、以下に記載されるように、リポソーム形成のために脂質溶液に加える。他の方法においては、生体分子の共有結合のために活性化したベシクル形成脂質を、リポソーム内へ組み込む。形成したリポソームを生体分子に曝露し、活性化脂質への生体分子の結合を達成する。さらに、内在性膜レセプターまたはタンパク質を含有するリポソーム作製に特に好適な他の方法においては、下記のとおり、リポソームを単に、そのようなタンパク質の存在下で形成し、「プロテオリポソーム」を作製する。

【0079】

生体分子とベシクル形成脂質から構成される結合体を調製するために種々の方法が利用できる。例えば、アミン含有生体分子を、N-ヒドロキシスクシンイミドの活性化エステルを含有するように誘導体化されている脂質と反応させることにより、水溶性のアミン含有生体分子をホスファチジルエタノールアミンなどの脂質に共有結合させることができる。

【0080】

他の例として、生体分子、特にタンパク質などの大型生体分子を、報告された方法に従って脂質に結合できる。方法の1つは、脂質、典型的にはリン脂質上のアルデヒド基と生体分子上の第一級アミノ酸との間の Schiff 塩基形成に関係する。前記アルデヒド基は、脂質の過ヨウ素酸塩酸化によって形成されることが好ましい。酸化剤を除去した後の結合反応は、Heath(1981)によって記載されたとおり、ジチオトレイトールなどの還元剤の存在下で実施される。この方法に好適な典型的なアルデヒド-脂質前駆体として、ラクトシルセラミド、トリヘキソシルセラミン、ガラクトセレブロシド、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトールおよびガングリオシドが挙げられる。

【0081】

第2の一般的な結合方法は、チオール含有生体分子に適用でき、脂質と生体分子との間のジスルフィド結合またはチオエーテル結合の形成に関係する。ジスルフィド反応においては、ホスファチジルエタノールアミンなどの脂質アミンは、生体分子における曝露されたチオール基と反応できるピリジルジチオ誘導体を含有するように修飾される。このような方法のための反応条件は、Martin (1981) に見ることができる。Martin (1982) によって記載されたチオエーテル結合法は、N-(4)P-マレイミド-フェニル(ブチリル)ホスファチジルエタノールアミンなどのスルフヒドリル反応性リン脂質を形成し、この脂質をチオール含有生体分子と反応させることによって実施される。

【0082】

生体分子を脂質と反応させるための他の方法は、生体分子をN-ヒドロキシスクシンイミドの活性化エステルを含有するように誘導体化されている脂質と反応させることに関係する。この反応は、典型的には、デオキシコール酸塩などの緩やかな洗浄剤の存在下で実施される。上記の反応のように、この結合反応は、リボソーム内への脂質の組み込み前に実施されることが好ましい。短いスパーアームによる生体分子のリボソームへの結合方法は、米国特許第4,762,915号などに記載されている。一般に、スパーアームへの部分の結合は、ベシクル形成脂質、典型的には、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)を、親和性部分の結合に反応性の末端基を有するポリエチレングリコール(PEG)などの親水性ポリマーにより誘導体化することによって達成できる。活性化PEG鎖に対するリガンドの結合方法は、当業界に記載されている(Allenら、1995年; Zalipsky、1992年a; Zalipsky、1992年b; Zalipsky、1993年; Zalipsky、1994年)。これらの方法において、mPEGの不活性な末端メトキシ基は、共役反応に好適な、アミノ基またはヒドラジド基などの反応性官能基と置換される。末端官能化PEGは脂質、典型的にはDSPEと結合する。

【0083】

官能化PEG-DSPE誘導体は、リボソーム形成に用いられ、所望のリガンド(すなわち、生体分子)は、リボソーム形成の前または後に、PEG鎖の反応性末端に結合する。

【0084】

タンパク質などの生体分子を支持脂質二重層に結合する他の方法は、アミノ酸、ヒスチジンの側鎖と膜表面に固定された二価の遷移金属イオンとの間の特異的相互作用によるものである(Malikら、1994年; Arnold、1991年)。この方法は、例えば、種々のタンパク質およびペプチドを脂質単層に結合するために用いられている(Shnekら、1994年; Freyら; 1996年; Sigalら、1996年)。簡略に述べると、二重層表面に固定されているリガンドまたはレセプターをコードするcDNAを、前記リガンドまたはレセプターがその末端の一方(例えば、C末端)にポリヒスチジン(例えば、ヘキサヒスチジン)タグを含有するように設計する。前記二重層は、金属キレート化部分(例えば、銅キレート化部分または脂質(Shnekら、1994年; Freyら; 1996年))から形成されるか、またはそれによって誘導体化され、発現したHis-タグ化タンパク質は、支持二重層を生成するために用いられるベシクルと共に、または支持二重層それ自体と共にインキュベートする。

【0085】

選択された生体分子を支持二重層に結合するために、特異的高親和性分子相互作用もまた使用し得る。例えば、二重層空間を、ビオチン化脂質(例えば、オレゴン州ユージーン所在のMolecular Probesより入手可能)およびアビジンに結合またはカップリングした生体分子を含むように形成し得るか、またはストレプトアビジンが、ビオチン部分を介して二重層に結合し得る。また、生体分子は、グリカン-ホスファチジルイノシトール(GPI)を介して支持脂質二重層に結合し得る。結合されるタンパク質は、GPI結合を含有するように遺伝子設計できる(Carasら、1987年; Whitehornら、1995年)。遺伝子内へのGPI結合シグナルの組み込みにより、前記タン

10

20

30

40

50

パク質は、細胞によって翻訳後修飾され、シグナル位置にGPI結合が生じる。このタイプの変化は、一般的に本明細書に記載されているものなどのタンパク質の分子認識特性に影響を与えないことは理解されるであろう(Linら、1990年; McHughら、1995年; Wettsteinら、1991年)。

【0086】

1つの簡便な方法は、関心対象のタンパク質をコードしているcDNA配列を、標準的な分子生物学の方法と操作を用いて、GPI結合シグナルを含有しているベクター内ヘクロン化することである(例えば、Ausubelら、1988年; Sambrookら、1989年を参照)。ベクターの一例は、修飾ポリリンカーおよびヒト胎盤のアルカリホスファターゼ(HPAP)GPI結合シグナルを含有する、Whitehornら(1995)に記載されたpBJ1Neo誘導体である。他の好適なベクターは、pBJ1Neo(Linら、1990年)である。次に前記構築体を、電気穿孔(例えば、約0.23kV/960μFの設定を用いて)などの標準的なトランスフェクション法を用いて、好適な宿主細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞)内へ形質移入する。形質移入された細胞を、例えば、関心対象のタンパク質に向けた抗体により、蛍光活性化細胞分類(FACS)を用いて選択する。

【0087】

高度に表面発現した形質移入CHO細胞を培養液中で増殖させる。GPI結合タンパク質を、例えば、洗浄剤抽出(Schildら、1944年)により細胞膜フラクションから精製する。簡略に述べると、殆どのコンフルエントな融合性CHO細胞を、プロテイナーゼおよびホスファターゼ阻害剤のカクテルを含有するPBSにより培地のない状態に洗浄する。前記細胞を、0.5%のNP40を含有する同じ緩衝液中、氷上で溶解する。核と細胞破片をスピアウトし、上澄液を抗体アフィニティカラム上に乗せる。

【0088】

次に前記洗浄剤をカラム上、1%オクチルグルコシド(OG)に交換し、タンパク質を1%OGを含有する塩基(pH 11.5)によって溶出する。溶出後、タンパク質を中和化溶出緩衝液中に貯蔵するか、または前記緩衝液をPBS中OGに交換する。次に精製したGPI-結合タンパク質、または他の任意の所望のタンパク質またはレセプターを下記のとおりに、プロテオリボソーム中へ組み込むことができる。

【0089】

選択された膜タンパク質を含有するプロテオリボソームは、標準的な方法を用いて、例えば、Sadlerら(1984)によって記載されたプロトコルを用いて調製し得る。この方法では、組替えレセプタータンパク質を好適な緩衝液(例えば、10mMトリスポH 8.0、0.1% LDAO緩衝液)中、例えば、DEAEイオン交換カラムまたはCentricon濃縮器(Amicon社、マサチューセッツ州ビバリー)を用いて濃縮する。所望の場合は、前記塩濃度を透析により、所望の値(例えば、100mM NaCl)に調整できる。

【0090】

次に、濃縮したレセプタータンパク質を、例えば、小型の円錐底バイアル中、攪拌しながら小型単層ベシクル(SUV; 下記のとおりに調製; 場合によっては、Texas Redなどの脂質標識をつけて)の懸濁液へ加え、選択された最終的なタンパク質:脂質のモル比とする。前記比は、一般的に、約1:100から1:1000の間であり、好ましくは、約1:300から1:500の間である。一実施形態において、前記比は、1:350である。

【0091】

上記のGPI結合タンパク質の場合、約100nMの濃度のタンパク質を、TN 25/50中、1mMの脂質濃度で、総OG濃度が、好ましくは0.15%を超えずに、SUVと混合する。洗浄剤は、4で1リットルTN 25/50の3回の交換に対して透析により除去できる。透析後、脂質濃度は、465nmにおけるNBD-PE吸収を用いて測定でき、0.2mg/mlに調整する。

【0092】

あるいは、前記サンプルを、脂質吸着を最少化するためにSUVにより予め平衡化したセファロースカラム（例えば、Sepharose CL-4B（Sigma）カラム）上で操作でき、フラクションを採取する。プロテオリポソームフラクションの吸収スペクトルを測定し、脂質標識の吸収ピークを用いて、真のタンパク質：脂質のモル比を算出する。典型的には、フラクション中のタンパク質：脂質のモル比は、約1：300で始まり、約1：1000～1200で終わる単調な減少をたどる。約1：500以下のモル比を有するフラクションのみが、一般に平面支持二重層の作製に用いられる。モル比のより高いフラクションは、常に均一な平面二重層を形成するとは限らないからである。

【0093】

IV. 適用

A. バイオセンサー

一態様において、本発明は、表面検出アレイデバイスを有するバイオセンサーを含む。前記検出アレイデバイスは、(i) 1つ以上の二重層バリア領域によって分離された複数の異なった二重層適合性面領域を規定している表面を有する基体、(ii) 前記基体表面を覆っている大量の水相、(iii) 各二重層適合性面領域上に維持された脂質二重層空間、および(iv) 各二重層適合性面領域と、対応する脂質二重層空間との間に挟まれた水性薄膜を含んでなり、各二重層空間はレセプターまたは生体分子の一種を含有し、異なった二重層空間は、レセプターまたは生体分子の異なった種類を含有する。前記レセプターまたは生体分子は、各脂質二重層空間へまたは、その中に固定されている。脂質空間中のレセプターに対する特定のリガンドの特異的結合は、光学的または電気的検出などの種々の公知のバイオセンサー検出機構のいずれかによって検出される。電気的検出を採用しているバイオセンサーにおいては、支持格子は、伝導性の電極および前記デバイスの各アレイ要素に対する電導線を含有することが好ましい。前記導線は、典型的には、前記デバイスからの延長線または「ピン」として終わっており、これは、プロセッサに導く接続ケーブルまたはリボンによりインターフェース接続ができる。前記電極は、二重層適合性面の少なくとも一部を形成することが好ましく、絶縁物質の細片によって、互いに分離されている。それらは、容量性過渡電流ならびに伝導性電流（持続的または過渡的であり得る）の検出に使用できる。一実施形態において、前記電極は、二重層適合性面の一部を形成する。他の実施形態において、その構成は実施例5に詳述されているが、前記電極は、二重層適合性面のすぐ下に位置する。すなわち、電極表面は、低温成熟酸化物（例えば、 SiO_2 ）などの材料の薄層で被覆され、それが二重層適合性面を形成する。この層が絶縁性材料である実施形態において、イオン輸送レセプターに対するリガンド結合により生じた容量性過渡電流の検出を可能にするために、その厚さは、約1 μm 未満であることが好ましい。バイオセンサーと共に使用する上で好適な表面検出アレイデバイスの構造部分の一実施形態は、上記のとおり、図4に示されている。

【0094】

前記デバイスは、各アレイ要素からのシグナルを貯蔵および/または解析するプロセッサにより接続するか、またはプロセッサによりインターフェース接続される。次にプロセッサは、データをコンピュータメモリー（ハードデスクまたはRAM）へ転送し、そこからさらにそのデータは、さらに解析し、プリントおよび/または結果を表示するために、ソフトウェアプログラムとともに使用できる。

