

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-507688

(P2007-507688A)

(43) 公表日 平成19年3月29日(2007.3.29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 G	2 G O 4 5
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 33/483 C	2 H O 8 8
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/545 Z	4 B O 2 9
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 O 2	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 83 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-521943 (P2006-521943)	(71) 出願人	504430503
(86) (22) 出願日	平成16年7月23日 (2004. 7. 23)		ブラティパス テクノロジーズ エルエル
(85) 翻訳文提出日	平成18年3月24日 (2006. 3. 24)		シー
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/023823		アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 マデ
(87) 国際公開番号	W02005/012872		イソン スイート 1 5 0 サウス ロー
(87) 国際公開日	平成17年2月10日 (2005. 2. 10)		ザ ロード 5 0 5
(31) 優先権主張番号	60/490, 122	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成15年7月25日 (2003. 7. 25)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100128048
(31) 優先権主張番号	60/518, 706		弁理士 新見 浩一
(32) 優先日	平成15年11月10日 (2003. 11. 10)	(72) 発明者	イスラエル バーバラ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 マウ
(31) 優先権主張番号	60/541, 516		ンテン ホレブ バイキング ロード 5
(32) 優先日	平成16年2月3日 (2004. 2. 3)		0 3
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 液晶ベースの分析物検出

(57) 【要約】

本発明は、ウイルス検出の分野、特に液晶アッセイフォーマットを用いるウイルス検出に関する。本発明において、検出領域内のウイルス結合は、検出領域に関連した任意のトポグラフィーにより引き起こされる配向とは無関係のウイルス結合により引き起こされる液晶配向の変化により同定される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

a)

i) ウイルスを含むことが疑わしい試料；

ii) その上に固定された第一のウイルス認識部分を有する少なくとも1個の検出領域を含む基板を含む、検出装置；

iii) メソゲンを提供する段階；

b) 該検出領域を該試料と接触する段階；

c) 該基板を該メソゲンと接触する段階

を含むウイルス検出法であって、

ここで該ウイルスの存在は、該検出領域にわたる該メソゲンの変化により示され、かつここで該変化は、該検出領域上に加えられたホメオトロピックディレクターの存在とは無関係である、方法。

10

【請求項2】

メソゲン中の変化が、色の変化、質感の変化、傾斜角度の変化、およびホメオトロピック配向からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項3】

メソゲン中の変化が、目視検査、光学的検出、分光法、光透過法、および電氣的検出からなる群より選択される方法により検出される、請求項1記載の方法。

【請求項4】

ウイルスが、アデノウイルス科、アレナウイルス科、アストロウイルス科、ビルナウイルス科、ブニヤウイルス科、カリシウイルス科、サーコウイルス科、コロナウイルス科、フィロウイルス科、フラビウイルス科、ヘパドナウイルス科、ヘルペスウイルス科、イリドウイルス科、フィロウイルス科、オルソミクソウイルス科、パポバウイルス科、パラミクソウイルス科、パルボウイルス科、ピコルナウイルス科、ポックスウイルス科、レオウイルス科、レトロウイルス科、ラブドウイルス科、トガウイルス科、バドナウイルス、プロモウイルス科、コモウイルス科、ジェミニウイルス科、パルティティウイルス科、ポティティウイルス科、セキウイルス科、およびトンプスウイルス科の科からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

20

【請求項5】

ウイルスが、日本脳炎ウイルス群のウイルスである、請求項1記載の方法。

30

【請求項6】

日本脳炎ウイルス群のウイルスが、西ナイルウイルスおよびセントルイス脳炎ウイルスからなる群より選択される、請求項5記載の方法。

【請求項7】

ウイルスが、エンベロープを持つウイルスである、請求項4記載の方法。

【請求項8】

基板が、金属フィルム、ガラス、シリコン、ダイヤモンドおよび高分子材料からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項9】

高分子材料が、ポリウレタン、PDMS、ポリイミド、ポリスチレン、ポリカーボネートおよびポリイソシアノアクリレートからなる群より選択される、請求項8記載の方法。

40

【請求項10】

メソゲンが、4-シアノ-4'-ペンチルビフェニル、N-(4-メトキシベンジリデン)-4-ブチルアニリンおよびそれらの組合せからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項11】

ウイルス認識部分が、抗原結合タンパク質および核酸からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項12】

抗原結合タンパク質が、免疫グロブリンである、請求項11記載の方法。

50

- 【請求項 1 3】
基板が、複数の検出領域を含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項 1 4】
複数の検出領域が、それらに結合する同じウイルス認識部分を有する、請求項1記載の方法。
- 【請求項 1 5】
複数の検出領域が、それらに結合する異なるウイルス認識部分を有する、請求項1記載の方法。
- 【請求項 1 6】
検出装置が、セルを形成するために、第一の基板と反対に配置された第二の基板を更に含む、請求項1記載の方法。 10
- 【請求項 1 7】
メソゲンの変化が、交差分極レンズ間の検出装置を目視する段階により検出される、請求項1記載の方法。
- 【請求項 1 8】
検出領域が、ウイルス非存在下では、メソゲンをホメオトロピック配向しない、請求項1記載の方法。
- 【請求項 1 9】
試料が、生体液、組織ホモジネート、糞便、水疱液、開口部または組織のスワブ、およびウイルスが培養または調製された培地からなる群より選択される、請求項1記載の方法 20。
- 【請求項 2 0】
生体液が、脳脊髄液、尿、血清、血漿、鼻分泌液、痰、精液および唾液からなる群より選択される、請求項1記載の方法。
- 【請求項 2 1】
ホメオトロピックな秩序が、試料を検出領域に塗布後48時間以内に認められる、請求項1記載の方法。
- 【請求項 2 2】
その上に固定された第一のウイルスに特異的な該ウイルス認識部分を有する少なくとも1個の検出領域を含む第一の基板を含み、ここで該検出領域は、該ウイルスの非存在下では添加されたメソゲンをホメオトロピック配向しない、ウイルス検出装置。 30
- 【請求項 2 3】
第一の基板が、複数の検出領域を含む、請求項22記載の装置。
- 【請求項 2 4】
ウイルス認識部分が、抗原結合タンパク質および核酸からなる群より選択される、請求項22記載の装置。
- 【請求項 2 5】
複数の検出領域が、アレイ内に配置されている、請求項23記載の装置。
- 【請求項 2 6】
固定されたウイルスを含む少なくとも1個の対照領域を更に含む、請求項22記載の装置 40。
- 【請求項 2 7】
メソゲンを含むセルを形成するために、第一の基板と反対に配向された第二の基板を更に含む、請求項22記載の装置。
- 【請求項 2 8】
基板が、金属フィルム、ガラス、シリコン、ダイヤモンドおよび高分子材料からなる群より選択される、請求項22記載の装置。
- 【請求項 2 9】
a)その上に固定された第一のウイルスに特異的な該ウイルス認識部分を有する少なくとも1個の検出領域を含む第一の基板を含み、ここで該検出領域は、該ウイルス非存在下で 50

は添加されたメソゲンをホメオトロピック配向しない、ウイルス検出装置；および

b)該ウイルス検出に関する説明書を含む、キット。

【請求項 3 0】

メソゲンを含むバイアルを更に含む、請求項29記載のキット。

【請求項 3 1】

陽性対照として使用するためのウイルスを含むバイアルを更に含む、請求項29記載のキット。

【請求項 3 2】

a)

i)脂質膜を伴う実体を含むことが疑わしい試料；

ii)少なくとも1個の検出領域を含む基板を含む、検出装置；

iii)メソゲンを提供する段階；

b)該検出領域を該試料と接触する段階；

c)該基板を該メソゲンと接触する段階

を含む、脂質膜を含む実体を検出する方法であり、

ここで該脂質膜を伴う生物学的実体の存在は、該検出領域にわたる該メソゲンの変化により示される、方法。

【請求項 3 3】

メソゲン中の変化が、色の変化、質感の変化、傾斜角の変化、およびホメオトロピック配向からなる群より選択される、請求項32記載の方法。

【請求項 3 4】

メソゲン中の変化が、目視検査、光学的検出、分光法、光透過法、および電氣的検出からなる群より選択される方法により検出される、請求項32記載の方法。

【請求項 3 5】

実体が、細胞、細菌、マイコプラズマ、ウイルス、およびリポソームまたはそれらの組合せからなる群より選択される、請求項32記載の方法。

【請求項 3 6】

基板が、金属フィルム、ガラス、シリコン、ダイヤモンドおよび高分子材料からなる群より選択される、請求項32記載の方法。

【請求項 3 7】

高分子材料が、ポリウレタン、PDMS、ポリイミド、ポリスチレン、ポリカーボネートおよびポリイソシアノアクリレートからなる群より選択される、請求項36記載の方法。

【請求項 3 8】

メソゲンが、4-シアノ-4'-ペンチルビフェニル、N-(4-メトキシベンジリデン)-4-ブチルアニリンおよびそれらの組合せからなる群より選択される、請求項32記載の方法。

【請求項 3 9】

メソゲンが、4-シアノ-4'-ペンチルビフェニルである、請求項32記載の方法。

【請求項 4 0】

検出領域が、生物学的実体を認識する認識部分を更に含む、請求項32記載の方法。

【請求項 4 1】

認識部分が、抗原結合タンパク質および核酸からなる群より選択される、請求項40記載の方法。

【請求項 4 2】

抗原結合タンパク質が、免疫グロブリンである、請求項41記載の方法。

【請求項 4 3】

基板が、複数の検出領域を含む、請求項32記載の方法。

【請求項 4 4】

複数の検出領域が、それらに結合する同じ認識部分を有する、請求項43記載の方法。

【請求項 4 5】

複数の検出領域が、それらに結合する異なる認識部分を有する、請求項43記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項46】

検出装置が、セルを形成するために、第一の基板と反対に配置された第二の基板を更に含む、請求項32記載の方法。

【請求項47】

メソゲンが、交差分極レンズ間の検出装置を目視する段階により検出される、請求項32記載の方法。

【請求項48】

検出領域が、ウイルス非存在下では、メソゲンをホメオトロピック配向しない、請求項32記載の方法。

【請求項49】

試料は、生体液、組織ホモジネート、糞便、水疱液、開口部または組織のスワブ、およびウイルスが培養または調製された培地からなる群より選択される、請求項32記載の方法。

10

【請求項50】

生体液が、脳脊髄液、尿、血清、血漿、鼻分泌液、痰、精液および唾液からなる群より選択される、請求項32記載の方法。

【請求項51】

ホメオトロピックな秩序が、試料を検出領域に塗布後48時間以内に認められる、請求項33記載の方法。

【請求項52】

脂質膜を含む実体は、リガンドを表示するリポソームである、請求項32記載の方法。

20

【請求項53】

装置が、その上に固定された脂質膜を含む実体に特異的な少なくとも1個の認識部分を有する少なくとも1個の検出領域を含む第一の基板を含み、ここで該検出領域は、該脂質膜を含む実体の非存在下では添加されたメソゲンをホメオトロピック配向しない、脂質膜を含む実体の検出装置。

【請求項54】

第一の基板が、複数の検出領域を含む、請求項53記載の装置。

【請求項55】

認識部分が、抗原結合タンパク質および核酸からなる群より選択される、請求項53記載の装置。

30

【請求項56】

複数の検出領域が、認識部分を含む、請求項54記載の装置。

【請求項57】

複数の検出領域の少なくとも2個は、同じ認識部分を含む、請求項56記載の装置。

【請求項58】

複数の検出領域が、アレイ内に配置されている、請求項56記載の装置。

【請求項59】

生体膜を含む固定された対照実体を含む少なくとも1個の対照領域を更に含む、請求項54記載の装置。

40

【請求項60】

メソゲンを含むセルを形成するために、第一の基板に反対に配向された第二の基板を更に含む、請求項54記載の装置。

【請求項61】

基板が、金属フィルム、ガラス、シリコン、ダイヤモンドおよび高分子材料からなる群より選択される、請求項54記載の装置。

【請求項62】

a)その上に固定された脂質膜を含む実体に特異的な第一の認識部分を有する少なくとも1個の検出領域を含む第一の基板を含み、ここで検出領域は、脂質膜を含む該実体の非存在下では添加されたメソゲンをホメオトロピック配向しない、脂質膜を含む実体の検出装

50

置；および

b)該脂質膜を含む実体の検出に関する説明書を含む、キット。

【請求項63】

メソゲンを含むバイアルを更に含む、請求項62記載のキット。

【請求項64】

陽性対照として使用するための脂質膜を含む実体を含むバイアルを更に含む、請求項62記載のキット。

【請求項65】

a)メソゲンを配列するように処理された機能化された検出基板、少なくとも1個の認識部分を表示するスタンプ基板、該認識部分の結合パートナーを含むと疑われる生物学的被験試料、およびメソゲンを提供する段階； 10

b)該被験試料を、該スタンプ基板に、該結合パートナーが該認識部分に結合することができるような条件下で接触する段階；

c)該検出基板を、該スタンプ基板と、該認識部分に対する該結合パートナーが該検出基板に移されるような条件下で接触する段階；

d)該メソゲンを該基板に塗布する段階により、該検出基板上の該認識部分に対する該結合パートナーの存在を検出する段階

を含む、方法。

【請求項66】

生物学的試料が、全血、血清、脳脊髄液、鼻咽頭吸引液、および鼻分泌液からなる群より選択される、請求項65記載の方法。 20

【請求項67】

検出基板によるメソゲンの配列が、認識部分への結合パートナーの存在により破壊される、請求項65記載の方法。

【請求項68】

配列が、ホメオトロピックである、請求項67記載の方法。

【請求項69】

メソゲンが、認識部分の結合パートナーが存在する検出基板の区域にわたりホメオトロピックに配列されていない、請求項65記載の方法。

【請求項70】

検出基板が、光学セルを形成するために使用される、請求項65記載の方法。 30

【請求項71】

検出が、検出基板の交差分極レンズによる分析により行われる、請求項65記載の方法。

【請求項72】

ホメオトロピックに配列されたメソゲンを伴う検出基板の区域が、暗く見える、請求項71記載の方法。

【請求項73】

実質的に非ホメオトロピックに配列されたメソゲンを伴う検出基板の区域が、明るく見える、請求項71記載の方法。

【請求項74】

二次的結合剤を提供し、かつ検出前に分析物または認識部分を該二次的結合剤と接触する段階を更に含む、請求項65記載の方法。 40

【請求項75】

二次的結合剤が、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸からなる群より選択される、請求項74記載の方法。

【請求項76】

二次的結合剤が、アビジンまたはビオチンである、請求項75記載の方法。

【請求項77】

二次的結合剤が、脂質と複合されている、請求項75記載の方法。

【請求項78】

二次的結合剤が、リボソーム上に表示されている、請求項74記載の方法。

【請求項79】

認識部分が、病原生物由来の抗原性物質である、請求項65記載の方法。

【請求項80】

抗原性物質が、タンパク質である、請求項79記載の方法。

【請求項81】

タンパク質が、ウイルスのエンベロープタンパク質である、請求項80記載の方法。

【請求項82】

エンベロープタンパク質が、西ナイルウイルス由来のEタンパクである、請求項81記載の方法。

10

【請求項83】

結合パートナーが抗体である、請求項65記載の方法。

【請求項84】

スタンプ基板が、アレイ内に2個またはそれよりも多い認識部分を含む、請求項65記載の方法。

【請求項85】

リガンドが、複数の種または属由来の結合パートナーにより結合されている、請求項65記載の方法。

【請求項86】

メソゲンが5CBである、請求項65記載の方法。

20

【請求項87】

スタンプ基板が、PDMSを含む、請求項65記載の方法。

【請求項88】

検出基板が、斜めに沈着された金を含む、請求項65記載の方法。

【請求項89】

a)少なくとも1個の認識部分を表示するスタンプ基板；
b)メソゲンを配向する機能化された検出基板；および
c)認識部分の結合パートナーを検出するための該基板の使用に関する説明書を含む、キット。

【請求項90】

メソゲンの容器を更に含む、請求項89記載のキット。

30

【請求項91】

二次的結合剤を含む容器を更に含む、請求項89記載のキット。

【請求項92】

a)認識部分を表示している第一の基板であり、ここで該認識部分は分析物と相互作用する、基板；
b)該認識部分と相互作用する該分析物を受け取るように構成された表面を含む第二の基板；および
c)該第二の基板にオーバーレイしている液晶を含む、分析物を検出するためのシステム。

40

【請求項93】

第一の基板が、スタンプ、ビーズ、およびカラムからなる群より選択される、請求項92記載のシステム。

【請求項94】

スタンプが、PDMSを含む、請求項92記載のシステム。

【請求項95】

ビーズが、磁気ビーズである、請求項92記載のシステム。

【請求項96】

カラムが、免疫親和性カラムである、請求項92記載のシステム。

【請求項97】

50

認識部分が、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸、炭水化物、脂質、有機分子および無機分子からなる群より選択される、請求項92記載のシステム。

【請求項98】

液晶が、E7、MLC、5CB(4-n-ペンチル-4'-シアノビフェニル)、8CB(4-シアノ-4'-オクチルビフェニル)、BL093、TL 216、ZLI 5800、MLC 6613、およびMBBA((p-メトキシベンジリデン)-p-ブチルアニリン)からなる群より選択されるメソゲンを含む、請求項92記載のシステム。

【請求項99】

第二の基板が、機能化された表面を含む、請求項92記載のシステム。

【請求項100】

機能化された表面が、ポリイミドを含む、請求項92記載のシステム。

【請求項101】

ポリイミドが、ラビング(rubbed)されている、請求項100記載のシステム。

【請求項102】

ポリイミドが、Nissan 7210、Nissan 3510、Nissan 410、Nissan 3140、Nissan 5291、およびJapan Synthetic Rubber JALS 146-R19からなる群より選択される、請求項101記載のシステム。

【請求項103】

ポリイミドが、液晶をホメオトロピックに配向する、請求項100記載のシステム。

【請求項104】

ポリイミドが、Nissan 7511LおよびSE 1211からなる群より選択される、請求項103記載のシステム。

【請求項105】

a)認識部分を表示する第一の基板、第二の基板、メソゲン、および分析物を含むことが疑われる試料を提供する段階；

b)該認識部分を表示する第一の基板を、分析物を含むことが疑われる該試料と接触させ、該分析物を該認識部分と相互作用させる段階；

c)該認識部分と相互作用する該分析物を、該第二の基板へ移動する段階；ならびに

d)該第二の基板を該メソゲンと接触させ、該第二の基板上の該分析物の存在を検出する段階

を含む、分析物を検出する方法。

【請求項106】

認識部分が、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸、炭水化物、脂質、有機分子および無機分子からなる群より選択される、請求項105記載の方法。

【請求項107】

分析物が、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸、有機分子、無機分子、ウイルス、リボソーム、細菌、真菌、および細胞からなる群より選択される、請求項105記載の方法。

【請求項108】

第一の基板が、スタンプ、ビーズ、およびカラムからなる群より選択される、請求項105記載の方法。

【請求項109】

第二の基板が、シリコン、ガラス、ポリマー、ダイヤモンド、および金属からなる群より選択される、請求項105記載の方法。

【請求項110】

第二の基板が、ポリイミドで機能化された表面を含む、請求項105記載の方法。

【請求項111】

ポリイミドが、ラビングされている、請求項110記載の方法。

【請求項112】

ポリイミドが、Nissan 7210、Nissan 3510、Nissan 410、Nissan 3140、Nissan 5291、

10

20

30

40

50

およびJapan Synthetic Rubber JALS 146-R19からなる群より選択される、請求項111記載の方法。

【請求項113】

ポリイミドが、液晶をホメオトロピックに配向する、請求項110記載の方法。

【請求項114】

ポリイミドが、Nissan 7511LおよびSE 1211からなる群より選択される、請求項113記載の方法。

【請求項115】

分析物の存在が、交差分極レンズにより目視した場合に白色または明色に見える秩序のない液晶により示され、ならびに分析物が結合されない区域は、秩序を維持し、および交差分極レンズにより目視した場合に暗色に見える、請求項105記載の方法。 10

【請求項116】

分析物の存在が、交差分極レンズにより目視した場合に白色または明色に見える無秩序な液晶により示され、ならびに分析物が結合されない区域は、ホメオトロピック配向を維持し、および暗色に見える、請求項105記載の方法。

【請求項117】

メソゲンが、E7、MLC、5CB(4-n-ペンチル-4'-シアノビフェニル)、8CB(4-シアノ-4'-オクチルビフェニル)、BL093、TL 216、ZLI 5800、MLC 6613、およびMBBA((p-メトキシベンジリデン)-p-ブチルアニリン)からなる群より選択される、請求項105記載の方法。

【請求項118】 20

第二の基板上の分析物の存在が、メソゲンの配向の差異により示される、請求項105記載の方法。

【請求項119】

メソゲンの配向の差異が、目視検査、光学的検出、分光法、光透過法、および電気的検出からなる群より選択される方法により検出される、請求項118記載の方法。

【請求項120】

移動段階が、分析物を第一の基板から溶離する段階を更に含む、請求項105記載の方法。

【請求項121】

分析物-認識部分複合体を、二次的結合剤と接触する段階を更に含む、請求項105記載の方法。 30

【請求項122】

二次的結合剤が、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、炭水化物、および核酸からなる群より選択される、請求項121記載の方法。

【請求項123】

二次的結合剤が、アビジンまたはビオチンである、請求項121記載の方法。

【請求項124】

二次的結合剤の存在が、第二の基板への移動後の、分析物の検出を増強する、請求項121記載の方法。

【請求項125】 40

二次的結合剤が、脂質と複合されている、請求項122記載の方法。

【請求項126】

二次的結合剤が、リポソーム上に表示される、請求項125記載の方法。

【請求項127】

a)分析物と相互作用する認識部分を表示する第一の基板；
b)該認識部分と相互作用している分析物を受け取るように構成された表面を含む第二の基板；
c)メソゲンを含むバイアル；および
d)分析物の検出に関する説明書を含む、キット。 50

【請求項 1 2 8】

第一の基板が、スタンプ、ビーズ、およびカラム媒体からなる群より選択される、請求項127記載のキット。

【請求項 1 2 9】

a)

i)分析物を含むことが疑われる試料；

ii)少なくとも1個の電極および少なくとも1個の検出領域を含む基板を含む、検出装置；

iii)メソゲンを提供する段階、

b)少なくとも1個の電極に電位を加え、該分析物を該基板に輸送する段階；

c)該基板を該メソゲンと接触させ、ここで該分析物の存在が、該少なくとも1個の検出領域にわたる該メソゲンの配列の差異により示される段階を含む、分析物を検出する方法。

10

【請求項 1 3 0】

電位が交流である、請求項129記載の方法。

【請求項 1 3 1】

輸送が、二元電気泳動(dielectrophoresis)により生じる、請求項129記載の方法。

【請求項 1 3 2】

メソゲンの配列における差異は、色の変化、質感の変化、傾斜角度の変化、およびホメオトロピック配向からなる群より選択される、請求項129記載の方法。

20

【請求項 1 3 3】

メソゲンの配列の差異は、目視検査、光学的検出、分光法、光透過法、および電氣的検出からなる群より選択される、請求項129記載の方法。

【請求項 1 3 4】

分析物が、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、核酸、有機分子、無機分子、ウイルス、細菌、リボソーム、細胞、および真菌からなる群より選択される、請求項129記載の方法。

【請求項 1 3 5】

基板が、金属フィルム、ガラス、シリコン、ダイヤモンドおよび高分子材料からなる群より選択される、請求項129記載の方法。

30

【請求項 1 3 6】

高分子材料が、ポリウレタン、PDMS、ポリイミド、ポリスチレン、ポリカーボネートおよびポリイソシアノアクリレートからなる群より選択される、請求項135記載の方法。

【請求項 1 3 7】

メソゲンが、E7、MLC、5CB(4-n-ペンチル-4'-シアノビフェニル)、8CB(4-シアノ-4'-オクチルビフェニル)、BL093、TL 216、ZLI 5800、MLC 6613、およびMBBA((p-メトキシベンジリデン)-p-ブチルアニリン)ならびにそれらの組合せからなる群より選択される、請求項129記載の方法。

【請求項 1 3 8】

メソゲンが、5CBである、請求項137記載の方法。

40

【請求項 1 3 9】

検出領域が、認識部分を含む、請求項129記載の方法。

【請求項 1 4 0】

認識部分が、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、炭水化物、有機分子、および無機分子からなる群より選択される、請求項129記載の方法。

【請求項 1 4 1】

タンパク質が、抗原結合タンパク質である、請求項140記載の方法。

【請求項 1 4 2】

基板が、複数の検出領域を含む、請求項129記載の方法。

【請求項 1 4 3】

50

複数の検出領域が、同じ認識部分を表示する、請求項142記載の方法。

【請求項144】

複数の検出領域が、異なる認識部分を表示する、請求項142記載の方法。

【請求項145】

検出装置が、セルを形成するために、第一の基板の反対に配置された第二の基板を更に含む、請求項129記載の方法。

【請求項146】

試料が、生体液、組織ホモジネート、糞便、水疱液、開口部または組織のスワブ、およびそこでウイルスが培養または調製された培地からなる群より選択される、請求項129記載の方法。

10

【請求項147】

生体液が、脳脊髄液、尿、血清、血漿、鼻分泌液、痰、精液、および唾液からなる群より選択される、請求項146記載の方法。

【請求項148】

検出装置のインピーダンスを測定する段階による、結合している分析物を検出する段階を更に含み、ここでキャパシタンスの変化は、分析物結合の指標である、請求項129記載の方法。

【請求項149】

インピーダンスが、キャパシタンスまたは抵抗である、請求項148記載の方法。

【請求項150】

測定がリアルタイムである、請求項148記載の方法。

20

【請求項151】

少なくとも1個の電極および少なくとも1個の検出領域を含む第一の基板であり、ここで該少なくとも1個の電極が、分析物を該基板に引きつけるための電位を提供し、かつ装置の電気特性の測定により、該分析物の存在を決定するように構成された基板、ならびに該第一の基板の反対に配向された第二の基板であり、ここで該第一の基板および第二の基板が、液晶を含むためのチャンバーを形成する基板を含む、分析物の検出装置。

【請求項152】

電気的特性が、インピーダンスである、請求項151記載の装置。

【請求項153】

インピーダンスが、キャパシタンスまたは抵抗である、請求項152記載の装置。

30

【請求項154】

インピーダンスが、キャパシタンスである、請求項153記載の装置。

【請求項155】

基板が、金属フィルム、ガラス、シリコン、ダイヤモンドおよび高分子材料からなる群より選択される、請求項151記載の装置。

【請求項156】

高分子材料が、ポリウレタン、PDMS、ポリイミド、ポリスチレン、ポリカーボネートおよびポリイソシアノアクリレートからなる群より選択される、請求項155記載の装置。

【請求項157】

メソゲンを更に含み、該メソゲンがE7、MLC、5CB(4-n-ペンチル-4'-シアノビフェニル)、8CB(4-シアノ-4'オクチルビフェニル)、BL093、TL 216、ZLI 5800、MLC 6613、およびMBBA((p-メトキシベンジリデン)-p-ブチルアニリン)ならびにそれらの組合せからなる群より選択される、請求項151記載の装置。

40

【請求項158】

検出領域が、認識部分を含む、請求項151記載の装置。

【請求項159】

認識部分が、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、炭水化物、有機分子、および無機分子からなる群より選択される、請求項158記載の装置。

【請求項160】

50

タンパク質が、抗原結合タンパク質である、請求項159記載の装置。

【請求項161】

第一の基板が、複数の検出領域を含む、請求項151記載の装置。

【請求項162】

複数の検出領域が、同じ認識部分を表示する、請求項161記載の装置。

【請求項163】

複数の検出領域が、異なる認識部分を表示する、請求項161記載の装置。

【請求項164】

少なくとも1個の電極が、交差指状（インターデジタル）電極、双曲電極、三角型電極、および長方形型電極からなる群より選択される、請求項151記載の装置。

10

【請求項165】

第一の基板が、少なくとも2個の電極を含む、請求項151記載の装置。

【請求項166】

請求項151記載の検出装置および読取り装置を含む、分析物を検出するシステムであり、該読取り装置が、該検出装置、および該検出装置が該読取り装置と接触される場合に少なくとも1個の電極と接続している電気回路を受けるように構成された開口部を含む、システム。

【請求項167】

読取り装置が、コンピュータプロセッサとインターフェース接続している、請求項166記載のシステム。

20

【請求項168】

読取り装置が、電子ディスプレイを含む、請求項166記載のシステム。

【請求項169】

読取り装置が、LCDディスプレイを含む、請求項166記載のシステム。

【請求項170】

電気回路が、発振回路である、請求項166記載のシステム。

【請求項171】

発振回路が、マイクロプロセッサを含む、請求項170記載のシステム。

【請求項172】

読取り装置が、電気キャパシタンスを測定するために構成されたマイクロプロセッサを含む、請求項166記載のシステム。

30

【請求項173】

読取り装置が、電源を含む、請求項166記載のシステム。

【請求項174】

a)分析物を含むことが疑わしい試料、ポリイミドを含む表面を有する基板、およびメソゲンを提供する段階；

b)該ポリイミドを含む表面を、該分析物を含むことが疑わしい試料と接触する段階；

c)該ポリイミドを含む表面を、該メソゲンと接触し、ここで該分析物の存在は、該メソゲンの配向の差異により示される段階

を含む、分析物を検出する方法。

40

【請求項175】

分析物は、ポリイミドを含む表面と非特異的に相互作用する、請求項174記載の方法。

【請求項176】

ポリイミドを含む表面は、認識部分を表示する、請求項175記載の方法。

【請求項177】

認識部分が、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸、炭水化物、脂質、有機分子および無機分子からなる群より選択される、請求項174記載の方法。

【請求項178】

メソゲンが、E7、MLC、5CB(4-n-ペンチル-4'-シアノビフェニル)、8CB(4-シアノ-4'-オクチルビフェニル)、BL093、TL 216、ZLI 5800、MLC 6613、およびMBBA((p-メトキシベン

50

ジリデン)-p-ブチルアニリン)からなる群より選択される、請求項174記載の方法。

【請求項179】

ポリイミドが、ラビングされている、請求項174記載の方法。

【請求項180】

ポリイミドが、Nissan 7210、Nissan 3510、Nissan 410、Nissan 3140、Nissan 5291、およびJapan Synthetic Rubber JALS 146-R19からなる群より選択される、請求項179記載の方法。

【請求項181】

ポリイミドが、メソゲンをホメオトロピックに配向する、請求項174記載の方法。

【請求項182】

ポリイミドが、Nissan 7511LおよびSE 1211からなる群より選択される、請求項181記載の方法。

【請求項183】

分析物の存在が、交差分極レンズにより目視した場合に白色または明色に見える無秩序な液晶により示され、ならびに分析物が結合されない区域は、秩序を維持し、および交差分極レンズにより目視した場合に暗色に見える、請求項174記載の方法。

【請求項184】

分析物の存在が、交差分極レンズにより目視した場合に白色または明色に見える無秩序な液晶により示され、ならびに分析物が結合されない区域は、ホメオトロピック配向を維持し、および暗色に見える、請求項174記載の方法。

【請求項185】

液晶のホメオトロピック配向が、目視検査、光学的検出、分光法、光透過法、および電氣的検出からなる群より選択される方法により検出される、請求項185記載の方法。

【請求項186】

a)少なくとも1種のリガンド分子および結合パートナー分子が、脂質と複合されている、該リガンドおよび該結合パートナー、ならびにメソゲンを提供する段階；

b)該リガンド分子および該結合パートナー分子を、該リガンド分子と該結合パートナー分子が相互作用し、リガンド-結合パートナー複合体を形成するような条件下で接触させる段階；

c)該複合体をメソゲンと接触させる段階により、該リガンド-結合パートナー複合体を検出する段階

を含む、リガンドとその結合パートナーの間の結合相互作用を検出する方法。

【請求項187】

メソゲンが、ホメオトロピックに配向されている、請求項186記載の方法。

【請求項188】

結合パートナーが、認識部分である、請求項186記載の方法。

【請求項189】

リガンドが、分析物である、請求項186記載の方法。

【請求項190】

検出段階が、メソゲンと接触させる前に、複合体を基板と接触させる段階を更に含む、請求項186記載の方法。

【請求項191】

メソゲンのホメオトロピックな配列が、目視検査、光学的検出、分光法、光透過法、および電氣的検出からなる群より選択される方法により検出される、請求項187記載の方法。