【0095】

独立して処理できるレセプター含有脂質二重層領域のアレイを採用しているバイオセンサーは、以前から利用できるバイオセンサーよりも、多数の利点を有している。例えば、二重層膜流動性は、本発明のデバイスに生きた細胞の表面特性に類似した表面特性を与える（例えば、Chanら、1991年；Tozerenら、1992年）。1つの特に注目すべき試験セットにおいて、支持膜に組み込まれた精製主要組織適合性複合タンパク質は、再処理された抗原のヘルパーT細胞に対する提示において、抗原提示細胞を効果的に交換できることが示された（McConnellら、1986年；WattsおよびMcC

10

20

30

40

50

onnel、1987年)。

【0096】

1. 検出法。レセプターベースのバイオセンサーは、バイオセンサー上の「レセプター」生体分子に対する選択された分析物の特異的結合を検出することによって働く。本発明は、細胞膜に類似した流動性二重層を採用しているため、事実上、任意の膜貫通型、膜固定または膜会合のタンパク質、炭水化物、脂質、核酸または他の生体分子をレセプターとして用いることができる。レセプターは、表面検出器アレイデバイスの二重層空間を生成させるために用いられる脂質ベシクル内に組み込まれる。レセプターに対するリガンドの結合は、典型的には光学的にまたは電氣的/電気化学的に検出される。

【0097】

光学的検出法としては、エリプソメトリー(Corsselら、1986年; Joenssonら、1985年; VromanおよびAdams、1969年)、光通信(NellenおよびLukosz、1990年)および表面プラスモン共鳴(SPR、Cullenら、1988年; Liedbergら、1983年)が挙げられる。SPRは、リアルタイムの分子相互作用モニタリングに特に有利であり、分子間結合相互作用の程度の高感度で包括的な分析を可能にする。

【0098】

このアプローチにおいて、支持格子は、二重層バリア領域によって分離された伝導性領域(例えば、金)のアレイよりなる支持格子を作製することによって製造される。次に、非常に薄いポリマーフィルム(例えば、ポリアクリルアミドまたはデキストラン; Enderら、1996年; Khuennerら、1994年)、を伝導性領域に蒸着させ、二重層適合性面を形成する。Khuennerら(1994)は、3-メタクリル-オキシプロピル-トリメトキシ-シラン(MPTS; Serva、ドイツ国ハイデルベルグ)による、表面へのポリアクリルアミドのカップリングを記載している。

【0099】

選択された分子を含有する二重層を記載されたとおり蒸着させ、レセプターが点在した脂質空間のアレイを含有する表面上を溶液が通過することを可能にするセル内に二重層含有支持格子を入れる。前記格子を発光ダイオード(LED)により、ある角度で照射し、反射光を光検出器で分析する。入射光と金属との相互作用により生じた一時的電場により、反射光は、レセプターから約1 μm (= 760 nm) 媒体中へ延長している層の環境に対して高感度である。レセプターに対するリガンド結合によって生じるようなレセプターの環境における変化は、反射のある特定の角度(共鳴角度)における反射率強度の変化として検出される。

【0100】

容量検出またはインピーダンス分析もまた使用できる。ここでは電極を、二重層適合性面領域の各々の中に組み込み、「基底」電極を大量水相の中に置く。選択されたアレイ要素にわたって供給される選択された電圧波形を発生させるために、変動周波数機能発生器からの電圧を用いる。電圧のピークからピークの振幅は、典型的には約10 Vの位数にあるが、それより相当小さくできる。周波数の範囲にわたって電圧をかけ、標準的なシグナル処理法を用いて、シグナル周波数の関数としての測定電流から容量を決定する。支持二重層の容量測定およびインピーダンス分析の適用例は、例えば、Steilzeら、(1993)およびSteilzeおよびSackmann(1989)で検討されており、双方とも参照として本明細書に組み込んである。

【0101】

他の検出方法は、参照として本明細書に全て組み込んであるGittlerら、1993年; Osmanら、1993年; Taylorら、1993年; Caseら、1994年; およびTomichら、1994年などの、バイオセンサーに関する米国特許において検討されている。

【0102】

2. バイオセンサーの作製

表面検出アレイデバイスを (i) 二重層空間を作製するために使用されるベシクルが、典型的には、所望のレセプターまたは生体分子を含有すること (このレセプターまたは生体分子は二重層が形成された後にも導入され得る) および (i i) 異なったアレイ要素は、典型的には、異なったベシクル懸濁液によって作製されることを除いては、本質的に上記のとおり製造される。

【 0 1 0 3 】

被検物の選択性は、各アレイ要素の支持二重層内に存在する異なったタイプのレセプターにより、異なったアレイ要素に与えられる。このような別個の二重層は異なった生体分子またはレセプターを含有するリポソームまたはプロテオリポソームを用いて形成し得る。このようなデバイスを作製する簡便な方法は蒸発による流体の損失を排除するために、加湿チャンバー内に入れてあるデバイスの異なった区画に、所望のリポソーム懸濁液のミクロ小滴を沈着させることである。

10

【 0 1 0 4 】

単一のミクロ組立て支持格子上に、異なった組成の二重層を形成するために、当業界で公知の幾つかの方法のいずれかを用いることができる。1つの好適な方法では、加湿チャンバー内のデバイスの個々の二重層適合性面領域上に、選択されたベシクル懸濁液を含有するミクロ小滴を沈着させるために改造インクジェット印刷装置 (B l a n c h a r d ら、1996、参照として、本明細書で援用される) を使用する。前記装置のインクジェットプリントヘッドは、ベシクル含有懸濁液の小滴 (例えば、直径が約 $100\text{ }\mu\text{m}$) を高密度アレイフォーマット内に送達するために改造される。隣接小滴は、互いに $30\text{ }\mu\text{m}$ の近さで沈着できる。このような適用におけるバリアは、典型的には、隣接小滴間の最小分離距離 (すなわち、約 $30\text{ }\mu\text{m}$) の位数にある幅を有するが、特定の適用においては、より大きいまたはより小さいこともあり得る。

20

【 0 1 0 5 】

もちろん、ベシクル懸濁液は、標準的なミクロピペット法 (すなわち、ミクロ操作器に接続したホルダー内のミクロピペット) を用いても沈着され得る。ミクロ操作器は、より高い精度と効率のため、電動駆動装置により制御され得る。このような駆動装置ならびにミクロ操作器は、例えば、Newport社 (カリフォルニア州アーバイン) および米国Narashige社 (ニューヨーク州グリーンベール) から商品として入手できる。次にこの駆動装置は、完全自動操作のため、マイクロコンピュータによって制御され得る。全体の過程は所望の場合、解剖顕微鏡などの従来の顕微鏡を用いてモニターできる。好適なミクロピペットは、Narashigeから入手できるプラーなどの標準的なミクロピペットプラーを用いて作製できる。

30

【 0 1 0 6 】

前記ピペットの先端は、1ミクロン未満から数百ミクロン以上の範囲の開口直径を有するように作製できる。ピペットの背部は、ベシクル懸濁液の所望の容量を分配するための標準的なミクロ注射ポンプセットに接続できる。

【 0 1 0 7 】

ベシクル懸濁液を含有する小滴は、形成できる本質的に全ての膜に形成させるために、数分間、基体格子上にインキュベートする。次に、好適な大量の水相が、二重層膜の上に確立するまで、前記格子水を水溶液に浸す。有意に前記二重層を乱すことなく、前記格子水を浸す簡便な方法は、前記表面が、前記格子の最上部と同一平面になり、しかも、区画が初めに沈着させた小滴を依然として含有している状態まで、チャンバー内の水性物の水位を上げることである。次に、小滴が、水性溶液の均一なフィルムへと合体するまで、格子の最上部を、水溶液の細かいミストに曝露させる。次に、格子上に大量水相の所望の容量を達成するまで、溶液の水位を上げる。

40

【 0 1 0 8 】

3. バイオセンサーの使用。上記のバイオセンサー表面検出器アレイデバイスを採用しているバイオセンサーは、リガンドの複雑な混合物を含有している溶液中の低濃度の生物活性被検物またはリガンドを検出するために使用できる。このような方法において、前

50

記表面検出器アレイデバイスは、異なったアレイ位置における二重層空間内の異なったレセプターによって構成される。シグナル変動を制御するため、幾つかの異なったアレイ要素が、同じタイプのレセプターを含有し得る。同様に、正および/または負の制御を目的として、指定されたアレイ要素を使用し得る。

【0109】

次に、レセプターアゴニストのような選択されたりガンドの存在に関して、バイオセンサー表面検出器アレイデバイスを、分析すべきリガンドの混合物を含有している水溶液に接触させるが、この接触は、この装置の大量の水溶液部分によって行われる。言い換えると、試験すべき混合物を、前記デバイス上で洗浄し、大量水性部分を交換する。選択されたりガンドが、あるレセプターに特異的に結合すると、その結合が、好適な検出方法によって検出される。例えば、少なくとも1つのアレイ要素の脂質空間内に組み込まれたアセチルコリン(Ach)レセプター(AchR)を含有するアレイ装置を用いているAchの存在に関するアッセイでは、AchRに対するAchの結合が、AchRを含有する要素における膜内外の電圧または電流の変化として検出される。

【0110】

B. 生物活性スクリーンのための基体

上記のバイオセンサー適用に関する一実施形態において、本発明のデバイスを、化合物の生物活性スクリーンにおいて使用されるレセプターのアレイを保持する基体として採用できる。特に、多数の化合物ライブラリーの高スループットスクリーンは、典型的には引き続き生物活性試験に関して、候補となる化合物を迅速に同定するために、スピードと効率に関して最適化される。このような生物活性試験が、例えば、イオンチャンネルアゴニスト、またはアンタゴニスト活性に関するアッセイに関係している場合、試験は、標的イオンチャンネルまたはレセプターを発現している個々の細胞の電気生理学的測定(例えば、パッチクランプ;例えば、Hamillら、1981年を参照)を用いて、一時期に1つの化合物が1人の科学者によって行われることが多い。このタイプの分析は、各化合物に関して、詳細で高品質のデータを提供するが、多数の化合物を生物活性に関してアッセイすべき時は、時間がかかり非効率的である。本発明の装置は、高スループットスクリーンにおいて同定された化合物の生物活性を評価する二次スクリーンにおいて使用でき、科学者が、真に関心対象の化合物に集中することを可能にする。このデバイスは、本質的にはバイオセンサーに関して上に記載されるとおりに作製される。同じタイプの結合検出体系を採用し得るが、イオントロフィックレセプターまたはイオンチャンネルについての生物活性に関して化合物をアッセイする場合は、典型的には光学的検出よりも電氣的検出が好ましい。

【0111】

アレイ要素の各々に電極を使用している電氣的検出を採用しているデバイスでは、水の薄膜が二重層から電極を分離しているため、例えば、電圧依存性イオンチャンネルを活性化するために、二重層膜にわたって電場をかけ得ることは理解されるであろう。これにより、チャンネルが本来の静止状態以外の状態(例えば、活性化または不活化状態)の場合にのみ、チャンネルに結合する化合物をスクリーニングすることが可能になる。

【0112】

関連した実施形態において、本発明のデバイスは、化合物のライブラリー(例えば、組合わせ小型分子ライブラリー、組合わせペプチドライブラリーまたは組合わせ核酸ライブラリーなどの組合わせ生物学的ライブラリー、または本発明の方法を用いて採用され得る化合物の任意の他のタイプのランダムまたは非ランダムな群)を保持するための基体として使用される。二重層空間は、実施例1に詳述されているように、一般的な大量のベシクル懸濁液から支持格子に沈着され、次に各二重層空間を、例えば、このアプローチが、ペプチドが、流動性膜の限定された区画の表面に表示される形態において、空間的に処理できる分子ライブラリー(例えば、ペプチドライブラリー)を生じる光方向づけ合成(Fodorら、1991年)の使用である場合、上記1つの適用で詳述した方法の1つを用いて、選択された生体分子によって誘導体化する。ここでは、ペプチド配列が、アレイ内

のその位置によって規定されていることを除けば、これはファージ表示にいくらか類似している。このようなライブラリーは、前記膜によって提供される天然様表面による細胞スクリーニングにとって特に有用であり得る。

【0113】

C. 高密度の膜タンパク質による領域形成

本発明は、非常に高密度の膜タンパク質の領域により支持二重層を形成する方法も含む。上述のように、タンパク質含有ベシクルまたはプロテオリポソームは、典型的には、約1:500以下のタンパク質:脂質のモル比でのみ形成することができ、より高いモル比を有するベシクルは、均一な平面二重層を一貫して形成することはない。したがって、支持二重層を形成するために、単にタンパク質含有ベシクルを表面と融合させることによって、脂質二重層におけるタンパク質の高密度アレイは形成できない。

10

【0114】

しかし、実施例3および図3に示されるように、支持二重層が、二重層バリア領域によって囲まれた囲いの中に形成され、電場に供されるならば、膜タンパク質を非常に高密度の領域に濃縮できる。この結果は、例えば移動焦点を三角形の囲いの頂点にすることにより増幅できる。

【0115】

前記タンパク質を濃縮した後、それらを、構造決定のための回折試験など、引き続き適用に使用することができる。所望の場合、電場誘導濃縮グラジエントの高密度タンパク質領域を、標準的な架橋法(例えば、グルタルアルデヒドによる処理)を用いて、タンパク質を架橋することにより「凍結」できる。

20

【0116】

D. レセプターのサイズおよび/または凝集を測定する装置

本発明の他の態様は、前記支持二重層内に統合されたまたは結合した生体分子に係る分類装置に関する。前記分類装置は、前記二重層バリア面領域を、異なった区画へと表面を区画分けするために使用するのではなく、前記装置の一端から他端までの、徐々に小さくなる「開口」を有する2次元のふるいとして作用させるために使用する。本発明のこの態様の構造部分の一実施形態を図5の平面図に示している。ここで、装置70の構造部分は、全側面が二重層バリア領域76に接している二重層適合性領域を規定している基体表面74を有するウェーハ72から形成される。前記二重層適合性領域はまた、二重層バリア面領域を規定している複数の実質的に平行な破線78によって中断されている。前記の線における隙間は分子の大きさであり、この装置の一端80から反対の端82に進むにつれて徐々に小さくなっていく。電極84、86は、この装置の端近くに位置しており、ワイヤ90、92によって、電圧源88に接続されている。

30

【0117】

前記装置は、膜会合分子をサイズによって分類するために使用される。種々のサイズを有する同様に荷電した分子の混合物を、周囲を囲っている二重層バリア領域および最大の隙間を有する破線により形成されたウェル内に入れる。電圧源を両極性で入れ、荷電生体分子を、連続的バリアの徐々に小さくなる隙間を通して、前記分子の通過には小さすぎる隙間を有するバリアにより「下流」側に規定されたウェル内のサイズにしたがって捕捉されるまで移動させる。

40

【0118】

関連した適用において、二重層バリア領域は、バリアの均一な、または等級化されたアレイまたはネットワークを提供するために調整され、電気穿孔された膜分子は、アレイを通る移動時間に基づいて分類される。ここで、分離方法は、より小さな分子が、より大きな分子よりも速く移動するアガロースまたはポリアクリルアミドゲルなどのゲルにより得られる方法と同様である。

【0119】

本発明の他の態様において、前記バイオセンサーアレイは、アレイにおける1つ以上バイオセンサーが、そのバイオセンサーアレイ内に存在する残りの他のバイオセンサーと異

50

なった二重層組成を有する複数のバイオセンサーをさらに含んでなる。生じたグラジエントバイオセンサーアレイは、各バイオセンサー上の二重層組成物の局所的濃度に関して、バイオセンサーアレイにわたって、少なくとも1次元または2次元のグラジエントを形成する。グラジエントの最初の形成時には、いずれか1つの特定のバイオセンサーにまたがってサブグラジエントが存在し得るが、このようなサブグラジエントは、各二重層の下に位置する特定の二重層適合性領域によって捕捉された脂質二重層領域の範囲内で迅速に均一化する。

【0120】

上記で検討したように、脂質ベシクルを含有する脂質二重層形成組成物が、1つ以上の二重層バリア領域によって囲まれた二重層適合性領域に接触すると、前記ベシクルは、各々二重層適合性領域面において融合して、その上に連続的な二重層空間を形成する。各二重層空間は、二重層バリア領域の存在によって、互いに分離されているため、各領域上に支持され生じた空間は、互いに二次元マトリックス隔離の状態にある。その結果、二重層適合性領域上の異なった、しかし、隣接した二重層空間の組成物は、それらがごく近位にあるにも係らず異なったままとなる。このような結果により、複数の異なったバイオセンサー領域を有し、各領域が、その隣接二重層空間に対して明らかに異なった二重層組成を有するバイオセンサーアレイを、迅速に確かに創製することを使用者に可能にさせる予期しない利益が提供される。本節の目的に関し、二重層組成物は、二重層自体の化学的成分および脂質二重層形成ベシクルとして送達中に脂質誘導できる、例えば、レセプターサブユニット、種々のレセプター、他の細胞膜連絡因子などの任意の他の成分の双方を意味する。レセプターサブユニットの異なる比は、この方法を用いて「力価決定」され得る。また、この方法は、二重層形成成分、例えば、種々のリン脂質の異なった比を作成するために使用できる。

【0121】

グラジエントバイオセンサーアレイは、異なった各組成物が、各々の二重層適合性領域内に留まり、1つ以上の二重層不適合性領域により、他の異なった二重層組成物含有二重層適合性領域から分離されるように、バイオセンサーアレイ内で異なった二重層組成物を、異なった二重層適合性領域に接触させることによって創製し得る。1つの方法として種々の二重層形成組成物を1つ以上の二重層バリア領域によって互いに分離された複数の二重層適合性領域を各々が含有するバイオセンサーアレイの種々の区域に選択的に接触させて、そのような区域内で同一の組成物を有するが、バイオセンサーアレイ内の他の区域とは異なっている複数の二重層適合性領域を各々が含有する複数の種々の区域を有するバイオセンサーアレイを生じることが挙げられる。

【0122】

グラジエントは種々の方法において形成できる。例えば、簡単な2次元グラジエントは、毛細管などの小直径穴あき導管を通して、互いに流体連絡している少なくとも2つの容器から混合物を引き出すことによって形成できる。最も簡単な形態においては、並んで置かれた2つのボトルを小さな穴あきサイフォン管によって連絡でき、2ボトルシステムのうちの一方から他の管によりポンプ吸出し、またはサイフォン作用によって流体を除去できる。各ボトルが、グラジエントを形成する異なった濃度の成分を含有する。高濃度または低濃度のどちらのボトルから引き出されるかによって、2ボトルシステムが作製される時に、高から低または低から高の流出液グラジエントが形成される。次にこの流出液を、幅の広がった薄いプロフィルのノズルに通して、バイオセンサーアレイの表面を被覆する。このノズルに対して、アレイを横に動かすことによって、バイオセンサー表面にわたって、混合物のグラジエントが形成される。グラジエント形成装置は、例えば、各々が参照として本明細書で援用される米国特許第3,840,040号、米国特許第4,074,687号、および米国特許第4,966,792号に見られるように、当業界に公知であり、それらを本発明に従って、さらに改造してグラジエントバイオセンサーアレイ形成装置を得ることができる。

【0123】

本発明のさらに他の態様では、複数の脂質二重層適合性領域を有し、各適合性領域が、1つ以上の二重層バリア領域によって囲まれているバイオセンサーアレイを提供する工程、2つ以上の異なった脂質二重層組成物を担持したグラジエント形成デバイスであって、表面上にスポットを形成するためのスポット形成デバイスと流体連絡している前記グラジエント形成デバイスを提供する工程、バイオセンサーアレイ製品を保持し、移動するための多軸移動テーブルを提供する工程および1つ以上の二重層バリア領域によって囲まれている複数の二重層適合性領域を有するバイオセンサーアレイ製品を配置する工程、グラジエントを形成するグラジエント形成装置から生じる混合脂質二重層組成物のスポットを形成する工程、少なくとも1つの軸で前記テーブルを移動させながら、形成されたこのような組成物混合物を分配し、それによって異なった連続的な位置に、異なった比率の各脂質二重層組成物を分配する工程を含んでなる、各領域が、異なった公知の脂質二重層組成物を有するバイオセンサー領域のアレイを形成する方法が提供される。このように、脂質二重層組成物のグラジエントは、各組成物の比率に関して形成されるため、このデバイス表面にわたって、スポット形成デバイスのアウトプットの相対位置をラストスキニングすることにより、このようなグラジエントの結果が、バイオセンサーアレイ中に分配され、それによってバイオセンサーの異なった位置に異なった組成混合物を蒸着させる。

【0124】

本発明のさらに他の実施形態において、一次元のバイオセンサーアレイの表面にわたってグラジエントを形成し得る。グラジエントバイオセンサーアレイを作製する方法は、第1および第2の供給源から、実質的に層流において流出させることによって、含有されている第1および第2の異なった脂質二重層形成組成物、2つの供給源からの2つの異なった組成物を、混合チャンバーを流れる間、この2つの異なった組成物の層流特性を実質的に保持する1つの混合チャンバー内で、一緒に混合する工程を含んでなり、各々異なった組成物の対面している端が、混合して第1の端と第2の端を有するグラジエントを形成し、第1の組成物に面するグラジエントの第1の端から始まり、他方の第2の組成物に面するグラジエントの第2の端で終わっている異なった比率の組成物配合をさらに含んでなり、前記混合チャンバーが、前記アレイの表面にわたって、実質的に層流において前記グラジエントを分配するように改造されており、グラジエントに含有されている組成物が、前記アレイの二重層アレイの二重層適合性領域に最初に接触した際に捕捉され、保持される。他の実施形態は、第1および第2の組成物が、前記アレイに隣接した各々異なった組成物を含有する複数の供給源によって供給されるバイオセンサーアレイの表面である混合チャンバーをさらに含んでなり得る。さらに、他の実施形態は、混合チャンバーと流体連絡している複数の異なった供給元内に含有されている複数の異なった組成物を、さらに含んでなり得る。

【0125】

本発明によれば、脂質二重層は、アレイにわたって分配された脂質二重層領域の上方に自然に形成される。例えば、グラジエント混合物は、グラジエント形成デバイスから分配される際に、このような混合物は、1つ以上の二重層バリア領域によって囲まれている複数の二重層適合性領域、場合によっては、他の二重層成分を含有する脂質二重層ベシクルなどの混合成分を含有するバイオセンサーアレイと接触し、前記二重層適合性領域に接触して、各二重層適合性領域には隣接しているが、このような連続的二重層の各々が、二重層不適合性領域によって互いに分離されて他の連続的二重層領域から不連続になっている連続的脂質二重層が自然に形成される。各二重層適合性領域に会合している二重層形成引力は、グラジエント混合物から、二重層適合性領域に最初に存在した瞬間の混合物を捕捉する働きをし、したがって、グラジエントバイオセンサーアレイの形成時に、二重層適合性領域に最初に存在したグラジエント混合物とは異なったその後のグラジエント混合物の存在に係らず、このような二重層適合性領域に最初に存在したグラジエント混合物の混合物特性を形成し、保持する。一旦、脂質二重層領域が形成されると、その組成は一般に脂質二重層形成組成物に曝露された場合の変化に影響を受けない。

【0126】

本発明のさらに他の実施形態において、複数のグラジエント形成デバイスが、1つ以上の副次的グラジエント形成デバイスと流体連絡しており、第1のグラジエントが、1つ以上の異なったグラジエントを組合わされて、バイオセンサーアレイをまたがってグラジエント混合物を分配するための分配デバイスと流体連絡している複合的グラジエント形成デバイスが形成される。

【0127】

図6は、グラジエントバイオセンサーアレイ形成の平面図を示している。混合デバイス605中、603の箇所、脂質二重層形成組成物A（X印で示されている）を脂質二重層形成組成物B（丸印で示されている）を合わせ、607の方向に実質的な層流グラジエント流を形成する。グラフ611を指す線609によって示された一定の箇所で、混合物流または流出液の断面プロファイルは、切断面にまたがる各箇所におけるAとB双方の切断濃度を示すグラフ611によって特性化できる。グラフ613は、グラジエントバイオセンサーアレイ内の異なった各二重層適合性領域における二重層組成を示している。

【0128】

図7a～7dは、2組成グラジエントバイオセンサーアレイの形成を示している。図7aでは、バイオセンサーアレイ701は重力に関して、一端が僅かに上方に偏っている。図7bでは、第1の二重層形成成分703、TEXAS RED（X印で示されている）は、アレイ701の表面701a上に流入し、一方、第2の二重層形成成分705、NBD（丸印で示されている）は、表面701a上に流入する。その結果生じた各成分からの流れは、矢印709aおよび709bによって示されるように、アレイ701を渡る層流を形成する。一次元におけるアレイのスペクトル強度分析から回収したデータから図7dにおいて得られた格子が図7cでグラフに描かれている。