【請求項192】

分析物が、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、核酸、有機分子、無機分子、ウイルス、細菌、リボソーム、細胞、および真菌からなる群より選択される、請求項189記載の方法。

【請求項193】

10

20

30

40

50

基板が、金属フィルム、ガラス、シリコン、ダイヤモンドおよび高分子材料からなる群より選択される、請求項190記載の方法。

【請求項194】

高分子材料が、ポリウレタン、PDMS、ポリイミド、ポリスチレン、ポリカーボネートおよびポリイソシアノアクリレートからなる群より選択される、請求項193記載の方法。

【請求項195】

メソゲンが、E7、MLC、5CB(4-n-ペンチル-4'-シアノビフェニル)、8CB(4-シアノ-4'オクチルビフェニル)、BL093、TL 216、ZLI 5800、MLC 6613、およびMBBA((p-メトキシベンジリデン)-p-ブチルアニリン)、ならびにそれらの組合せからなる群より選択される、請求項186記載の方法。

10

【請求項196】

基板が、認識部分を含む検出領域を含む、請求項129記載の方法。

【請求項197】

認識部分が、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、炭水化物、有機分子、および無機分子からなる群より選択される、請求項196記載の方法。

【請求項198】

タンパク質が、抗原結合タンパク質である、請求項197記載の方法。

【請求項199】

基板が、複数の検出領域を含む、請求項196記載の方法。

【請求項200】

複数の検出領域が、同じ認識部分を表示する、請求項199記載の方法。

20

【請求項201】

複数の検出領域が、異なる認識部分を表示する、請求項199記載の方法。

【請求項202】

a)脂質に複合された認識部分；
b)メソゲンを含むバイアル；および
c)分析物の検出に関する説明書
を含む、分析物を検出するためのキット。

【請求項203】

基板を更に含む、請求項202記載のキット。

30

【請求項204】

a)脂質に複合された認識部分；および
b)液晶
を含む、分析物の検出のためのシステム。

【請求項205】

基板を更に含む、請求項204記載のシステム。

【請求項206】

認識部分が、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸、炭水化物、有機分子および無機分子からなる群より選択される、請求項204記載のシステム。

【請求項207】

基板が、シリコン、ガラス、ポリマー、ダイヤモンド、および金属からなる群より選択される、請求項205記載のシステム。

40

【請求項208】

基板が、液晶を配向させない、請求項205記載のシステム。

【請求項209】

メソゲンが、E7、MLC、5CB(4-n-ペンチル-4'-シアノビフェニル)、8CB(4-シアノ-4'オクチルビフェニル)、BL093、TL 216、ZLI 5800、MLC 6613、およびMBBA((p-メトキシベンジリデン)-p-ブチルアニリン)からなる群より選択される、請求項204記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

発明の技術分野

本発明は、液晶アッセイフォーマットを使用する、分析物の検出の分野、特にウイルス、細胞、細菌、脂質膜含有生物、タンパク質、核酸、炭水化物、ならびに他の生体分子、有機分子および無機分子の検出に関する。

【0002】

本出願は、2003年7月25日に出願された米国特許仮出願第60/490,122号；2003年11月10日に出願された米国特許仮出願第60/518,706号；および、2004年2月3日に出願された米国特許仮出願第60/541,516号の恩典を請求するものである。

【0003】

本発明は、米国立衛生研究所(NIH)/NIAIDにより与えられたSBIRグラント番号5R43AI4960602により政府の支援の下で行われた。米国政府は、本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

生物学的試料中の病原体、タンパク質、および核酸標的の検出は、数十億ドル規模のインビトロ診断産業の基礎を形成する。タンパク質標的および核酸標的の検出は、診断ベースと研究ベースの市場に分けることができる。診断市場は、ウイルスおよび細菌などの病原体の検出および同定、様々な遺伝子マーカーの同定、および腫瘍の存在に関連したマーカーの同定を含む。研究市場は、解析技術、創薬技術、およびハイスループットスクリーニング技術を必要とする、ゲノムおよびプロテオミクス産業を含む。

【0005】

最初のウイルス診断は、試料材料の、哺乳マウス、孵化卵、または生存細胞への直接接種という粗雑であるが感度がありかつ非特異的な技術からなっていた。診断法は、感度が良く特異的であるが時間のかかる血清学的中和技術、ELISAおよび蛍光抗体アッセイ、ならびに引き続き核酸増幅の現在の非常に感度の良い器機依存型技術および発光ビーズベースのアッセイから展開されている。ウイルスの検出および同定の方法の展開は、生物学(細胞培養、免疫学)の進歩により推進され、その後生化学(免疫化学、分子生物学、染色化学)の進歩が続いた。より最近の進展は、器機科学(光学、電子、ロボット、小型化、微小流動化など)の進歩から来ており、引き続きバイオセンサーの第一世代を開発するための生物学とマイクロエレクトロニクスの結びつきによる。

【0006】

試料中のウイルスの存在を検出する多くの方法がある。最高感度の方法(リアルタイムPCR、組織培養、電子顕微鏡)は、最高の複雑さならびに／または経費、精巧な装置および施設の必要性ならびに高度に訓練した技術者の必要性にも関連している。感度の低い方法(IFA、ELISA、ディップスティック法)は、実践において、交差反応性の問題に悩まされており、より多くの実地時間に関連しおよび／または多数の試料の迅速なスクリーニングへの適合性がより少ない。アルボウイルス監視、バイオの脅威のモニタリング、および原因不明の疾患の大流行時の迅速な物質同定などの状況においては、多重化の必要性が大きい。実際に核酸技術およびビーズベースの技術は、現在およそ6～20種の異なる標的を多重化することができる。

【0007】

ウイルスの検出および同定に利用可能な多くの技術があるが、改善が必要とされている。中でも望ましい特性は以下である：低い経費、生物学的システムに対する依存性の低さ、不安定で高価な試薬の使用に対する依存性の低さ、履行の複雑さが少ないこと、短縮された試料の処理およびアッセイの履行に必要な実地時間、アッセイの試行および結果の解釈について技術的熟練が最も少ないこと、装置の小型化および運搬性、自動化、および多重化能の増大。

【発明の開示】

【0008】

10

20

30

40

50

発明の概要

本発明は、液晶アッセイフォーマットを使用する、分析物の検出の分野、特にウイルス、細胞、細菌、脂質膜含有生物、タンパク質、核酸、炭水化物および他の生体分子、有機分子および無機分子の検出に関する。従って本発明は、以下を含むウイルスを検出する方法を提供する：a) i) ウイルスを含むことが疑わしい試料；ii) その上に固定された第一のウイルス認識部分を有する少なくとも1個の検出領域を含む基板を含む、検出装置；および、iii) メソゲン；を提供すること；b) 該検出領域を該試料と接触すること；ならびに、c) 該基板を該メソゲンと接触することを含み、ここで該ウイルスの存在は、該検出領域にわたる該メソゲンの変化により示され、かつここで該変化は、該検出領域上の追加のホメオトロピックディレクターの存在とは無関係である。本発明は、液晶を形成するメソゲンの特定の变化の検出に限定されるものではない。実際、様々な変化が検出され、これは色の变化、質感の変化、チルト角の変化、およびホメオトロピック配向を含むが、これらに限定されるものではない。

10

【0009】

本発明は、特定型のウイルスの検出に限定されない。実際様々なウイルスの検出が企図されており、これは、アデノウイルス科、アレナウイルス科、アストロウイルス科、ビルナウイルス科、ブニヤウイルス科、カリシウイルス科、サーコウイルス科、コロナウイルス科、フィロウイルス科、フラビウイルス科、ヘパドナウイルス科、ヘルペスウイルス科、イリドウイルス科、フィロウイルス科、オルソミクソウイルス科、パポバウイルス科、パラミクソウイルス科、パルボウイルス科、ピコルナウイルス科、ポックスウイルス科、レオウイルス科、レトロウイルス科、ラブドウイルス科、トガウイルス科、バドナウイルス、プロモウイルス科、コモウイルス科、ジェミニウイルス科、パルティティウイルス科、ポティウイルス科、セキウイルス科、およびトンプスウイルス科の科を含むが、これらに限定されるものではない。いくつかの態様において、ウイルスは、日本脳炎ウイルス群のウイルスである。別の態様において、日本脳炎ウイルス群のウイルスが、西ナイルウイルスおよびセントウルイス脳炎ウイルスからなる群より選択される。より更なる態様において、ウイルスは、エンベロープを持つウイルスである。

20

【0010】

本発明は、いずれか特定の基板の使用に限定されるものではない。実際、金属フィルム、ガラス、シリコン、ダイヤモンドおよび高分子材料を含むが、これらに限定されるものではない様々な基板の使用が企図されている。本発明は、いずれか特定の高分子材料の使用に限定されるものではない。実際、ポリウレタン、PDMS、ポリイミド、ポリスチレン、ポリカーボネートおよびポリイソシアノアクリレートからなる群より選択されるものを含むが、これらに限定されない様々な高分子材料の使用が企図されている。本発明は、いずれか特定のメソゲンの使用に限定されるものではない。実際、4-シアノ-4'-ペンチルビフェニル、N-(4-メトキシベンジリデン)-4-ブチルアニリンおよびそれらの組合せからなる群より選択されるものを含むが、これらに限定されない様々なメソゲンの使用が企図されている。本発明は、いずれか特定のウイルス認識部分の使用に限定されるものではない。実際、抗原結合タンパク質および核酸を含むが、これらに限定されない様々なウイルス認識部分の使用が企図されている。いくつかの態様において、抗原結合タンパク質は免疫グロブリンである。

30

40

【0011】

いくつかの態様において、基板は複数の検出領域を含む。いくつかの態様において、複数の検出領域は、それらに結合した同じウイルス認識部分を有する。別の態様において、複数の検出領域は、それらに結合した異なるウイルス認識部分を有する。いくつかの態様において、検出装置は、セルを形成するために、該第一の基板と反対側に配置された第二の基板を更に含む。

【0012】

更なる態様において、メソゲンの変化は、交差分極レンズ間の該検出装置を目視することにより検出される。いくつかの態様において、検出領域は、ウイルス非存在下では、メ

50

ソゲンをホメオトロピック配向しない。いくつかの態様において、ホメオトロピックな秩序は、該試料の該検出領域への塗布後48時間以内に認められる。

【0013】

本発明は、いずれか特定の種類の試料の分析に限定されるものではない。実際生体液、組織ホモジネート、糞便、水疱液、開口部または組織のスワブ、およびそこでウイルスが培養または調製される培地を含むが、これらに限定されるものではない様々な試料の分析が企図されている。本発明は、いずれか特定の種類の生体液の分析に限定されるものではない。実際本発明は、脳脊髄液、尿、血清、血漿、鼻分泌液、痰、精液および唾液を含むが、これらに限定されるものではない様々な生体液の分析を企図している。

【0014】

いくつかの態様において、本発明は、その上に固定された第一のウイルスに特異的な該ウイルス認識部分を有する少なくとも1個の検出領域を含む第一の基板を有し、ここで該検出領域は、該ウイルスの非存在下で添加されたメソゲンをホメオトロピック配向しない、ウイルス検出のための装置を提供する。いくつかの態様において、第一の基板は、複数の検出領域を含む。本発明は、いずれか特定の基板の使用に限定されるものではない。実際金属フィルム、ガラス、シリコン、ダイヤモンドおよび高分子材料を含むが、これらに限定されるものではない様々な基板の使用が企図されている。本発明は、いずれか特定の高分子材料の使用に限定されるものではない。実際ポリウレタン、PDMS、ポリイミド、ポリスチレン、ポリカーボネートおよびポリイソシアノアクリレートを含むが、これらに限定されるものではない様々な高分子材料の使用が企図されている。

【0015】

本発明は、いずれか特定のウイルス認識部分の使用に限定されるものではない。実際、抗原結合タンパク質および核酸を含むが、これらに限定されるものではない様々なウイルス認識部分の使用が企図されている。いくつかの態様において、抗原結合タンパク質は、免疫グロブリンである。いくつかの態様において、基板は複数の検出領域を含む。いくつかの態様において、複数の検出領域は、それらに結合した同じウイルス認識部分を含む。別の態様において、複数の検出領域は、それらに結合した異なるウイルス認識部分を含む。いくつかの態様において、検出装置は、セルを形成するために、該第一の基板と反対側に配置された第二の基板を更に含む。より更なる態様において、複数の検出領域が、アレイに配置されている。いくつかの態様において、基板は固定されたウイルスを含む少なくとも1個の対照領域を更に含む。別の態様において、装置は、メソゲンを含むセルを形成するために、該第一の基板に反対に配向された第二の基板を更に含む。更に別の態様において、装置は、該第一の基板および該基板のいずれかの側に配向された交差分極レンズを含む。いくつかの態様において、基板は該第一の基板内にマイクロチャネルを含み、ここで該マイクロチャネルは、試料を該検出領域に送達する。

【0016】

より更なる態様において、本発明は、以下を含むキットを提供する：a)その上に固定された第一のウイルスに特異的な該ウイルス認識部分を有する少なくとも1種の検出領域を含む第一の基板を含む、ウイルス検出装置であり、ここで該検出領域は、該ウイルスの非存在下で添加されたメソゲンをホメオトロピックに配向しないような、装置；および、b)該ウイルスの検出に関する説明書。いくつかの態様において、キットは、メソゲンを含むバイアルを更に含む。別の態様において、キットは、陽性対照として使用するためのウイルスを含むバイアルを更に含む。

【0017】

より更なる態様において、本発明は以下を含む方法を提供する：a)メソゲンが配列するように処理された機能化された検出基板、少なくとも1種のリガンドを表示するスタンプ基板、リガンドの結合パートナーを含むことが疑われる生物学的被験試料、およびメソゲンを提供すること；b)結合パートナーがリガンドに結合することができる条件下で、被験試料をスタンプ基板と接触すること；c) リガンドへの結合パートナーを検出基板に移動する条件下で、検出基板をスタンプ基板と接触すること；d)メソゲンを基板に塗布するこ

10

20

30

40

50

とにより、検出基板上のリガンドへの結合パートナーの存在を検出すること。本発明は、いずれか特定の生物学的試料の使用に限定されるものではない。実際全血、血清、脳脊髄液、鼻咽頭吸引液、および鼻分泌液からなる群より選択されるものを含むが、これらに限定されない様々な生物学的試料の使用が企図されている。いくつかの態様において、検出基板によるメソゲンの配列は、リガンドへの結合パートナーの存在により破壊される。いくつかの好ましい態様において、配列はホメオトロピックである。更なる態様において、メソゲンは、リガンドの結合パートナーが存在する検出基板の区域にわたりホメオトロピックに配列されていない。更に別の態様において、検出基板は、光学セルを形成するために使用される。いくつかの態様において、検出は、検出基板の交差分極による分析により行われる。更なる態様において、ホメオトロピックに配列されたメソゲンを伴う検出基板の区域は、暗く見える。別の態様において、実質的にホメオトロピックに配列されないメソゲンを伴う検出基板の区域は、明るく見える。本発明は、いずれか特定の型のリガンドの使用に限定されるものではない。実際、様々なリガンドの使用が企図されている。いくつかの態様において、リガンドは、病原生物由来の抗原性物質である。いくつかの態様において、抗原性物質はタンパク質である。更なる態様において、タンパク質は、ウイルスのエンベロープタンパク質である。いくつかの好ましい態様において、エンベロープタンパク質は、西ナイルウイルス由来のEタンパクである。本発明は、特定の種類の結合パートナーの検出に限定されるものではない。実際、様々な結合パートナーの検出が企図されている。いくつかの態様において、結合パートナーは抗体である。本発明は、特定の基板上のいずれか特定の数のリガンドの使用に限定されるものではない。いくつかの態様において、スタンプ基板は、アレイ内に2個またはそれよりも多いリガンドを含む。いくつかの好ましい態様において、リガンドは、複数の種または属からの結合パートナーにより結合されている。本発明は、いずれか特定のメソゲンの使用に限定されるものではない。実際、様々なメソゲンの使用が企図されている。いくつかの好ましい態様において、メソゲンは5CBである。本発明は、スタンプ基板を製造するためのいずれか特定の型の材料の使用に限定されるものではない。実際、様々な材料の使用が企図されている。いくつかの好ましい態様において、スタンプ基板はPDMSを含む。本発明は、いずれか特定の型の検出基板の使用に限定されるものではない。実際、様々な試験基板の使用が企図されている。いくつかの好ましい態様において、検出基板は、斜めに沈着された金を含む。

【0018】

より更なる態様において、本発明は、以下を含むキットを提供する：a)少なくとも1種のリガンドを表示するスタンプ基板；b)メソゲンを配向させる機能化された検出基板；および、c)リガンドの結合パートナーの検出のための基板の使用に関する説明書。いくつかの態様において、このキットは、メソゲンの容器を更に含む。本発明は、いずれか特定のメソゲンの使用に限定されるものではない。実際、様々なメソゲンの使用が企図されている。いくつかの好ましい態様において、メソゲンは5CBである。本発明は、スタンプ基板を製造するためのいずれか特定の型の材料の使用に限定されるものではない。実際、様々な材料の使用が企図されている。いくつかの好ましい態様において、スタンプ基板はPDMSを含有する。本発明は、いずれか特定の型の検出基板の使用に限定されるものではない。実際、様々な試験基板の使用が企図されている。いくつかの好ましい態様において、検出基板は、斜めに沈着された金を含む。本発明は、いずれか特定の型のリガンドの使用に限定されるものではない。実際、様々なリガンドの使用が企図されている。いくつかの態様において、リガンドは、病原生物由来の抗原性物質である。いくつかの態様において、抗原性物質はタンパク質である。更なる態様において、タンパク質は、ウイルスのエンベロープタンパク質である。いくつかの好ましい態様において、エンベロープタンパク質は、西ナイルウイルス由来のEタンパクである。いくつかの態様において、キットは、対照結合パートナーを含む容器を更に含む。本発明は、いずれか特定の結合パートナーに限定されるものではない。実際、様々な結合パートナーが企図されている。いくつかの態様において、結合パートナーはリガンドである。いくつかの態様において、キットは光学セルを形成する追加の基板を更に含む。更に他の態様において、キットは分極されたレンズを含

む。

【0019】

より更なる態様において、本発明は、以下を含む分析物を検出するシステムを提供する：
：a)認識部分を表示している第一の基板であり、ここで認識部分は分析物と相互作用する、基板；b)認識部分と相互作用する分析物を受けるように構成された表面を含む第二の基板；および、c)第二の基板にオーバーレイしている液晶。いくつかの態様において、第一の基板は、スタンプ、ビーズ、およびカラム媒体からなる群より選択される。いくつかの態様において、スタンプはPDMSを含む。いくつかの態様において、ビーズは磁気ビーズである。いくつかの態様において、カラムは免疫親和性カラム媒体である。いくつかの態様において、認識部分は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸、炭水化物、脂質、有機分子および無機分子からなる群より選択される。いくつかの態様において、液晶は、E7、MLC、5CB(4-n-ペンチル-4'-シアノビフェニル)、8CB(4-シアノ-4'オクチルビフェニル)、BL093、TL 216、ZLI 5800、MLC 6613、およびMBBA((p-メトキシベンジリデン)-p-ブチルアニリン)からなる群より選択されるメソゲンを含む。いくつかの態様において、第二の基板は、機能化された表面を含む。いくつかの態様において、機能化された表面は、ポリイミドを含む。いくつかの態様において、ポリイミドは、ラビング(rubbed)されている。いくつかの態様において、ポリイミドは、Nissan 7210、Nissan 3510、Nissan 410、Nissan 3140、Nissan 5291、およびJapan Synthetic Rubber JALS 146-R19からなる群より選択される。いくつかの態様において、ポリイミドは、液晶をホメオトロピックに配向する。いくつかの態様において、ポリイミドは、Nissan 7511LおよびSE 1211からなる群より選択される。

【0020】

更なる態様において、本発明は、以下を含む分析物を検出する方法を提供する：
a)認識部分を表示する第一の基板、第二の基板、メソゲン、および分析物を含むことが疑われる試料を提供すること；
b)認識部分を表示する第一の基板を、分析物を含むことが疑われる試料と接触させ、分析物を認識部分と相互作用させること；
c)認識部分と相互作用する分析物を、第二の基板へ移動すること；
ならびに、
d)第二の基板を該メソゲンと接触させ、第二の基板上の分析物の存在を検出すること。
いくつかの態様において、認識部分は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸、炭水化物、脂質、有機分子および無機分子からなる群より選択される。いくつかの態様において、分析物は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸、有機分子、無機分子、ウイルス、リポソーム、細菌、真菌、および細胞からなる群より選択される。いくつかの態様において、第一の基板は、スタンプ、ビーズ、およびカラム媒体からなる群より選択される。いくつかの態様において、第二の基板は、シリコン、ガラス、ポリマー、ダイヤモンド、および金属からなる群より選択される。いくつかの態様において、第二の基板はポリイミドで機能化された表面を含む。いくつかの態様において、ポリイミドはラビングされている。いくつかの態様において、ポリイミドは、Nissan 7210、Nissan 3510、Nissan 410、Nissan 3140、Nissan 5291、およびJapan Synthetic Rubber JALS 146-R19からなる群より選択される。いくつかの態様において、ポリイミドは、液晶をホメオトロピックに配向する。いくつかの態様において、ポリイミドは、Nissan 7511LおよびSE 1211からなる群より選択される。いくつかの態様において、分析物の存在は、交差分極レンズにより目視した場合に白色または明色に見える秩序のない液晶により示され、ならびに分析物が結合されない領域は、秩序を維持し、および交差分極レンズにより目視した場合に暗色に見える。いくつかの態様において、分析物の存在は、交差分極レンズにより目視した場合に白色または明色に見える無秩序な液晶により示され、ならびに分析物が結合されない区域は、ホメオトロピック配向を維持し、および暗色に見える。いくつかの態様において、メソゲンは、E7、MLC、5CB(4-n-ペンチル-4'-シアノビフェニル)、8CB(4-シアノ-4'オクチルビフェニル)、BL093、TL 216、ZLI 5800、MLC 6613、およびMBBA((p-メトキシベンジリデン)-p-ブチルアニリン)からなる群より選択される。いくつかの態様において、第二の基板上の分析物の存在は、メソゲン配向の差異により示される。いくつかの態様において、メソゲン配向の差異は、目視検査、

光学的検出、分光法、光透過法、および電氣的検出からなる群より選択される方法により検出される。いくつかの態様において、移動段階は、分析物を該第一の基板から溶離する段階を更に含む。いくつかの態様において、方法は、分析物-認識部分複合体を、二次的結合剤と接触する段階を更に含む。いくつかの態様において、二次的結合剤は、抗原結合タンパク質、ならびに酵素、アビジン、およびビオチンからなる群より選択される。いくつかの態様において、二次的結合剤の存在は、第二の基板への移動後の分析物の検出を増強する。いくつかの態様において、二次的結合剤は脂質と複合されている。いくつかの態様において、二次的結合剤はリポソーム上に表示される。

【0021】

より更なる態様において、本発明は、以下を含むキットを提供する：a)認識部分を表示する第一の基板であり、ここで認識部分は、分析物と相互作用する、基板；b)該認識部分と相互作用している分析物を受けるように構成された表面を含む第二の基板；c)メソゲンを含むバイアル；および、d)分析物の検出に関する説明書。いくつかの態様において、第一の基板は、スタンプ、ビーズ、およびカラム媒体からなる群より選択される。いくつかの態様において、スタンプはPDMSを含む。いくつかの態様において、ビーズは磁気ビーズである。いくつかの態様において、カラムは、免疫親和性カラムである。いくつかの態様において、認識部分は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸、炭水化物、脂質、有機分子および無機分子からなる群より選択される。いくつかの態様において、メソゲンは、E7、MLC、5CB(4-n-ペンチル-4'-シアノビフェニル)、8CB(4-シアノ-4'-オクチルビフェニル)、BL093、TL 216、ZLI 5800、MLC 6613、およびMBBA((p-メトキシベンジリデン)-p-ブチルアニリン)からなる群より選択される。いくつかの態様において、第二の基板は、機能化された表面を含む。いくつかの態様において、機能化された表面はポリイミドを含む。いくつかの態様において、ポリイミドはラビングされている。いくつかの態様において、ポリイミドは、Nissan 7210、Nissan 3510、Nissan 410、Nissan 3140、Nissan 5291、およびJapan Synthetic Rubber JALS 146-R19からなる群より選択される。いくつかの態様において、ポリイミドは、液晶をホメオトロピックに配向する。いくつかの態様において、ポリイミドは、Nissan 7511LおよびSE 1211からなる群より選択される。いくつかの態様において、キットは、二次的結合剤を含む第二のバイアルを更に含む。いくつかの態様において、二次的結合剤は、抗原結合タンパク質、酵素、アビジンおよびビオチンからなる群より選択される。

【0022】

より更なる態様において、本発明は、以下を含む分析物を検出する方法を提供する：a) i)分析物を含むことが疑われる試料；ii)少なくとも1個の電極および少なくとも1個の検出領域を含む基板を含む、検出装置；iii)メソゲンを提供すること；b)少なくとも1個の電極に電位を加え、分析物を基板に移動すること；c)基板をメソゲンと接触させ、ここで分析物の存在が、少なくとも1個の検出領域にわたるメソゲンの配列の差異により検出されること。いくつかの態様において、電位は交流である。いくつかの態様において、移動は二元電気泳動(dielectrophoresis)により生じる。いくつかの態様において、メソゲンの配列における差異は、色の変化、質感の変化、チルト角の変化、およびホメオトロピック配向からなる群より選択される。いくつかの態様において、メソゲンの配列の差異は、目視検査、光学的検出、分光法、光透過法、および電氣的検出からなる群より選択される。いくつかの態様において、分析物は、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、核酸、有機分子、無機分子、ウイルス、細菌、リポソーム、細胞、および真菌からなる群より選択される。いくつかの態様において、基板は、金属フィルム、ガラス、シリコン、ダイヤモンドおよび高分子材料からなる群より選択される。いくつかの態様において、高分子材料は、ポリウレタン、PDMS、ポリイミド、ポリスチレン、ポリカーボネートおよびポリイソシアノアクリレートからなる群より選択される。いくつかの態様において、メソゲンは、E7、MLC、5CB(4-n-ペンチル-4'-シアノビフェニル)、8CB(4-シアノ-4'-オクチルビフェニル)、BL093、TL 216、ZLI 5800、MLC 6613、およびMBBA((p-メトキシベンジリデン)-p-ブチルアニリン)ならびにそれらの組合せからなる群より選択される。いくつかの態様にお

いて、検出領域は認識部分を含む。いくつかの態様において、認識部分は、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、炭水化物、有機分子、および無機分子からなる群より選択される。いくつかの態様において、タンパク質は、抗原結合タンパク質である。いくつかの態様において、基板は複数の検出領域を含む。いくつかの態様において、複数の検出領域は、同じ認識部分を表示する。いくつかの態様において、複数の検出領域は異なる認識部分を表示する。いくつかの態様において、検出装置は、セルを形成するために、第一の基板の反対側に配置された第二の基板を更に含む。いくつかの態様において、メソゲンの変化は、交差分極レンズ間の検出装置を目視することにより検出される。いくつかの態様において、試料は、生体液、組織ホモジネート、糞便、水疱液、開口部または組織のスワブ、およびそこでウイルスが培養または調製される培地からなる群より選択される。いくつかの態様において、生体液は、脳脊髄液、尿、血清、血漿、鼻分泌液、痰、精液、および唾液からなる群より選択される。いくつかの態様において、方法は、検出装置のインピーダンスを測定することによる、結合している分析物を検出する段階を更に含み、ここでキャパシタンスの変化は、分析物結合の指標である。いくつかの態様において、インピーダンスは、キャパシタンスまたは抵抗である。いくつかの態様において、測定はリアルタイムである。

10

【0023】

より更なる態様において、本発明は、少なくとも1個の電極および少なくとも1個の検出領域を含む第一の基板であり、ここで該少なくとも1個の電極が、分析物を基板に引きつけるための電位を提供し、かつ装置の電気特性の測定により、分析物の存在を決定するように構成された基板、ならびに第一の基板の反対に配向された第二の基板であり、ここで第一の基板および第二の基板が、液晶を含むためのチャンバーを形成する基板を含む、分析物の検出装置を提供する。いくつかの態様において、電気的特性はインピーダンスである。いくつかの態様において、インピーダンスは、キャパシタンスまたは抵抗である。いくつかの態様において、インピーダンスは、キャパシタンスである。いくつかの態様において、基板は、金属フィルム、ガラス、シリコン、ダイヤモンドおよび高分子材料からなる群より選択される。いくつかの態様において、高分子材料は、ポリウレタン、PDMS、ポリイミド、ポリスチレン、ポリカーボネートおよびポリイソシアノアクリレートからなる群より選択される。いくつかの態様において、装置は、メソゲンを更に含み、ここでメソゲンは、E7、MLC、5CB(4-n-ペンチル-4'-シアノビフェニル)、8CB(4-シアノ-4'-オクチルビフェニル)、BL093、TL 216、ZLI 5800、MLC 6613、およびMBBA((p-メトキシベンジリデン)-p-ブチルアニリン)ならびにそれらの組合せからなる群より選択される。いくつかの態様において、検出領域は、認識部分を含む。いくつかの態様において、認識部分は、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、炭水化物、有機分子、および無機分子からなる群より選択される。いくつかの態様において、タンパク質は、抗原結合タンパク質である。いくつかの態様において、第一の基板は、複数の検出領域を含む。いくつかの態様において、複数の検出領域は同じ認識部分を表示する。いくつかの態様において、複数の検出領域は異なる認識部分を表示する。いくつかの態様において、少なくとも1個の電極は、交差指状(インターデジタル)電極、双曲電極、三角電極、および長方形電極からなる群より選択される。いくつかの態様において、第一の基板は、少なくとも2個の電極を含む。

20

30

40

【0024】

より更なる態様において、本発明は、先に説明された検出装置および読取り装置を含む分析物の検出のためのシステムを提供し、この読取り装置は、検出装置、および検出装置が読取り装置と接触された場合に少なくとも1個の電極と接続している電気回路を受けるように構成された開口部を含む。いくつかの態様において、読取り装置は、コンピュータプロセッサとインターフェース接続している。いくつかの態様において、読取り装置は電子ディスプレイを含む。いくつかの態様において、読取り装置はLCDディスプレイを含む。いくつかの態様において、電気回路は発振回路である。いくつかの態様において、発振回路はマイクロプロセッサを含む。いくつかの態様において、読取り装置は電気

50

キャパシタンスを測定するために設定されたマイクロプロセッサを含む。いくつかの態様において、読取り装置は電源を含む。

【0025】

更に別の態様において、本発明は、以下を含む分析物の検出法を提供する：a)分析物を含むことが疑わしい試料、ポリイミドを含む表面を有する基板、およびメソゲン；を提供すること；b)ポリイミドを含む表面を、分析物を含むことが疑わしい試料と接触すること；c)ポリイミドを含む表面を、メソゲンと接触し、ここで分析物の存在は、メソゲン配向の差異により示されること。いくつかの態様において、分析物は、ポリイミドを含む表面と非特異的に相互作用する。いくつかの態様において、ポリイミドを含む表面は認識部分を表示する。いくつかの態様において、認識部分は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸、炭水化物、脂質、有機分子および無機分子からなる群より選択される。いくつかの態様において、メソゲンは、E7、MLC、5CB(4-n-ペンチル-4'-シアノビフェニル)、8CB(4-シアノ-4'オクチルビフェニル)、BL093、TL 216、ZLI 5800、MLC 6613、およびMBBA((p-メトキシベンジリデン)-p-ブチルアニリン)からなる群より選択される。いくつかの態様において、ポリイミドは、ラビングされている。いくつかの態様において、ポリイミドは、Nissan 7210、Nissan 3510、Nissan 410、Nissan 3140、Nissan 5291、およびJapan Synthetic Rubber JALS 146-R19からなる群より選択される。いくつかの態様において、ポリイミドは、メソゲンをホメオトロピックに配向する。いくつかの態様において、ポリイミドは、Nissan 7511LおよびSE 1211からなる群より選択される。いくつかの態様において、分析物の存在は、交差分極レンズにより目視した場合に白色または明色に見える無秩序な液晶により示され、ならびに分析物が結合されない領域は、秩序を維持し、および交差分極レンズにより目視した場合に暗色に見える。いくつかの態様において、分析物の存在は、交差分極レンズにより目視した場合に白色または明色に見える無秩序な液晶により示され、ならびに分析物が結合されない領域は、ホメオトロピック配向を維持し、および暗色に見える。いくつかの態様において、液晶のホメオトロピック配向は、目視検査、光学的検出、分光法、光透過法、および電気的検出からなる群より選択される方法により検出される。

10

20

30

40

50

【0026】

いくつかの態様において、本発明は、以下を含む、リガンドとその結合パートナーの間の結合相互作用を検出する方法を提供する：a)少なくとも1種のリガンド分子および結合パートナー分子は脂質と複合されている、リガンドおよび結合パートナー、ならびにメソゲンを提供すること；b)リガンド分子および結合パートナー分子を、リガンド分子と結合パートナー分子が相互作用し、リガンド-結合パートナー複合体を形成するような条件下で接触すること；および、c)複合体をメソゲンと接触することにより、リガンド-結合パートナー複合体を検出すること。いくつかの態様において、メソゲンは、複合体によりホメオトロピックに配向されている。いくつかの態様において、結合パートナーは認識部分である。いくつかの態様において、リガンドは試料中の分析物である。いくつかの態様において、検出段階は、メソゲンと接触する前に、複合体を基板と接触することを更に含む。いくつかの態様において、メソゲンのホメオトロピック配列は、目視検査、光学的検出、分光法、光透過法、および電気的検出からなる群より選択される方法により検出される。いくつかの態様において、分析物は、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、核酸、有機分子、無機分子、ウイルス、細菌、リポソーム、細胞、および真菌からなる群より選択される。いくつかの態様において、基板は、金属フィルム、ガラス、シリコン、ダイヤモンドおよび高分子材料からなる群より選択される。いくつかの態様において、高分子材料は、ポリウレタン、PDMS、ポリイミド、ポリスチレン、ポリカーボネートおよびポリイソシアノアクリレートからなる群より選択される。いくつかの態様において、メソゲンは、E7、MLC、5CB(4-n-ペンチル-4'-シアノビフェニル)、8CB(4-シアノ-4'オクチルビフェニル)、BL093、TL 216、ZLI 5800、MLC 6613、およびMBBA((p-メトキシベンジリデン)-p-ブチルアニリン)、ならびにそれらの組合せからなる群より選択される。いくつかの態様において、基板は認識部分を含む検出領域を含む。いくつかの態様において、認識部分は、

ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、炭水化物、有機分子、および無機分子からなる群より選択される。いくつかの態様において、タンパク質は、抗原結合タンパク質である。いくつかの態様において、基板は複数の検出領域を含む。いくつかの態様において、複数の検出領域は、同じ認識部分を表示する。いくつかの態様において、複数の検出領域は、異なる認識部分を表示する。いくつかの態様において、リガンドはビオチンであり、および認識部分はアビジンである。いくつかの態様において、脂質と複合された少なくとも1種のリガンド分子および結合パートナー分子は、二次的結合剤である。

【0027】

いくつかの態様において、本発明は、以下を含む分析物を検出するためのキットを提供する：a)脂質に複合された認識部分；b)メソゲンを含むバイアル；および、c)分析物の検出に関する説明書。いくつかの態様において、キットは、基板を更に含む。いくつかの態様において、認識部分は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸、炭水化物、有機分子および無機分子からなる群より選択される。いくつかの態様において、基板は、シリコン、ガラス、ポリマー、ダイヤモンド、および金属からなる群より選択される。いくつかの態様において、基板は、液晶を配向させない。いくつかの態様において、メソゲンは、E7、MLC、5CB(4-n-ペンチル-4'-シアノビフェニル)、8CB(4-シアノ-4'-オクチルビフェニル)、BL093、TL 216、ZLI 5800、MLC 6613、およびMBBA((p-メトキシベンジリデン)-p-ブチルアニリン)からなる群より選択される。

【0028】

いくつかの態様において、本発明は、以下を含む分析物を検出するシステムを提供する：a)脂質に複合された認識部分；および、b)液晶。いくつかの態様において、このシステムは、基板を更に含む。いくつかの態様において、認識部分は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸、炭水化物、有機分子および無機分子からなる群より選択される。いくつかの態様において、基板は、シリコン、ガラス、ポリマー、ダイヤモンド、および金属からなる群より選択される。いくつかの態様において、基板は、液晶を配向させない。いくつかの態様において、メソゲンは、E7、MLC、5CB(4-n-ペンチル-4'-シアノビフェニル)、8CB(4-シアノ-4'-オクチルビフェニル)、BL093、TL 216、ZLI 5800、MLC 6613、およびMBBA((p-メトキシベンジリデン)-p-ブチルアニリン)からなる群より選択される。

【0029】

定義

本明細書において使用される用語「認識部分」は、関心のある分析物と共有または非共有のいずれかの様式で相互作用する組成物を意味する。

【0030】

本明細書において使用される用語「ウイルス認識部分」は、ウイルスと特異的に結合するいずれかの組成物を意味する。「ウイルス認識部分」の例は、抗原結合タンパク質および核酸アプタマーを含むが、これらに限定されるものではない。

【0031】

用語「基板」は、認識部分のような別の組成物の土台として役立つ組成物を意味する。基板の例は、シリコン面、ガラス面、ガラスビーズ、磁気ビーズ、アガロースビーズなどを含むが、これらに限定されるものではない。

【0032】

本明細書において使用される用語「リガンド」は、別の分子に結合するまたは別の分子により結合され得るのいずれかの分子を意味する。リガンドは、別の実体と結合し、より大きい複合体を形成する、いずれかのイオン、分子、分子群、または他の物質である。リガンドの例は、ペプチド、炭水化物、核酸、抗体、または受容体と結合する分子を含むが、これらに限定されるものではない。

【0033】

本明細書において使用される用語「ホメオトロピックディレクター」は、液晶をホメオトロピックに配向する基板のトポグラフィ的特徴(例えば、ナノ構造またはホメオトロピック配向しているポリイミド)を意味する。

10

20

30

40

50

【0034】

本明細書において使用される用語「病原体」は、ウイルス、細菌、寄生体(原生動物、扁形動物、袋形動物、鉤頭虫、および節足動物の門の生物を含むが、これらに限定されるものではない。)、真菌、およびプリオンを含むが、これらに限定されるものではない、疾患を引き起こす生物、微生物、または物質を意味する。

【0035】

本明細書において使用される単数または複数の用語「細菌」は、全て原核生物界の門に属するものを含む、全て原核生物を意味する。この用語は、マイコプラズマ、クラミジア、アクチノミセス、ストレプトミセス、およびリケッチアを含む細菌であると見なされる全ての微生物を包含することが意図されている。球菌、桿菌、スピロヘータ、スフェロプラスト、プロトプラストなどを含む、全ての細菌型は、この定義に含まれる。「グラム陰性」および「グラム陽性」は、当該技術分野において周知のグラム染色法により得られる染色パターンを意味する(例えば、Finegold and Martin, Diagnostic Microbiology, 6th Ed. (1982), CV Mosby St. Louis, pp13-15参照)。

10

【0036】

本明細書において使用される用語「脂質膜」は、その最も広範な意味で、脂質分子を含有する薄いシートまたは層を意味する。この用語は、全ての「生体膜」(すなわち、形質膜、核膜、オルガネラ膜、および合成膜を含むが、これらに限定されるものではない有機的膜(organelle membrane))を包含することが意図されている。典型的には、膜は、脂質、タンパク質、糖脂質、ステロイド、ステロール、および/または他の成分により構成される。本明細書において使用される用語「膜断片」は、膜の一部または小片を意味する。

20

【0037】

本明細書において使用される用語「脂質」は、有機溶媒中のそれらの溶解度により特徴付けられる様々な化合物を意味する。このような化合物は、脂肪、ワックス、ステロイド、ステロール、糖脂質、グリコスフィンゴ脂質(ガングリオシドを含む)、リン脂質、テルペン、脂溶性ビタミン、プロスタグランジン、カロテン、およびクロロフィルを含むが、これらに限定されるものではない。本明細書において使用される語句「脂質ベースの材料」とは、脂質を含有するいずれかの材料を意味する。

【0038】

本明細書において使用される用語「リポソーム」は、水性媒質を隔離するために誘導することができる人工的に作成された球形の脂質複合体を意味する。

30

【0039】

本明細書において使用される用語「二次的結合剤」は、分析物-認識部分複合体のひとつに結合する、分子または分子の集合体を意味する。二次的結合剤は、分析物-認識部分結合から生じるシグナルを増幅するのに有用であることが企図されている。

【0040】

本明細書において使用される用語「カラム媒体」は、カチオン交換媒体、アニオン交換媒体、および免疫親和性カラム媒体などの、クロマトグラフィーカラムを充填するために使用される媒体を意味する。

【0041】

本明細書において使用される用語「検出領域」は、試料中の分析物(例えば、関心のあ

40

【0042】

るウイルス)の検出のためにデザインされている基板上の区切られた区域を意味する。

【0043】

本明細書において使用される単数または複数の用語「材料」は、その最も広い意味で、いずれかの組成物を意味する。

【0044】

50

本明細書において使用される用語「抗原結合タンパク質」は、免疫原(抗原)により動物において誘発された糖タンパク質、およびそのような糖タンパク質由来のタンパク質(例えば、1本鎖抗体およびF(ab')₂、Fab'およびFab断片)を意味する。抗体は、免疫原への、より詳細に述べると免疫原に含まれた1種または複数のエピトープに対する特異性を示す。未変性の抗体は、少なくとも2個の軽鎖ポリペプチドおよび少なくとも2個の重鎖ポリペプチドを含む。重鎖および軽鎖の各ポリペプチドは、ポリペプチド鎖のアミノ末端部分に可変領域(すなわち、各々、VHおよびVL)を含み、これは抗原と相互作用する結合ドメインを含む。重鎖および軽鎖の各ポリペプチドは、ポリペプチド鎖の定常領域も含み(一般にはカルボキシ末端部分)、これは宿主組織ならびに免疫系の様々な細胞、一部の食細胞および古典的補体システムの補体第1成分(C1q)に影響を及ぼす要因への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。軽鎖の定常領域は「CL領域」と称され、重鎖の定常領域は「CH領域」と称される。重鎖の定常領域は、CH1領域、CH2領域、およびCH3領域を含む。CH1領域とCH2領域の間の重鎖部分は、ヒンジ領域(すなわち「H領域」)と称される。抗体の細胞表面型の重鎖の定常領域は、膜カルボキシ末端のスペーサー膜貫通領域(M1)および細胞質領域(M2)を更に含む。抗体の分泌型は一般に、M1およびM2領域を欠いている。

【0045】

本明細書において使用される用語「選択的結合」は、特定の分子構造の存在に左右される、ひとつの材料の別のものへの結合を意味する(すなわち特異的結合)。例えば免疫グロブリンは、免疫グロブリンのリガンド結合部位に相補的である化学構造を含む抗原へ選択的に結合する。これは、それにより相互作用が仲介され、かつ分子の構造的適合性を基にしない、「非選択的結合」とは対照的である。

【0046】

本明細書において使用される用語「重合」は、小型の分子モノマーの反復単位からなるより大きい分子への転換を生じるプロセスを包含している。典型的には、重合は、モノマーの別のものへの化学的架橋が関連している。

【0047】

本明細書において使用される用語「抗原」は、少なくとも1種の抗体により認識されるいずれかの分子または分子群を意味する。定義により、抗原は、少なくとも1種のエピトープ(すなわち、抗体により認識されることが可能である特異的生化学的単位)を含まなければならない。用語「免疫原」は、抗体産生を誘導するいずれかの分子、化合物、または凝集体を意味する。定義により、免疫原は、少なくとも1種のエピトープ(すなわち、免疫応答を引き起こすことが可能である特異的生化学的単位)を含まなければならない。

【0048】

本明細書において使用される用語「自宅検査(home testing)」および「診療所検査(point of care testing)」は、実験室環境以外で生じる検査を意味する。このような検査は、屋内または屋外、例えば個人の家、職場、公共または個人的な場所、車中に加え、患者のベッド脇で行うことができる。

【0049】

本明細書において使用される用語「ウイルス」は、例外はあるが、光学顕微鏡で観察不可能であり、独立した代謝を欠き、かつ生存宿主細胞内でのみ複製することができる、微小な感染性物質を意味する。個々の粒子(すなわちビリオン)は、核酸およびタンパク質の殻またはコートからなり；一部のビリオンは、脂質含有膜も有する。用語「ウイルス」は、動物、植物、ファージ、および他のウイルスを含む、全ての種類のウイルスを包含している。

【0050】

本明細書において使用される用語「ナノ構造」は、典型的にはナノスケールで測定される、顕微鏡構造を意味する。このような構造は、リポソーム、フィルム、多層、編組(branched)、ラメラ、らせん状、管状、および線維様の形状、ならびにそれらの組合せを含むが、これらに限定されるものではない、様々な3次元集成体を含む。このような構造は、いくつかの態様において、ロッドおよびコイルのように、集合状態の溶媒和されたポリマ

ーとして存在することができる。このような構造は、金フィルムの固形表面への物理的沈着、機械的にラビングされた表面上に固定されたタンパク質、および電子ビームリソグラフにより調製されたシリコン鋳型を用いることでトポグラフィーにより成形またはインプリントされた高分子材料により調製されるような、無機材料から形成することもできる。

【0051】

本明細書において使用される用語「自己集成モノマー」および「脂質モノマー」は、自発的に会合し、分子集成体を形成する分子を意味する。ひとつの意味でこれは、会合し、界面活性剤分子集成体を形成する、界面活性剤分子を意味する。用語「自己集成モノマー」は、単独分子(例えば、単独の脂質分子)および小型の分子集成体(例えば、重合した脂質)を含み、これにより個々の小型の分子集成体は、より大きい分子集成体へ更に凝集される(例えば、集成および重合により)。

10

【0052】

本明細書において使用される用語「リンカー」または「スペーサー分子」は、ひとつの実体を別のものに連結する物質を意味する。ひとつの意味で、分子または分子群は、2個以上の他の分子へ共有結合されるリンカーであることができる(例えば、リガンドの自己集成するモノマーへの連結)。

【0053】

本明細書において使用される用語「結合」は、分子内の原子間および結晶中のイオンと分子の間の連結を意味する。用語「単結合」は、2個の電子が結合軌道を占有する結合を意味する。分子内の原子間の単結合の表記は、2個の原子間に描かれた1本線で表される(例えばC-C)。用語「二重結合」は、2個の電子対を共有する結合を意味する。二重結合は、単結合よりもより強力であり、かつより反応性である。用語「三重結合」は、3個の電子対の共有を意味する。本明細書で使用される用語「エン-イン(ene-yne)」は、二重結合と三重結合が交互であることを意味する。本明細書において使用される用語「アミン結合」、「チオール結合」および「アルデヒド結合」は、各々、アミン基(すなわち、1個または複数のその水素原子が炭化水素基と置換されることによりアンモニアから生じた化学基)、チオール基(すなわち、アルコールのイオウアナログ)、およびアルデヒド基(すなわち、別の炭素原子上に直接連結された化学基-CHO)の間と、別の原子または分子の間に形成された結合を意味する。

20

【0054】

本明細書において使用される用語「共有結合」は、1個の電子が各原子によりもたらされる、2個の電子を共有する2個の原子の連結を意味する。

30

【0055】

本明細書において使用される用語「スペクトル」は、波長の順番で配置された光のエネルギーの分布を意味する。

【0056】

使用される用語「可視スペクトル」は、約360nm～約800nmの波長を含む、光照射を意味する。

【0057】

本明細書において使用される用語「基板」は、その上に別の材料が重層または付着された固形物体または表面を意味する。固形支持体は、とりわけガラス、金属、ゲル、および濾紙を含むが、これらに限定されるものではない。

40

【0058】

本明細書において使用される用語「アレイ」および「パターン化されたアレイ」は、要素(すなわち実体)の材料または装置への配置を意味する。例えばリガンド結合分子(例えば、抗体または核酸)の分析物-検出装置とのいくつかの種類の組合せは、アレイを構成するであろう。

【0059】

本明細書において使用される用語「インサイチュー」は、その自然環境の状況内に存在または生じる、プロセス、事象、目的、または情報を意味する。

50

【0060】

本明細書において使用される用語「試料」は、その最も広範な意味で使用される。ひとつの意味で、これは生体高分子材料を意味する。別の意味で、これは、いずれかの給源から得られた標本または培養物に加え、生物学的試料および環境学的試料を含むことを意味する。生物学的試料は、動物(ヒトを含む)から得られ、かつ液体、固形物、組織、気体を包含している。生物学的試料は、血漿、血清などのような血液産物を含む。環境試料は、地表物質(surface matter)、土壌、水、結晶および産業試料などの、環境材料を含む。これらの例は、本発明で適用可能な試料の種類を制限するものとして構成されてはいない。

【0061】

本明細書において使用される用語「液晶」は、一般に固相および等方性液相の間の温度範囲内にある、3次元結晶格子の存在を伴わない、異方性の特性により特徴付けられる、熱力学的安定相を意味する。 10

【0062】

本明細書において使用される用語「メソゲン」は、液晶を形成する化合物、特に液晶系材料の成分である、剛直な棒状または平板状の分子を意味する。

【0063】

本明細書において使用される用語「サーモトロピック液晶」とは、温度上昇のために、メソゲン性固形物の溶融から生じる液晶を意味する。純粋な物質および混合物の両方が、サーモトロピック液晶を形成する。

【0064】

本明細書において使用される用語「ライオトロピック」とは、溶媒中に配向性および／または位置的順序を伴う相を形成する分子を意味する。ライオトロピック液晶は、両親媒性分子(例えば、ラウリン酸ナトリウム、ホスファチジルエタノールアミン、レシチン)を用いて形成することができる。この溶媒は水であることができる。 20

【0065】

本明細書において使用される用語「異種表面」は、勾配の全域でのように、少なくともふたつの個別の面または方向に液晶を配向する表面を意味する。

【0066】

本明細書において使用される用語「ネマチック」は、分子の長軸が、実質的に平行であるが、重心の位置はランダムに分布されている液晶を意味する。ネマチック液晶は、実質的に表面近傍に配向させることができる。 30

【0067】

本明細書において使用される用語「キラルネマチック」は、メソゲンが光学的に活性である液晶を意味する。ネマチックの場合のように局所的に一定に維持されているディレクター(director)の代わりに、このディレクターは、試料を通じてらせん式に回転している。キラルネマチック結晶は、個々のメソゲンの回転力を基に説明することができるものよりも、はるかに高い強力な光学活性を示す。ディレクターのピッチに対して波長が等しい光が液晶に衝突する場合、このディレクターは回折格子のように作用し、その上の入射光をほとんどおよび時には全て反射する。白色光がこのような材料に入射する場合、ただ1種の色の光が反射され、これは循環的に偏光する。この現象は、選択的反射として知られており、キラルネマチック結晶により作成された虹色の原因である。 40

【0068】

本明細書において使用される用語「スメクチック」は、配向秩序に加え、より大きい程度の位置順序の存在により「ネマチック」とは識別される液晶を意味し；これらの分子は、これらの平面および層の間で行うよりも、より多くの時間を平面および層内で費やす。「有極性スメクチック」層は、メソゲンが永久双極子モーメントを有する場合に生じる。例えばスメクチックA2相において、連続層は抗強誘電性秩序を示し、永久双極子の方向は層毎に交互になる。分子が分子の長軸を横断する永久双極子モーメントを有する場合、結果的にキラルスメクチック相は強誘電性である。この相を利用する装置は、本質的に双安定性である。

【0069】

本明細書において使用される用語「フラストレート相」は、キラル分子により形成された別の種類の相を意味する。これらの相はキラルではないが、しかしねじれが、結晶粒界のアレイによりこの相へ導入される。立方格子欠陥(そこではディレクターが定義されない)が、複雑に配向された秩序のあるねじれた構造に存在する。これらの欠陥の間の距離は、数百ナノメートルであり、そのためこれらの相は、正に結晶がx-線を反射するように、光を反射する。

【0070】

「ディスコチック相」は、伸長型よりもむしろ平板型である分子から形成される。通常これらの分子は、芳香族コアおよび6個の側鎖置換基を有する。これらの分子がキラルであるか、またはキラルドーパントがディスコチック液晶に加えられる場合、キラルネマチックディスコチック相を形成することができる。

10

【0071】

発明の説明

本発明は、液晶アッセイフォーマットを使用する、分析物検出の分野、特にウイルス、細胞、細菌、脂質膜含有生物、タンパク質、核酸、炭水化物、および他の生体分子、有機分子および無機分子の検出に関する。液晶ベースのアッセイシステム(LCアッセイ)は、米国特許第6,284,197; 国際公開公報第01/61357号; 第01/61325号; 第99/63329号; Gupta et al., Science, 279:2077-2080(1998); Seung-Ryeol Kim, Rahul R. Shah, and Nicholas L. Abbott; Orientations of Liquid Crystals on Mechanically Rubbed Films of Bovine Serum Albumin: A Possible Substrate for Biomolecular Assays Based on Liquid Crystals, Analytical Chemistry, 2000;72(19):4646-4653; Justin J. Skaife and Nicholas L. Abbott, Quantitative Interpretation of the Optical Textures of Liquid Crystals Caused by Specific Binding of Immunoglobulins to Surface-Bound Antigens, Langmuir, 2000;16(7):3529-3536; Vinay K. Gupta and Nicholas L. Abbott, Using Droplets of Nematic Liquid Crystal To Probe the Microscopic and Mesoscopic Structure of Organic Surfaces, Langmuir, 1999;15(21):7213-7223において開示されており、これらは全て本明細書に参照として組入れられている。

20

【0072】

本発明は、分析物を直接的および間接的の両方で検出するための、システム、装置、および方法を提供する。間接的検出システムは、関心のある分析物と、好ましくは特異的に、相互作用する認識部分を含む第一の基板を利用する。第一の基板が分析物を含むことが疑われる試料に曝された後、第一の基板上に表示された認識部分と相互作用する分析物は、第二の基板へ移動される。好ましい態様において、分析物は、非特異的様式で第二の基板と相互作用する。更に好ましい態様において、第二の基板は、液晶中のメソゲンを配向させる検出領域を含む。その後第二の基板は、液晶と接触される。無秩序な液晶は、検出領域中の分析物の存在の指標である。

30

【0073】

国際公開公報第01/61357号は、液晶ベースのアッセイを用いるウイルスの検出を説明している。これらのアッセイは、ホメオトロピック配向でメソゲンを組織化する基板上のパターン化された検出領域を利用する。これらのアッセイは、ウイルスの検出領域への結合が、ホメオトロピック配向を破壊するようにデザインされている。

40

【0074】

驚くべきことに、表面に結合した脂質膜を有するウイルス粒子および他の粒子または生物および細胞は、基板上のあらゆる基礎となるトポグラフィーパターンとは無関係に、メソゲンをホメオトロピックに配向することができることが発見された。従って、アッセイ装置は、ナノ構造の表面の最適化および二次加工の時間がかかったり、費用がかかり中断することなく、開発製造することができる。脂質膜含有する実体が、基板表面へ特異的または非特異的のいずれかで結合した場合には、ホメオトロピック配列が、本アッセイ下で観察されている。本発明のアッセイは、多種多様な試料中の多種多様な脂質膜を伴う実体

50

を検出するために、様々な認識部分を利用することができる。更にこれらのアッセイは、温度の制約とは無関係に機能する。従って本発明のアッセイを用い、液晶のメソゲンにアクセス可能な脂質膜を含む事実上あらゆる実体を検出することができる。

【0075】

本発明の装置、システムおよび方法は、以下に列記した脂質膜を伴う実体に加え、下記分析物を含むが、これらに限定されるものではない様々な分析物を検出するために有用である：ポリペプチド(例えばタンパク質)、毒素、ポリヌクレオチド(例えばRNAおよびDNA)、炭水化物、ウイルス、マイコプラズマ、真菌、細菌および原生動物を含む生体分子、特にクラスA物質、例えば、痘瘡ウイルス(痘瘡)、炭疽菌(炭疽)、ペスト菌(ペスト)、ボツリヌス菌(ボツリヌス中毒)、野ウサギ病菌(野ウサギ病)、アレナウイルス(アレナウイルス科)、エボラ出血ウイルス、マールブルグ出血熱、ラッサ熱ウイルス、ジュニンウイルスとその関連ウイルス(アルゼンチン出血熱ウイルス、ボリビア出血熱ウイルス、ブラジル出血熱ウイルス、ベネズエラ出血熱ウイルス)、デング出血熱ウイルス、および毒素、例えばボツリヌス菌およびトリコテセン(T2)マイコトキシン；クラスB物質、例えばコクシエラ・ブルネッティ(Q熱)、ブルセラ種(ブルセラ症)、鼻疽菌(鼻疽)、サルモネラ種、志賀赤痢菌、大腸菌株0157:H7、クリプトスポリジウム・パルブム、アルファウイルス(トガウイルス科)、例えばベネズエラウマ脳炎ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、ならびに毒素、例えばリシン毒、ウェルシュ菌由来の ϵ (epsilin)毒素、およびブドウ球菌腸管毒素B；ならびに、クラスC物質、例えば多剤耐性結核菌、ニパーウイルス、ハンタウイルス、マダニ媒介出血熱ウイルス、マダニ媒介脳炎ウイルス、および黄熱病ウイルス。

10

20

【0076】

他の分析物は、酸、塩基、有機イオン、無機イオン、医薬品、除草剤、殺虫剤、化学兵器用物質、および有毒ガスを含むが、これらに限定されるものではない。これらの物質は、構造的に無関係の化合物の混合物、立体異性体のラセミ混合物、立体異性体の非ラセミ混合物、ジアステレオマーの混合物、位置異性体の混合物中の成分として、または純粋な化合物として、存在することができる。これらの分析物の検出、ならびにそのような検出に特異的な基板および認識部分は、同時係属出願第10/227,974号、第10/443,419号、および第60/585,275号により詳細に開示されており、これらは全て本明細書に参照として組入れられている。

30

【0077】

従って本発明は、分析物検出のための改善された基板および装置を提供する。便宜上、本発明の説明は、下記の項目に分ける：I.認識部分；II.基板；III.基板の機能化；IV.メソゲン；V.脂質膜を伴う実体の直接検出；VI.特異的捕獲後の非特異的検出；VII.脂質タグの検出；VIII.キット。

【0078】

I.認識部分

様々な認識部分の本発明における使用を認める。好ましい態様において、認識部分は、基板の検出領域上に固定される(以下により詳細に説明する)。本発明のいくつかの態様において、基板に付着または会合した「認識部分」は、別の1個または複数の分子(例えば分析物)と結合またはそうでなければ相互作用するために利用される。例えばいくつかの態様において、認識部分は、 ω -官能基化されたスパーサーアームまたは ω -官能基化されたSAM成分のいずれかに付着され、これは次に基板に付着または会合される。更に認識部分は、ポリマー表面(例えば、ラビングされたポリマー表面)により提示することができる。

40

【0079】

いくつかの好ましい態様において、認識部分は有機官能基を含む。現在好ましい態様において、有機官能基は、アミン、カルボン酸、薬物、キレート剤、クラウンエーテル、シクロデキストリンまたはそれらの組合せからなる群より選択されるメンバーである。別の好ましい態様において、認識部分は生体分子である。より更に好ましい態様において、生体分子は、タンパク質、抗原結合タンパク質、ペプチド、核酸(例えば単独のヌクレオチ

50

ドまたはヌクレオシド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドおよび1本鎖またはより多くの鎖の核酸)またはそれらの組合せである。現在好ましい態様において、認識部分はビオチンである。いくつかの態様において、認識部分は、抗原結合タンパク質である。本発明における使用が認められる抗原結合タンパク質の例は、免疫グロブリン、1本鎖抗体、キメラ抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ならびにF(ab')₂、Fab'およびFab断片を含むが、これらに限定されるものではない。

【0080】

当該技術分野において公知の様々な手法を、ポリクローナル抗体の作成に使用することができる。抗体の作成に関して、ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどを含むが、これらに限定されるものではない様々な宿主動物を、エピトープに対応するペプチドの注射により免疫処置することができる。好ましい態様において、このペプチドは、免疫原担体(例えばジフテリア毒素、ウシ血清アルブミン(BSA)、またはキーホールリムベット(KLH))に複合される。様々なアジュバントを用い、宿主種に応じ免疫応答を増強することができ、これはフロイント(完全および不完全)、ミネラルゲル(例えば水酸化アルミニウム)、表面活性物質(例えばリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、キーホールリムベットヘモシアニン、ジニトロフェノール、および有用な可能性のあるBCG(カルメットゲラン桿菌)およびコリネバクテリウム・パルブムなどのヒトアジュバント)を含むが、これらに限定されるものではない。

【0081】

モノクローナル抗体の調製に関して、連続細胞系培養による抗体分子の作成を提供するあらゆる技術が、本発明での用途を見出すことが企図されている(例えば、Harlow and Lane, *Antibodies : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY参照)。これらは、当初KohlerおよびMilsteinにより開発されたハイブリドーマ技術(Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497(1975))に加え、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(例えばKozbor et al., *Immunol. Tod.*, 4:72(1983)参照)、およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., *Monoclonal Antibody and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96(1985)参照)を含むが、これらに限定されるものではない。

【0082】

加えて、1本鎖抗体の作成のための説明された技術(米国特許第4,946,778号；本明細書に参照として組入れられている)は、認識部分として役立つ特異的1本鎖抗体の作成における使用を見出すことが企図されている。更に抗体断片を作成するのに適した技術は、有用な認識部分である抗体断片の作成における用途を見出すことが企図されている。例えばこのような断片は、以下を含むが、これらに限定されるものではない：抗体分子のペプシン消化により作成することができるF(ab')₂断片；F(ab')₂断片のジスルフィド橋の還元により作成されるFab'断片；および、パパインおよび還元剤による抗体の処理により作成することができるFab断片。より更なる態様において、認識部分は、抗原結合タンパク質をディスプレイするファージを含む。

【0083】

いくつかの態様において、認識部分がポリヌクレオチドまたはポリペプチドである場合、複数の認識部分が、光活性化化学(photo activated chemistry)、マイクロコンタクトプリンティング、およびインクジェット印刷を用い、基板上に配列される。特に好ましい態様においては、フォトリソグラフィーが利用される(例えば、米国特許第6,045,996号；第5,925,525号；および第5,858,659号参照；各々本明細書に参照として組入れられている)。基板露出部位を規定するために、連続フォトリソグラフィーを利用しマスキングし、その後特異的化学合成段階を行うこのプロセスは、アレイ内の予め規定された位置に各プローブを伴うオリゴヌクレオチドの高密度アレイを構築する。マルチプローブアレイが、例えば大型ガラスウエハ上で同時に合成される。次にこれらのウエハは四角に切断され、個々のプローブアレイは、それらを環境から保護し、かつハイブリダイゼーションチャンバーとして役立つ、注入成形されたカートリッジ中に包装される。

10

20

30

40

50

【0084】

別の態様において、核酸認識部分は、適当な基板上に電子的に捕獲される(例えば、米国特許第6,017,696号；第6,068,818号；および、第6,051,380号参照；各々本明細書に参照として組入れられている)。超微小電子技術の使用にもかかわらず、この技術は、半導体マイクロチップ上にデザインされた試験部位へおよびそこからの、帯電した分子の能動的移動および濃縮を可能にする。所定の標的に独自のDNA捕獲プローブは、マイクロチップ上の特定部位へ、電子的に配置されるか、または「アドレス設定」される。DNAは強力な負電荷を有するので、これは正電荷の区域へ電氣的に移動させることができる。