【0129】

以下の実施例は、本発明を例示するが、決して本発明を限定する意図はない。

【実施例】

【0130】

材料および方法

他に指定されない限り、化学物質は、Sigma（ミズーリ州セントルイス）または米国Biochemical（オハイオ州クリーブランド）から購入した。

【0131】

A. 緩衝液

標準緩衝液

10 mM トリス

100 mM NaCl (pH 8.0)

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)

10×貯蔵溶液、1リットル

80 g NaCl

2 g KCl

11.5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2 g KH_2PO_4

PBSの作業溶液、pH 7.3:

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

4.3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1.4 mM KH_2PO_4

B. 脂質および標識

卵由来のL-ホスファチジルコリン（卵-PC）を、Avanti Polar Lipids（アラバマ州アラバスター）より入手した。蛍光プローブN（Texas Redスルホニル）-1，2-ジヘキサデカノイル-sn-グリセロ-3ホスホエタノールアミン、トリエチルアンモニウム塩（Texas Red DHPE）は、Molecu

10

20

30

40

50

lar Probes (オレゴン州ユージーン) から入手した。

【0132】

C. リン脂質ベシクルの調製

小型単層ベシクル (SUV) 類は、卵 L - ホスファチジルコリン (Avanti) を用いて、Barenholz ら (1977) に概説されたプロトコルに従って調製した。ホスファチジルコリンを、HPLC グレードのクロロホルム (Sigma Aldrich) 中、1 モル % の Texas red DHP E と混合し、真空デシケータ中、一晚乾燥した。乾燥した脂質を Sibata フィルタユニットを用いて Rainin Nylon - 550、45 μm フィルタを通して過した標準緩衝液中、約 6 mg/ml に再懸濁した。前記懸濁液を、Branson 超音波処理器を用いて、氷上アルゴン流下、1 分間の冷却時間をはさんで、3 分間、音波処理して透明にした。(Martin, 1990)。

10

【0133】

次に、音波処理器先端から放出された Ti 粒子を除去するために、サンプルを 100,000 $\times g$ で 30 分間回転させ、上澄液を 166,000 $\times g$ で 4 時間回転させて SUV 類を得た。SUV 類は、暗所で N_2 または Ar 下、4 で貯蔵し、3 週間以内に使用した。ベシクル中の Texas red プローブの濃度が 1 モル % に調製されているとして、590 nm における Texas red プローブの吸収 ($\epsilon = 100,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Haugland, 1992 年) から、これらのサンプル中の脂質濃度を測定した。収量 (mg SUV 脂質 / mg 最初の脂質) を、この濃度から算出すると、Barenholz ら (1977) によって報告された収量と等しい。

20

【0134】

D. 膜の電気泳動

電気泳動試験のため、PBS 中の支持膜を、1 mM 総イオン強度に希釈した。次にこれを緩衝液下、他のカバースリップによって、サンドイッチ状に組み立てた。電気泳動セルは、Teflon 槽の溶液を満たしたウェル中 0.01 インチ直径の 2 本の白金ワイヤ電極から構成した。前記カバースリップサンドイッチを、2 つの電極ウェル間に橋を形成するように調整した。電氣的接続は、前記カバースリップサンドイッチ内の溶液を介して達成した。標準的電気供給により、60 V/cm までの電場をかけた。Keithley ピコ電流計 (オハイオ州クリーブランド) を用いて電流をモニターすると、15 V/cm において、18 mm 正方形のカバースリップサンドイッチ 1 個に関して、典型的には凡そ 3 μA であった。これは、総電力消費、 $9 \times 10^{-5} \text{ W}$ に相当し、生成されるジュール熱は無視し得るはずである。

30

【0135】

実施例 1 - 表面検出器デバイスの構成

標準的な方法 (Wolf および Tauber, 1986 年) を用いてパターンづけした支持格子をマイクロ組立てした。100 nm 直径のシリコン 1-0-0 ウェーハを、Silrec 社 (カリフォルニア州サンジョセ) から入手した。前記ウェーハを酸化炉 (Tylan 社、カリフォルニア州サンディエゴ) において、1000 で蒸気中に維持し、熱酸化物の約 1 μm 厚さの層を生成した。標準的なポジホトレジスト (S1800: Shipley 社、マサチューセッツ州マールボロー) をトラックコーター (Silicon Valley グループ、カリフォルニア州サンジョセ) により 1 ミクロンの厚さでウェーハ上にスピンした。

40

【0136】

前記ウェーハをコンタクトマスク配列器 (Karl Suss America (Waterbury Center, VT), MA - 4) により、ホトリソグラフィマスクを介して約 8 秒間、約 10 mW/cm² の UV 光に曝露した。現像は、標準的な水酸化テトラメチルアンモニウム (TMAH) 基剤の現像剤 (Shipley) を用いてトラック現像剤 (SVG) 上に実施した。次に、前記ウェーハを、アルゴンプラズマ中、3 分間食刻に供した。

【0137】

50

前記ウェーハ支持格子のパターンづけした表面を、1モルパーセントの蛍光標識脂質、Texas Red DHPEでドーブしたL - -ホスファチジルコリン(PC)分子から主に構成されている約25mm直径の単層ベシクルを含有し、上記のとおり調製された懸濁液に接触させることによって、膜を形成した。懸濁液中のベシクルは、光退色および下記の電気泳動実験に確認されるようにせいぜい数秒のうちに、自然に集合し、支持格子の二重層適合性領域上に連続的な単二重層を形成する。同時に過剰のベシクルは濯ぎ落とされたが、バルク水溶液下の膜は常に維持された。支持二重層の状態をモニタリングする長期実験の結果は、前記二重層が水の下で安定であり、数週間、それらの均一性と流動性を保持することを示した。

【0138】

10

実施例2 - 光退色によりアッセイした支持二重層の流動性

二重層適合性領域または囲い内の長範囲流動性は、光退色後の蛍光回復(FRAP)によって観察された。この実験は、25の二重層適合性面領域または囲いを含有し、これらの各表面領域上に維持された、対応する脂質二重層空間を有する表面検出器アレイデバイスの略図を示す図2Aおよび2Bに関して記載されている。前記デバイスは、1辺が100μmの寸法の囲いを生成させるために、ホトレジストによってパターンづけした酸化シリコンウェーハから作製される。幅10μmのホトレジスト(二重層バリア領域)は、図2Aおよび2Bにおいて、25個の囲いを分離している黒い境界線として表されている。Texas Red DHPE脂質プローブ(Molecular Probes、オレゴン州ユージーン)を、標識として働くように二重層膜の中に組み込んだ。

20

【0139】

5個の個々の囲い40(図2A)において、蛍光プローブ分子を光退色させるために、100μm未満の直径を有する光の円形ビームを用い、図2Bに図式化された結果を得た。各囲い内の分子の拡散性混合により、円形の退色スポットが分散し、正方形の囲いを満たす。ホトレジストの線は、横方向の拡散バリアとして働き、別々の囲い間の混合を防いだ。膜の流動性は、退色領域が分散して各正方形の囲いを満たすことによって証明された。膜が流動性でなかった場合、円形の退色(黒色)領域は、そのままであった。

【0140】

図2Bに示したような退色パターンは何日間も安定であったが、このようなバリアのない単一の連続膜へ光退色されたスポットは、約30分で完全に拡散した。

30

【0141】

実施例3 - 電気泳動によってアッセイされた支持二重層の流動性

二重層適合性面領域上の支持二重層の流動性は、荷電した膜成分の電気泳動再分配によっても評価された。この方法は、前記脂質二重層の流動性、および異なった組成の二重層区画を異なった、独立してアドレス指定できる二重層適合性面領域へ局限することの双方を示す。

【0142】

200μmの正方形の囲いを有するデバイスは、1モルパーセントの蛍光標識脂質、Texas Red DHPE(Molecular Probes)によってドーブしたPC分子を用いて、上記のとおり調製した。

40

【0143】

15V/cmの電場を脂質二重層膜に対して平行にかけた。電場をかけると、荷電した分子(標識DHPE)は、二重層平面内で流動するが、膜のバルク形成している中性のPC分子は、電場に影響されなかった。約25分間、電場をかけると、負に荷電した蛍光プローブの定常状態の電場誘導濃度プロファイル(GrovesおよびBoxer、1995年)が生じた。

【0144】

電場誘導濃度グラジエントの定量的描写は、図3に示されているが、この図は、2つの200μmミクロ組立てされた囲いにおける蛍光プローブ脂質(Texas Red DHPE)の定常状態濃度グラジエントのビデオマイクログラフから算出された蛍光強度の

50

定量的記録を示している。この実験における濃度グラジエントには、指数プロファイルを採用した。蛍光強度の結果を算出する画像は、蛍光強度の線型画像化用に調整した低光レベルビデオカメラを用いて撮影した。

【0145】

電場誘導濃度グラジエントは、完全に可逆的であり、15 V/cmにおける形成にかかる時間量と消散にかかる時間量とはほぼ同じであった。前記プロファイルは、膜または二重層バリア領域またはバリアに明らかな効果を及ぼすことなく、電場の極性を繰り返し反転させることによって変更し得る。上記の電場誘導濃度プロファイルは、分子のサイズ、集合および非理想混合を試験するために使用できる。

【0146】

実施例4 - 二重層バリア領域は、隣接二重層空間の機械的分離によって機能しない

二重層バリア領域が、隣接二重層空間を分離するのは、機械的分離によるのか、それとも二重層バリア表面領域を作製している材料の固有な性質によるのかを判断するために実験を行った。上記のとおり、パターンづけされていないSiO₂基体（すなわち、単一の二重層適合性面領域）上に、二重層膜を被覆した。しかし、前記二重層適合性面領域のトポグラフィは、上記のホトレジストパターンづけSiO₂基体のものと同じであった。

【0147】

前記二重層の連続性を、上記のFRAPおよび電気穿孔法を用いてアッセイした。その結果は、前記脂質空間が、波形化表面の輪郭を中断することなくたどる単一の支持膜であることを示した。

【0148】

実施例5 - 支持二重層の下に電極を有するアレイデバイスの生成

この実施例では、二酸化ケイ素の薄層で覆われたシリコン電極の作製を記載する。ワイヤをシリコン電極に接続するためにボンドパッドを使用できる。

【0149】

A. ウェーハ

酸化物上シリコンウェーハを、Ibis Technology社マサチューセッツ州デンヴァースから購入した。前記ウェーハは、直径100mmで、厚さが凡そ500μmである。製造元により供給されたウェーハは、ウェーハ上面を形成する約0.2μmの厚さの純粋シリコン層の下に埋められた約0.4μmの厚さの二酸化シリコン層を有する。

【0150】

B. 前レジスト洗浄およびレジスト被覆

前記ウェーハを、従来のRCA洗浄操作（KernおよびPuotinen、1970年；WolfおよびTauber、1986年、p. 516）によって洗浄し、150で30分焼付けし、Silicon Valleyグループ（SVG）トラックコーターシステムにより、従来のスピンコーティングを用いて、1μmのホトレジスト（Shipley S-1813）によって被覆した。

【0151】

C. 曝露および現像

前記マスクパターンを石英基体上のクロムパターンから構成されている電子ビームマスクを用いて、Karl Suss MA-4接触マスク整列器における8秒曝露を用いて曝露させた。次に前記ウェーハを、クロロベンゼン中に15分間浸漬してから、Silicon Valleyグループ（SVG）トラック現像器システムを用いて、標準的なTMAH（水酸化テトラメチルアンモニウム）基剤の現像剤（Shipley）により現像した。

【0152】

D. 食刻および薄オキシドの厚化

選択的にシリコンを食刻するが、二酸化ケイ素は、食刻しない従来のフッ素基剤のプラズマ食刻（WolfおよびTauber、1986年）を用いて、シリコン層上面に電極パターンを食刻した。プラズマ食刻に用いられる気体は、SF₆、O₂およびCHF₃で

10

20

30

40

50

ある。1秒間のRCA洗浄後に、薄オキシドを蒸気オーブン中、1000で0.1μmの厚さにした。

【0153】

E. ボンドパッド用パターン

再度RCA洗浄を行い、新たなレジスト層を上記のとおり被覆した。先の工程において厚化させたオキシド層の開口を規定する新たなパターンを上記のとおり、ホトリソグラフィにより、レジストに移し、曝露したレジストを上記のとおり現像した。

【0154】

F. ボンドパッド用食刻開口

前記ウェーハを、Applied Materials (カリフォルニア州サンタクララ)の反応性イオン食刻剤中で食刻し、ボンドパッド用に基礎シリコン層への接触が実施できるように、オキシド層上面に穴を開けた。

【0155】

G. 金蒸着

先の工程のレジストを除去する前に、0.3μm層の金を、前記ウェーハ上に蒸着させた。次に、この金をアセトンで取り去ると、先の工程で食刻された穴の中に金のボンドパッドが配置された。

【0156】

実施例6 - 表面上の機械印刷個別流動性膜アレイ

本発明の表面検出器アレイデバイスを、Proteomic System社により現像した。Membrane ChipsTMとして公知のこれらのデバイスは、試験薬物標的に会合した膜の試験にとって重要な道具である。これらのMembrane ChipsTMについてのごく初期の研究は、生体膜研究のための手動による流動性膜アレイの構成に関係していた。その後の研究により、アレイ表面にわたって膜組成を連続的に変化させられるグラジエントアレイの構成が可能になった。これらの結果は、表面検出器アレイデバイスに関するコンセプトの証拠を明らかに示したが、これらのアプローチは、実験的なものであり、したがって、工業的製造にはコスト効率がなく、小型サイズ特性の利点を維持しつつ、アレイ表面上で個別の予め決定された膜組成物を扱う能力に関して、特に制限を課していた。

【0157】

Membrane ChipsTM表面上にマイクロアレイ化流動性二重層を組立てる自動化法の開発は、これらのデバイスの大規模生産の必要条件である重要な技術的成果である。また、それは、各特徴または囲いにおいて、個別の予め決められた膜組成を有する流動性膜の高品質アレイを再現性よく構成することを可能にする。

【0158】

個別の流動性膜20のアレイ(図8)を、多ウェルプレート80(例えば、24、48、96、384、1536個またはそれ以上のウェル)のウェル85内に沈着させることができ、単一の試験物質またはリガンドに対するアレイ内の全ての囲いの並行的な制御曝露および異なった試験物質またはリガンドに対する異なったアレイ(各々が別個のウェルに配置されている)の曝露を可能とする。個別の膜アレイ要素全てから、一度に情報を収集する能力は、極めて有効である。試験物質またはリガンドを含有する同一のバルク溶液に対して、全ての囲いを曝露させることによって、結果採取の最も明確で最も制御された方法が提供されるからである。多ウェルプレートの使用は、多数の異なった試験物質またはリガンドの迅速なスクリーニングを可能にする。したがって、本発明の表面検出器アレイデバイスを多ウェルプレートと組み合わせるアッセイデザインにより、N×Mのデータポイントを迅速に採取できる。ここで、Nは、表面検出器アレイデバイス上の囲いの数に等しく、Mは、多ウェルプレートにおけるウェルの数に等しい。

【0159】

本実施例では、表面検出器アレイデバイスにおける個別の機能的な膜のアレイを構成するためのマイクロアレイヤーの使用を記載する。以下の実施例で詳述されるとおり、膜内の

10

20

30

40

50

薬物標的を試験するために、機械製作されたMembrane ChipsTMを使用することができる。

【0160】

本質的には、上記の材料および方法の節、A、B、Cに記載されたとおり、ベシクル/プロテオベシクル拡散溶液を調製した。

【0161】

パターンづけ支持格子を、本質的には実施例1に記載されたとおり、以下の修飾をして調製した。表面のピランハ(piranha)洗浄後、パターンづけ支持格子を脱イオン水下、少なくとも6日間貯蔵した。この期間に選択的表面修飾が生じる。これらの修飾は、ミクロアレイヤーをベースとした支持体表面上の個別の膜アレイ構成にとって重要である。

10

【0162】

ミクロアレイヤーは、以下のパラメータを用いてMembrane ChipTM組立てに対して最適化した。使用されたミクロアレイヤーは、以下のソフトウェア設定を用いるカルテシアン(Cartesian)AxSysTMバージョン79.12ソフトウェア、カリフォルニア州アーバインにより操作されたカリフォルニア州アーバインのカルテシアンMicroSysTMモデル4100-2SQであった：

分配タイプ：分配するための2つの異なる方法に関するソフトウェアプログラムの書き込みを行った。それらは、「直接」および「タッチ - オフ」と呼ばれる。両分配タイプとも、下記のパラメータを用いて、好結果を伴って実行された。

20

【0163】

Z起源：0.00mm(パターンづけ支持格子の表面から31.00mm離れて)

分配時におけるチップの高さ：

直接：表面(Z起源から29.50mm)から約1500ミクロン離れて。

【0164】

タッチ - オフ：サンプルの小滴を、表面(Z源から29.50mm)から約1500ミクロンにおけるチップ末端で形成した。次にこのチップを、該表面(Z源から30.84mm)から約160ミクロン離れた表面近くに静かに移動して、チップが該表面に接触しないようにサンプルの小滴を該表面に接触させた。

【0165】

30

前分配：前分配を準備し、実際の分配のためにチップを調節する。

【0166】

直接：10回分配後真空乾燥し、再度8回分配後真空乾燥し、次いで再度4回分配後真空乾燥する。

【0167】

タッチ - オフ：2回分配後真空乾燥し、再度2回分配後真空乾燥し、次いで再度10回分配後真空乾燥する。

【0168】

分配のためのバルブの開放時間：AxSysTMバージョン79.12ソフトウェアの使用により値が示唆された(すなわち、200マイクロ秒から3秒の範囲の上記パラメータに関して)

40

シリンジスピード：

開始：0.04モル/秒

中止：0.5秒/秒

加速：12mL/秒²

Membrane ChipsTMは、以下に要約した工程後にマイクロアレイヤーを用いて組立てられた。

【0169】

1. システムの気泡を除くためにイソプロパノールをシステムに入れ、次いで微量のイソプロパノールを除くために脱イオン水を入れる

50

2. チップを洗浄し、真空乾燥する(3回)
3. システム圧を除去するために通気する
4. セラミックチップ(直径3mm、オリフィスサイズ190ミクロン)を供給源ウェル(96/384ウェルプレート)に移動する
5. 供給源96ウェル(20~300 μ lの範囲の作業容量)プレートまたは384ウェルプレート(10~100 μ lの範囲の作業容量)から脂質/プロテオベシクルを吸引する(典型的に約50 μ L)
6. システム圧を除去するために通気する
7. バルブを開けずに実際の分配容量を1回分配することにより前加圧してシステム内を陽圧にする
8. 上記のとおり前分配する
9. 実際の分配容量: 10~90nL - -用意したMembrane ChipsTMパターンづけ支持格子に分配する
10. 脱イオン水でチップホルダーを満たす
11. 脱イオン水で掃流する
12. チップを洗浄し、真空乾燥する

プログラムのパラメータを、精密に最適化し、アレイヤーが、機能的で流動性の膜二重層を創製することを確保する。マイクロアレイヤーが、チップ上にプリント膜を仕上げた直後にMembrane ChipsTMを水に浸した(上記工程9)。より大きなオリフィスサイズチップ(508ミクロン)を用いて、チップホルダーを脱イオン水で満たした。膜形成後、空気への短時間曝露によっても、直ちにそれらの構造が破壊され、膜の流動性欠如のみならず、生体膜中に埋め込まれているまたはそれらと会合しているタンパク質の破壊が生じる。したがって、膜アレイは、組立て後、常時水面下に維持しなければならない。

【0170】

2つのタイプの分配方法が、上記のとおり、Membrane ChipsTMアレイを構築するために用いられた。「タッチ-オフ」技法により、脂質ベシクルの小滴を、最初にチップの末端に形成し、次いで脂質二重層を創製するために、これらの小滴を、表面に僅かに接触させた。チップホルダーが水で満たされるまで、水玉はそれを保護する二重層上で良好な丸いスポットとして存在する。第2の技法を、「直接分配」と呼ぶ。直接分配技法において、脂質ベシクル溶液サンプルは、短距離(例えば、約150ミクロン)でチップからの射出されることにより、各囲い上に正しく分配される。サンプルは、薄層内の表面にわたって急速に拡がる。ここでも形成された二重層は、水の薄層により保護される。両技法とも、機能性膜を創製するために使用できる。

【0171】

マイクロアレイヤーは、2つの異なるタイプの小型単層ベシクル、1モルパーセントのN-(テキサスレッドスルホニル)-1,2-ジヘキサデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(Molecular Probesから、オレゴン州ユージーン)を有する卵ホスファチジルコリン(Avanti Polar Lipids、アラバマ州アラバスター)および1モルパーセントの16:0~12:0 NBD-ホスファチジルグリセロール(Avanti Polar Lipidsより、アラバマ州アラバスター)を有する卵PCを用いてMembrane ChipsTM上に「チェッカーボード(Checkered Board)」パターン(図9)を好結果で構築した。本実験で調製されたMembrane ChipsTMは、囲い間で1500ミクロン分離した500平方ミクロンの囲いを有する。囲い内で観察されたレッド(暗灰色として示されている)およびグリーン(薄灰色として示されている)は、それぞれ脂質二重層を含有するNBD結合体およびテキサスレッド結合体からの蛍光である。囲い内の色は、純粋なグリーンまたはレッドのままである。色の混合は生じず、別個の分離した膜のアレイを構築する上で最適化されたマイクロアレイヤーの能力を証明している。

【0172】

実施例 7 - 流動性膜を有する機械製 Membrane ChipsTM

光退色後の蛍光回復 (FRAP) 実験は、マイクロアレイにより組立てられた Membrane ChipsTM における NBD 標識膜 (図 10) およびテキサスレッド標識膜 (データは示していない) から代表的な囲いに対して実施された。囲いの 1 つにおいて、凡そ 100 ミクロン/ミリメートル直径スポットは、開口絞りを通して方向付けられた 100 W 水銀アークランプ (Ushio 社、USH-102DH、日本国東京) で 2 分の照射により光退色した (図 10a)。光退色後、広範な拡散により、囲い内の蛍光回復が生じ (照射 10 分後に撮影された図 10b を参照)、マイクロアレイにより整列された Membrane ChipsTM における膜の流動性を証明している。

【0173】

実施例 8 - コレラ毒素は、Membrane ChipTM 上のガングリオシド GM1 に特異的に結合する

Membrane ChipTM の表面を、前記アレイの全ての特性点 (すなわち、囲い) が同時に単独試剤に曝露するようにデザインする。この性質を立証するために、Membrane ChipTM 実験を実施して、整列された膜が、試験物質の結合をアッセイするためにも特異的な標的として使用できることを示した (図 11)。Membrane ChipTM は、実施例 6 に記載された自動化方法に従って構築された。500 平方ミクロンの特性点 (すなわち、囲い) を有する 4 × 4 のアレイにおいて、1 つを除いて全ての囲いを、1 モルパーセント NBD - ホスファチジルグリセロールを有する 99 モルパーセント卵ホスファチジルコリンを含有する溶液で整列させた。最後の囲い 110 (第 3 欄、第 3 列、上部左コーナーが原点) は、98 モルパーセント卵ホスファチジルコリン、1 モルパーセント NBD - ホスファチジルグリセロールおよび 1 モルパーセント非標識 GM1 により整列させた。適切な FITC フィルタセット (Nikon Instruments 社、96106807B-2A、ニューヨーク州メルビレ) を装備した蛍光顕微鏡 (Nikon Instruments 社、Nikon Eclipse E400、ニューヨーク州メルビレ) 下で観察すると、チップは、均一にグリーンが表れた (データは示していない)。

【0174】

コレラ毒素は、ガングリオシド GM1 に極めて特異的に結合する。Membrane ChipTM は、この特異的な相互作用を検出できた。Membrane ChipTM を、1 ml のリン酸緩衝生理食塩水中の 2 μg/ml テキサスレッド標識コレラ毒素 (Molecular Probes、オレゴン州ユージーン) と共に室温で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、Membrane ChipTM を洗浄してコレラ毒素含有溶液を除去し、1 ml のリン酸緩衝生理食塩水を室温で加えた。洗浄工程をさらに 4 回繰り返した。1 モルパーセント GM1 を含有する囲いのみがコレラ毒素に結合した。蛍光顕微鏡で画像化すると、GM1 を含有している囲い 110 は、レッドで現れる (暗灰色として示される) が、一方、GM1 を欠く他の囲いは、いずれのコレラ毒素とも結合せず、したがってグリーンのままであった (薄灰色として示される) (図 11)。

【0175】

表面上の機能性膜を表示する Membrane ChipTM ミクロアレイの自動化構築の成功により、大量の並行実験、薬物ターゲットであるタンパク質と会合した細胞膜など天然および人工細胞膜を試験する能力が拡大される。したがって、これらのマイクロアレイ化 Membrane ChipTM は、ハイスループットの、低コストの極めて精確な薬物スクリーニング、最適化、および膜成分に関する標的同一に役立つ器具である。