【0085】

より更なる態様において、認識部分は、表面張力の差異を利用することにより、適当な基板上に配列される(例えば、米国特許第6,001,311号；第5,985,551号；および、第5,474,796号を参照；これは各々本明細書に参照として組入れられている)。この技術は、液体は、化学コーティングにより付与された表面張力の差異により、平坦な表面上で隔離することができるという事実を基にしている。一旦そのように隔離された場合、オリゴヌクレオチドプローブは、試薬のインクジェット印刷によりチップ上に直接合成される。表面張力により規定されたその反応部位を伴うアレイは、4種の標準DNA塩基の各々について1個である、4個の圧電ノズルセット下で、X/Y翻訳ステージ上に搭載される。翻訳ステージは、アレイの各列に沿って移動し、かつ適当な試薬が、各反応部位へ送達される。例えばAアミダイトは、アミダイトAが合成段階などの間にカップリングされる部位にのみ送達される。共通の試薬および洗浄液は、全表面の冠水により送達され、その後回転によりそれらが除去される。

【0086】

より更なる態様において、認識部分は、適当な基板上にスポッティングされる。このようなスポッティングは、毛細管またはマイクロピペットにより手作業によるか、またはAfymetrix and Gilsonから入手できるもののような自動スポッティング装置により行うことができる(例えば、米国特許第5,601,980号；第6,242,266号；第6,040,193号；および、第5,700,637号参照；その各々は本明細書に参照として組入れられている)。

【0087】

認識部分がアミンである場合、好ましい態様において、認識部分は、アミンへの結合により反応する分析物上の構造(例えば、カルボニル基、アルキルハロ基)と相互作用するであろう。別の好ましい態様において、アミンは、関心のある分析物上の酸性部分(例えば、カルボン酸、スルホン酸)によりプロトン化される。

【0088】

ある好ましい態様において、認識部分がカルボン酸である場合、この認識部分は、錯体形成により分析物(例えば、金属イオン)と相互作用するであろう。更に他の好ましい態様において、カルボン酸は、分析物上の塩基性基(例えばアミン)をプロトン化するであろう。

【0089】

別の好ましい態様において、認識部分は薬物部分である。薬物部分は、既に臨床使用が承認された物質であるか、またはこれらは、その使用が実験的であるか、もしくはそれらの活性または作用機序が研究中であるような薬物であることができる。薬物部分は、所定の病態における証明された作用を有するか、または所定の病態において望ましい作用を示すと単に仮定することができる。好ましい態様において、薬物部分は、選択された分析物と相互作用するそれらの能力についてスクリーニングされる化合物である。従って本発明の実践において有用である薬物部分は、様々な薬学的活性を有する広範な薬物のクラスからの薬物を含む。

【0090】

有用な物質のクラスは、例えば、非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDS)を含む。MAIDSは、例えば以下の範疇から選択することができる：(例えばプロピオン酸誘導体、酢酸誘導体、フェナム酸誘導体、ビフェニルカルボン酸誘導体およびオキシカム)；ヒドロコルチゾ

ンなどを含む、ステロイド系抗炎症薬；抗ヒスタミン薬(例えばクロルフェニラミン、トリプロリジン)；鎮咳薬(例えばデキストロメトローファン、コデイン、カルミフェン(carmi phen)およびカルピタペンタン)；かゆみ止め(例えばメトジラジンおよびトリメプラジン)；抗コリン作用薬(例えばスコポラミン、アトロピン、ホマトロピン、レボドパ)；抗嘔吐薬および制吐薬(例えばシクリジン、メクリジン、クロロプロマジン、ブクリジン)；食欲抑制薬(例えばベンズフェタミン、フェンテルミン、クロルフェンテルミン、フェンフルラミン)；中枢神経刺激薬(例えばアンフェタミン、メタンフェタミン、デキストロアンフェタミンおよびメチルフェニデート)；抗不整脈薬(例えばプロパノロール、プロカインアミド、ジソピラミド、キニジン、エンカイニド)；P-アドレナリン遮断薬(例えばメトプロロール、アセブトロール、ベタキソロール、ラベタロール、およびチモロール)；強心薬(例えばミルリノン、アムリノンおよびドブタミン)；降圧薬(例えばエナラプリル、クロニジン、ヒドララジン、ミノキシジル、グアナドレル、グアネチジン)；利尿薬(例えばアミロリドおよびヒドロクロロチアジド)；血管拡張薬(例えばジルチアゼム、アミオダロン、イソスブリン(isosuprine)、ナイリドリン、トラゾリンおよびベラパミル)；血管収縮薬(例えばジヒドロエルゴタミン、エルゴタミンおよびメチルセルジド)；潰瘍治療薬(例えばラニチジンおよびシメチジン)；麻酔薬(例えばリドカイン、ブピバカイン、クロロプロカイン、ジブカイン)；抗鬱薬(例えばイミプラミン、アミトリプチリン、ノルトリプチリン)；トランキライザおよび鎮静薬(例えばクロルジアゼポキシド、ベナクチジン、ベンズキナミド、フルラゼパム、ヒドロキシジン、ロクサピンおよびプロマジン)；抗精神病薬(例えばクロルプロチキセン、フルフェナジン、ハロペリドール、モリンドン、チオリダジンおよびトリフルオペラジン)；抗微生物薬(抗菌薬、抗真菌薬、抗原生動物薬および抗ウイルス薬)。

10

20

30

40

50

【0091】

本組成物に混入するのに好ましい抗微生物薬は、例えば、 β -ラクタム薬、キノロン薬、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、テトラサイクリン、エリスロマイシン、アミカシン、トリクロサン、ドキシサイクリン、カプレオマイシン、クロルヘキシジン、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、クリンダマイシン、エタンブトール、イセチオン酸ヘキサミジン、メトロニナゾール、；ペンタミジン、ゲンタマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メタサイクリン、メテナミン、ミノサイクリン、ネオマイシン、ネチルマイシン、パロモマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン、ミコナゾール、およびアマンタジンの薬学的に許容できる塩を含む。

【0092】

別の本発明の実践において使用するための薬物部分は、抗新生物薬(例えば抗男性ホルモン(例えばロイプロリドまたはフルタミド)、細胞殺傷薬(例えばアドリアマイシン、ドキソルビシン、タキソール、シクロホスファミド、ブスルファン、シスプラチン、 α -2-インターフェロン)、抗エストロゲン(例えばタモキシフェン)、代謝拮抗薬(例えばフルオロウラシル、メトトレキセート、メルカプトプリン、チオグアニン)を含む。

【0093】

この認識部分は、ホルモン(例えばメドロキシプロゲステロン、エストラジオール、ロイプロリド、メゲストロール、オクトレオチドまたはソマトスタチン)；筋弛緩薬(例えばシンナメドリン、シクロベンザプリン、フラボキセイト、オルフェナドリン、パパベリン、メベベリン、イダベリン、リトドリン、デフェノシシラート(dephenoxylate)、ダントロレンおよびアズモレン)；抗痙攣薬；骨活性化薬(例えばジホスホネートおよびホスホノアルキルホスフィネート系薬物化合物)；内分泌調節薬(例えば避妊薬(例えばエチノジオール、エチニルエストラジオール、ノルエチンドロン、メストラノール、デソゲストレル、メドロキシプロゲステロン)、糖尿病治療薬(例えばグリブリドまたはクロルプロパミド)、蛋白同化薬、例えばテストラクトンまたはスタノゾロール、アンドロゲン(例えばメチルテストステロン、テストステロンまたはフルオキシメステロン)、抗利尿薬(例えばデスマプレシン)およびカルシトニン)も含むことができる。

【0094】

同じく本発明における使用において、エストロゲン(例えばジエチルスチルベステロール)、糖質コルチコイド(例えばトリアムシノロン、ベタメタゾンなど)および黄体ホルモン薬(progenstogens)、例えばノルエチンドロン、エチノジオール、ノルエチンドロン、レボノルゲストレル；甲状腺作用薬(例えばリオサイロニンまたはレボサイロキシシン)または甲状腺機能低下薬(例えばメチマゾール)；過プロラクチン血症治療薬(例えばカベルゴリン)；ホルモン抑制薬(例えばダナゾールまたはゴセレリン)、分娩促進薬(例えばメチルエルゴノビンまたはオキシトシン)およびプロスタグランジン、例えばミオプロストール(mioprostol)、アルプロスタジルまたはジノプロストンも使用される。

【0095】

他の有用な認識部分は、免疫変調薬(例えば、抗ヒスタミン、マスト細胞安定剤、例えばロドキサミドおよび／またはクロモリン、ステロイド(例えばトリアムシノロン、ベクロメタゾン、コルチゾン、デキサメタゾン、プレドニソロン、メチルプレドニソロン、ベクロメタゾン、またはクロベタゾール)、ヒスタミン H_2 拮抗薬(例えばファモチジン、シメチジン、ラニチジン)、免疫抑制薬(例えばアザチオプリン、シクロスポリン)などを含む。抗炎症活性を伴う群であるスリンダック、エトドラック、ケトプロフェンおよびケトロラックなども、使用される。本発明と組合わせて使用される他の薬物は、当業者には明らかであろう。

10

【0096】

認識部分がキレート剤、クラウンエーテルまたはシクロデキストリンである場合、宿主-ゲスト化学(host-guest chemistry)は、認識部分と分析物の間の相互作用を支配するであろう。宿主-ゲスト化学の使用は、大きい度合いの認識-部分-分析物特異性が本発明の装置へと設計されることを可能にする。特定の化合物へ結合するこれらの化合物の使用は、当業者に周知である。例えば、Pitt et al. 「The Design of Chelating Agents for the Treatment of Iron Overload」、INORGANIC CHEMISTRY IN BIOLOGY AND MEDICINE; Martell, A. E., Ed.; American Chemical Society, ワシントン, 1980, pp.279-312; Lindoy, L. F., THE CHEMISTRY OF MACROCYCLIC LIGAND COMPLEXES; Cambridge University Press, ケンブリッジ, 1989; Dugas, H., BIOORGANIC CHEMISTRY; Springer-Verlag, ニューヨーク, 1989、およびそこに含まれた参考文献を参照のこと。

20

【0097】

加えて、キレート剤、クラウンエーテルまたはシクロデキストリンの他の分子への付着を可能にするマニホールドな経路は、当業者により利用可能である。例えば、Meares et al. 「Properties of In Vivo Chelate-Tagged Proteins and Polypeptides」 MODIFICATION OF PROTEINS: FOOD, NUTRITIONAL, AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS; Feeney, R. E., Whittaker, I. R., Eds., American Chemical Society, ワシントン, 1982, pp.370-387; Kasina et al. Bioconjugate Chem., 9:108-117(1998); Song et al., Bioconjugate Chem., 8:249-255(1997)参照のこと。

30

【0098】

現在好ましい態様において、認識部分は、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)またはジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)などの、ポリアミノカルボン酸型キレート剤である。これらの認識部分は、例えば市販の二価無水物(dianhydride)(Aldrich Chemical Co., ミルウォーキー, WI)を利用することにより、SAMまたはスパーサーアームのアミン末端を持つ成分にのみ付着することができる。

40

【0099】

より更に好ましい態様において、認識部分は、タンパク質、核酸、ペプチドまたは抗体などの、生体分子である。本発明の実践において有用な生体分子は、あらゆる供給源に由来することができる。生体分子は、天然の給源から単離することができるか、または合成法により作成することができる。タンパク質は、天然のタンパク質または変異したタンパク質であることができる。変異は、化学変異誘発、位置指定変異誘発または当業者に公知の変異を誘導する他の手段により実行することができる。本発明の実践に有用なタンパク質は、例えば、酵素、抗原、抗体および受容体を含む。抗体は、ポリクローナルまたはモ

50

ノクロールノのいづれかであることができる。ペプチドおよび核酸は、天然の給源から単離することができるか、または全体もしくは部分的に起源から合成することができる。

【0100】

認識部分がタンパク質または抗体であるようなこれらの態様において、タンパク質は、タンパク質の表面上で利用可能であるいずれかの反応性ペプチド残基により、SAM成分またはスパーサーアームにつながることもできる。好ましい態様において、反応基はアミンまたはカルボキシラートである。特に好ましい態様において、反応基は、リシン残基のε-アミン基である。更にこれらの分子は、基板またはSAMの表面へ、非特異的相互作用(例えば、化学吸着、物理吸着)により吸着することができる。

【0101】

抗体である認識部分は、タンパク質、ペプチド、核酸、糖質または小型分子、例えば薬物、除草剤、殺虫剤、工業用化学物質および兵器用物質などである分析物を認識するために使用することができる。特異的分子に対する抗体を産生する方法は、当業者に周知である。米国特許第5,147,786号；第5,334,528号；第5,686,237号；第5,573,922号を参照し；これらは各々本明細書に参照として組入れられている。抗体を表面に付着する方法も、当該技術分野において公知である(Delamarche et al., Langmuir, 12:1944-1946(1996)参照)。

【0102】

ペプチドおよび核酸は、SAM成分またはスパーサーアームに付着することができる。天然または合成の両方のペプチドおよび核酸は、本発明と組合せて使用される。これらの分子は、SAM成分またはスパーサーアームへ、利用可能な反応基により付着することができる。例えばペプチドは、アミン、カルボキシル、スルフヒドリルまたはヒドロキシル基を介して付着することができる。このような基は、ペプチド末端またはペプチド鎖の内部の位置に存在することができる。核酸は、塩基上の反応基(例えば、環外アミン)または糖部分の利用可能なヒドロキシル基(例えば3'-または5'-ヒドロキシル)を介して付着することができる。ペプチド鎖および核酸鎖は更に、鎖上の適当な反応基の付着を可能にするように、1個または複数の部位で誘導体化され得る(Chrissey et al., Nucleic Acids Res., 24:3031-3039(1996)参照)。

【0103】

ペプチドまたは核酸は、完全なまたは部分的な合成分子である場合、反応基またはマスキングされた反応基は、合成プロセス時に組込むことができる。ペプチドおよび核酸の両方における反応基組込みに適した多くの誘導体化されたモノマーは、当業者に公知である(例えば、THE PEPTIDES: ANALYSIS, SYNTHESIS, BIOLOGY, Vol.2:「Special Methods in Peptide Synthesis」、Gross, E. and Melenhofer, J., Eds., Academic Press、ニューヨーク(1980)参照)。多くの有用なモノマーが市販されている(Bachem、Sigmaなど)。その後このマスキングされた基は、合成後脱マスキングされ始め、この時点で、SAM成分またはスパーサーアームとの反応のために利用可能となり始める。

【0104】

別の好ましい態様において、ペプチドは、基板へ直接付着される(Frey et al., Anal. Chem., 68:3187-3193(1996)参照)。特に好ましい態様において、ペプチドは、金基板へ、システイン残基上のスルフヒドリル基を介して付着される。別の好ましい態様において、ペプチドは、チオールを介して、例えばヨードアセトアミド、クロロアセトアミド、ヨウ化ベンジル、臭化ベンジル、ヨウ化アルキルまたは臭化アルキルなどの末端であるスパーサーアームへ付着される。同様の固定技術は、当業者に公知である(例えば、Zull et al., J. Ind. Microbiol., 13:137-143(1994)参照)。

【0105】

別の好ましい態様において、認識部分は、関心のある分析物と封入複合体を形成する。特に好ましい態様において、認識部分は、シクロデキストリンまたは修飾されたシクロデキストリンである。シクロデキストリンは、多くの微生物により生成された環式オリゴ糖の群である。シクロデキストリンは、バスケット様の形状の環構造を有する。この形は、

10

20

30

40

50

シクロデキストリンが多く種類の分子をその中空部分に含むことを可能にする(例えば、Szejtli, J., CYCLODEXTRINS AND THEIR INCLUSION COMPLEXES; Akademiai Kiado, ブタペスト、1982; および、Bender et al., CYCLODEXTRIN CHEMISTRY, Springer-Verlag, ベルリン、1978参照)。

【0106】

シクロデキストリンは、例えば、薬物、殺虫剤、除草剤および兵器用物質を含む、有機分子のアレイと封入複合体を形成することができる(Tenjarla et al., J. Pharm. Sci., 87:425-429(1998); Zughul et al., Pharm. Dev. Technol. 3:43-53(1998); および、Albers et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 12:311-337(1995)参照)。重要なことに、シクロデキストリンは、それらの封入複合体内の化合物のエナンチオマーを識別することができる。従ってひとつの好ましい態様において、本発明は、エナンチオマーの混合物中の特定のエナンチオマーの検出を提供する(Koppenhoefer et al., J. Chromatogr. A 793:153-164(1998)参照)。

10

【0107】

シクロデキストリン認識部分は、SAM成分ヘスパーサーアームを介してまたは直接基板へ付着することができる(Yamamoto et al., J. Phys. Chem. B 101:6855-6860(1997)参照)。シクロデキストリンを他の分子へ付着する方法は、クロマトグラフィーおよび医薬品の分野の業者には周知である(Sreenivasan, Appl. Polym. Sci., 60:2245-2249(1996)参照)。

【0108】

別の態様において、認識部分は、核酸(例えばRNAまたはDNA)または特定の实体(例えばウイルス)に特異的な受容体であることができる。いくつかの態様において、核酸はアプタマーである。アプタマーの単離は、米国特許第5,475,096号; 第5,270,163号; および、第5,475,096号; ならびに、国際公開公報第97/38134号、第98/33941号および第99/07724号に開示されており、これらは全て本明細書に参照として組入れられている。

20

【0109】

いくつかの態様において、認識部分は、様々な細菌および病原体を検出するために組込まれる。このような認識部分は、HIV(Wies et al., Nature, 333:426 (1988))、インフルエンザ(White et al., Cell, 56:725(1989))、クラミジア(Infect. Imm., 57:2378(1989))、レトロウイルス、ストレプトコッカス・スuis、サルモネラ、センダイウイルス、ムンプス、ニューカッスル、ミクソウイルス、および髄膜炎菌を検出するための、シアル酸; コロナウイルス、脳脊髄炎ウイルス、およびロタウイルスを検出するための、9-OACシアル酸; サイトメガロウイルス(Virology, 176:337(1990))および麻疹ウイルス(Virology, 172:386(1989))を検出するための、非シアル酸糖タンパク質; HIVを検出するための、CD4(Khatzman et al., Nature, 312:763(1985))、血管作動性腸管ペプチド(Sacerdote et al., J. of Neuroscience Research, 18:102(1987))およびペプチドT(Ruff et al., FEBS Letters, 211:17(1987)); ワクシニアを検出するための、上皮細胞増殖因子(Epstein et al., Nature, 318:663(1985)); 狂犬病を検出するための、アセチルコリン受容体(Lentz et al., Science, 215:182(1982)); エプスタイン-バーウイルスを検出するための、Cd3補体受容体(Carel et al., J. Biol. Chem., 265:12293(1990)); レオウイルスを検出するための、 β アドレナリン作動性受容体(Co et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 82:1494(1985)); ライノウイルスを検出するための、ICAM-1(Marlin et al., Nature, 344:70(1990))、N-CAM、およびミエリン関連糖タンパク質MAB(Shephey et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 85:7743(1988)); ポリオウイルスを検出するための、ポリオウイルス受容体(Mendelsohn et al., Cell, 56:855(1989)); ヘルペスウイルスを検出するための、線維芽細胞増殖因子受容体(Kaner et al., Science, 248:1410(1990)); 大腸菌を検出するための、オリゴマンノース; 髄膜炎菌を検出するための、ガングリオシドG_{M1}; ならびに、広範な病原体(例えば、淋菌、ビブリオ・フルニフィカス、腸炎ビブリオ、コレラ菌、ビブリオ・アルギノリチクスなど)を検出するための、抗体を含むが、これらに限定されるものではない。

30

40

50

【0110】

より更なる態様において、認識部分は、結合パートナーと相互作用するリガンドである。リガンドの例は、ステロイド分子のような小型有機分子および小型薬物分子、タンパク質、ポリペプチドおよびペプチド、金属イオン、ならびに核酸を含むが、これらに限定されるものではない。いくつかの態様において、リガンドは、試料中の結合分子により認識される。結合分子の例は、ステロイド、ホルモン、タンパク質、ポリペプチド、および免疫グロブリン分子およびそれらの断片のようなペプチド、核酸、ならびに他の有機または非有機分子を含むが、これらに限定されるものではない。いくつかの好ましい態様において、リガンドは、試験対象の体液中の結合分子により認識される。例えばリガンドは、ウイルスエンベロープタンパク質または病原生物(先に列記されたものなど)由来の他の抗原性分子の一部であることができる。好ましい態様において、抗原性分子(例えばタンパク質)は、病原生物に曝された試験対象の体液中の抗体分子により認識される。特に好ましい態様において、リガンドは、西ナイルウイルスのエンベロープ由来のEタンパクである。

10

【0111】

いくつかの好ましい態様において、リガンドまたは認識部分は、脂質と複合される。本発明は、脂肪酸、リン脂質、脂肪酸および／またはリン脂質を含むモノ-、ジ-およびトリ-グリセリド、脂質二層、ならびにリポソームを含むが、これらに限定されるものではない、様々な脂質および脂質含有材料と、認識部分の複合体を企図している。脂質含有材料は、多層に加え、編組、ラメラ、らせん状、管状、および繊維様形状、ならびにそれらの組合せとして提供され得る。関心のある認識部分またはリガンドの脂質および脂質含有材料への付着に関しては、標準の付着化学が利用可能である。これらの付着化学は、リポソームに関して以下により詳細に説明されている。

20

【0112】

いくつかの好ましい態様において、本発明は、リポソームを利用する。様々な方法が、リポソームの作成に有用である。このような方法は、多くの論文に詳細に説明されており、かつとりわけNew(New, Liposomes: A Practical Approach, IRL Press、オックスフォード、(1989))、およびRosoff(Rosoff, Vesicles, Marcel Dekker, Inc., ニューヨーク、(1996))などの論文により検証されている。リポソームおよび他の脂質含有材料を形成する方法も米国特許第6,183,772号、第6,306,598号、第6,180,784号、第6,740,643号および第6,706,922号に開示されており、これらは全て本明細書に参照として組入れられている。いくつかの好ましい態様において、リポソームは、プローブ音波法を用いて調製される。多様な範囲の化合物(例えば、炭水化物、タンパク質、核酸、および他の化学基)により脂質を誘導体化する方法は、当該技術分野において周知である。脂質末端のカルボン酸は、容易に修飾され、エステル、リン酸エステル、アミノ基、アンモニウム、ヒドラジン、ポリエチレンオキシド、アミド、および多くの他の化合物を形成する。これらの化学基は、炭水化物、タンパク質、核酸、および他の化学基への連結基を提供する(例えば、カルボン酸は、タンパク質へ、活性化エステルを形成することにより、直接連結し、その後タンパク質上の遊離アミン基と反応し、アミド連結を形成する)。ラングミュアーフィルムへ付着した抗体の例は、当該技術分野において公知である(例えば、Tronin et al., Langmuir, 11:385(1995); および、Vikhohn et al., Langmuir, 12:3276(1996)参照)。材料を膜へ結合するか、または材料を膜内に組込む、多くの他の手段が存在し、これは特に、例えば、タンパク質または核酸のポリマー膜へのカップリング(例えば、Bamford et al. Adv. Mat., 6:550(1994)参照); タンパク質の自己組織化された有機単分子層へのカップリング(例えば、Willner et al., Adv. Mat., 5:912(1993)参照)、およびタンパク質の膜への組込み(例えば、Downer et al., Biosensor and Bioelect., 7:429(1992)参照)などを含む。リガンド(例えば、タンパク質、核酸、および炭水化物)は、誘導体化された脂質へ都合良く付着することができる。

30

40

【0113】

いくつかの態様において、リガンドまたは認識部分は、脂質モノマーの頭部基へ共有的

50

に連結される。別の態様において、リガンドまたは認識部分は、脂質含有材料の表面に共有的に連結される(例えば、タンパク質および抗体が複数のアミンおよびチオール連結により材料表面へ)。更に別の態様において、リガンドまたは認識部分は、生体高分子材料へ非共有的に組込まれる(例えば、ガングリオシドは、フィルムおよびリポソームの膜へ組込まれる。)。

【0114】

II. 基板

本発明の実践において有用な基板は、実質的にいずれか物理化学的に安定した材料で製造することができる。好ましい態様において、基板材料は、メソゲン層の構成成分に対し非反応性である。基板は、剛性または柔軟性のいずれかであることができ、かつ光学的に透明または光学的に不透明であることができる。これらの基板は、電氣的に絶縁体、導体または半導体であることができる。更に基板は、液体、蒸気および／または気体に対し実質的に非透過性であるか、あるいは基板は、これらの種類の1種または複数の物質に対し透過性であることができる。基板材料の例は、無機結晶、無機ガラス、無機酸化物、金属、有機ポリマー、およびそれらの組合せを含むが、これらに限定されるものではない。いくつかの態様において、基板は、試料および／または他の試薬を、基板表面またはその上の検出領域へ送達するためのマイクロチャネルをその中に有する。マイクロチャネルのデザインおよび使用は、例えば、米国特許第6425972号、第6418968号、第6447727号、第6432720号、第5976336号、第5882465号、第5876675号、第6186660号、第6100541号、第6379974号、第6267858号、第6251343号、第6238538号、第6182733号、第6068752号、第6429025号、第6413782号、第6274089号、第6150180号、第6046056号、第6358387号、第6321791号、第6326083号、第6171067号、および第6167910号に開示され、これらは全て本明細書に参照として組入れられている。

【0115】

A. 無機結晶およびガラス

本発明のいくつかの態様において、無機結晶および無機ガラスが、基板材料として利用される(例えば、LiF、NaF、NaCl、KBr、KI、CaF₂、MgF₂、HgF₂、BN、AsS₃、ZnS、Si₃N₄など)。結晶およびガラスは、当該技術分野の標準技法により調製することができる(例えば、Goodman, C. H. L., Crystal Growth Theory and Techniques, Plenum Press, ニューヨーク、1974参照)。あるいは、これらの結晶は、商業的に購入することができる(例えば、Fischer Scientific)。結晶は、基板の単独成分であるか、または1種または複数の追加基板成分で被覆することができる。従って、例えば1種または複数の金属フィルムまたは1種の金属フィルムおよび有機ポリマーで被覆された結晶を利用することは、本発明の範囲内である。加えて結晶は、様々な材料、または同じ材料の異なる物理的形(例えばガラス)で製造された基板の別の部分と接触する基板の一部を構成することができる。無機結晶および／またはガラスを利用する他の有用な基板の構成は、当業者には明らかであろう。

【0116】

B. 無機酸化物

本発明の別の態様において、無機酸化物が基板として利用される。本発明において使用する無機酸化物は、例えば、Cs₂O、Mg(OH)₂、TiO₂、ZrO₂、CeO₂、Y₂O₃、Cr₂O₃、Fe₂O₃、NiO、ZnO、Al₂O₃、SiO₂(ガラス)、石英、In₂O₃、SnO₂、PbO₂などを含む。無機酸化物は、フィルム、支持材入り粉末(supported powders)、ガラス、結晶などの様々な物理的形で利用することができる。基板は、単独の無機酸化物または1種よりも多い無機酸化物の複合体からなることができる。例えば、無機酸化物の複合体は、層状構造を有する(すなわち、第一の酸化物上に沈着した第二の酸化物)か、または2種もしくはそれよりも多い酸化物を連続して非層状構造で配置することができる。加えて1種または複数の酸化物を、様々なサイズの粒子として混合し、かつガラスまたは金属シートのような支持体上に沈着することができる。更に1種または複数の無機酸化物の層は、ふたつの別の基板層の間に挟むことができる(例えば、金属-酸化物-金属、金属-酸化物-結晶)。

【0117】

現在好ましい態様において基板は、液体および気体に対し非透過性である剛構造である。この態様において基板は、その上に金のような金属が蒸着により重層されているガラスプレートである。より更に好ましい態様において基板は、その上にチタンのような第一の金属層が重層されているガラスプレート(SiO_2)である。その後金のような第二の金属層が、第一の金属層の表面に重層される。

【0118】

C. 金属

本発明のより更なる態様において、金属が基板として利用される。金属は、結晶、シートまたは粉末として使用することができる。金属は、蒸着、スパッタリング、無電解沈着、電着、および金属ナノ粒子を含有する金属のプレフォーム粒子の吸着または沈着を含むが、これらに限定されるものではない当業者に公知のいずれかの方法により、裏当て上に沈着することができる。

【0119】

メソゲン層に対し化学的に不活性である金属は、本発明の基板として有用であろう。メソゲン層と反応性または相互作用する金属も、本発明において有用であろう。現在基板として好ましい金属は、金、銀、白金、パラジウム、ニッケルおよび銅を含むが、これらに限定されるものではない。ひとつの態様において、1種よりも多い金属が使用される。1種よりも多い金属は、合金として存在するか、またはこれらは層状「サンドイッチ」構造を形成するか、またはこれらは互いに側方に隣接することができる。好ましい態様において、基板に使用される金属は金である。特に好ましい態様において、使用される金属は、チタン上に重層された金である。

【0120】

この金属層は、液体、溶液、蒸気および気体などの物質に対し、透過性または非透過性のいずれかであることができる。

【0121】

D. 有機ポリマー

更に別の本発明の態様において、有機ポリマーが基板材料として利用される。本発明の基板として有用な有機ポリマーは、気体、液体および溶液中の分子に対し透過性であるポリマーを含む。他の有用なポリマーは、1種または複数のこれらの同種化合物に非透過性であるものである。

【0122】

有用な基板を形成する有機ポリマーは、例えば、ポリアルケン(例えばポリエチレン、ポリイソブテン、ポリブタジエン)、ポリアクリル系(例えば、ポリアクリレート、ポリメチルメタクリレート、ポリシアノアクリレート)、ポリビニル(例えば、ポリビニルアルコール、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルブチラール、ポリ塩化ビニル)、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリウレタン、ポリアミド、ポリイミド、ポリスルホン、ポリシロキサン、ポリヘテロ環、セルロース誘導体(例えば、メチルセルロース、酢酸セルロース、ニトロセルロース)、ポリシラン、含フッ素ポリマー、エポキシ、ポリエーテルおよびフェノール樹脂(Cognard, J. ALIGNMENT OF NEMATIC LIQUID CRYSTALS AND THEIR MIXTURES, Mol. Cryst. Liq. Cryst., 1:1-74(1982)参照)を含む。現在好ましい有機ポリマーは、ポリジメチルシロキサン、ポリエチレン、ポリアクリロニトリル、セルロース系物質、ポリカーボネートおよびポリビニルピリジニウムである。

【0123】

現在好ましい態様において、基板は透過性であり、かつこれは金の層、またはチタン上の金の層からなり、これは、液体、蒸気および／または気体に対し透過性であるポリマー系膜または他の材料上に沈着されている。これらの液体および気体は、純粋な化合物(例えば、クロロホルム、一酸化炭素)であるか、または他の分子中に分散された化合物(例えば、水性タンパク質溶液、空気中の除草剤、小型有機分子のアルコール性溶液)であることができる。有用な透過膜は、柔軟なセルロース系物質(例えば、再生セルロース透析膜)、剛性セルロース系物質(例えば、セルロースエステル透析膜)、剛性ポリフッ化ビニリド

ン膜、ポリジメチルシロキサンおよびトラック蝕刻したポリカーボネート膜を含むが、これらに限定されるものではない。

【0124】

更に好ましい態様において、透過膜上の金の層それ自身が透過性である。より更に好ましい態様において、透過性金層は、厚さ約70Åまたはそれ未満を有する。

【0125】

基板の透過性が問題なくかつ金属フィルム層が使用されるようなこれらの態様において、フィルムは、具体的用途に必要な厚さであることができる。例えばフィルムが電極として使用される場合、このフィルムは、フィルムが光に対して透明または半透明であるために必要であるような態様における厚さよりも厚くてよい。