【0176】

実施例 9 - Membrane ChipTM を用いる G - 蛋白共役レセプターの分析
序論

大多数の薬物標的は、G - 蛋白共役レセプター (GPCR) 類などの膜タンパク質である。例えば、全処方医薬品の 60 % が GPCR 類を標的にする。これらのタンパク質は、GPCR 類に結合するホルモン類および神経伝達物質など、リガンドにより開始される大

10

20

30

40

50

多数の細胞作用を媒介するので、このような注目に値する。GPCR類に結合するリガンドは、代謝、細胞増殖、および神経伝達に関連する広範囲の生理的機能を媒介する。

【0177】

最近、ヒトゲノムデータの助けにより、約1,000のGPCR類が発見され、新規な標的に関する薬物を創製する膨大な機会を提供している。これらの発見により、評価すべき最良の標的を選択する上で医薬品開発における新たなジレンマを生んでいる。今日までに薬物開発に用いられた方法は、主に直線的な1対1の過程に頼っており、複数標的の並行評価にとって適切ではない。最近のGPCR発見を完全に利用するために、膜タンパク質を並行して取り扱うための新規な方法が要求されている。プロテオミクスシステムのMembraneChipTMプラットフォームは、この必要性を扱っている。薬物を、並行性の高い複合様式で多数のGPCR類に対して試験できるように、MembraneChipTMが、アレイフォーマットにて天然の膜環境における多数の活性GPCR類を表示するために使用できる。

10

【0178】

この例は、MembraneChipTMを用いて実施された本発明の実験を述べている。このデータは、MembraneChipTM技術が、医薬品開発におけるGPCR類の並行分析用システムを提供することを明確に立証している。

【0179】

MembraneChipTM GPCRアッセイ

MembraneChipTMは、並行フォーマットにおいて任意の数のGPCR類をディスプレイするために使用できる。GPCR膜製剤は、Stratagene（カリフォルニア州ラホーヤ）またはPackard Bioscience（コネチカット州メリデン）より購入した。材料と方法に記載された方法を用いて調製された、膜製剤対卵ホスファチジルコリン（Avanti Polar Lipids、アラバマ州アラバスター）ベシクル製剤の1:1比を、37℃で一晩インキュベートし、拡散溶媒として用いた。次に、GPCR類を、実施例6に記載されたマイクロアレイヤーを用いてチップ上にデザインされた囲い内に整列した。チップ上の各GPCRの座標を追跡した。GPCR類が埋め込まれている脂質二重層は生物学的に活性である。すなわち、GPCR類は、機能的であり、天然または天然様膜環境内に適応されていた。

20

【0180】

GPCR類に対するリガンド結合を検出するために蛍光に基づく検出システムを使用した。前記リガンドを、蛍光染料BODIPYTMまたはBODIPY 558/568（Molecular Probes、オレゴン州ユージーン）により標識した。全てのリガンドを、他に特記しない限り、50mMトリスHCl（pH 7.2）、12.5mM MgCl₂、2mM EDTAにより溶解させた。飽和曲線は、本明細書中に参考として援用される、METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, RECEPTOR BINDING TECHNIQUES、Humana Press、ニュージャージー州トトワ、1999年、p. 41~42に記載されている標準的プロトコルに従って作製した。 - アドレナリンサブタイプ1レセプター（AR-1、Packard Bioscience、コネチカット州メリデン）を、室温で1時間、1mlの全容量中、42nM、15nM、10nM、5nM、0.02nMのBODIPYTM TMR CGP12177（Molecular Probes、オレゴン州ユージーン）と共にインキュベートした。MembraneChipTMを含有する各ウェルは、1mlの50mMトリスHCl（pH 7.2）、12.5mM MgCl₂、2mM EDTAにより室温で3回洗浄した。他の全てのアッセイは、同様に飽和曲線に対して実施した。

30

40

【0181】

競合結合試験もまた、METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, RECEPTOR BINDING TECHNIQUES、Humana Press、ニュージャージー州トトワ、1999年、p. 42~43に記載されている標準的ブ

50

ロトコルに従って飽和実験と同様な条件下で実施された。簡略に述べると、蛍光リガンドおよび非標識薬物を、50 mM トリス HCl (pH 7.2)、12.5 mM MgCl₂、2 mM EDTA に溶解した。蛍光強度は、全容量 1 ml 中、室温でプロービング 1 時間後に測定された。各ウェルは、1 ml の 50 mM トリス HCl (pH 7.2)、12.5 mM MgCl₂、2 mM EDTA により室温で 3 回洗浄した。

【0182】

標識リガンドの特定の GPCR 類に対する結合を、特定の GPCR (類) が残留している膜囲い中の蛍光シグナルの存在により測定した。競合結合アッセイがデザインされ、具体的な GPCR 類に対する薬物 (または候補薬物または他の試験物質) の相対的親和性を同定するために実施された。非標識薬物を、蛍光リガンドと混合し、Membrane ChipTM と共にインキュベートした。あるいは、蛍光リガンドを、最初に Membrane ChipTM と共にインキュベートしてもよく、リガンドの特異的結合は、蛍光画像を捕捉し、囲い (単数または複数) と会合した絶対的または相対的シグナルを確立することにより決定され、その後、Membrane ChipTM を非標識薬物 (または候補薬物または他の試験薬剤) と共にインキュベートする。GPCR 上の結合部位に関して、非標識化合物が蛍光リガンドと競合する場合、GPCR に結合する蛍光リガンドが置き換わり、その GPCR を含有する囲いにおける蛍光を消失させる。シグナルの減少は、その特定の GPCR に対して試験される薬物に関するポジティブの「ヒット」と考えられる。

【0183】

Membrane ChipTM 上にディプレースされた GPCR 類に対するリガンド類の結合は、蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss 社、Axiovert 100、ニューヨーク州ソーヌウッド) を用いてモニターされた。顕微鏡画像をとらえ (Roper Scientific Germany、CoolSNAP、ドイツ国ミュンヘンおよび Roper Scientific Germany、CoolSNAP ソフトウェアバージョン 1.1、ドイツ国ミュンヘン)、総合蛍光密度を、公に入手可能なソフトウェアパッケージ、ScionImage (Scion 社、Scion Image Beta 4.0.2、メリーランド州フレデリック) を用いて Relative Fluorescence Units (RFUs) と称される定量数に変換された。

【0184】

結果

Membrane ChipTM の重要な特徴の 1 つは、今日薬物開発に使用されている他の伝統的なアッセイ (フィルタ結合およびシンチレーション近接アッセイ (SPA)) と比較して各データポイントに必要な GPCR が実質的に少ないことであることである。表 1 に、典型的なフィルタ結合アッセイおよび SPA に必要な膜と特定の GPCR、AR-1 の量が算出され、Membrane ChipTM に対するアッセイに必要なものと比較されている。これは特に、GPCR 類の量獲得がしばしば時間がかかり、困難であることから重要である。さらに、GPCR 類は、薬物スクリーニングおよび最適アッセイの開発において全コストのうち最も大きな割合になることが多い。表 1 に例示されるように、Membrane ChipTM は、データポイント 1 つあたりに必要とされる GPCR 量において約 300 倍以上の減少を提供する。

【0185】

【表 1】

表 1: 1 アッセイに使用される膜および GPCR (AR-β1) の量

アッセイタイプ	膜 (μg)	AR-β1 ¹ のフェントモル
MembraneChip ^{TM2}	<0.2	<0.3
フィルタ結合アッセイ ³	21.5	36.6
SPA ⁴	19	32.3

【0186】

¹ Packard BioScience (コネチカット州メリデン) カタログ 番号 6110106、ロット番号 6110106X-21、比活性: 1.8 pmol/mg 膜タンパク質。

² 1mm² 囲いを用いる。

³ Packard BioScience AR-1、ロット番号 6110110X-24 に関する技術データシートに概要される、直径 5mm GF/C フィルタによる推奨アッセイ条件を用いる。

⁴ SPA に概要される G-タンパク質共役レセプターアッセイ (Amersham Biosciences、RPNQ0210、ニュージャージー州ピスカタウェイ)

競合結合アッセイは、2種のGPCR、 α -アドレナリンサブタイプ1レセプター (AR-1、Packard BioScience コネチカット州メリデン) (図12 および表2) およびムスカリンレセプターサブタイプM1 (M1、Packard BioScience コネチカット州メリデン) (表2) を用いて開発された。このタイプの実験は、薬物最適化に使用され得る。脂質のみのコントロール (ネガティブコントロール) で整列された Membrane ChipTM の表面囲いを、AR-1 選択的蛍光アンタゴニスト類縁体、BODIPY TMR CGP12177 (Molecular Probes、オレゴン州ユージーン) の 100nM 溶液により探査した。表面の蛍光は、著しく低かった (図12 および表2 の「ネガティブ」)。他のGPCR類に対する結合特異性を評価するために、CXCR4 (CXCKケモカインレセプター4) を含有する Membrane ChipsTM は、同一濃度の BODIPY TMR CGP12177 (図12 および表2 「CXCR4」) により探査された。ネガティブコントロールよりも僅かに高いシグナルが得られ、このCXCR4細胞膜調製物は、低内在性濃度のAR-1を含有することから予想されたことであった。AR-1を過剰発現している細胞から細胞膜製剤を含有する Membrane ChipTM が、100nM BODIPY TMR CGP12177 で探査された場合、大きなシグナルが観察された (図12 および表2 の「ポジティブ」)。重要なことに、5mM の非標識 AR-1 選択的アンタゴニスト、プロプラノール (Sigma、ミズーリ州セントルイス) が、ヒット薬物の模擬物である、100nM BODIPY TMR CGP12177 と共に含まれた場合 (図12 および表2 の「競合」)、ポジティブシグナルの約95%は、競合で追い出された。

【0187】

Z' (表2) は、ハイスループットスクリーニング (HTS) アッセイの評価にしばしば用いられる有用な無次元形態である。参照として本明細書で援用される、「A Simple Statistical Parameter for use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays」、Biomolecular Screening、4: p. 67~73 (1999) を参照されたい。0未満のZ'値は、通常使用される工業的基準値によれば許容されない。3つの独立して実施された実験から、9つの測定値のセット (3個のチップ×1チップ当たり3つの測定部位) に関するZ'は、0.43 (表2) であり、これは、0.5の近傍にある他の市販アッセイを用いて得られた値に等しい。このセットの標準偏差は、14%であった (表2)。

【0188】

同様の実験を、他の十分に特性化されたGPCR、ムスカリンレセプターサブタイプM1に対し実施された (表2)。この場合に用いられた蛍光リガンドは、サブタイプ選択的蛍光アンタゴニストである、15 μ M BODIPY 558/568 Pirenzepine (Molecular Probes、オレゴン州ユージーン) であった。競合薬物は、レセプター選択的アンタゴニスト、スコボラミン (1.3 μ M、Sigma、ミズーリ州セントルイス) であった。一緒にまとめられたこれらのデータは、Membrane ChipTM が、他のGPCR類との交差反応を殆ど示さないリガンド結合アッセイを確立するために使用できることを立証している。さらに、前記データは、Membrane ChipTM が、薬物開発過程に許容できる様式で実施されることを示している。

【 0 1 8 9 】

【 表 2 】

表2: 相対的蛍光単位(RFU)⁵ ±標準偏差値、
任意の単位における強度

レセプター	ネガティブ	CXCR4	ポジティブ	競合	シグナル対 ノイズ (S/N)	%標準 偏差値 ⁶	Z'
AR-β1	1,447 ± 208	3,796 ± 424	199,137 ± 28,494	11,484 ± 1,649	138x	14	0.43
M1	2,637 ± 1,846	8,788 ± 3,137	58,467 ± 4,911	16,266 ± 744	22x	8	0.19

10

【 0 1 9 0 】

⁵ Scion Image Beta 4.0.2 による分析により得られた。

⁶ 独立して実施された実験に関して。

【 0 1 9 1 】

さらなる実験としては、所与の薬物化合物に関する解離定数値を測定するための Membrane ChipTM の能力を評価するために実施された。これらの解離定数値、K_d は、化合物のそのレセプターへの結合親和性の尺度である。標準的飽和等温結合曲線を、METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, RECEPTOR BINDING TECHNIQUES、Humana Press、ニュージャージー州トトワ、1999年、p. 40 ~ 41 に要約されている標準的プロトコルに従って決定した。これらの実験は、上記の AR - 1、GPCR の固定量を探索するために BODIPY TMR CGP 12177 の種々の濃度を用いて実施された。生じた飽和曲線は、図 13 に示されている。曲線適合分析 (Graphpad、Prism バージョン 3.0、カリフォルニア州サンディエゴ) を用いて、K_d が、他の CGP 12177 誘導体に関して報告された K_d 類と一致する 10 nM (図 13) であることが決定された。この実験は繰り返され、8 nM の K_d が決定され (データは示していない)、これは、再現性に関して十分、工業的に許容し得る範囲内にある。

20

30

【 0 1 9 2 】

実施例 10 - 複合 Membrane ChipTM アッセイ

Membrane ChipTM は、複合 GPCR アッセイのための Membrane ChipTM システムの有用性を立証するために開発された。複数の標的が、単一の基体存在し、同時に試験物質に曝露されている複合アッセイにより、基体上の種々の標的に対する試験物質の相対的親和性を極めて精確に判定することが可能である。GPCR 類、CXCR1、CXCR3、CXCR4、M1 および AR - 1 を含有する Membrane ChipTM は、実施例 6 に要約された方法に従って組み立てられ、実施例 9 に要約された方法に従って AR - 1 特異的リガンド CGP 12177 により探索された。AR - 1 に結合する 20 nM BODIPY TMR CGP 12177 からの蛍光シグナルは、純粋脂質 (図 14、「ネガティブ」) CXCR1、CXCR3、CXCR4 および M1 に対する蛍光リガンドの非特異的結合からの平均蛍光の 2.2 倍である (図 14、「BODIPY CGP」バー)。蛍光標識 CGP 12177 の AR - 1 に対する結合は、予想されたとおり、未標識 5 mM プロプラノロールの添加により競合した (図 14、AR - 1 欄に関する「CGP + プロプラノロール」のバー)。AR - 1 ではなく、M1 レセプターに高親和性を有する試剤、15 mM スコポラミンの添加時には蛍光減少が殆ど見られなかった (図 14、AR - 1 欄に関する「CGP + スコポラミン」のバー)。

40

【 0 1 9 3 】

CGP 12177 の結合は、AR - 1 に対して著しく特異性であった。上記のように

50

、BODIPY TMR CGP12177の結合は、純粋脂質CXCR1、CXCR3、CXCR4またはM1に対して殆ど見られなかった(図14)。脂質のみ(「ネガティブ」)、CXCR1、CXCR3およびCXCR4の囲いに関して、プロプラノロールまたはスコポラミンが添加されると、無視できる相違のみが見られた(図14)。これらの結果は、MembraneChipsTMに対して調製されたGPCR類が、リガンド類および薬物に対するそれらの天然の生物学的特異性を保持していることを明確に立証している。

【0194】

MembraneChipsTMはまた、種々の化合物のGPCR類に対する親和性を推定するために使用できる。競合結合アッセイは、蛍光リガンドCGP12177およびAR-1を表示するMembraneChipsTMを用いて確立された。蛍光シグナルおよび図15の「ポジティブ」に示されるリガンド結合は、AR-1に可変親和性を有することが公知である薬物と競合した。図15に、「ネガティブ」は脂質のみのコントロールの囲いであり、「ポジティブ」はAR-1の囲いである。薬物ICI118,551およびプロプラノロールは双方とも、AR-1に結合するが、K_dがそれぞれ約200nMと約1nMの異なる親和性を有する。我々の実験において、50μMのICI118,551は、蛍光シグナルの略30%を競合して追い出したが、一方、同じ濃度で、プロプラノロールは、該シグナルの略90%を競合して追い出した(図15)。これらの結果は、AR-1に対して結合するICI118,551およびプロプラノロールの公知のK_dと矛盾せず、単一のGPCRに対する種々の薬物の結合能力の差が、MembraneChipsTM技術を用いて測定され得ることを示している。

【0195】

アドレナリンレセプターファミリー、すなわち、AR-2C、AR-1およびAR-2に対する化合物の親和性の相違を推定する可能性を試験するために、さらなる試験が実行された(図16)。ある特定のファミリーメンバーに対する薬物の選択性は、望ましくない副作用を最少にしながらか治療効果を最大にするために重大である。BODIPY TMR CGP12177は、AR-ファミリーの選択的アンタゴニストである。AR-に対するこの選択性は、AR-2Cの囲いではなくてAR-1およびAR-2の囲いにおける相対的BODIPY TMR CGP12177蛍光シグナルにより立証される(図16、「-ICI118,551」バー)。ICI118,551の添加の際に、ICI118,551が、AR-1(K_dが約200nM)に対するよりもAR-2(K_dが約1nM)に対して大きな親和性で結合することから、BODIPY TMR CGP12177の蛍光は、AR-2の囲いでは劇的に減少するが、AR-1の囲いでは部分的減少のみである(図16、「+ICI118,551」のバー)。これらの結果は、MembraneChipsTMを、同一のレセプターファミリーの異なるメンバーに対する薬物の相対的結合親和性を特徴付ける複合アッセイを実施するために使用できることを示している。

【0196】

実施例11 - MembraneChipsTM上に整列したレセプターに対する抗体結合

ケモカインレセプター、CXCR1、CXCR3およびCXCR4(Stratagene、カリフォルニア州ラジョラ)を、上記のとおり、プロテオリボソームベシクルに組み込み、実施例6に記載された方法を用いてMembraneChipsTMの表面上に整列させた。次にそれらは、各GPCR類を認識する蛍光標識抗体と共にMembraneChipsTMをインキュベートし(図17)、MembraneChipsTMを洗浄し、上記のとおり蛍光顕微鏡写真画像をとらえ、処理することにより検出された。GPCR類が置かれている位置のバックグランド(それぞれ図17中の「+」および「-」)と比較した相対的蛍光単位(RFU)が統計的に有意に増加していることは、MembraneChipsTM表面上に整列後も、レセプター上の抗原部位構造が保存されたことを証明している。この結果は、MembraneChipsTMが、抗原に結合する抗体

10

20

30

40

50

を特徴付けるために使用でき、抗体結合が、Membrane ChipsTMの表面に存在する標的を検出するために使用できることを説明している。

【0197】

結論

高感度膜アッセイをMembrane ChipsTMに適合させた。前記アッセイは、簡潔で、試剤ロボット操作システムに適合性があり、複合フォーマットにおけるレセプターの個別の膜アレイに対する新規のアンタゴニストおよびアゴニストのスクリーニングを可能にする。

【0198】

本発明を、特定の方法および実施形態を参照にして記載したが、本発明から逸脱することなく、種々の修飾がなされ得ることは理解される。科学刊行物、公表された特許出願および刊行された特許など、引用された全ての参考文献は、全ての目的のために、本明細書中に参考として援用される。

【0199】

【 数 1 - 1 】

References

- Allen, T.M., *et al.*, in STEALTH LIPOSOMES Chapter 20 (D. Lasic and F. Martin, Eds.) CRC Press, Boca Raton, FL, (1995).
- Arnold, F.H., *Bio/Technol.* 9:151-156 (1991).
- Ausubel, F.M., *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley and Sons, Inc., Media PA (1988).
- Ballantyne, J.P., *et al.*, *J. Vac. Sci. Technol.* 10:1094 (1973). 10
- Barenholz, Y., *et al.*, *Biochemistry* 16:2806-2810 (1977).
- Blanchard, A., *et al.*, *Biosensors & Bioelectronics* 11:687-690 (1996).
- Brian, A.A., and McConnell, H.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6159 (1984).
- Caras, *et al.*, *Science* 238:1280-1283 (1987).
- Case, *et al.*, U.S. Patent No. 5,192,507, issued March 9, 1994.
- Chan, P.Y., *et al.*, *J. Cell Biol.* 115:245 (1991).
- Cullen, D.C., *et al.*, *Biosensors* 3:211-225 (1988).
- Corsel, J.W., *et al.*, *J. Colloid. Interface Sci.* 111:544-554 (1986). 20
- Elender, *et al.*, *Biosensors and Bioelectronics* 11:565-577 (1996).
- Fodor, S.P.A., *et al.*, *Science* 251:767 (1991).
- Frey, W., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:4937 (1996).
- Gitler, *et al.*, U.S. Patent No. 5,204,239, issued April 20, 1993.
- Groves, J.T., and Boxer, S.G., *Biophys. J.* 69:1972 (1995).
- Groves, J.T., *et al.*, *Biophys. J.* 71:2716 (1996).
- Hamill, O.P., *et al.*, *Pflugers Arch.* 391:85 (1981).
- Haugland, R.P., in HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, 5th Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene, OR (1992). 30
- Heath, T.D., *Biochem. et Biophys. Acta* 640:66 (1981).
- Hillebrandt, *et al.*, *Langmuir* 15: 8451-8459 (1999).
- Jönsson, U., *et al.*, *Colloids Surfaces* 13:333-339 (1985).
- Kern, W. and D.A. Puotinen, "Cleaning solution based on hydrogen peroxide for use in semiconductor technology" *RCA Review* (June) p. 187 (1970).
- Khüner, *et al.*, *Biophys J.* 67:217-226 (1994).

【 0 2 0 0 】

40

【 数 1 - 2 】

- Krutenat, Kirk-Othmer 3rd Ed., Vol. 15, pp. 241-274 (1986).
- Liedberg, B., *et al.*, *Z. Phys.* 4:299-304 (1983).
- Lin, A.Y., *et al.*, *Science* 249:677-679 (1990).
- Malik, S., *et al.*, *New J. Chem.* 18:299-304 (1994).
- Martin, F. J., *Biochemistry* 20:4229 (1981).
- Martin, F.J., *J. Biol Chem.* 257:286 (1982).
- Martin, F.J., in SPECIALIZED DRUG DELIVERY SYSTEMS - MANUFACTURING AND PRODUCTION TECHNOLOGY, (P. Tyle, Ed.) Marcel Dekker, New York, pp. 267-316 (1990). 10
- McConnell, H.M., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 864:95 (1986).
- McHugh, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8059-8063 (1995).
- METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, RECEPTOR BINDING TECHNIQUES, Humana Press, Totowa, NJ, 1999, p.41-42.
- Nellen, Ph.M., and Lukosz, W., *Sensors Actuators* B1:592-596 (1990).
- Osman, *et al.*, U.S. Patent No. 5,234,566, issued August 10, 1993.
- Petersen, K.E., *Proceedings of the IEEE* 70:420-457 (1982). 20
- Plant, A.L., *et al.*, *Anal. Biochem.* 226(2):342-8 (1995).
- Sackmann E., Tanaka M., *Trends Biotechnol.* 18(2):58-64 (2000).
- Sadler, D.M., *et al.*, *Biochemistry* 23:2704-2712 (1984).
- Salafsky, J., Groves, J.T., and Boxer, S.G., *Biochem.* 35:14773-14781 (1996).
- Sambrook, J., *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989).
- Schild, H., *et al.*, *Cell* 76:29-37 (1994).
- Shnek, D.R., *et al.*, *Langmuir* 10:2382-2388 (1994). 30
- Sigal, G.B., *et al.*, *Anal. Chem.* 68:490 (1996).
- Stelzle, M., and Sackmann, E., *Biochim. Biophys. Acta* 981:135 (1989).
- Stelzle, M., *et al.*, *J. Phys. Chem.* 97:2974-2981 (1993).
- Sui, S.F., Urumow, T., and Sackmann, E., *Biochemistry* 27(19):7463-9 (1988).
- Szoka, F., Jr., *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467 (1980).
- Taylor, *et al.*, U.S. Patent No. 5,192,507, issued March 9, 1993.
- Tiberio, R.C., *et al.*, *Applied Physics Letters* 62:476-478 (1993).

40

【 0 2 0 1 】

【数 1 - 3】

Thompson, L.F., *et al.*, Eds., "Introduction to Microlithography", ACS Symposium Series, Washington D.C (1983).

Tomich, *et al.*, U.S. Patent No. 5,368,712, issued November 29, 1994.

Tozeren, A., *et al.*, *J. Cell Biol.* 116:997 (1992).

Vroman, L., and Adams, A.L., *Surface Sci.* 16:438-446 (1969)

Watts, T.H., and McConnell, H.M., *Ann. Rev. Immunol.* 5:461 (1987).

Wettstein, *et al.*, *J. Exp. Med.* 174:219-228 (1991).

Whitehorn, *et al.*, *Biotechnology* 13:1215-1219 (1995).

Wolf, S., and Tauber, R.N., SILICON PROCESSING FOR THE VLSI ERA, Vol. 1, Lattice Press, Sunset Beach, CA (1986).