10

【0126】

従って好ましい態様において、フィルムは厚さ約0.01nm～約1μmである。更に好ましい態様において、フィルムは厚さ約5nm～約100nmである。より更に好ましい態様において、フィルムは厚さ約10nm～約50nmである。

【0127】

E. フォーマット

本発明の基板は、様々なフォーマットで提供される。例えば基板は、平面もしくは曲面で存在するか、またはビーズであることができる。ビーズフォーマットは、以下に説明する間接的検出法に特に有用である。本発明のビーズ基板は、先に説明した基板材料のいずれかを含むことができる。いくつかの好ましい態様において、ビーズは、アガロースビーズ、アクリル系ビーズ、またはラテックスビーズなどの、市販のビーズである。いくつかの態様において、ビーズは磁気性である。更に別の態様において、ビーズは、銀または金などの金属で被覆される。更に別の態様において、カラムクロマトグラフィー媒体のような基板を、分析物を捕獲するために使用してもよい。このような基板の例は、免疫親和性カラム(すなわち、抗原結合タンパク質により機能化された媒体を含むカラム)、プロテインA親和性カラム、S-SEPHAROSE、SP-SEPHAROSE、およびカルボキシメチルセルロースなどのカチオン交換カラム、DEAEセルロース、QAE SEPHADEX、およびFAST Q SEPHAROSEなどのアニオン交換カラム、ULTRAGELカラムのようなサイジングカラム、ホスホセルロースカラム、ヘパリン硫酸カラムなどである。カラムの溶離後、分析物は以下に詳細に説明されたように検出される。

20

30

【0128】

III. 基板の機能化

いくつかの態様において、基板の表面は、認識部分が基板の表面上に固定されるように機能化されている。いくつかの態様において、固定された認識部分は、検出領域を形成する。いくつかの態様において、複数の検出領域が、基板の表面に形成される。いくつかの態様において、同じ認識部分が、複数の検出領域の2個またはそれ以上に提供されるのに対し、別の態様においては、少なくとも2個の異なる認識部分が、複数の検出領域の1個または複数の上に固定される。いくつかの態様において、認識部分は、以下により詳細に説明される方法により、基板表面上の不連続の検出領域にアレイ形成されている。

40

【0129】

A. 自己組織化された単分子層

いくつかの態様において、基板の表面は、基板表面上に自己組織化された単分子層(SAM)を形成することにより、最初に機能化される。自己組織化された単分子層は一般に、組織化され、密集された(closely packed)線状分子の集成体として示される。固形基板上に単分子層を沈着するための、2種の広く使用される方法が存在する: Langmuir-Blodgettトランスファーおよび自己組織化。追加の方法は、単分子層前駆体の蒸気の基板表面への沈着、ならびに溶液からのポリマーおよび高分子電解質の層毎の沈着のような技術を含む(L adam et al., Protein Adsorption onto Auto-Assembled Polyelectrolyte Films, Langmuir, 2001;17(3):878-882)。

【0130】

50

本発明に有用なSAM層の組成は、化合物の構造および分子比の広範な範囲にわたり変動することができる。ひとつの態様において、SAMはただ1種の化合物から形成される。現在好ましい態様において、SAMは2種またはそれよりも多い成分から形成される。別の好ましい態様において、2種またはそれよりも多い成分が使用される場合、ひとつの成分は、鎖の長さが10~25個の炭素である長鎖炭化水素であり、第二の成分は、鎖の長さが1~9個の炭素原子である短鎖炭化水素である。特に好ましい態様において、SAMは、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{SH}$ および $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{SH}$ または $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{SH}$ および $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{SH}$ から形成される。前述の態様のいずれかにおいて、炭素鎖は、 ω -末端で(例えば、 NH_2 、 COOH 、 OH 、 CN)、鎖の内部位置で(例えば、アザ、オキサ、チア)、または鎖の ω -末端および内部位置の両方で機能化される。

10

【0131】

認識部分は、SAM表面へ、多くの当該技術分野において公知の付着方法のいずれかにより、付着することができる。ひとつの好ましい態様において、反応性SAM成分が基板に付着され、その後認識部分が、その成分上の反応基および認識部分上の相補的反応性の基を介して、SAM成分へ付着される(例えば、Hegner et al., Biophys. J., 70:2052-2066(1996)参照)。別の好ましい態様において、認識部分は、SAM成分に付着され、その後SAM成分が基板表面に固定され：次にこの認識部分-SAM成分カセットが基板に付着される。より更に好ましい態様において、認識部分は基板に、交換反応により付着される。この態様において、SAMはプレフォームされ、その後SAM成分の画分が、認識部分によりまたはウイルス認識部分を持つSAM成分の画分により交換される。更に別の態様において、ポリペプチド認識部分は、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{SH}$ のような疎水性単分子層に直接吸着される。認識部分が抗体またはプロテインAに結合する他の分子であるような態様において、プロテインAは、最初に単分子層へ、その後抗体へ付着され、抗体はプロテインAにより結合される。

20

【0132】

B.機能化されたSAM

下記の考察は、反応性SAM成分の基板表面への付着に焦点を当てている。この焦点は単に便宜上であり、当業者は、本考察が、SAM成分-認識部分が基板へのその付着の前にプレフォームされる態様に、同等に適用可能であることを理解するであろう。本明細書において使用される用語「反応性SAM成分」とは、認識部分または他の種との反応、その後の成分の基板への付着に利用可能な官能基を有する成分を意味する。

30

【0133】

現在好ましい種類の反応性SAM成分と共に利用可能な反応は、比較的穏やかな条件下で進行する反応である。これらは、求核置換(例えば、アミンおよびアルコールのハロゲン化アシルとの反応)、求電子置換(例えば、エナミン反応)、ならびに炭素-炭素および炭素-ヘテロ原子多重結合への付加(例えば、マイケル反応、ディールス-アルダー付加)を含むが、これらに限定されるものではない。これらの反応および他の有用な反応は、Marchの著書(ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY, Third Ed., John Wiley & Sons, ニューヨーク、1985)に説明されている。

【0134】

本発明に従い基板の表面は、基板表面の複数の利用可能な反応性官能基による誘導体化のような方式で、反応性SAM成分の基板表面への共有結合により、SAM、成分および他の種により機能化されている。本発明の実践において使用することができる反応基は、例えば、アミン、ヒドロキシル基、カルボン酸、カルボン酸誘導体、アルケン、スルフヒドリル、シロキサンなどを含む。

40

【0135】

多種多様な反応型が、基板表面の機能化に利用可能である。例えば、ポリプロピレンのようなプラスチックで構築された基板は、クロム酸酸化し、それに続けてヒドロキシル化されたもしくはアミノメチル化された表面に転換することにより、表面を誘導体化することができる。高度に架橋したジビニルベンゼンにより製造された基板は、クロロメチル化、およびそれに続く官能基の操作により、表面を誘導体化することができる。加えて機能

50

化された基板は、蝕刻され還元されたポリテトラフルオロエチレンにより製造することができる。

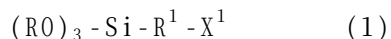
【0136】

基板が、ガラスのようなケイ素系(siliceous)材料で構築される場合、その表面は、表面のSi-OH、SiO-H、および／またはSi-Si基を、官能基化試薬と反応することにより、誘導体化することができる。基板が金属フィルムで製造される場合、その表面は、その金属に結合力を示す材料により誘導体化することができる。

【0137】

基板はガラスから製造される好ましい態様において、反応基のガラス表面への共有結合は、基板の表面上の基の下記のようなケイ素改質試薬による転換により実現される：

10



ここで、Rは、アルキル基、例えばメチルまたはエチルであり、 R^1 は、ケイ素とXの間の連結基であり、Xは、反応基または保護された反応基である。反応基は、以下に考察したように認識部分であることもできる。示されたアルコキシ基に加え、ハロゲンまたは他の脱離基を有するシラン誘導体も、本発明において有用である。

【0138】

例えば下記のような、多くのシロキサン官能基化試薬を用いることができる：

1. ヒドロキシアルキルシロキサン(シリル化された表面、ジボランによる官能基化、および H_2O_2 のアルコールへの酸化)
 - a. アリルトリクロロシラン 3-ヒドロキシプロピル
 - b. 7-oct-1-エニルトリクロロシラン 8-ヒドロキシオクチル
2. ジオール(ジヒドロキシアルキル)シロキサン(シリル化された表面およびジオールへの加水分解)
 - a. (グリシジルトリメトキシシラン (2,3-ジヒドロキシプロピルオキシ)プロピル
3. アミノアルキルシロキサン(中間体の官能基化段階が不要なアミン)
 - a. 3-アミノプロピルトリメトキシシラン アミノプロピル
4. 二量体第2級アミノアルキルシロキサン
 - a. ビス(3-トリメトキシシリルプロピル)アミン ビス(シリルオキシルプロピル)アミン

20

【0139】

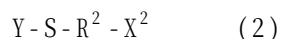
シロキサン以外のSAM成分が使用される場合に、同様の有用な機能化の化学のアレイが利用可能であることは、当業者には明らかであろう。従って例えば同様に官能基化されたアルキルチオールは、金属フィルムへ付着することができ、引き続き反応し、先に例示されたもののような官能基を生成する。

30

【0140】

別の好ましい態様において、基板は、少なくとも部分的に金フィルムのような金属フィルムであり、および反応基は、その表面へ結合力を表示する物質により、金属表面につながれる。現在好ましい態様において、基板は、少なくとも部分的に金フィルム、ならびに下記のような、チオール、スルフィドまたはジスルフィドを含む、金属表面と反応する基である：

40



R^2 はイオウと X^2 の間の連結基であり、および X^2 は反応基または保護された反応基である。 X^2 は、以下に説明されるような認識部分であることもできる。Yは、H、 R^3 および R^3-S -からなる群より選択される一員であり、ここで R^2 および R^3 は、独立して選択される。 R^2 および R^3 が同じである場合、対称のスルフィドおよびジスルフィドが生じ、かつこれらが異なる場合は、非対称のスルフィドおよびジスルフィドが生じる。

【0141】

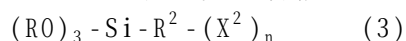
多くの官能基化されたチオール、スルフィドおよびジスルフィドが、市販されている(Aldrich Chemical Co., セントルイス)。加えて当業者は、追加のこのような分子を生成するマニホールドな合成経路で、それらを利用可能にする。例えばアミン官能基化されたチ

50

オールは、対応するハロ-アミン、ハロ-カルボン酸などから、これらのハロゲン前駆体のナトリウムスルフヒドリドとの反応により生成することができる。例えばReid, ORGANIC CHEMISTRY OF BIVALENT SULFUR, vol.1, pp.21-29, 32-35, vol.5, pp.27-34, Chemical Publishing Co., ニューヨーク 1958, 1963を参照のこと。加えて、官能基化されたスルフィドは、メルカプタン塩による、アルキルチオ脱ハロゲン化により調製することができる(Reid, ORGANIC CHEMISTRY OF BIVALENT SULFUR, vol.2, pp.16-21, 24-29, vol.3, pp.11-14, Chemical Publishing Co., ニューヨーク, 1960参照のこと)。本発明の実践に有用な化合物を作成する他の方法は、当業者には明らかであろう。

【0142】

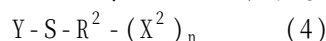
別の好ましい態様において、官能基化試薬は、各試薬分子につき1個よりも多い反応基を提供する。下記化合物3のような試薬を使用し、基板表面上の各反応部位を、本質的に2個またはそれよりも多い官能基に「増幅」する：



ここでRはメチルのようなアルキル基であり、R²はケイ素とX²の間の連結基であり、X²は反応基または保護された反応基であり、ならびにnは、2～50の間の、より好ましくは2～20の整数である。

【0143】

同様に増幅する分子も、基板が、少なくとも部分的に金属フィルムであるような態様において使用される。これらの態様において、金属表面と反応する基は、下記式(4)のような、チオール、スルフィドまたはジスルフィドを含む：



【0144】

前述のように、R²は、イオウとX²の間の連結基であり、X²は、反応基または保護された反応基である。X²は、認識部分でもある。Yは、H、R³およびR³-S-からなる群より選択される一員であり、ここでR²およびR³は、独立して選択される。

【0145】

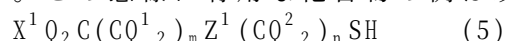
先に説明した本発明の態様においてR¹、R²およびR³に使用するR基は、アルキル、置換されたアルキル、アリール、アリールアルキル、置換されたアリール、置換されたアリールアルキル、アシル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、アルコキシ、アシルオキシ、アリールオキシ、アリールオキシアルキル、メルカプト、飽和環式炭化水素、不飽和環式炭化水素、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、置換されたヘテロアリール、置換されたヘテロアリールアルキル、ヘテロ環式、置換されたヘテロ環式およびヘテロ環式アルキル基を含むが、これらに限定されるものではない。

【0146】

先の各式1-4において、R¹、R²およびR³の各々は、安定しているか、または化学反応もしくは光化学反応により切断することができる。例えばエステルまたはジスルフィド結合を含むR基は、各々、加水分解および還元により切断することができる。例えばニトロベンジル誘導体、フェナシル基、ベンゾインエステルなどの光により切断されるR基の使用も、本発明の範囲内である。他のこのような切断可能な基は、当業者に周知である。

【0147】

別の好ましい態様において、有機イオウ化合物は、部分的にまたは全体的にハロゲン化される。この態様に有用な化合物の例は以下である：



ここでX¹は、H、ハロゲン反応基および保護された反応基からなる群より選択される一員である。反応基は、以下に考察するように認識部分であることもできる。Q、Q¹およびQ²は、独立してHおよびハロゲンからなる群より選択される一員である。Z¹は、-CQ₂-、-CQ¹₂-、-CQ²₂-、-O-、-S-、NR⁴-、-C(O)NR⁴およびR⁴NC(OO-からなる群より選択される一員であり、ここでR⁴は、H、アルキル、置換されたアルキル、アリール、置換されたアリール、ヘテロアリールおよびヘテロ環式基からなる群より選択される一員であり、ならびにmおよびnは独立して0～40の間の数である。

10

20

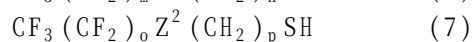
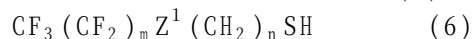
30

40

50

【0148】

更に別の好ましい態様において、有機層は、先の式5の化合物を含み、ここで Q 、 Q^1 および Q^2 は、独立してHおよびフッ素からなる群より選択される一員である。より更に好ましい態様において、有機層は、式(6)および(7)の構造を有する化合物を含む：



ここで、 Z^1 および Z^2 は、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 NR^4 、 $-C(O)NR^4$ および $R^4NC(O)-$ からなる群より独立して選択される一員であり、ここで R^4 は、H、アルキル、置換されたアルキル、アリール、置換されたアリール、ヘテロアリールおよびヘテロ環式基からなる群より選択される一員である。現在好ましい態様において、隣接分子のZ基は、引力(例えば水素結合)または反発(例えばファンデルワールス力)のいずれかの相互作用に参加する。

10

【0149】

式7において、 m は0～40の数であり、 n は0～40の数であり、 o は0～40の数であり、および p は0～40の数である。

【0150】

更に好ましい態様において、式6および7の化合物は、認識部分を持つ、ハロゲン化されたまたはされない、いずれかの有機イオウ化合物と共に使用される。

【0151】

有機層がハロゲン化された有機イオウ化合物から形成される場合、有機層は、単独のハロゲン化された化合物または1種よりも多い異なる構造を持つハロゲン化された化合物を含むことができる。加えてこれらの層は、ハロゲン化されない有機イオウ化合物を含むことができる。

20

【0152】

反応性官能基(X^1 および X^2)は、例えば以下である：

(a)カルボキシル基およびそれらの様々な誘導体、これはN-ヒドロキシスクシンイミドエステル、N-ヒドロキシベンズトリアゾールエステル、酸ハロゲン化物、アシルイミダゾール、チオエステル、p-ニトロフェニルエステル、アルキル、アルケニル、アルキニルおよび芳香族エステルを含むが、これらに限定されるものではない；

(b)エステル、エーテル、アルデヒドなどに転換することができる、ヒドロキシル基

(c)ハロゲン化物が、例えば、アミン、カルボキシラートアニオン、チオールアニオン、カルボアニオン、またはアルコキシドイオンなどの求核基と後で交換することができ、これによりハロゲン原子の位置の新たな基の共有的付着を生じる、ハロアルキル基；

30

(d)例えばマレイミド基のような、ディールス-アルダー反応に参加することが可能である、ジエノフィル基；

(e)その後の誘導体化が、例えば、イミン、ヒドラゾン、セミカルバゾンまたはオキシムなどのカルボニル誘導体の形成により、またはグリニャール付加もしくはアルキルリチウム付加のような機構により可能である、アルデヒド基またはケトン基；

(f)例えばスルホンアミドを形成するための、アミンとの引き続きの反応のための、ハロゲン化スルホニル基；

(g)ジスルフィドに転換またはハロゲン化アシルと反応することができる、チオール基；

40

(h)例えばアシル化またはアルキル化することができる、アミン基またはスルフヒドリル基；

(i)例えば、付加環化、アシル化、マイケル付加などを受けることができる、アルケン；ならびに

(j)例えば、アミンおよびヒドロキシル化合物と反応することができる、エポキシド。

【0153】

これらの反応性部分は認識部分であることもできる。これらの基の性質は、以下により詳細に説明する。

【0154】

50

これらの反応性官能基は、機能化されたSAM成分の基板の表面への付着を制御する反応に参加しない、またはこれを妨害しないように選択することができる。あるいは、反応性官能基は、保護基の存在により、この反応に参加しないように保護することができる。当業者は、特定の官能基を、選択された反応条件のセットの干渉からいかにして保護するかを理解するであろう。有用な保護基の例については、Greene et al., PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, John Wiley & Sons, ニューヨーク, 1991を参照のこと。

【0155】

好ましい態様において、認識部分を持つSAM成分は、基板の表面への「安定した結合」により、直接かつ本質的に不可逆的に付着される。本明細書において使用される用語「安定した結合」は、広範な条件にわたりその化学的完全性を維持する結合である(例えば、アミド、カルバメート、炭素-炭素、エーテルなど)。別の好ましい態様において、認識部分を持つSAM成分は、基板表面へ「切断可能な結合」により付着される。本明細書において使用される「切断可能な結合」とは、認識部分-分析物複合体中の他の結合は崩壊しない条件下で切断を受けるようにデザインされた結合である。切断可能な結合は、ジスルフィド結合、イミン結合、カーボネート結合およびエステル結合を含むが、これらに限定されるものではない。

10

【0156】

ある態様において、バルクSAMの構成成分のものとは異なる構造を有するSAM成分に付着された認識部分を有することは、利点となる。この態様において、認識部分が結合される基は、「スペーサーアーム」または「スペーサー」と称される。このようなスペーサーアームを使用し、認識部分に隣接するSAMの特性を制御することができる。通常制御される特性は、例えば疎水性、親水性、表面活性ならびに基板および/またはSAM平面からの認識部分の距離を含む。例えばアルカンチオールで構成されたSAMにおいて、認識部分は、基板またはSAMの表面へ、アミン末端ポリ(エチレングリコール)を介して付着することができる。スペーサーアームおよびSAMの多くの他の組合せに、当業者はアクセス可能である。

20

【0157】

基板表面の親水性は、アミン-、ヒドロキシル-およびポリヒドロキシル含有分子などの極性分子との反応により、増強することができる。代表例は、ポリリシン、ポリエチレンジアミン、ポリ(エチレングリコール)およびポリ(プロピレングリコール)を含むが、これらに限定されるものではない。これらの化合物の適当な機能化の化学および戦略は、当該技術分野において公知である(例えば、Dunn, R. L., et al., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol.469, American Chemical Society, ワシントン, 1991参照)。

30

【0158】

基板表面の疎水性は、例えば、長鎖ジアミン、長鎖チオール、アルファ、 ω -アミノ酸などの、疎水性スペーサーアームを用い調整することができる。代表的疎水性スペーサーは、1,6-ヘキサンジアミン、1,8-オクタンジアミン、6-アミノヘキサン酸および8-アミノオクタン酸を含むが、これらに限定されるものではない。

【0159】

基板表面は、界面活性剤特性を有するスペーサーを、基板表面に付着することにより、表面活性があるように作成することもできる。この目的に有用な化合物は、例えば、アミン化またはヒドロキシル化された洗剤分子、例えば1-アミノドデカン酸を含む。

40

【0160】

別の態様において、スペーサーは、ウイルス認識部分を基板またはSAMから距離をおくために役立つ。この特徴を持つスペーサーは、いくつかの用途を有する。例えば、基板またはSAM表面に非常に密に保持される認識部分は、入ってくる(incoming)分析物とは反応しないか、または受入れ難い程緩徐に反応することがある。分析物はそれ自身立体的に苛酷である場合、ふたつの成分の接近を妨げるモノリシック基板のために、認識部分-分析物複合体形成につながる反応は、望ましくないほど遅いか、または全く発生しない。

50

【0161】

別の態様において、基板表面および／またはSAMの物理化学特性(例えば、疎水性、親水性、表面活性、立体配置)は、バルクSAMの構成成分よりも組成が異なり、および認識部分を持たないような一価の部分に付着することにより変更される。本明細書において使用される用語「一価の部分」は、ただ1個の反応性官能基を有する有機分子を意味する。この官能基は、分子を基板へ付着する。「一価の部分」は、先に説明された二価の「スパーサー」基と対比される。このような一価の基を使用し、基板表面の親水性、疎水性、結合特性などが修飾される。この目的に有用な基の例は、長鎖アルコール、アミン、脂肪酸、脂肪酸誘導体、ポリ(エチレングリコール)モノメチルエーテルなどである。

【0162】

2種またはそれよりも多い構造的に異なる部分をSAMの成分として使用する場合、これらの成分は、SAM成分の混合物として基板に接触することができるか、またはこれらの成分は、個別に添加することができる。SAM成分が混合物として添加される態様において、溶液中のこれらの成分の混合のモル比は、混合SAM中と同じ比を生じる。SAMが組織化される方法により、これらふたつの成分は、島に相分離(segregate)することはない(Bain and Whitesides, J Am. Chem. Soc., 111:7164(1989))。SAMのこの特徴を用い、これらの分子間の、立体障害のようなある種の相互作用を最小化する方式で、認識部分またはかさ高い修飾基を固定することができる。

【0163】

SAMの個々の成分は、逐次方式で基板に結合することもできる。従ってひとつの態様において、第一のSAM成分は、第一の成分の化学量論的等量よりも少ない表面官能基を「標識下(underlabeling)」とすることにより、基板の表面へ付着される。この第一の成分は、末端の反応基または認識基、スパーサーアームまたは一価部分に連結されたSAM成分であることができる。引き続き第二の成分が基板と接触される。この第二の成分は、化学量論的に等量、化学量論的に過剰のいずれかで添加されるか、または再度第三の成分のための部位を開放するために標識下とするよう使用され得る。

【0164】

C. ポリイミド

いくつかの態様において、基板は、ポリイミド層で被覆される。ポリイミド被覆された基板は、場合によっては、その表面は液晶をホメオトロピック配向する一方で、別の場合は表面はラビングされ、液晶の配向のための異方性表面を提供することができるので、特に有用であることが企図されている。好ましい態様において、シリコンウエハのような基板は、ポリイミドで被覆される。好ましい態様において、基板は、ポリイミドでスピコーティングされる。液晶の平面配列のためのNissan 7210、Nissan 3510、Nissan 410、Nissan 3140、Nissan 5291、およびJapan Synthetic Rubber JALS 146-R19、ならびに液晶のホメオトロピック配向のためのNissan 7511LおよびSE 1211を含むが、これらに限定されるものではない様々なポリイミドが、本発明での使用が認められる。驚くべきことに、ラビングされたポリイミド表面の液晶を配向させる能力は、認識部分がラビングされた表面上に表示される場合に維持され、その後分析物が認識部分へ結合する場合に、マスキングされることがわかった。従って分析物が結合された区域は、秩序のない液晶を有し、交差分極により目視した場合に白色または明るく見え、ならびに分析物が結合されなかった区域は、秩序を保ち続け、交差分極により目視した場合に暗く見える。驚くべきことに、液晶をホメオトロピック配向するポリイミド表面を用い、表面への非特異的結合を報告することができることもわかった。これらの態様において、分析物が結合した区域は無秩序な液晶を有し、交差分極により目視した場合に白色または明るく見え、ならびに分析物が結合されなかった区域は、ホメオトロピック配向を維持し、暗く見える。これらの様々なポリイミドは、タンパク質間の結合事象を探索および報告するために使用することができる様々なタンパク質に対し、異なる係留特性および異なる結合親和性を提供する。同様に異なる液晶は、特異的結合事象に対する異なる反応を示す。従って、異なる光学特性および誘電特性を伴う様々な液晶系の材料、例えば5CB、BL093、TL216、ZLI5800、MLC6613、

10

20

30

40

50

および(p-メトキシベンジリデン)-p-ブチルアニリン(MBBA)を使用することによりアッセイを調節することが可能である。

【0165】

D.直接吸着

いくつかの態様において、認識部分は、直接吸着により基板上に固定されている。例えば抗体は、金基板表面上にスピンコーティングされたポリウレタンの薄フィルム上に固定することができる。

【0166】

E.アレイ

ウイルス認識部分がポリヌクレオチドまたはポリペプチドであるようないくつかの態様において、複数のウイルス認識部分が、光活性化化学、マイクロコンタクトプリンティング、およびインクジェット印刷を用い、基板上にアレイ形成されている。特に好ましい態様において、フォトリソグラフィーが利用される(例えば、米国特許第6,045,996号；第5,925,525号；および第5,858,659号参照；各々本明細書に参照として組入れられている)。基板露出部位を規定するために連続フォトリソグラフィーを用いマスキングし、その後特異的化学合成段階が続くこのプロセスは、アレイ内の予め決められた位置に各プローブを伴う、オリゴヌクレオチドの高密度アレイを構成する。マルチプローブアレイが、例えば大型ガラスウェハ上で同時に合成される。その後ウェハは四角に切断され、個々のプローブアレイが、それらを環境から保護し、かつハイブリダイゼーションチャンバーとして役立つような、注入成形されたプラスチック製カートリッジ中に包装される。

【0167】

別の態様において、核酸ウイルス認識部分は、適当な基板上に電子的に捕獲される(例えば、米国特許第6,017,696号；第6,068,818号；および、第6,051,380号参照；各々本明細書に参照として組入れられている)。超微小電子技術の使用により、この技術は、その半導体マイクロチップ上にデザインされた試験部位へのおよび部位からの帯電した分子の能動的移動および濃縮を可能にする。所定の標的に独自のDNA捕獲プローブは、マイクロチップ上の特定部位に電子的に配置されるか、または「アドレス設定される」。DNAは強力な負電荷を有するので、正帯電の区域に電子的に移動することができる。

【0168】

より更なる態様において、ウイルス認識部分は、表面張力の差異を用い、適当な基板上に配列される(例えば、米国特許第6,001,311号；第5,985,551号；および、第5,474,796号参照；各々は本明細書に参照として組入れられている)。この技術は、液体は、化学コーティングに付与された表面張力の差により平坦な表面上で分離することができるという事実を基にしている。一旦そのように分離されたならば、オリゴヌクレオチドプローブが、試薬のインクジェット印刷により、チップ上に直接合成される。表面張力により規定されたその反応部位を伴うアレイは、4種の標準DNA塩基の各々について1個である、4個の圧電ノズルのセット下のX/Y翻訳ステージ上に搭載される。翻訳ステージは、アレイの各列に沿って移動し、適当な試薬が、各反応部位に送達される。例えばAアミダイトは、アミダイトAが合成段階などの間に最大にカップリングされるべき部位へのみ、送達される。共通の試薬および洗浄液は、全表面の冠水により送達され、その後回転によりそれらが除去される。

【0169】

より更なる態様において、ウイルス認識部分は、適当な基板上にスポットティングされる。このようなスポットティングは、キャピラリーチューブもしくはマイクロピペットにより手作業で行うか、またはAffymetrixおよびGilsonから入手可能であるような自動スポットティング装置により行うことができる(例えば、米国特許第5,601,980号；第6,242,266号；第6,040,193号；および、第5,700,637号参照；各々本明細書に参照として組入れられている)。

【0170】

E.ブロックング

いくつかの態様において、認識部分の基板表面への固定後、基板の残余は、基板表面への非特異的結合に対して保護するために、ブロックされる。適当なブロック剤の例は、血清アルブミン、双性イオン性ポリマー、吸着された脂質層、デキストランおよび他の糖類、架橋した脂質、ポリエチレンオキシド、ポリオキサゾリン、ヒドロゲルおよびミルクを含むが、これらに限定されるものではない。好ましい態様において、ブロック剤は、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミンまたはウマ血清アルブミンである。

【0171】

IV. メソゲン

メソゲン層を形成するいずれかの化合物または化合物の混合物は、本発明と組合せて使用することができる。メソゲンは、サーモトロピック液晶またはライオトロピック液晶を形成することができる。サーモトロピックおよびライオトロピックの両液晶は、ネマチック、キラルネマチック、スメクチック、極性スメクチック、キラルスメクチック、フラストレート相およびディスコチック相を含む、多くの形で存在することができる。

【0172】

(表1) 液晶アッセイ装置における使用に適したメソゲンの分子構造

メソゲン	構造	
アニサルダジン (Anisaldazine)	$\text{CH}_3\text{-O-}\langle\bigcirc\rangle\text{-CH=N-N=CH-}\langle\bigcirc\rangle\text{-O-CH}_3$	
NCB	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{-}\langle\bigcirc\rangle\text{-}\langle\bigcirc\rangle\text{-CN}$	20
CBOOA	$\text{C}_9\text{H}_{19}\text{-O-}\langle\bigcirc\rangle\text{-N=CH-}\langle\bigcirc\rangle\text{-CN}$	
Comp A	$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{-}\langle\bigcirc\rangle\text{-COO-}\langle\bigcirc\rangle\text{-NCS}$	
Comp B	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{-O-}\langle\bigcirc\rangle\text{-O-CO-}\langle\bigcirc\rangle\text{-O-CH}_2\text{-}\langle\bigcirc\rangle\text{-CN}$	
DB ₇ NO ₂	$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{-}\langle\bigcirc\rangle\text{-O-CO-}\langle\bigcirc\rangle\text{-O-CO-}\langle\bigcirc\rangle\text{-NO}_2$	
DOBAMBC	$\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{-O-}\langle\bigcirc\rangle\text{-CH=N-}\langle\bigcirc\rangle\text{-CH=CH-COO-CH}_2\text{-CH}\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{matrix}$	
<i>nOm</i> <i>n</i> =1, <i>m</i> =4: MBBA <i>n</i> =2, <i>m</i> =4: EBBA	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{-O-}\langle\bigcirc\rangle\text{-CH=N-}\langle\bigcirc\rangle\text{-C}_m\text{H}_{2m+1}$	30
<i>n</i> OBA <i>n</i> =8: Ooba <i>n</i> =9: NOBA	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{-O-}\langle\bigcirc\rangle\text{-COOH}$	
<i>nm</i> OBC	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{-O-CO-}\langle\bigcirc\rangle\text{-}\langle\bigcirc\rangle\text{-O-C}_m\text{H}_{2m+1}$	
<i>n</i> OCB	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{-O-}\langle\bigcirc\rangle\text{-}\langle\bigcirc\rangle\text{-CN}$	
<i>n</i> OSI	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{-O-}\langle\bigcirc\rangle\text{-}\langle\bigcirc\rangle\text{-COO-}\langle\bigcirc\rangle\text{-CH}_2\text{-CH}\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{matrix}$	40
98P	$\text{C}_3\text{H}_7\text{-[CH}_2\text{(CH}_3\text{)]}_5\text{-O-}\langle\bigcirc\rangle\text{-}\langle\bigcirc\rangle\text{-C}_8\text{H}_{17}$	
PAA	$\text{CH}_3\text{-O-}\langle\bigcirc\rangle\text{-N=N-}\langle\bigcirc\rangle\text{-O-CH}_3$	
PYP906	$\text{C}_9\text{H}_{19}\text{-}\langle\bigcirc\rangle\text{-}\langle\bigcirc\rangle\text{-O-C}_6\text{H}_{13}$	
<i>nSm</i>	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{-O-}\langle\bigcirc\rangle\text{-CO-S-}\langle\bigcirc\rangle\text{-C}_m\text{H}_{2m+1}$	

【0173】

現在好ましいメソゲンを表1に示した。特に好ましい態様において、メソゲンは、4-シ

10

20

30

40

50

アノ-4'-ペンチルビフェニル、N-(4-メトキシベンジリデン)-4-ブチルアニリンおよびそれらの組合せからなる群より選択される一員である。

【0174】

メソゲン層は、実質的に純粋な化合物であるか、またはメソゲンの特性を増強もしくは変更する他の化合物を含むことができる。従ってひとつの好ましい態様において、メソゲン層は更に、第二の化合物、例えばネマチック相および等方相が存在する温度範囲を広げるアルカンを含む。この組成物のメソゲン層を含む装置の使用は、より大きい温度範囲にわたる分析物認識部分の相互作用の検出を可能にする。

【0175】

いくつかの好ましい態様において、メソゲン層は更に、二色性色素またはまたは蛍光化合物を更に含む。本発明において有用な二色性色素および蛍光化合物の例は、アゾベンゼン、BTBP、ポリアゾ化合物、アントラキノン、ペリレン色素などを含むが、これらに限定されるものではない。特に好ましい態様において、アッセイを読みとるために偏光を必要としないよう、液晶の配向依存性を補う蛍光化合物の二色性色素が選択される。いくつかの好ましい態様において、液晶の吸光度が可視光範囲であるならば、配向の変化は、交差分極を伴わず、周囲光を用い観察することができる。別の好ましい態様において、二色性色素または蛍光化合物を、蛍光光度計と組合せて使用し、かつ蛍光の変化を用い、液晶の配向の変化を検出する。

【0176】

V. 脂質膜を伴う実体の直接検出

本発明は、病原体であるウイルスおよび細菌を含む、生体膜を有する実体を直接検出する方法および装置を提供する。本発明のシステムおよび装置は、メソゲン層の、有機層または無機層(例えば金属、金属塩または金属酸化物)との接触を可能にする構造のいずれかであることができる。サイズおよび形状に関する唯一の制限は、装置が使用される状況または意図された目的から生じる制限である。この装置は、平面または非平面であることができる。従って本発明を実施するための、いくつかの偏光子、レンズ、フィルター光などの使用は、本発明の範囲内である。

【0177】

本発明のシステムおよび装置は、様々な種類のウイルスおよび脂質膜を有する実体の検出における使用が認められる。脂質膜を有するそのような実体の例は、ウイルス、細菌、リボソーム、細胞、マイコプラズマ、原生動物、真菌などを含むが、これらに限定されるものではない。

【0178】

本発明は、いずれか特定の型のウイルスの検出に限定されない。実際本発明は、様々なウイルスの検出が企図されており、これは下記の科：アデノウイルス科、アレナウイルス科、アストロウイルス科、ビルナウイルス科、ブニヤウイルス科、カリシウイルス科、サーコウイルス科、コロナウイルス科、フィロウイルス科、フラビウイルス科、ヘパドナウイルス科、ヘルペスウイルス科、イリドウイルス科、フィロウイルス科、オルソミクソウイルス科、パポバウイルス科、パラミクソウイルス科、パルボウイルス科、ピコルナウイルス科、ポックスウイルス科、レオウイルス科、レトロウイルス科、ラブドウイルス科、トガウイルス科、バドナウイルス、プロモウイルス科、コモウイルス科、ジェミニウイルス科、パルティティウイルス科、ポチウイルス科、セキウイルス科、およびトンプスウイルス科；下記の属：マストアデノウイルス、アピアデノウイルス、アフリカブタ発熱性ウイルス、アレナウイルス、アルテリウイルス、アストロウイルス、アクアビルナウイルス、アピビルナウイルス、ブニヤウイルス、ハンタウイルス、ナイロウイルス、フレボウイルス、カリシウイルス、サーコウイルス、コロナウイルス、トロウイルス、デルタウイルス、フィロウイルス、フラビウイルス、日本脳炎ウイルス群、ペスチウイルス、C型肝炎ウイルス、オルソヘパドナウイルス、アピヘパトーマウイルス、単純ヘルペスウイルス、バリセロウイルス、サイトメガロウイルス、ムロメガロウイルス、ロゼオラウイルス、リンホクリプトウイルス、ラディノウイルス、ラナウイルス、リンホシスティスウイルス

、金魚ウイルス様ウイルス、インフルエンザウイルスA型、B型、インフルエンザウイルスC型、トゴト様ウイルス、ポリオーマウイルス、パピローマウイルス、パラミクソウイルス、モルビリウイルス、風疹ウイルス、肺炎ウイルス、パルボウイルス、エリスロウイルス、ディペンドウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、ヘパトウイルス、カルジオウイルス、アフトウイルス、オルソポックスウイルス、パラポックスウイルス、アビポックスウイルス、カプリポックスウイルス、レポリポックスウイルス、スイポックスウイルス、モルシポックスウイルス、ヤタポックスウイルス、オルソレオウイルス、オルビウイルス、ロタウイルス、コルチウイルス、アクアレオウイルス、哺乳類B型レトロウイルス、哺乳類C型レトロウイルス、トリC型レトロウイルス、D型レトロウイルス、blv-htlvレトロウイルス、レンチウイルス、スプマウイルス、ベシクロウイルス、リッサウイルス、エフェメロウイルス、アルファウイルス、ルビウイルス、バドナウイルス、アルファモウイルス、イラルウイルス、プロモウイルス、ククモウイルス、トスポウイルス、カピロウイルス、カルラウイルス、カリモウイルス、クロステロウイルス、コモウイルス、ファバウイルス、ネボウイルス、ダイアンソウイルス、エナモウイルス、フロウイルス、亜群Iジェミニウイルス、亜群IIジェミニウイルス、亜群IIIジェミニウイルス、ホルデイウイルス、イダエオウイルス、ルテオウイルス、マクロモウイルス、マラフィウイルス、ネクロウイルス、パルティティウイルス科、アルファクリプトウイルス、ベータクリプトウイルス、ポテックスウイルス、ポティウイルス、ライモウイルス、バイモウイルス、フジウイルス、フィトレオウイルス、オリザウイルス、ヌクレオラブドウイルス、セキウイルス、ワイカウイルス、ソベモウイルス、テヌイウイルス、トバモウイルス、トブラウイルス、カルモウイルス、トンブスウイルス、トリコウイルス、チモウイルス、ウンブラウイルス、

；ならびに、下記の種：ヒトアデノウイルス2、家禽アデノウイルス1、アフリカブタ発熱性ウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、ウマ動脈炎ウイルス、ヒトアストロウイルス1、伝染性脾臓壊死ウイルス、伝染性滑液囊症ウイルス、ブニヤムウェラウイルス、ハンターウイルス、ナイロビヒツジ疾患ウイルス、シシリア型サシチョウバエ熱病ウイルス、ブタ水疱性発疹ウイルス、ニワトリ貧血ウイルス、トリ伝染性気管支炎ウイルス、バーンウイルス、デルタ肝炎ウイルス、マールブルグウイルス、黄熱病ウイルス、西ナイルウイルス、ウシ下痢症ウイルス、C型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、アヒルB型肝炎ウイルス、ヒトヘルペスウイルス1、ヒトヘルペスウイルス3、ヒトヘルペスウイルス5、ヒトサイトメガロウイルス、マウスサイトメガロウイルス1、ヒトヘルペスウイルス6、ヒトヘルペスウイルス4、クモザルヘルペスウイルス2、カエルウイルス3、ヒラメウイルス、金魚ウイルス1、インフルエンザA型ウイルス、インフルエンザB型ウイルス、インフルエンザC型ウイルス、トゴトウイルス、マウスポリオーマウイルス、ワタオウサギパピロマウイルス(ショーブ)、パラミクソウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス1、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ヒトRSウイルス、マウス微小ウイルス、B19ウイルス、アデノ随伴ウイルス2、ポリオウイルス1、ヒトライノウイルス1A、ブトライノウイルス、A型肝炎ウイルス、脳心筋炎ウイルス、セントルイス脳心筋炎ウイルス、口蹄疫ウイルス0、ワクシニアウイルス、オルフウイルス、家禽ポックスウイルス、ヒツジポックスウイルス、サルポックスウイルス、ミクソーマウイルス、ブタポックスウイルス、伝染性軟ゆうウイルス、ヤバサル腫瘍ウイルス、レオウイルス3、青舌病ウイルス1、シミアンロタウイルスSA11、コロラドダニ熱ウイルス、金魚転覆病(golden shiner)ウイルス、マウス乳癌ウイルス、マウス白血病ウイルス、トリ白血病ウイルス、メーソン-ファイザーサルウイルス、ウシ白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス1、ヒトスプマウイルス、水疱性口内炎インディアナウイルス、狂犬病ウイルス、ウシ一日熱ウイルス、シンドビスウイルス、風疹ウイルス、ツユクサ黄斑ウイルス、アルファルファモザイクウイルス、タバコ条斑病ウイルス、ブロムモザイクウイルス、キュウリモザイクウイルス、トマト黄化壊疽ウイルス、リングステムグルーピングウイルス、カーネーション潜在ウイルス、カリフラワーモザイクウイルス、ビート黄化ウイルス、カウピーモザイクウイルス、ソラマメウィルトウイルス1、タバコ輪斑ウイルス、カーネーション輪斑ウイルス、マメエネーションモザイクウイルス、土壌コムギモザイクウイルス、トウモロコシ条斑病ウイルス、ビートカーリー

トップウイルス、ゴールデンビーモンモザイクウイルス、オオムギ斑葉病モザイクウイルス、ラズベリー矮小萎縮ウイルス、オオムギイエロー萎縮ウイルス、メイズクロロディックリーフスポットウイルス、メイズラヤドフィノウイルス(MRFV)、タバコ壊死ウイルス、シロツメグサ潜在ウイルス1、シロツメグサ潜在ウイルス2、ジャガイモウイルスX、ジャガイモウイルスY、ライグラスモザイクウイルス、オオムギ黄化モザイクウイルス、フィジー病ウイルス、傷腫瘍ウイルス(WTV)、イネラッキドスタントウイルス(RRSV)、ジャガイモ黄化萎縮ウイルス、タバコ壊死サテライトウイルス、アメリカボウフウ黄化斑点ウイルス、イネツングロ球状ウイルス、サザンビーモンモザイクウイルス、イネ縞葉枯ウイルス、タバコモザイクウイルス、タバコ茎壊疽ウイルス、カーネーション斑紋ウイルス、トマト矮性萎縮ウイルス、リンゴ高接病ウイルス、カブ黄化モザイクウイルス、ニンジン斑紋ウイルスのウイルスを含む。

10

【0179】

本発明は、いずれか特定の型の細菌の検出に限定されるものではない。実際、下記を含むが、これらに限定されるものではない様々な細菌の検出が企図されている：グラム陽性球菌、例えば黄色ブドウ球菌、化膿性連鎖球菌(A群)、連鎖球菌種(ヴィリダンス型)、ストレプトコッカス・アガラクチエ(B群)、S.ボービス、連鎖球菌(嫌気性菌)、肺炎連鎖球菌、およびエンテロコッカス種など；グラム陰性球菌、例えば淋菌、髄膜炎菌、およびカタール球菌など；グラム陽性桿菌、例えば炭疽菌、枯草菌、ジフテリア菌および類ジフテリア菌であるコリネバクテリウム種(好気性および嫌気性)、リステリア菌、破傷風菌、クロストリジウム・ディフィシル、大腸菌、エンテロバクター種、プロテウス・ミラビリスおよび他の種、緑膿菌、肺炎桿菌、カンピロバクター・イエユニ、レジオネラ・ニューモフィラ、結核菌、破傷風菌、インフルエンザ菌、淋菌、梅毒トレポネーマ、炭疽菌、コレラ菌、ライム病菌、ジフテリア菌、黄色ブドウ球菌、炭疽菌、ならびに下記の属の他のメンバー：ビブリオ、サルモネラ、シゲラ、シュードモナス、アクチノマイセス、アエロモナス、バシラス、バクテロイデス、ボルデテラ、ブルセラ、カンピロバクター、カプノシトファガ、クラミジア、クロストリジウム、コリネバクテリウム、エイケネラ、エリジペロトリックス、エシェリキア、フゾバクテリウム、ヘモフィルス、クレブシエラ、レジオネラ、レプトスピラ、リステリア、ミコバクテリア、マイコプラズマ、ナイセリア、ノカルジア、パスツレラ、プロテウス、シュードモナス、リケッチア、サルモネラ、セレノモナス、シゲラ、スタフィロコッカス、ストレプトコッカス、トレポネーマ、ビブリオおよびエルシニア。細菌性感染症は、菌血症、肺炎、髄膜炎、骨髄炎、心内膜炎、静脈洞炎、関節炎、尿路感染症、破傷風、壊疽、大腸炎、急性胃腸炎、気管支炎、および様々な膿瘍、院内感染症、および日和見感染症などの疾患を生じる。

20

30

【0180】

本発明は、いずれか特定の真菌の検出に限定されるものではない。真菌の例は、下記を含むが、これらに限定されるものではない：皮膚糸状菌(例えばイヌ小胞子菌および他の小胞子菌種；ならびに、白癬菌、例えば紅色白癬菌、および毛瘡白癬菌)、酵母菌(例えばカンジダアルビカンス、カンジダトロピカリス、または他のカンジダ種)、サッカロミセス・セレビシアエ、トルロプシス・グラブラタ、鼠径表皮菌、デン風菌(ピチロスポロン・オルビクラーレ、またはP.オーバーレ)、クリプトコッカス・ネオフォルマンس、アスペルギルス・フミガーツス、アスペルギルス・ニジュランス、および他のアスペルギルス種、接合菌(例えばクモノスカビ、ケカビ)、パラコクシディオイデス・ブラジリエンス、プラストマイセス・デルマチチデス、ヒストプラズマ・カプスラーツム、コクシジオイデス・イミチス、およびスポロトリクス・シエンキー。真菌感染症(真菌症)は、皮膚、皮下、または全身性であり得る。表在性真菌症は、頭部白癬、体部白癬、足部白癬、爪真菌症、爪周囲真菌症、でん風、鷲口瘡、ならびに膣、気道、胆管、食道および尿道カンジダ症などの他のカンジダ症。全身性真菌症は、全身性および粘膜皮膚のカンジダ症、クリプトコッカス症、アスペルギルス症、ムコール症(フィコミコーシス)、パラコクシジオミコーシス、北米ブラストミセス症、ヒストプラズマ症、コクシジオイデス真菌症、およびスポロトリクス症を含む。真菌感染症は、髄膜炎および肺または気道疾患にも寄与し得る。真菌

40

50

日和見感染症は、特にAIDS患者のような、免疫無防備状態の患者において、増殖される。好ましい生物は、大腸菌、肺炎連鎖球菌、黄色ブドウ球菌、サッカロミセス・セレビシアエ、アスペルギルス・フミガーツス、およびアスペルギルス・ニジュランスを含む。追加の微生物病原体、疾患、および現在の治療薬については、Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics(第8版、1990)表44-1、1024-1033頁参照のこと。前述の細胞は、一般に例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)から入手可能である。

【0181】

本発明は、いずれか特定の型の細胞の検出に限定されるものではない。このような細胞の例は、下記を含むが、これらに限定されるものではない：チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-K1, ATCC CCL-61)；ウシ乳腺上皮細胞(ATCC CRL 10274；ウシ乳腺上皮細胞)；SV40で形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651)；ヒト胚性腎細胞株(293細胞または浮遊培養における増殖のためにサブクロニングされた293細胞；例えばGraham et al., J. Gen Virol., 36:59(1977)参照)；ベビーハムスター腎細胞(BHK, ATCC CCL 10)；マウスセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251(1980))；サル腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；アフリカミドリザル腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；ヒト頸部癌細胞(HELA, ATCC CCL 2)；イヌ腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34)；バッファローラット肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75)；ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065)；マウス乳腺腫瘍(MMT 060562, ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci., 383:44-68(1982))；MRC5細胞；FS4細胞；ラット線維芽細胞(208F細胞)；MDBK細胞(ウシ腎細胞)；ヒト肝癌株(Hep G2)、ならびに例えば下記の癌性細胞または下記の癌腫から単離された細胞：線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、軟骨腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、ユーイング腫瘍、リンパ管内皮腫、滑膜腫、中皮腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛上皮癌、セミノーマ、胚性癌腫、ウィルムス腫瘍、頸部癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮細胞癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、稀突起膠腫、髄膜腫、メラノーマ、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫；白血病、急性リンパ性白血病および急性骨髄性白血病(骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病)；慢性白血病(慢性骨髄性(顆粒球性)白血病および慢性リンパ性白血病)；および、真性赤血球増加、リンパ腫(ホジキン病および非ホジキン病)、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、および重鎖疾患。

【0182】

従っていくつかの態様において、本発明は、ウイルスまたは脂質膜を有する生物学的実体と結合またはそうでなければ相互作用する、認識部分を含む少なくとも1個の検出領域を含む基板を提供する。好ましい態様において、検出領域は、不連続であり、かつ基板の表面上の少なくとも1個の認識部分をアレイ形成することにより作成される。前述のように、本発明者らは、基板表面上のウイルス認識部分に結合したウイルス粒子は、検出領域において、他のホメオトロピックディレクター(例えば、ホメオトロピック配向を引き起こす表面トポグラフィー)の存在とは無関係に、液晶中のメソゲンのホメオトロピック配向を提供するという、驚くべき発見をした。同じく本発明者らは、驚くべきことに、脂質膜を伴う実体(例えば細胞)も、他のホメオトロピックディレクターの存在とは無関係に、メソゲンのホメオトロピック配向を提供することも発見した。従っていくつかの好ましい態様において、検出領域は、検出領域に結合またはそうでなければ相互作用するウイルスまたは脂質膜を伴う実体の非存在下で、液晶内のメソゲンをホメオトロピック配向する構造を含まない。好ましい態様において、認識部分は、先に詳述されたように基板上に固定される。いくつかの態様において、様々なウイルスおよび／または脂質膜を有する実体に関し複数のアッセイを、同時に行うことができるように、複数の認識部分が、基板の表面上にアレイ形成される。別の態様において、基板の表面上に固定された対照種を含むか、

または検出される実体の既知量を含む対照試料と接触する部位を提供する対照領域が、基板上に含まれる。

【0183】

本発明は、装置におけるメソゲンの配向の変化を検出するいずれか特定の方法に限定されるものではない。従って、メソゲン層の変化の検出を補助するために、光、顕微鏡、分光計、電気的技術などを使用することは、本発明の範囲内である。スペクトルの可視領域の光を利用するこれらの態様において、目視検査を提供するためにメソゲン層の詳細を単純に照射するために、光を使用することができる。あるいは、光は、メソゲン層を通過することができ、透過、吸収または反射された光の量が測定される。この装置は、米国特許第5,739,879号に開示されたような、バックライト照明装置を利用することができる。紫外および赤外領域の光も、本発明において使用することができる。顕微鏡技術は、単純な光学顕微鏡、共焦点顕微鏡、偏光顕微鏡、原子間力顕微鏡(Hu et al., Langmuir, 13:5114-5119(1997))、走査型トンネル顕微鏡(Evoy et al., J. Vac. Sci. Technol A, 15:1438-1441, Part 2(1997))などを利用することができる。本発明の実践において使用される分光技術は、例えば、赤外分光法(Zhao et al., Langmuir, 13:2359-2362(1997))、ラマン分光法(Zhu et al., Chem. Phys. Lett., 265:334-340(1997))、X-線光電子分光法(Jiang et al., Bioelectroch. Bioener., 42:15-23(1997))などである。可視および紫外分光法も、本発明において使用することができる。他の有用な技術は、例えば、表面プラスモン共鳴(Evans et al., J. Phys. Chem. B, 101:2143-2148(1997))、楕円偏光法(Harke et al., Thin Solid Films, 285:412-416(1996))、電気的方法(例えば、インピーダンス測定(impedometric)法(Rickert et al., Biosens. Bioelectron., 11:757-768(1996))などである。

【0184】

いくつかの態様において、本発明の装置は更に、電極または一連の電極を含む。いくつかの好ましい態様において、少なくとも2個の電極が、装置基板のひとつの表面上、平面内に提供される。交差指状、双曲、三角型および長方形型電極を含むが、これらに限定されるものではない様々な電極を利用することができる。一部の特に好ましい態様において、装置は、交差指状電極を含む。図3aおよび3bは、本発明の装置および好ましい電極の概略図を提供する。図3aは、認識部分(この態様においては抗体)で被覆されたナノ構造の表面上に支持された液晶分子を示す。結合した分析物が存在しない場合、メソゲンは平面配向を呈した。表面上に分析物(この態様においてウイルス粒子)が結合すると、これらの分子は、表面に対し垂直に配列し、ふたつの電極間にキャパシタンスの変化を誘導する。図3bは、交差指状電極の概略を示す。この態様において、矢印のサイズは500 μm の桁である。図7は、二元電気泳動のために構成された基板の概略図を示している。電極は、当該技術分野において公知の方法(例えば、フォトリソグラフィ、印刷など)により、基板の表面に形成される。電極は、電源(例えば交流電源)と位相反転器をインターフェース接続している回路を含む。いくつかの態様において、マスク(例えばPDMSで形成された)を用い、二元電気泳動時に基板の試料を含むようにする。

【0185】

好ましい態様において、電極は、ウイルスまたは他の粒子を、アッセイ装置の表面へ、好ましくは認識部分を含む表面へ移動するために利用される。電極は、装置の誘電キャパシタンスの変化を測定するためにも利用される(以下および実施例において詳細に説明される)。

【0186】

迅速な表面ベースの検出システムの認識に取り組む挑戦は、アッセイ表面による液体試料中に存在するウイルスの効果的捕獲である。ほとんどの方法は、表面へのウイルスの拡散、および液体運動を増加するためのいずれかの機械的方法によるかまたは温度の上昇による、このプロセスの増強に頼っている。これらは、ウイルス中和、プラーク減少中和アッセイまたはELISAのように、適度に大きい容量の試料中に十分数のウイルス粒子が存在する場合、および試料の表面との接触が適度に長い期間(数時間)生じる場合に、満足でき

る方法である。

【0187】

いくつかの好ましい態様において、本発明の方法は、生物学的試料からウイルス粒子を直接機能化されたアッセイ表面上に捕獲および濃縮するために、二元電気泳動(DEP)を利用する。DEPは、不均一な時間依存型の電界による、分極可能な粒子の輸送である。本発明は、いずれかの作用機序に限定されるものではない。実際作用機序の理解は、本発明の実践には不要である。DEP力は、誘導された双極子と不均一な場の相互作用により発生し、その場の強度および大きさは、分析物(例えばウイルス)の誘電特性およびその中に分析物が疑わしい媒体のイオン強度に関連している。

【0188】

生物学的粒子に対するDEPの作用に関する初期の研究は、ふたつのウイルス、単純ヘルペスウイルス(HSV)とタバコモザイクウイルス(TMV)の二元電気泳動の挙動が、電界の周波数およびウイルスの誘電特性によって決まることを示した。溶液中の周波数6MHz、電解質導電率 10mSm^{-1} で、TMVは、正のDEP(最高電界領域への移動)を経験した。対照的に、同じ条件下で、HSVは、負のDEP(最低の電界領域への移動)を経験した。1999年にMorganらの論文(Separation of submicron bioparticles by dielectrophoresis, Biophysical Journal, 77:516-525(1999))は、二元電気泳動を用い、ウイルスの異種混合物を分離することができることを明らかにした。彼らは、微細加工されたポリノミアル電極を用い、TMVおよびHSVの混合物を分離することに成功した。研究は、ウイルスの誘電特性は、エンベロープへの力学的損傷または表面タンパク質の酵素による剥ぎ取りなどの、ウイルス粒子の物理的または生化学的組立て(makeup)の変化により影響を受けることも示した(Hughes et al., Measuring the dielectric properties of herpes simplex virus type 1 virions with dielectrophoresis, Biochimica et Biophysica Acta, 1571:1-8(2002))。カルボシアニン色素および求核ヘキスト色素(Akin et al., Real-time virus trapping and fluorescent imaging in microfluidic devices, Nano Letters, 4:257-259(2003))で標識したワクシニアウイルスを用い、微小流動用バイオチップ内の二元電気泳動フィルターによるウイルス粒子の捕獲およびトラップのリアルタイム画像形成が明らかにされている。食品媒介病原体の迅速診断の開発に向けた段階において、Suehiroらは(Selective detection of specific bacteria using dielectrophoretic impedance measurement method combined with an antigen-antibody reaction, Journal of Electrostatics, 58:229-246(2003))は、DEPインピーダンスの測定を、抗体凝集と組合せ、懸濁液中の細菌を検出した。

【0189】

DEPから生じる力を用い、ウイルスを容量の少ない試料から、迅速に濃縮、操作、および分離さえすることができる。しかし先に説明した実験は、非常にイオン強度が低い媒体中に懸濁された非常に高濃度の精製されたウイルス(最高 10^{12} pfu/mL)のモデルシステムを用いて行われた。ウイルス診断への実際の適用のためには、DEPは、生理的イオン強度(60mSm^{-1} またはそれ以上)の条件下で利用されなければならない、かつ有効でなければならない。

【0190】

本発明の方法は、1pNの桁のウイルスに対する二元電気泳動の力を企図している。この力は、ウイルスに作用する場合、 $\sim 100\mu\text{ms}^{-1}$ の速度を生じる。従って好ましい態様において、粒子が $100\mu\text{m}$ の距離を移動するのにかかる時間は、1秒の桁である。対照的に、ウイルス粒子に作用するブラウン力は、 $\sim 10^{-12}\text{m}^2\text{s}^{-1}$ の拡散係数を生じる。従ってウイルス粒子が二元電気泳動力の非存在下で $100\mu\text{m}$ の距離を拡散するのにかかる時間は、1.4時間である。従って好ましい態様において、二元電気泳動力は、ウイルスの表面への移動を3桁促進する。

【0191】

更に好ましい態様において、試料中の分析物の存在は、装置の誘電キャパシタンスを測定することにより決定される。本発明は、特定の作用機序に限定されるものではない。実際作用機序の理解は、本発明の実践には不要である。しかしながら、液晶は、電界内での

配向に関連している電気キャパシタンスの変化を反映している、大きい異方性の電気特性を有することが企図されている。誘電エネルギー変換(dielectric transduction)を基にした本発明の方法は、ふたつの電極間の媒体の誘電特性が変化する場合、ふたつの電極間のキャパシタンスの変化の原理に依っている。従って本発明のいくつかの態様において、DEPは、分析物(例えばウイルス)を分析用表面へと押し進めるために利用される。分析物が表面へ結合する場合、これは、電極間の媒体の誘電特性の変化を誘導する。これが生じる場合、電極間の電界分布の非常に小さい画分のみが影響を受け、かつ電極間のキャパシタンスの変化は、無視できるほど小さいことが企図される。しかし好ましい態様において、液晶フィルムが結合したウイルス上に配置される場合、ウイルスに反応した液晶配向の遷移(transition)は、液晶の全層を通じて増大され、電界分布のほぼ全体に影響を及ぼし、かつキャパシタンスの変化は、大きく、市販の装置により測定可能である。本発明の方法は、試料中の約10,000個よりも少ない分析物粒子(例えばウイルス)、好ましくは試料中の約1,000個よりも少ない分析物粒子、より好ましくは試料中の約100個よりも少ない分析物粒子、最も好ましくは試料中の約10個よりも少ない分析物粒子を検出するために利用することができることが企図される。

10

20

30

40

50

【0192】

より更なる態様において、本発明は、誘電キャパシタンスの変化を検出する装置を提供する。図14は、このような装置の概略図を提供する。検出装置は、アッセイ装置を受けるように構成されたハウジングを含むことが好ましい。好ましい態様において、ハウジングはその中に、アッセイ装置が挿入される開口部を有する。更なる態様において、検出装置へアッセイ装置を挿入すると、装置上の電極は発振回路と接触するようになる。いくつかの好ましい態様において、発振回路をベースにしたマイクロプロセッサ(例えば、DS1086 ECONOSCILLATOR, MAXIM Integrated Products Inc.)を用い、望ましい振幅および周波数の出力を伴うAC電圧を発生する。好ましい態様において、印加された電界の周波数は、約100Hz~約50MHzの範囲である。更に好ましい態様において、小型の要因を維持するために、入力DC電圧が電池電源から供給される。この発振回路は、発振回路のキャパシタンス/抵抗などのパラメータを調節することにより、可変出力電圧および周波数を提供する。より更なる態様において、この装置は、発振回路の出力パラメータの容易なリードアウトを提供するために、液晶ディスプレイを含む。いくつかの態様において、電池を再充電するために、充電器がこの装置に一体化されている。更に別の好ましい態様において、検出装置は、電極間の示差的キャパシタンスを測定するマイクロプロセッサを含む。いくつかの好ましい態様において、マイクロプロセッサは、MS3110チップである。このチップは、出力電圧の形でキャパシタンス間に差異を生じる。

【0193】

本発明の装置を使用し、試料中の多種多様な生物学的実体の存在を検出することができる、先に説明したものを含むが、これらに限定されるものではない。同様に、本発明の装置を用い、様々な試料中の生物学的実体を検出することができる。いくつかの態様において、生物学的試料は、生体液、組織ホモジネート、糞便、水疱液、開口部もしくは組織のスワブ、またはそこでウイルスが培養もしくは調製される培地である。いくつかの態様において、生体液は、脳脊髄液、尿、血清、血漿、鼻分泌液、痰、精液または唾液である。

【0194】

生物学的試料は、様々な技術により収集することができる。いくつかの態様において、全血が、多くの経路(例えば、血管穿刺または指穿刺)で、ヘパリンまたはクエン酸ナトリウムなどの抗凝固剤のはいったチューブへ採取される。この血液は混合され、次に試料が取り出され、検知面と接触するように配置される。いくつかの態様において、前述のように採取された血液をチューブ内で血塊形成させることにより、血清が得られる。このチューブを遠心し、1時間以上静置させ、血清成分を細胞成分から分離する。血清試料を、検知面と接触するように配置する。いくつかの態様において、組織ホモジネートが利用される。臓器片(例えば、腎臓、脾臓、心臓、脳、肝臓、リンパ節)は、鋏または刃物により細断されるか、または液体(PBS、他の緩衝液、培地、水など)の入った容器に入れ、プラス

チック製の乳棒を用いるかもしくは容器への機械式ホモジナイザーの投入のいずれかにより、目視可能な組織の大きい破片が存在しなくなるまでホモジナイズされる。この調製物は、低速(<20,000rpmで5~60分間)で遠心され、残存する粒子状の物質を除去する。上清は、装置の基板表面と接触するように配置される。いくつかの態様において、脊髄液が、脊髄から穿刺により採取される。この液体は、滅菌チューブに入れられる。脊髄液試料は、装置の基板表面に接触するように配置される。いくつかの態様において、鼻分泌液試料は、綿花または合成アプリケータースワブで採取され、このスワブは、液体(PBS、水、培地、他の緩衝液など)中に配置される。この試料のアリコートが、装置の基板表面と接触するように配置される。いくつかの態様において、鼻咽頭吸引試料が、スワブの鼻咽頭への挿入により採取される。このスワブは、液体(PBS、培地、水、緩衝液)の入ったチューブ内に配置され、この液体の試料が、装置の基板表面と接触するように配置される。いくつかの態様において、生物学的試料は、中間宿主動物(例えば、西ナイルウイルスの場合の蚊)から得られる。1匹以上の蚊が、リン酸緩衝生理食塩水もしくは他の緩衝液、または細胞増殖に使用される培地、または水などの液体中で、懸濁される。蚊は、使い捨て用プラスチック製乳棒を用いるか、または容器内への機械式ホモジナイザーの投入により、ホモジナイズされる。蚊は、目視可能な完全な昆虫が存在しなくなるまでホモジナイズされる。このホモジネートには、低速遠心が施され(例えば2,000rpmで5分間)、上清が収集される。上清は、装置の基板表面と接触するように配置される。前述の態様のいずれかにおいて、粒子状物質が目視される場合には、試料は更に遠心することが必要なことがある。