Wong, A.P., Groves, J.T., *J Am Chem Soc.* 123(49):12414-5 (2001).

Xia, Y., *et al.*, *Science* 273:347 (1996).

Zalipsky, S., *et al.*, in POLY (ETHYLENE GLYCOL) CHEMISTRY: BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS (J. M. Harris, Ed.) Plenum Press, pg. 347-370 (1992a).

Zalipsky, S., *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 15:100 (1992b).

Zalipsky, S., *Bioconjugate Chemistry* 4(4):296-299 (1993).

Zalipsky, S., *et al.*, *FEBS Letters* 353:71-74 (1994).

Zalipsky, S., in STEALTH LIPSOMES Chapter 9 (D. Lasic and F. Martin, Eds.) CRC Press, Boca Raton, FL, (1995).

【図面の簡単な説明】

【0202】

【図1】図1は、本発明の表面検出器アレーデバイス（SDAD）の一部を示している。

【図2】図2Aと2Bは、本発明の表面検出器アレーデバイスの5つの異なる領域の脂質二重層における光退色蛍光レポーター脂質の効果を例示する略図である。

【図3】図3は、各々が荷電蛍光レポーター脂質の電場誘導濃度グラジエントを含む、表面検出器アレーデバイスの2つの領域の蛍光強度を示す。

【図4】図4は、バイオセンサーにおける使用に好適な本発明のデバイスの構造部分を示している。

【図5】図5は、膜会合分子のサイズによる分離における使用に好適な本発明のデバイスの構造部分を示している。

【図6】図6は、グラジエントバイオセンサーアレイ形成の平面図を示している。

【図7-1】図7a～dは、2組成物グラジエントバイオセンサーアレイ形成をカラーで示している。

【図7-2】図7a～dは、2組成物グラジエントバイオセンサーアレイ形成をカラーで示している。

【図8】図8は、ウェルの底部における本発明の表面検出器アレーデバイスを有するウェルプレートを示している。

【図9】図9は、本発明の表面検出器アレーデバイスの表面上に「格子縞ボード」のパターンに整列させた2つの異なる脂質組成物を含んでなる前記デバイスを示している。

【図10】図10aおよび10bは、卵ホスファチジルコリン（PC）および1モルパーセントの16:0～12:0 NBD-ホスファチジルグリセロールから構成された囲いに対する光退色（FRAP）実験後の蛍光回復の結果を示している。

【図 1 1】図 1 1 は、コレラ毒素がガングリオシド GM 1 に特異的に結合することを例示するための、本発明の表面検出器アレーデバイスを用いた実験結果を示している。

【図 1 2】図 1 2 は、薬物スクリーニングと最適化適用に使用するための本発明の表面検出器アレーデバイスの好適性を示す 1 アドレナリン作用性レセプター (AR - 1) 競合アッセイ結果を示している。

【図 1 3】図 1 3 は、本発明の表面検出器アレーデバイス上の 1 アドレナリン作用性レセプターに対する蛍光標識 1 アドレナリン作用性レセプターアンタゴニスト BODIPY TMR CGP 12177 の結合に関する用量応答曲線を示している。

【図 1 4】図 1 4 は、複合アッセイ実施に関し、本発明の表面検出器アレーデバイスの有用性を例示する実験結果を示している。

【図 1 5】図 1 5 は、AR - 1 に関し、種々の化合物の親和性を予測するための競合アッセイにおける本発明の表面検出器アレーデバイスの使用を例示する実験結果を示している。

【図 1 6】図 1 6 は、化合物 ICI 118, 551 に関し、種々のアドレナリン作用性レセプターの親和性を予測するための競合アッセイにおける本発明の表面検出器アレーデバイスの使用を例示する実験結果を示している。

【図 1 7】図 1 7 は、本発明の表面検出器アレーデバイスに組み込まれたケモカインレセプターを認識するための標識抗体と共に本発明の表面検出器アレーデバイスを使用することを例示する実験結果を示している。

10

【図 1】

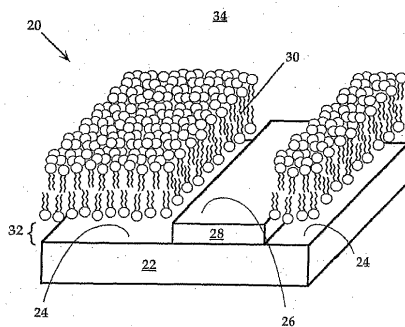


Fig. 1

【図 2 B】

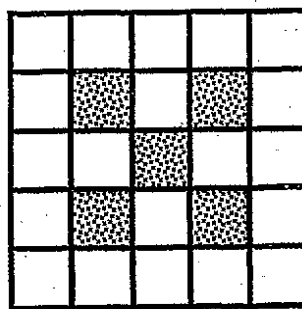


Fig. 2B

【図 2 A】

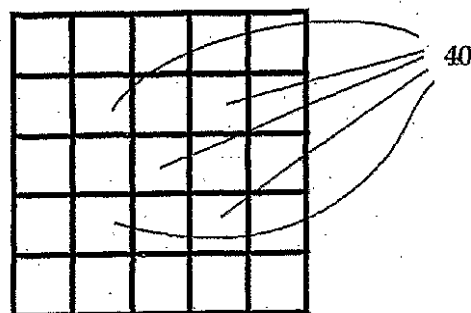


Fig. 2A

【図 3】

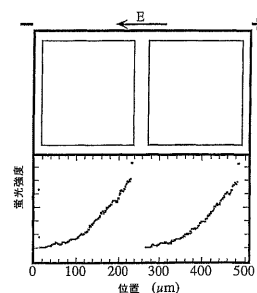


Fig. 3

【図 4】

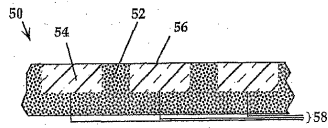


Fig. 4

【図 5】

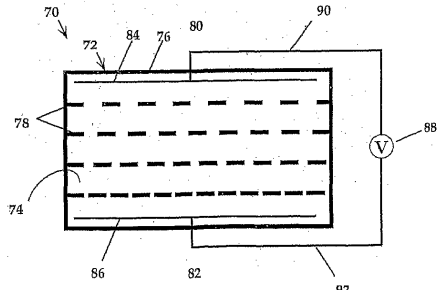


Fig. 5

【図 6】

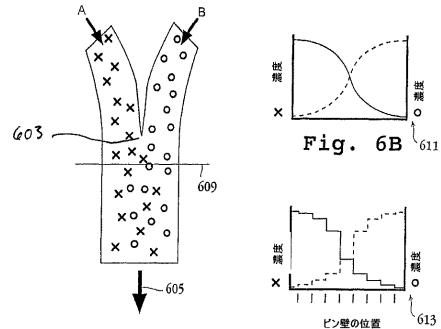


Fig. 6A

Fig. 6B

Fig. 6C

【図 7 - 1】

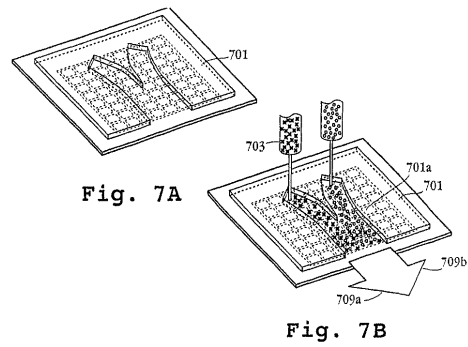


Fig. 7A

Fig. 7B

【図 7 - 2】

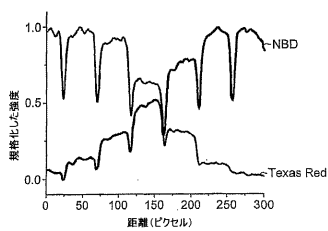


Fig. 7C

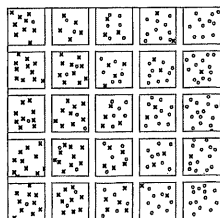


Fig. 7D

【図 8】

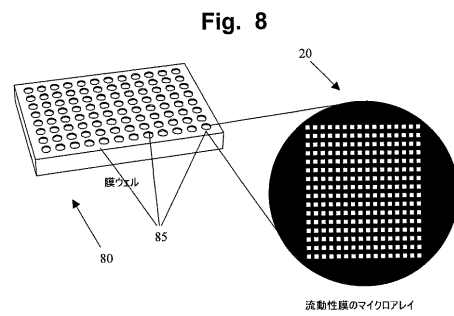


Fig. 8

流動性膜のマイクロアレイ

【図 9】

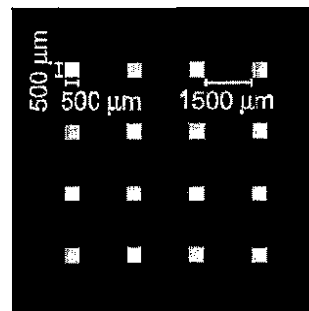


Fig. 9

【図 10 A】

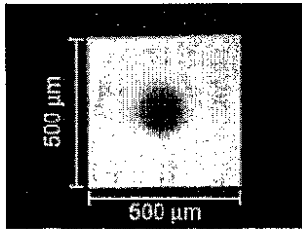


Fig. 10A

【図 10 B】

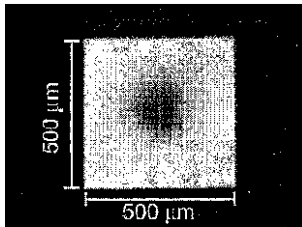


Fig. 10B

【図 11】

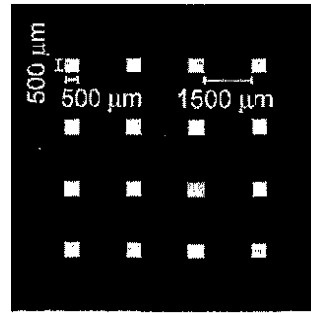
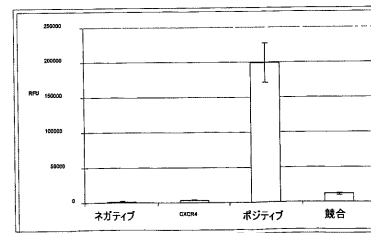


Fig. 11

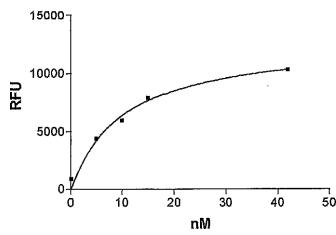
【図 12】

Fig. 12



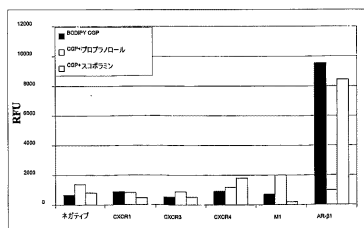
【図 13】

Fig. 13



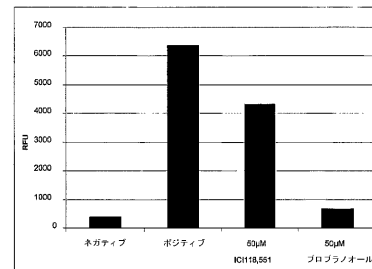
【図 14】

Fig. 14



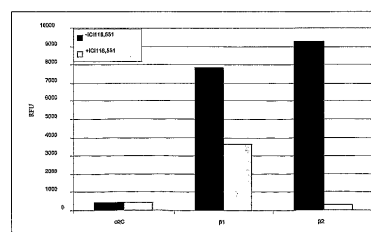
【図 15】

Fig. 15

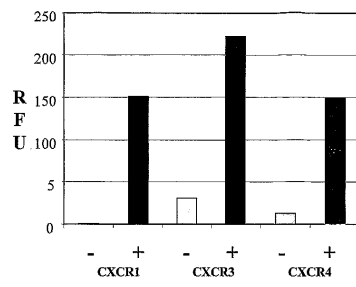


【図 16】

Fig. 16



【図 17】
Fig. 17



フロントページの続き

(72)発明者 ウルマン, モリソン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94040-1600, マウンテン ビュー, ラサム ス
トリート 2295, アpartment 8

(72)発明者 ニュイエン, ルアット ティー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94539, フレモント, トウヒー ストリート 474
21

(72)発明者 ボクサー, スティーヴン ジー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94305, スタンフォード, メイフィールド アヴェニ
ュー 811

(72)発明者 グローヴス, ジョン ティー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94705, バークレイ, ストーンウォール 221

審査官 森 竜介

(56)参考文献 米国特許第06228326(US, B1)

特表2004-506208(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 37/00

G01N 27/416