10

20

【0195】

いくつかの態様においては、セルが形成されるように、第一の基板の反対側に構成される第二の基板が提供される。いくつかの態様においては、第二の基板も認識部分がアレイ形成されているが、別の態様においては、第二の基板は認識部分を持たない。いくつかの態様において、第二の基板は、非特異的結合を防ぐ、または非特異的結合に抵抗するために、ブロックされている。

【0196】

いくつかの態様において、ウイルスまたは脂質膜を有する実体を含むことが疑われる試料は、第一の基板上の検出領域と接触させられる。この試料は、ある期間(例えば、約0.5~24時間、好ましくは約2~10時間、最も好ましくは約1.5~5時間)、基板と接触することが可能である。いくつかの態様において、基板は、インキュベーション期間中に揺動される。いくつかの態様において、インキュベーション後、基板は、適当な緩衝液(例えばPBS)で洗浄される。前記段階は、第二の基板の存在下または非存在下で行うことができる。例えばいくつかの態様において、試料は、基板に塗布され、インキュベーション段階および洗浄段階が、セルを集成することなく行われる。別の態様においては、セルが集成され、インキュベーションおよび洗浄段階はこのセル中で行われる。

30

【0197】

洗浄段階後、必要ならばセルが構築される。いくつかの態様においては次に、液晶がセル内で形成されるように、メソゲンがセルに添加される。その後このセルは、液晶を生じる変化を可能にする期間、インキュベーションされる。いくつかの態様において、液晶の変化は直ぐに起こる。本アッセイは、様々な温度範囲で作動する。いくつかの態様において、インキュベーションは、約15~50℃で、好ましくは約22~35℃で行われる。

40

【0198】

液晶とのインキュベーション後、セルは、1個または複数の検出領域上で液晶の変化が生じたかどうかについて、アッセイされる。メソゲン層の多くの変化は、周辺光下での肉眼による観察により検出することができるが、メソゲン層の変化を検出するいずれかの手段を、装置に組込むか、またはこれと併用することができる。従ってメソゲン層の変化の検出を補助するために、光、顕微鏡、分光計、電気的技術などを使用することは、本発明の範囲内である。いくつかの態様において、ウイルスのウイルス認識部分への結合は、液晶の色および質感の変化により検出される。本発明は、いずれか特定の作用機序に限定されるものではない。実際本発明を実践する上で、作用機序の理解は不要である。しかしな

50

がら、色および質感の変化は、ホメオトロピック配向の仮設前の、液晶中のメソゲンの傾斜(tilting)によるものである。

【0199】

従ってスペクトルの可視領域の光を利用するそのような態様において、光は、メソゲン層の詳細を単純に照射するために使用することができる。あるいは光は、メソゲン層を通過することができ、透過、吸収または反射された光の量は測定することができる。この装置は、本明細書に参照として組入れられている米国特許第5,739,879号に開示されているような、バックライト装置を利用することができる。紫外および赤外領域の光も、本発明において使用される。

【0200】

いくつかの態様において、セルは交差分極レンズ間に配置され、光は、レンズとセルを通過する。ホメオトロピック配向の区域は黒色に見えるのに対し、平面配向の区域は明るく見える。従って結合したウイルスの存在は、暗視野(black field)により示されるのに対し、ウイルス非結合区域は、明視野で示される。

【0201】

いくつかの態様において、本発明は、分析物の結合時の、メソゲンの配向の変化を検出するために、プレートリーダーを利用する。特に本発明は、透過光または反射光の定量を基にした、液晶フィルムを通る透過光の定量の方法およびプロセスを含む。

【0202】

本発明は、いずれか特定の作用機序に限定されるものではない。実際、本発明を実践する上で、作用機序の理解は不要である。しかしながら、秩序のあるナノ構造とされた基板は、それらの表面上の液晶の薄フィルムへ秩序を与えることが企図されている。これらの液晶の秩序のあるフィルムは、それらを通じた偏光した光の面を保持する。液晶が良く規定された変形—例えば90°のねじれ変形など—を有する場合、液晶は、良く規定されかつ予測可能な様式で、透過光の偏光を変化するであろう。更に液晶の秩序のあるフィルム(例えばホメオトロピック配向の区域)は、特定波長光を示差的に吸収する(ランダムな秩序の液晶フィルムと比べて)ことが企図される。

【0203】

従って本発明は、交差分極を通して目視される場合に、LCアッセイ装置を通る光の透過、適当な波長光で照射されたLCアッセイ装置を通る光の透過、またはLCアッセイ装置の表面からの反射光(すなわち、特定波長の偏光した光または偏光していない光)の検出のためのプレートリーダーの使用が企図される。特に好ましい態様において、LCアッセイと組合せて使用するようにデザインされたプレートリーダーが提供される。本発明の他の態様は、修飾された市販のリーダー、例えばLCアッセイを読むために適合されたELISAリーダーおよび蛍光検出リーダーを提供する。

【0204】

本発明との組合せにおいて有用なプレートリーダーの限定でない例は、米国特許出願第10/227,974号に開示されており、これは本明細書に参照として組入れられている。いくつかの態様において、2個の偏光フィルターが、交差または平行の極性の構成で、プレートリーダーの光路に配置される。1個のフィルターは、試料を通過する前の光路の放出側に配置されるのに対し、第二の偏光フィルターは、光が試料を通過した後であるがフォトダイオードまたはCCDのような検知装置により集光される前の、光路の分析側に配置される。LCアッセイ装置内の秩序のある液晶は、偏光面を保存し、および集光および検知装置に到達する光量を、交差分極を通り目視される場合に著しく減衰するか、または平行分極を通り目視される場合には著しく強調される。LCアッセイ装置の液晶のランダム組織化は、偏光面を保存せず、ならびに交差分極を通過し、集光および検知装置に到達する光量は、余り影響を受けない。従って好ましい態様において、LCアッセイ装置の認識部分による標的分子の結合は、結合した標的分子の量と共に増加するLCのオーバーレイしている薄フィルムへ無秩序さを導入する。別の態様において、特異的帯域通過フィルターが、光が試料へ遭遇する前の光路の励起側に加え、光路の放出側(光が試料を通過または試料により反

10

20

30

40

50

射された後であるが、集光および検知装置(例えばフォトダイオードまたはCCD)に到達する前)に配置される。この構成は、反射光および透過光の両方の定量に有用である。

【0205】

本発明は、プレートリーダー内で使用するために構成されたLCアッセイ装置も提供する。好ましい態様において、LCアッセイ装置は、標準の市販のプレート(例えば24、96、384および1536ウェルプレート)の寸法に従い、フォーマットまたはアレイ形成される。いくつかの態様において、LCアッセイ装置は、所定の市販のリーダーに正確に取付けるのに適した外寸である表面(例えば付着された認識部分を伴う基板)を含む。

【0206】

本発明は、プレート読取り装置およびLCアッセイ装置は、LCアッセイ装置の少なくとも10 1個の表面を通過または反射したプレート読取り装置から供された光が、プレート読取り装置の検出ユニットにより検出されるように構成されているプレート読取り装置およびLCアッセイ装置を含むアッセイシステムを提供することは、認められるであろう。適当な検出ユニットは、CCDおよび光電子増倍管を含む。

【0207】

本発明に従い改変することができる市販のプレートリーダーは、Nalge Nunc International Corporation(ロチェスター、NY)、Greiner America, Inc.(レークマリー、FL)、Akers Laboratories Inc.(スロファール、NJ)、Alpha Diagnostic International, Inc.(サンアントニオ、TX)、およびQiagen Inc.(バレンシア、CA)により入手できるものを含むが、これらに限定されるものではない。 20

【0208】

VI. 特異的捕獲後の非特異的検出

いくつかの態様において、本アッセイは、特異的捕獲後の分析物の非特異的検出のための使用を認める。これらの態様において、分析物は、分析物と相互作用する認識部分を表示している捕獲基板(例えば、PDMSスタンプまたはビーズ)により捕獲される。その後分析物は、分析物が非特異的に結合する検出基板へ移動される。第二の基板上の分析物の存在は、第二の基板の液晶との接触により検出される。液晶内の無秩序なまたは秩序のある区域は、分析物の存在の指標である。前述のように、様々な方法が、装置のメソゲンの配向の変化が存在するかどうかの決定に有用である。いくつかの態様において、アッセイ装置は、電流の使用により分析物がアッセイ装置の表面へ移動することができるように(例え 30 ば二元電気泳動による)、前述のような電極が構成されている。これらの電極は、液晶配向の変化の結果としての、装置の電気的特性(例えば誘電キャパシタンス)の変化を測定するためにも使用される。

【0209】

いくつかの好ましい態様において、本発明のアッセイは、病原生物に対する複数の動物種または属の検出に使用される。非限定的な例において、抗体特異的な西ナイルウイルスが、ウマ、マガモ、ハト、ウサギ、およびマウスから採取された試料中で検出される。これらのアッセイは、カラス、アオカケス、ワシ、スズメなどのトリ種、および西ナイルウイルスに感染していることがわかっている150種を超える米国に住んでいるトリ、ウマ、ヒト、小型哺乳類、例えばイヌおよびネコ、ならびに他のペット動物、マウスおよびラット 40 のような齧歯類など、ならびに他の野生動物、例えばアライグマ、スカンク、ネコ科、イヌ科などに由来した検査試料を試験するための使用を認めることが認識されるであろう。

【0210】

いくつかの態様において、先に説明されたように検出基板の表面は、前述の化学を用い、タンパク質結合のために機能化されている。いくつかの好ましい態様において、検出基板は、その上に金属(例えば金)が斜めに沈積され、かつ4-アミノチオフェノール(ATP)により機能化された基板である。好ましい態様において、検出基板の表面を機能化するために使用される化合物は、そのリガンドがその結合パートナー(例えば西ナイルウイルスのエンベロープEタンパク)について示す親和性よりも、リガンド(例えば抗体)に対するより 50

強力な親和性を示すことが好ましい。

【0211】

いくつかの態様において、少なくとも1個の認識部分を表示するスタンプ基板表面が調製される。スタンプ基板は、スタンプ基板の表面に共有的または非共有的に結合している実体を、別の表面へ移動するために使用することができるいずれかの基板である。適当なスタンプ基板の例は、PDMSおよび他のエラストマー材料を含むが、これらに限定されるものではない。いくつかの態様において、同じ認識部分の異なる濃度が、スタンプ基板の異なる区域にアレイ形成される。別の態様において、様々な異なる認識部分(例えば異なるエンベロープを持つウイルス由来のエンベロープタンパク質)が、スタンプ基板表面にアレイ形成されている。いくつかの態様において、複数の濃度の複数の認識部分が、スタンプ基板表面上にアレイ形成されている。別の態様において、対照領域が、スタンプ基板表面上に含まれる。その後1個の認識部分(または複数の認識部分)が、スタンプ基板表面に、好ましくはアレイの形で導入される。

10

【0212】

いくつかの態様において、スタンプ基板表面は、認識部分と共有的化学結合が形成されるように、機能化された表面である。いくつかの好ましい態様において、PDMS基板は、スベリン酸ジスクシンイミジル(DSS)により機能化されている。一般に、スタンプ基板の表面の機能化に使用される化合物は、その会合した分析物についてこの認識部分(例えば、血清中に存在する認識部分、この場合抗原に対する抗体)が示す親和性よりも、より強力な認識部分(例えばウイルス由来のエンベロープタンパク質)への親和性を示すことが好ましい。他の適当な官能基化剤の例は、先に列記されたものを含む。

20

【0213】

いくつかの態様において、スタンプ基板は次に、被験試料中に含まれることが疑われる分析物(例えば認識部分の結合パートナー)が、スタンプ基板上の認識部分により捕獲される条件下で、被験試料に露出される。好ましい態様において、被験試料は、試験対象由来の体液を含む。インキュベーション期間(例えば10分間～約10時間)の後、スタンプ基板は洗浄される。いくつかの態様においてはその後、検出基板は、分析物(例えば抗体)がスタンプ基板表面から検出基板へ移るような条件下で、スタンプ基板と接触される。好ましい態様において、検出基板の表面の機能化に使用される化合物は、認識部分よりも分析物により強力な親和性を示し、その結果、分析物が認識部分から引き離されかつ検出基板に移される。

30

【0214】

より更なる態様において、分析物は、認識部分を表示するビーズ上に捕獲される。先に説明されたように、ビーズは、ラテックス、ポリマー、アガロース、または他の材料から形成され、およびいくつかの好ましい態様において、磁気を帯びている。いくつかの態様において、分析物はその後、検出基板へ移される。この移動は、様々な方法で実現される。いくつかの態様において、分析物は、ビーズから検出基板上へ直接溶離されるか、またはスポットティングなどの方法により検出基板へ溶離および移動されるかのいずれかである。別の態様において、分析物に露出されたビーズは、検出基板と接触され、その結果分析物が検出基板に移される。前述のようにいくつかの態様において、検出基板表面は、ビーズ上の認識部分よりも、分析物により強力な親和性を持つ部分により機能化され、その結果分析物が検出基板へ移される。いくつかの態様において、分析物からのシグナルは、溶離前の、1種または複数の追加の分子の分析物への結合により増幅される。例えば、使用される分析物が抗体であるならば、二次的anti-species抗体(例えば、および特定の種の抗Fc抗体、またはウサギ-抗ヒト抗体、マウス-抗ヒト抗体、マウス-抗ウサギ抗体など)が使用される。酵素-抗体複合体、分析物特異的二次抗体、金ゾル粒子ならびに他の分子および分子システムも、利用することができる。核酸が検出される場合、本明細書に概説された分析物検出アッセイは、PCRのような増幅法に従うことができる。

40

【0215】

先に詳述された機能化された基板を含む、様々な検出基板の、本発明のアッセイにおけ

50

る用途が認められる。いくつかの好ましい態様において、検出基板は、液晶をホメオトロピック配向するラビングされたポリイミドまたはポリイミドを含む。

【0216】

いくつかの態様において、検出基板上の結合パートナーの存在を検出することができるように、分析物の検出基板への移動後、液晶が検出基板に塗布される。先に列記したものを含む、様々な液晶形成物質を使用することができる。いくつかの好ましい態様において、5CBが使用される。いくつかの態様において、検出基板を使用し、他の基板と共に光学セルを形成し、かつ液晶が、2個の基板により形成されたチャンバーへ塗布される。

【0217】

認められるように、前記方法は、タンパク質-タンパク質、タンパク質-核酸、核酸-核酸、および他の分子の相互作用を含む、様々な分析物-認識部分の組合せの検出に適合することができる。この検出は、標識を伴わない。従ってこのシステムは、多重化されたアッセイに関して特に有用であることが企図されている。理解されるように、この捕獲基板は、検出基板上の一連の不連続の検出領域に対応するアレイ内の様々な認識部分を伴い機能化することができる。従って検出基板上の陽性シグナルは、スタンプ基板上的特定のリガンドに相関することができる。従って検出基板上の第一の検出区域は、第一の分析物(例えば、特定の病原体に特異的な抗体)に特異的であることができ、検出基板上の第二の検出区域は、第二の分析物(例えば、第二の病原体に特異的な抗体、または確証の結果を生じるために、第一の病原体に特異的な異なる抗体)に特異的であることなどができる。

10

【0218】

本発明のシステムにより可能な標識を伴わない検出は、ELISAのような現在使用されるプロセスに勝る利点を提供する。本システムは、試験対象由来のリガンドまたは抗原に特異的な抗体を検出するために、二次抗体を必要としない。これは、本システムは、各種に特異的な個別の二次抗体は不要であるので、単独のアッセイにおいて異なる種由来の抗原/リガンド特異的抗体の検出に利用することができるので重要である。この局面は、広範なまたは先に試験されない対象集団における疾患の大発生に反応するために必要なアッセイおよび時間の柔軟性を大きく増大する。更に本システムは、放射性、蛍光、または酵素システムのような、標識システムを必要としない。これらのシステムは、相対的に不安定であるか、または短い貯蔵寿命を有することが多く、野外使用では容易に適合させることができない特別な装置(シンチレーションカウンター、フィルム)を必要とする。

20

30

【0219】

VII.脂質タグの検出

いくつかの態様において、リポソームのような脂質の液晶を配向させる能力を利用し、分析物が検出される。先に説明されたように、本発明は、脂質と複合された認識部分またはリガンドの使用を企図している。いくつかの態様において、これらの脂質複合体(例えばリポソーム)を利用し、試料中のまたは基板上の分析物の存在を検出する。例えば先に説明したように、脂質およびリポソームのような脂質含有実体は、誘導体化し、タンパク質または核酸などの認識部分を表示することができる。試料またはその上に試料が塗布された基板は、その後、脂質-認識部分複合体と接触され、その結果認識部分は分析物と結合し、そうでなければ会合し始める。得られる分析物-認識部分-脂質複合体は、必要ならば複合体を基板へ移し、次に液晶を伴う基板と接触することにより検出することができる。本発明は、いずれか特定の作用機序に限定されるものではない。実際作用機序の理解は、本発明の実践には不要である。しかしながら複合体の脂質部分は、脂質と接触している液晶部分にホメオトロピック配向を提供することが企図される。ホメオトロピック配向は、先に説明された方法により検出することができる。基板それ自身が液晶を配向させることは不要であることは認められるであろう。従ってこれらのアッセイは、異方性表面またはそうでなければ有機層で誘導体化される表面を提供しない、低コストの単純な基板を使用することができる。当然これらの基板は、望ましいならば先に説明されたような、異方性表面または誘導体化された表面を有する。

40

【0220】

50

別の態様において、脂質-認識部分複合体が、分析物-認識部分複合体を検出するための、二次的結合剤として使用される。例えば分析物は最初に、第一の認識部分と接触される。いくつかの態様において、第一の認識部分は、脂質と複合された第二の認識部分のリガンドである。分析物-第一の認識部分複合体は次に、第二の認識部分-脂質複合体と接触され、第二の認識部分は、第一の認識部分と結合し、その結果分析物-第一の認識部分複合体は脂質により標識される。その後脂質の存在は、先に説明されたように検出することができる。いくつかの好ましい態様において、第一の認識部分は、アビジンまたはビオチンのいずれかと融合され、その結果アビジンまたはビオチンのいずれかを含む脂質複合体は、二次的結合剤として使用することができる。別の態様において、第一の認識部分が抗体である場合、第二の認識部分は、プロテインAまたは第一の抗体、例えばFc領域に結合する抗体である。 10

【0221】

VIII. キット

いくつかの態様において、本発明は、分析物の検出のためのキットを提供する。好ましい態様において、キットは、先に説明されたような基板を1個または複数含む。いくつかの態様において、キットは、捕獲基板および検出基板を含む。いくつかの好ましい態様において、捕獲基板は、ビーズまたはスタンプである。更なる態様において、キットは、液晶セルと集成するために、検出基板と組合せて使用することができる基板を含む。いくつかの態様において、キットは、メソゲンを含むバイアルを含む。更に別の態様において、キットは、対照の1種または複数の分析物を含む少なくとも1個のバイアルを含む。更に別の態様において、キットは、少なくとも1種の分析物の検出のためにキットに含まれた試薬の使用説明書を含む。いくつかの態様において、この説明書は更に、インビトロ診断用製品のラベリング中に、米国食品医薬品局(FDA)により要求された意図された用途に関する陳述を含む。FDAは、インビトロ診断薬を医療器具として分類し、かつ510(k)手順により承認されることを要求している。510(k)申請(市販前申請)に必要な情報は以下を含む：1)インビトロ診断用製品の名称で、器具の商用名または商標名、一般名または通称、および分類名を含むもの；2)製品の意図された用途；3)入手可能であるならば、510(k)申請を提出する所有者または操業者の確定された登録番号；既知であるならば、食品医薬品化粧品法(FD&C Act)513条の下での、当該インビトロ診断用製品の属するクラス、その適切なパネル、または所有者もしくは操業者がそのような条項下で当該器具が分類されないと決定した場合は、その決定に関する陳述およびインビトロ診断用製品がそのように分類されないという決定の根拠；4)当該インビトロ診断用製品、その意図された用途、および用法の指示を説明するのに十分な、提唱されたラベル、ラベリングおよび広告。使用可能であるならば、写真および技術的図面が供給されるべきである；5)当該器具は、米国において流通している同等の型の他のインビトロ診断用製品と類似しているおよび／または異なることを示す陳述と、その陳述を裏付けるデータの添付；6)実質的に同等であるという決定の基になった、安全性および有効性のデータの510(k)まとめ；または、実質的に同等であるというFDA見解を裏付ける、510(k)安全性および有効性の情報が、書面による請求の30日以内に誰もが入手可能であることの陳述；7)申請者が、自身の最善の知識において、市販前通知において申請された全てのデータおよび情報が信頼できかつ正確であるとみなすこと、および重要事実の省略がないことに関する陳述；8)実質的に同等性の決定を成す上で、FDAが必要として求めたインビトロ診断用製品に関する追加情報。追加情報は、米国FDAのインターネットウェブページ上で入手可能である。 20 30 40

【0222】

実験

本発明のある好ましい態様および局面を明らかにしかつ更に例証するために、下記実施例が提供されるが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0223】

以下の実験の開示において、下記の略号が使用される：eq(当量)；M(モル)； μ M(マイクロモル)；N(ノルマル)；mol(モル)；mmol(ミリモル)； μ mol(マイクロモル)；nmol(ナ 50

ノモル)；g(グラム)；mg(ミリグラム)； μ g(マイクログラム)；ng(ナノグラム)；lまたはL(リットル)；ml(ミリリットル)； μ l(マイクロリットル)；cm(センチメートル)；mm(ミリメートル)； μ m(マイクロメートル)；nm(ナノメートル)；C(摂氏度)；U(単位)、mU(ミリ単位)；min.(分)；sec.(秒)；%(パーセント)；kb(キロベース)；bp(塩基対)；PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)；BSA(ウシ血清アルブミン)。

【0224】

実施例1 基板上の抗体の固定

本実施例は、抗体を基板上に固定する様々な方法を説明している。5種の異なる固定化の戦略が、評価された：

1)HEXA：金フィルム表面上の $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{SH}$ (HEXA)から形成された疎水性単分子層上への、プロテインA、その後の西ナイルウイルスモノクローナル抗体(WNV Mab)の吸着。この表面は、抗体の固定後、BSAによりブロックされた。 10

2)SPDP：スルフヒドリル反応性(タンパク質)およびアミン反応性(単分子層)異種二官能性架橋剤N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸エステル(SPDP)を用いることによる、金フィルム上の2-メルカプトエチルアミン(2-MEA)により形成された単分子層への、WNV Mabの共有的付着。この表面は、抗体の固定後、BSAによりブロックされた。

3)PMPI：スルフヒドリル反応性(タンパク質)およびヒドロキシル反応性(単分子層)異種二官能性架橋剤N-(p-マレイミドフェニル)イソシアナート(PMPI)を用いることによる、金フィルム上の11-メルカプトウンデカノール(11-MU)により形成された単分子層への、Ras 20
ポリクローナル抗体(Ras Pab)の共有的付着。この表面は、抗体の固定後、BSAによりブロックされた。

4)DSS：アミノ反応性同種二官能性架橋剤スベリン酸ジスクシンイミジル(DSS)を用いることによる、金フィルム上の2-MEAから形成された単分子層への、Ras Pabの共有的付着。この表面は、抗体の固定後、BSAによりブロックされた。

5)Adsp：金表面上にスピンコーティングされた薄フィルム上への、WNV Mabの、直接吸着。この表面は、抗体の固定後、BSAによりブロックされた。

【0225】

これらの5種の方法により固定された抗体の偏光解析法による厚さを、分析した。5種の方法は全て、表面上への抗体の固定を生じた。抗体の表面への共有的固定の3種の戦略(SP 30
DP、PMPIおよびDSS)は、ほぼ同レベルの抗体の固定につながった(偏光解析法による厚さ $\sim 3\text{nm}$)。ポリウレタン表面上への抗体の受動的吸着(Adsp)は、抗体の偏光解析法による厚さ $\sim 8\text{nm}$ の捕獲につながり、および抗体のプロテインAが媒介した付着(HEXA)は、IgGの偏光解析法による厚さ $\sim 4\text{nm}$ の固定につながった。直接吸着法(Adsp)およびプロテインA媒介型吸着は、抗体固定の最高レベルにつながった。

【0226】

実施例2 西ナイルウイルスの検出

検出領域がトポグラフィ的特徴を含む液晶アッセイによるウイルスの検出は、国際公開公報第01/61357号に開示されている。液晶と組合せたこれらの表面の種類をうまく使用し、そのような基板の表面に捕獲された西ナイルウイルス(WNV)の存在を報告した。しかし 40
驚くべきことにここで、報告する機構は、表面上のトポグラフィを必要としないことがわかった。この予想外の結果は、液晶を使用するウイルス検出のための基板の二次加工を実質的に単純化する。以下に説明するように、この報告する機構は、様々なウイルスに適用することができることが明らかにされている。

【0227】

WNVに対する抗体を、成形されたポリウレタンレプリカの表面に沈着した。微小成形されたレプリカは、ピッチ 400nm および深度 54nm を有した。WNVを含有する水溶液の液滴を、ポリマー性レプリカの表面上に沈着した。この溶液はWNVの $10^{8.4}\text{pfu}/0.2\text{ml}$ を含み、かつインキュベーションを 4.5 時間行った。表面上のWNVを含有する液滴のインキュベーション後、表面をPBSですすぎ、その後液晶を用い、画像形成した。驚くべきことに、WNVを含有 50

する溶液と接触した表面の領域は、液晶のホメオトロピックな係留(anchoring)を引き起こした。特にホメオトロピックな領域が、名目上滑かな区域に加え、トポグラフィーを保持するレプリカの区域の両方において認められた。制御されたトポグラフィーを保持しない基板の二次加工は、単純かつ単刀直入に実施されるので、液晶を用いるウイルスのアッセイの基礎としてトポグラフィーを伴わない表面を使用する可能性を調べた。以下に説明するように、WNVに対するホメオトロピック反応は、表面上に特異的に捕獲されたウイルスの存在に特有である。

【0228】

次にトポグラフィーフリーの領域で観察された反応は、表面上に特異的に捕獲されたWNVに対する反応であることを確認することが必要であった。SLE、デング熱、LACVおよびWNVに対する抗体を、同じ平面的な基板上に沈着した。WNVストックは、35℃で17時間、4個の領域にわたり揺動した。このセルはその後、交差分極レンズを通して観察した。デング熱およびLACVの抗体領域は明るく着色しかつ無秩序なLCを表示し、これはWNVの非特異的抗体への結合がないことを示していた。WNV抗体領域は、完全なホメオトロピックな円形を表示し、これは結合したウイルスを示した。SLE抗体領域において、ホメオトロピック配列の小さい区域が存在し、これはWNVのSLE抗体へのわずかな交差反応を意味した。

【0229】

いくつかの知見が得られた。第一に、WNVに対する液晶のホメオトロピックな反応は、印象的かつ明確である。WNVを含有する液滴に曝された表面の全領域は、ホメオトロピックな配向を呈した。第二に、WNVに対する抗体を提示する表面の領域とは対照的に、SLE、デング熱およびLACVに対する抗体を提示する領域は、液晶のホメオトロピックな配向を引き起こさなかった。SLEに対する抗体を提示する表面の小さい区域はホメオトロピック配列を引き起こしたが、しかしこれはWNVに対する抗体を提示する領域と比べ、非常に小さく、これはWNVに対する抗体を提示する領域とは明確に識別可能であったことが注目される。まとめるとこれらの結果は、WNVに対する液晶のホメオトロピックな反応は、WNVに対する抗体を提示する表面の領域に特異的に捕獲されたウイルスに対する反応であることを明確に明らかにしている。

【0230】

これらの結果は、OTSで処理したガラスの第二の表面を含む光学セルを用いて得た。液晶は、OTS処理したガラス表面上でホメオトロピックに配向するので、結合したウイルスに対する液晶のホメオトロピック反応が、ウイルス修飾された表面の配向の影響の欠如と組合わせて、OTS処理したガラススライドにより引き起こされる可能性を考慮した。この可能性に対処するために、光学セルを、ウイルスで修飾された2個のポリウレタン表面から調製した。ウイルスがポリウレタン表面の抗体により捕獲された場合に、液晶のホメオトロピックな係留が認められた。この結果から、ウイルス修飾された表面上の液晶のホメオトロピックな配向は、WNVに対する反応であり、OTS被覆されたガラススライドにより引き起こされないと結論付けることができる。加えて平面的な金基板を、C₁₆SHで、次にWNVモノクローナル抗体で機能化し、その後WNVで処理した。平面的な金基板は次に、OTSスライドと対形成し、光学セルを形成した。WNVに対する抗体がヘキサデカンチオールにより疎水性とされた金フィルム上に固定された場合に、液晶のホメオトロピックな配向を得ることができることが観察された。

【0231】

実施例3 抗体固定の最適化

抗体を固定する様々な方法を調べ、最良の結果をもたらす手法を決定した。簡単に述べると、ポリウレタン基板を、(a)1μM WNVモノクローナル抗体、(b)5μM WNVモノクローナル抗体、および(c)最初1mg/mlプロテインA、その後1μM WNVモノクローナル抗体で機能化した。全ての機能化された基板をその後、WNVストックと共にインキュベーションした。結果は、ポリウレタンが1μMまたは5μM抗体により機能化された場合、同じく基板が最初にプロテインA(抗体を正確に配向させる分子)とインキュベーションされ、その後1μM抗体で機能化された場合に、実質的に同じホメオトロピック反応が観察されたことを示した

。これらの結果は、強力な ホメオトロピック反応は、プロテインAを伴うまたは伴わずに、比較的低い濃度の抗体で得られることを示している。現在の方法は、基板全体の1mg/mlプロテインAによるコーティング、それに続く基板上の特異的検出領域における抗体の固定が関連している。

【0232】

実施例4 ウイルス送達最適化

先に説明した結果は、表面を、ウイルス溶液と共に、最大20時間インキュベーションすることにより得た。次に、表面に固定されたWNVモノクローナル抗体へのウイルス送達を最適化し、従って結合時間を最小化する方法を調べた。下記の3種のパラメータを調べた：a)インキュベーションの温度；b)対流を発生するための、試料の前後の揺動；および、(c)抗体のスポットサイズの影響。

10

【0233】

最初に、インキュベーション温度を室温(ほぼ22℃)から35℃まで上げ、必要な結合時間を短縮した。次におよそ20μlの液滴を抗体で機能化された表面へ送達することにより、100%ホメオトロピックな配列反応に必要な時間を、一晚(16~20時間)から3時間へ短縮することが可能であった。結合時間をより更に短縮するために、「揺動」法をこの手法に導入した。基板上の静止した20μlの液滴としてWNVをインキュベーションする代わりに、PDMS「プール」を用い、基板の表面にWNVのより大きい容量(300μl)を含ませた。その後WNVは、2方向回転装置を用い、連続して揺動した。この手法の変化は、結合時間の3時間から2時間への短縮をもたらした。抗体のスポットサイズの縮小の作用を決定するために、抗体容量(固定された)を20μlから5μlに減少した。温度上昇、揺動、および固定された抗体の表面積の低下という、これら3種の方法を一緒にすることにより、結合時間を2時間から1.5時間に短縮した。これは単にアッセイに必要なインキュベーション時間であることは強調されなければならない。一旦ウイルスと抗体が相互作用すると、液晶が添加され、これらは数秒以内にそれらの好ましい配向を呈した。読取りは迅速であった。この配向は安定しており、アッセイを直ちに読みとる必要はない。これは、定時の必要要件を示さない。これらのエンドポイントは、100%ホメオトロピックな配列に定めた。部分的配列は、1.5時間時点以前に認められた。これらの結果は、液晶を使用し、WNVに対する抗体で被覆された基板に結合したWNVを、液晶のホメオトロピックな反応を介して検出することができることの明確な証拠を提供する。

20

30

【0234】

実施例5 セントルイス脳炎ウイルス(SLE)の検出の実証

液晶のホメオトロピック反応を介して、WNV以外のウイルスを報告する方法の一般性を評価するために、SLEに対する抗体を提示している表面上に捕獲されたSLEに対する液晶の反応を介して、SLEが検出されるかどうかを決定する実験を行った。SLEのアッセイは、本質的にWNVについて先に説明したように行った。SLEウイルスがこのアッセイにおいて試験される各々の場合において、ホメオトロピック配列の区域は、スライドの縁の上、診断用ゾーンの外側、しかしPBS洗浄の方向に認められた。診断用表面上に形成された抗原抗体複合体は、PBSすすぎの間に洗浄除去され、一部の残留物のみが、液晶のホメオトロピック配列により目視されるスライドの縁の近傍に残存しているように見える。これは、WNVアッセイでは起こらなかった。これらの区域は、SLEは、液晶のホメオトロピック反応を介して検出することができることを示している。この結果は液晶のホメオトロピック反応は、WNVに制限されないが、WNV以外のウイルスの検出に活用することができることを示唆しているので、この結果は重要である。WNV、SLEおよびEEEの大発生が同時に生じ、迅速な多重アッセイが利用可能である場合に、このことは何倍も(in times)価値があるであろう。

40

【0235】

実施例6 複数の検出領域のアッセイ

ウイルスアッセイの有用なフォーマットは、同じ表面上に空間的にパターン化されたいくつかのウイルスに対する抗体を伴うマルチアレイである。表面上の抗体のパターン化、

50

およびそれらへのウイルス結合の検出の実行可能性を明らかにするために、WNVに対する抗体を、表面の3領域にパターン化した実験を行った。簡単に述べると、ポリウレタン基板は、レーンフォーマットでWNVモノクローナル抗体で機能化した。WNVは、基板上で35°Cで2時間揺動した。3種のホメオトロピックレートを観察したところ、これは結合したウイルスの配置を示した。

【0236】

実施例7 WNVのトリ組織からの検出

この実施例は、トリ組織からのWNVの検出を説明している。ポリウレタン基板を、表面のプロテインAの1mg/mlと一緒にインキュベーションにより調製した。次に、1 μ M WNVモノクローナル抗体を含有する液滴4滴を、いくつかの試料の各区域内に固定した。腎/脾組織懸濁液を含有するカラス試料を、NWHC's Diagnostic Virologyラボから入手した。これらの試料を、リアルタイムRT-PCRによるか、または組織培養単離により、各々、陽性または陰性であると決定した。組織懸濁液は、2,000rpmで10分間遠心し、上清を直接試料区域に塗布した。10^{7.7} pfu/.2mlのWNVストックをこれらの実験において使用した。インキュベーションは、35°Cで一晩行った。WNVモノクローナル抗体で機能化されたポリウレタン基板を、陽性または陰性Americanカラス組織懸濁液、培養培地、または陽性対照としてWNVストックで処理した。陽性カラスおよびWNV試料の領域は、ホメオトロピック配列を示し、このことは、結合した西ナイルウイルスの存在を示している。陰性カラスおよび培養培地試料の領域は、無秩序なおよび明るく着色したLCを示し、これは結合したウイルスの欠如を示している。本発明者らは、陽性対照および陰性対照が、液晶の正確な反応を生じたことに注目している。

【0237】

追加の対照実験は、トリおよびウマの全血を用いて行った。ニワトリ血液(抗凝固剤としてハパリンまたはクエン酸塩のいずれかを伴う)およびウマ血液を、WNV抗体で機能化された基板へ直接塗布した。インキュベーションは、35°Cで一晩行った。これらの結果は、正常なトリまたはウマ全血試料とは交差反応または非特異的結合が存在しないことを明確に明らかにしていた。追加の結果は、ニワトリ/ウマ/マガモから得た陰性血清または培養培地により得た。加えてNY State Dept of Healthから、Taqman PCRによりWNV陰性であることが先に示された6種の蚊ホモジネートを手入れし試験した。これらのホモジネートも、LCアッセイで陰性と試験し、表面への非特異的結合の証拠を示さなかった。この実験は、本発明のアッセイでほとんどプロセッシングを伴わない濃縮された生物学的試料を使用する能力を明らかにしている。

【0238】

実施例8 セルによるホメオトロピック配向

この実施例は、組織培養細胞によるホメオトロピック配向を明らかにしている。組織培養細胞は、スライドガラス表面に付着することができる。この表面を洗浄し、メソゲンを表面に配置した。細胞により占拠された表面の区域は、均一に暗く見える。細胞領域により占拠されなかった表面の区域は、均一に暗く見える。細胞領域により占拠されなかった区域は、無秩序であり、明るく着色したLCを示している。

【0239】

実施例9 スタンプ移動による検出

この実施例は、リガンドを含むスタンプ基板から検出基板へ移動された抗体の検出を説明している。スタンプ基板を形成するために、Sylgard 184 Elastomer Kit(Dow Corning)の硬化剤1部に対しエラストマー10部を一緒に混合し、真空デシケーター内で脱気し、~65°Cで1時間PDMSへ硬化した。PDMSスタンプは、硬化したPDMSからFisher's Finest顕微鏡ガラススライドに切出した。次にPDMSスタンプを、それらを清浄にするために、エタノールですすぎ、窒素で乾燥した。次にPDMSスタンプを、酸素プラズマ(200mTorr O₂バックフィル圧(backfill pressure))中、275ワットで4分間、プラズマ集塵(plasma ash)し、PDMS表面を酸化し、ガラスに似た表面を作成した。このPDMSスタンプを次に、2% APES/98% 無水アセトン溶液に一定に攪拌しながら2分間浸漬した。PDMSスタンプを次に、アセトンへ5

分間一定に攪拌しながら移した。PDMSスタンプをその後、アセトンから取り出し、アセトンですすぎ、窒素で乾燥した。PDMSスタンプは次に、100℃の蓋のない炉の中に30分間放置した。PDMSスタンプを炉から取り出し、室温に冷却し、その後無水メタノール198mlと混合した2mlのDMSO中の74mgのDSSの溶解から作成した1mM DSS(Pierce)溶液中に配置した。スタンプは、DSS化学物質20ml中に一定で攪拌しながら1時間維持した。その後PDMSスタンプをDSSから取り出し、メタノールですすぎ、引き続き窒素流でこれらを乾燥した。その後0.25 μ MのEタンパク (L^2 Diagnostics, LLC)の20 μ L液滴を個々のスタンプ上で、4℃で一晩、および室温で1.5時間インキュベーションした。

【0240】

斜めに(35°)沈着した30 Ti/300 Au Corning 1737顕微鏡スライドを、~1mM ATP(4-アミノチオフェノール、Aldrich)中に一晩放置した。その後Eタンパクの液滴を、噴射瓶からのミリQ水によりスタンプを約15秒間すすぎ、引き続き窒素流によりスタンプを乾燥した。20mg/ml(総タンパク質濃度)抗Eウサギポリクローナル抗体(L^2 Diagnostics, LLC)、20mg/ml陰性ウサギ血清(Pierce)、1:2希釈した陽性ウマ血清(Cornell大学)、および1:2希釈した陰性ウマ血清(Cornell大学)の20 μ L液滴を、Eタンパクがインキュベーションされたそれらの個々のスタンプ上に配置した(PBS中で希釈した)。血清を、室温で6時間インキュベーションした。この血清を、~0.5mlのPBS中の0.01% TritonでPDMSスタンプからすすぎ落とし、続けて噴射瓶からのミリQ水で15秒間すすいだ。このスタンプを窒素で乾燥した。斜めに金被覆したスライドを、ATPから取り出し、エタノールですすぎ、窒素で乾燥し、0.1N HClに浸漬し、窒素で乾燥し、再度0.1N HClに浸漬し、窒素で乾燥した。

10

20

【0241】

PDMSスタンプは次に、ATP処理した斜めの金スライドと1分間接触するように静かに配置し、ゆるい圧力を接触の開始時および終了時に5秒間加えた。このスタンプを表面から取り除いた。25 μ m Mylarと共に、OTS((トリデカフルオロ-1,1,2,2-テトラヒドロオクチル)トリメトキシシラン、Gelest)で真空蒸着したFisherスライドから、スタンプした斜めの金/ATP表面を分離することにより、光学セルを構成した。この光学セルを、バインダークリップで互いに保持した。5CB液晶(4-シアノ-4'ペンチル-1-1'-ビフェニル、EM Science)を、その等方相で~40℃で、光学セルへ導入した。次に光学セルを、移動された生物学的物質の円形の形状が破壊されない限りは、液晶がいずれの場所においてもホメオトロピックに配列されるまで(通常一晩)、37℃で加熱した。

30

40

【0242】

結果を図2に示している。この手法においてEタンパクは、PDMSスタンプ上のDSS化学物質に共有結合されている。Eタンパクは次に、WNV抗体が血清のインキュベーション液滴中に存在するならば、これを捕獲した。血清中にWNV抗体が存在しない場合(この場合図2の右側の陰性血清または対照)であっても、PDMSスタンプ表面への若干の非特異的吸収があると推定され、従って非特異的に吸収された実体を除去するために、Tritonすすぎの使用は必要である。PDMSスタンプがATP処理された金表面と接触される場合、Eタンパクは、スタンプ上のDSS化学物質と共有結合し続け、および捕獲されたWNV抗体が存在する場合は、これをより強力な結合の物理のために、ATP化学物質へ移す。図2の写真を参照し、交差分極により目視された左側のふたつの光学セルは、それらの上でインキュベーションされたWNV抗体について血清陽性であるPDMSでスタンプされた。図2の右側の二つの写真は、交差分極により目視された対照光学セルは、それらの上でインキュベーションされたWNV抗体について血清陰性であるPDMSでスタンプされた。WNV抗体が存在する場合、WNV抗体をその上に捕獲したスタンプは、ATP処理した金へ移り、液晶光学セル中に円形の(インキュベーション液滴の形に由来)破壊パターンを生じ、これは左側の写真を参照のこと。抗体を捕獲しなかった対照スタンプは、光学セル内にホメオトロピックに配列した液晶を明らかにしている(図2右側写真参照)。

40

【0243】

実施例10 集団からの特異的抗体を報告するための親和性接触印刷(α CP)

本実験は、溶液中の2種の抗体の混合物からの特異的抗体の捕獲を明らかにしている。

50

図4を参照し、6ボタン式PDMSスタンプを、 O_2 クラウド(cloud)中で8分間プラズマ集塵し、PDMSの表面を酸化した。次にスタンプを、無水アセトン溶液中の2% APES内に2分間攪拌しながら放置した。スタンプを次に、アセトン内に5分間攪拌しながら放置した。その後スタンプをアセトンですすぎ、窒素で乾燥し、100°Cの炉に30分間放置した。スタンプを次に、1mM DSS溶液中に1時間攪拌しながら放置した。スタンプをDSSから取り出し、メタノールですすぎ、窒素で乾燥した。6ボタン式PDMS α スタンプの3個のボタン上で、0.25 μ MのEタンパクの20 μ l液滴を4°Cで一晩インキュベーションした。残りの3個のボタンには、0.25 μ Mビオチン化したBSAの20 μ l液滴を入れ、4°Cで一晩インキュベーションした。これらのタンパク質を、水ですすぎ落とし、 α スタンプを窒素で乾燥した。3個のEタンパクで機能化されたボタンの2個および3個のビオチン化されたBSAで機能化されたボタンの2個には、抗ビオチンおよび抗E抗体の0.25 μ M混合物の20 μ l液滴を入れ、これらを室温で6時間インキュベーションした。3番目のEタンパクで機能化されたボタンには、0.25 μ M抗ビオチン抗体の20 μ l液滴を有し、これを陰性対照として、室温で6時間インキュベーションした。3番目のビオチン化したBSAで機能化されたボタンには、0.25 μ M抗E抗体の20 μ l液滴を入れ、これを陰性対照として、室温で6時間インキュベーションした。6個のボタンの各々は、最初に、PBS中の0.01% Tritonの～5液滴ですすぎ、引き続きミリQ水で15秒間ですすぎ、その後窒素で乾燥した。次に6ボタン式 α スタンプを、1mM ATP処理した35°斜めに沈着したAuスライドと～1分間接触させ、接触を確実にするために、接触の開始時にはゆるい圧力を数秒間加えた。その後 α スタンプを剥離し、光学セルをOTSスライドおよび5CB液晶と共に配置した。その後光学セルを、40°Cで2日間インキュベーションし、バックグラウンドLCホメオトロピックに戻した。結果は、図5の画像に示している。

【0244】

このデータの分析は、混合物からその特異的抗体である抗ビオチン抗体を引き出している、ビオチン化されたBSA由来のふたつの強力な陽性を明らかにし、これを α CPを介して認められたLC光学セル中で報告している。その上でインキュベーションされた抗体混合物を有する両Eタンパクボタンは、抗E抗体移動からの印刷区域縁の周囲に陽性結果を示しているが、抗ビオチン抗体の結果(readout)のように強力なシグナルではなかった。両方の陰性対照はブランクであり、これは4種の陽性対照が抗体混合物からそれらの特異的抗体を引き出し、かつ α CPを介してそれらを報告したことを暗示している。いくつかの理由で、抗E抗体シグナルは、抗ビオチン抗体シグナル程強力ではなかった：つまり、光学セルバックグラウンドがホメオトロピックに転換することを待つ間、インキュベーションが長すぎたこと、これは洗浄除去される破壊を若干引き起こしたため、および／または α スタンプの印刷時の一様でない圧力のため。

【0245】

実施例11 ポリイミド表面は分子相互作用を留めることができる

シリコンウエハは、1-メチル-2-ピロリジノン(NMP)でスクラビングした。スクラビングしたウエハは、NMPにより1700rpmで回転洗浄し、およびこのウエハは、1.0% 固形SE-7210ポリイミドにより1700rpmでスピンコーティングした。ウエハは、85°Cで10分間予備硬化し、その後最終硬化を180°Cで15分間行った。ポリイミド表面は、機械により、下記設定でラビングした：

ホイールスピード：343rpm、
テーブルスピード：3cm/秒
非負荷ホイール電流：0.065amp
負荷ホイール電流：0.055amp
左高さ読取り：2.530
右高さ読取り：2.530

【0246】

下記材料を、液滴からウエハ上に並べて沈着した。各々の添加に2時間のインキュベーション期間を用いた：

プロテインA：1mg/ml

10

20

30

40

50

ウシ血清アルブミン：0.1mg/ml

マウスIgG：1 μ M

【0247】

各結合段階の後に偏光解析器の読取りから計算した、ウエハの表面厚を、以下に列記する：

ポリイミド被覆したウエハ：21.0、21.1

プロテインA：23.4、22.9、22.9

BSA：22.3、21.8、22.2

マウス抗体：24.9、24.2

【0248】

これらの読み値は、プロテインAのポリイミド表面への結合およびそれに続くマウス抗体のプロテインAへの結合を明らかにしている。

【0249】

実施例12 液晶によるポリイミド表面上の分子相互作用の検出

ガラススライドを、1-メチル-2-ピロリジノン(NMP)でスクラビングし、NMPにより1700rpmで回転洗浄し、および1.0%固形ポリイミドSE-7210により1700rpmでスピンコーティングした。スライドは、85℃で10分間予備硬化し、その後最終硬化を180℃で15分間行った。下記の材料を、列記した順番で、液滴インキュベーションにより添加した：

プロテインA：1mg/ml

BSA：0.1mg/ml

マウス抗体：1 μ M

【0250】

スライドは、インキュベーションの間に、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。これらは、窒素流で乾燥し、トップスライドの追加によりセルを形成した。液晶ZLI-1221を、ガラススライド間の空間に添加した。

【0251】

マウス抗体のポリイミド表面上に存在する固定されたプロテインAへの結合を、液晶配向の変化により報告した。プロテインAのみまたはプロテインA+BSAを伴う区域は、交差分極を通して目視した場合、裸眼では暗色に見え、プロテインAで機能化されていないポリイミド表面の区域と同じであった。プロテインAで機能化されかつマウス抗体に曝された区域は、偏光フィルムを通して目視された場合、白色に見えた。機能化されない区域または抗体曝露されない区域との、マウス抗体に結合した区域のコントラストは、強力であった。

【0252】

この実験は、液晶ZLI-15700-000、5CB、およびMLC-6710-080で行い、先に説明されたものと同様の結果を伴った。これらの実験は、液晶は、機能化されたポリイミド表面上に留められた結合事象を報告することができることを明らかにしている。

【0253】

実施例13 ポリイミド表面上の結合特異性の実証

液晶と組合せたポリイミド表面(SE-7210)を用い、標的分子を特異的に検出することができる。この実験において、本発明者らは、プロテインAで処理した表面上のマウスIgGの検出およびラットIgGの検出の欠損を明らかにしている。プロテインAは、マウスIgGに強力に結合することがわかっているが、これは弱いか無のラットIgGの結合親和性を示す。

【0254】

ガラススライドは、NMPでスクラビングし、NMPにより1700rpmで回転洗浄し、および1.0%固形ポリイミドSE-7210により1700rpmでスピンコーティングした。スライドは、85℃で10分間予備硬化し、その後最終硬化を180℃で15分間行った。ポリイミド表面は、先に説明した標準のラビング条件下で、高圧(2.43)または常圧(2.53)、または低圧(2.63)のいずれかでラビングした。

【0255】

10

20

30

40

50

下記の材料を、列記した順番で、液滴インキュベーションにより添加した：

プロテインA：1mg/ml

BSA：0.1mg/ml

マウスIgG 2a：1 μ M

ラットIgG：1 μ M

【0256】

スライドは、インキュベーションの間に、リン酸緩衝した生理食塩水で洗浄した。これらは、窒素流で乾燥し、トップスライドの追加によりセルを形成した。液晶ZLI-1221を、ガラススライド間の空間に添加した。

【0257】

3種のラビング圧は全て同様の結果を生じた。プロテインA、プロテインA+BSAまたはプロテインA+BSA+ラット抗体を伴う対照試料については、非常に限定された破壊が存在した(試験区域は、交差分極下で暗色に見える)。プロテインA+BSA+マウス抗体を伴う試料についてはほぼ全体の破壊が存在した。この区域は、交差分極下で白色に見えた。ラット抗体のプロテインAへの有意な結合は存在せず、このことは、ポリイミド表面の結合特異性を示している。

【0258】

実施例14 ポリイミド表面は、「サンドイッチ」技術を用い標的分子を特異的に検出することができ、およびこのシステムの感度は、表面上に存在する受容体の量の制御により調節することができる

ガラススライドは、ポリイミドで被覆し、先に説明した標準プロトコールを用いてラビングした。スライドは、下記の試薬により、各試薬について30分間のインキュベーション期間を用い、機能化した。ブロック剤魚ゼラチン中のプロテインAの連続希釈1:99、10:90、25:75および50:50を作成し、表面の標的分子に対する感度を制御した：

プロテインA：1.0mg/ml

魚ゼラチンの30%ストック液を0.1%希釈

抗ビオチン抗体：100 μ g/ml

ビオチン(100 μ g/ml)を、各機能化された区域に添加した。二次抗ビオチン抗体(100 μ g/ml)を塗布した。下記のように処理された対照領域を含んだ：

- 1.プロテインA+魚ゼラチン
- 2.プロテインA+魚ゼラチン+抗体1
- 3.プロテインA+魚ゼラチン+抗体1+ビオチン

【0259】

対照1および2は、交差分極間で目視した場合に暗色に見え、これは液晶が表面上に均一に配列していることを示している。対照3は、最小の破壊を示したが、交差分極間でほとんど暗く見え、これは液晶の均一な配列を示している。プロテインA対魚ゼラチンの比の増大につれて、破壊の程度が増加するように見え、このことは、表面の感度の増加を示している。完全なサンドイッチ、プロテインA+魚ゼラチン+抗体1+ビオチン+抗体2に曝された領域は、交差分極間で目視した場合に白色に見え、これは液晶配列の破壊、その結果の標的分子ビオチンの結合を示している。完全なサンドイッチにおいて、プロテインA対魚ゼラチンの比は全て同様の結果を生じ、このことは比1:99よりも低い濃度を、このアッセイを調節するために使用することができることを示している。

【0260】

実施例15 インキュベーション時間の短縮およびE7 LCFの使用

ポリイミド表面は、実施例12および13に説明されたものと同様に調製した。表面に塗布した試薬も、先の実験と同じであった。この場合、各段階のインキュベーション時間を、2時間から10時間に短縮した。液晶E7を使用した。

【0261】

対照区域の液晶フィルムの最小破壊と比較して、試料視野内に液晶フィルムの破壊のごくわずかな増加が認められた。E7の使用は、マウスIgGの結合に対するLCの反応を有意に

10

20

30

40

50

低下した。この破壊の性質は、5CBまたはZL1-1221を使用した破壊された液晶の概観とは、目視観測で非常に異なった。

【0262】

実施例16 インキュベーション時間の10分間への短縮およびタンパク質濃度の変動

ポリイミド表面は、実施例12および13に説明されたものと同様に調製した。各試薬について、インキュベーション時間10分を使用した。LC ZL1-1221を使用した。標的タンパク質(マウス抗体)の濃度は変動し(0.1 μ M、0.01 μ Mおよび1.0 μ M)、ラット抗体を陰性対照として使用した。

【0263】

液晶フィルムの強力な破壊が、濃度1.0 μ Mのマウス抗体に曝された区域に認められた。10
中等度の破壊が、濃度0.1 μ Mのマウス抗体に曝された区域に認められた。最低濃度(0.01 μ M)のマウス抗体に曝された区域では、液晶フィルムの破壊は認められなかった。これらのラビング条件下での10分間のインキュベーション時間は、0.01 μ M範囲での感度には十分でない可能性がある。

【0264】

実施例17 抗体の2時間インキュベーションによるタンパク質濃度の変動

ポリイミド表面は、実施例12および13に説明されたものと同様に調製した。全ての試薬は、これらの実施例において使用したものと同じであった。ラット抗体を陰性対照として使用した。LC ZL1-1221を使用した。プロテインAおよびBSA曝露に関しては、10分のインキュベーション時間を使用した。20
抗体曝露には2時間のインキュベーションを使用した。

【0265】

1.0 μ Mまたは0.1 μ Mマウス抗体と共にインキュベーションした区域は、液晶フィルムの著しい破壊を示した。0.01 μ Mマウス抗体と共にインキュベーションした区域は、液晶フィルムの破壊を生じなかった。ラット抗体は、破壊を生じなかった。0.01 μ Mアッセイについて表面区域に結合した抗体数は、液晶フィルムの破壊を引き起こすのに必要な閾値以下である。感度は、機能化された表面区域の減少により増加することができる。

【0266】

実施例18 プロテインA結合部位を最小化する魚ゼラチンの使用

4個のポリイミドで被覆およびラビングしたスライドを、以下に列記した材料でプロットした。スライドは、各材料について30分間のインキュベーション時間を用いてプロットした。連続希釈は、プロテインAと希釈した魚ゼラチンの比1:99、10:90、25:75および50:50を用いて行った。各スライドは、4種の混合したプロテインA/魚ゼラチン希釈試料のひとつでプロットした。一次抗体(抗ビオチン)、ビオチン、および二次抗体(抗ビオチン)の連続添加を、特定された区域に添加した。スライドのコーティングおよびラビング手法は、先の実施例において使用されるものと同一であった。試薬は以下である：30

プロテインA:1.0mg/ml

魚ゼラチン:30%ストックの0.1%希釈

抗ビオチン抗体:100 μ g/ml

ビオチン抗原:100 μ g/ml

ZL1-1221

40

【0267】

50:50および25:75試料について、一次抗体がプロテインAに結合した場合に、わずかな破壊が認められた。10:90比について、破壊は前述のものよりも少なく、および1:99については更に少なかった。

【0268】

プロテインAを魚ゼラチンで希釈することにより、一次抗体の量を制限することが可能である。これは、このシステムの感度を制限する方法である。これは、ラビングされたポリイミドを、抗体検出のシステムに加え、抗原の検出のためのアッセイを作成することを目標とするシステムのために使用することを可能にする。これらの結果を基に、1:99より50

も更に低い濃度を用い、かつ一次抗体および抗原の更に少ない破壊を生じつつ、依然二次抗体の結合に反応し良好な破壊を生じることができるように見える。

【0269】

実施例19 VSV-Iの検出

全般的材料：

ウイルス：アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)(Chantilly, VA)から入手した小胞口内炎ウイルス-インディアナ株(VSV-I)を、BHK-21細胞上で増殖した。最初のストックのアリコート、 -80°C で貯蔵し、作業用ストックウイルス調製のために提供した。ウイルス力価は、BHK細胞上でのプラーク形成により計算した。ウイルスは、試験のために、10%ウシ胎仔血清を含む増殖培地で希釈した。

抗体：VSV-Iに対する抗体は、National Veterinary Diagnostic Laboratory(Ames, Iowa)およびATCC(Chantilly, VA)から入手した。

ポリウレタン：Norland Optical Adhesive 61(Norland Products, Cranbury, NJ)

液晶：5CB、E7、ZLI 1221、MLC 1400-100、MLC10000-100(EMD Chemicals)

ポリイミド配列層：SE 7210、SE 7511L(Nissan Chemicals)

ガラススライド：アルミノケイ酸塩、Corning 1737 F

【0270】

電極の幾何学的形状のデザインおよび微小電極の加工

Coulomb 3Dなどの利用可能なソフトウェアを用い、電界をシミュレーションし、平面内の電極間のキャパシタンスを計算した。シミュレーションの結果を基に、適当な電極形状(三角、双曲、交差指状など)およびパラメータ(厚さ、幅、間隔)は、電極の間のキャパシタンスが、容易に検出可能な範囲に、典型的にはpF範囲内に収まるように確定される。

【0271】

電気検出システムの感度の概算推定を行うことができる。このキャパシタンスは、図3bに示したように、幅 $5\mu\text{m}$ およびそれらの間の間隔 $5\mu\text{m}$ の交差指状電極間で計算した。半無限のストリップ近似の使用により、各長さ $500\mu\text{m}$ の50個の指を伴う電極間のキャパシタンスは、 $C=0.4\varepsilon_{\text{eff}}\text{ pF}$ であり、ここで ε_{eff} は電極を覆う媒体の相対誘電率である。LCの均一に配列した層は、平面からホメオトロピック立体配置への配向遷移を受け、有効誘電定数は、 $\varepsilon_{\text{planar}}=38$ から $\varepsilon_{\text{homeo}}=8$ へ変化し(液晶MLC10000-100について算出)、これはキャパシタンス変化 3.2pF から 15pF に対応している。pF範囲のキャパシタンスの変化は、実験室の設定で市販のLCRメーターを用いるか、またはoff-the-shelfチップ(例えばMS3110 Universal Capacitive Readout from MicroSensors Inc, Costa Mesa CA)を使用し示差的キャパシタンスを測定することにより、検出することができる。

【0272】

この検出システムの感度は、キャパシタンス測定に使用される装置の解像度により左右される。市販のLCRメーターおよびoff-the-shelf示差的キャパシタンス測定チップの両方とも、 10pF レベルで 0.1fF の桁の解像度を有する。先に説明された交差指状電極の解像度 0.1fF の概算推定値は、 $500\mu\text{m}\times 500\mu\text{m}$ 区域の総計10ビリオンに相当している。この結果は、電気検出システムの使用により、表面に結合した10ビリオン粒子の検出を可能になることを予測している。

【0273】

交差指状同一平面電極のアレイは、先に説明された計算を基にデザインされる。好ましい態様において、電極は、マイクロメーター範囲であり、およびこれらの電極の加工は、パターン化のための標準のフォトリソグラフィ法、その後の離断(lift off)プロセスを用いて行われる。これらの電極アレイは、市販のガラス基板上で加工される。

【0274】

液晶の平面およびホメオトロピック配向の間のキャパシタンスの変化の推定

先に説明したように加工した電極を用い、実験測定を行い、既知の配向で電極に係留された液晶のキャパシタンスを測定した。これらの測定は、LCの既知の配向を生じているLC配列フィルムで電極をコーティングすることにより行った。薄い(20nm -厚さ)LC配列層(Ni

10

20

30

40

50

ssan SE 7210)を、2個のガラス基板(1個は最適化した電極を伴い、他方は電極を伴わない)上にコーティングし、緩衝し、電極指に対し垂直の予め決定された方位角方向にLC材料を配列している表面形態の異方性を生じた。約 $25\mu\text{m}$ の厚さの光学セルを、各端をMylarフィルムで分離した、これらの2個の基板を一緒にしたクランプ締めにより加工した。液晶4'-シアノ-4'-ペンチルビフェニル(5CB)を、等方相(40°C)で基板間のギャップに注入し、室温に冷却した。精密LCRメーター(HP 42841, Agilent Technologies)を用い、電極間のキャパシタンスを測定した。

【0275】

同様のセルを、ホメオトロピック配列層(Nissan SE 7511L)を用い調製し、および電極間のキャパシタンスを測定した。これらふたつの測定値の比較は、LCが表面へのウイルス結合時に配向遷移を受ける場合の、キャパシタンスの変化の推定を提供した。 10

【0276】

分析用表面の調製

その上に抗体が固定される(ウイルス捕獲のため)化学的に均一な表面を提供するために、同一平面電極アレイを薄いポリマー層でコーティングした。前記実施例は、ポリウレタンフィルム上に固定された抗体は、WNVの検出に十分な結合能を有し、従ってポリウレタンの薄層は、電極アレイ上にスピンコーティングされることを確立した。特にポリウレタンNOA61の薄層を、表面上にスピンコーティングし、真空デシケータ内で脱気した。ポリジメチルシロキサン(PDMS)の平らな小片を、NOA61コーティングしたガラススライド上に配置し、圧縮し脱気した。このサンドイッチを、 365nm の紫外光中で30分間架橋した。PDM 20 Sを、表面から剥離し、基板上にポリウレタンの薄い $\sim 40\mu\text{m}$ 層を得た。PUフィルムが液晶の再配向のために変化を見るには厚すぎる場合は、表面上をスピンコーティングする前に、NOA61をアセトンで希釈することにより、より薄い層を作成した。電極指の間のキャパシタンスを参照のために測定した。

【0277】

分析用表面の機能化およびウイルス結合の光学的確認

抗体の固定にはふたつの手法を利用した。両方とも、前記実施例においてVSVの検出が可能ながわかった。第一の方法は、ポリウレタン表面への抗体の受動吸着を使用する。第二の方法は、抗体の配向した固定を実現するために、プロテインAを利用する。抗体(モノクローナルまたはウサギポリクローナル)は、 $20\mu\text{l}$ 液滴からの表面への吸着が可能である。これらの表面のVSV結合能は、機能化された区域のVSV-Iの溶液への 35°C で1.5時間の揺動を伴う曝露によりバリデーションした。試料はPBSですすぎ、厚さ $20\mu\text{m}$ のMylarス 30 ペーサーを、スライドの各端に配置した。トリデカフルオロ-1,1,2,2-テトラヒドロオクチル-1-トリクロロシラン被覆したスライドを、最上部に置き、底のスライドヘクランプ締めし、光学セルを形成した。 $15\mu\text{l}$ の5CBをセルに添加した。その後表面を、交差(90°)分極フィルター間で目視した。目視の暗視野は、LCのホメオトロピック配列を証明した。

【0278】

実施例20 ウイルスの電氣的検出を実現するための液晶と組合せたキャパシタンス測定値の使用

キャパシタンスの測定

実施例19に説明したようなバリデーションされた表面および電極幾何学的形状を使用し、高精度のLCRメーターを使用し、ウイルスに未結合の表面上の液晶フィルムおよび結合したウイルスを伴う表面上の液晶フィルムを支えている電極間のキャパシタンスの変化を測定した。配向遷移により誘導されたキャパシタンスの変化を決定するために、5種の光学セルを構成した：

- 1)未処理のポリウレタン(PU)表面；
- 2)VSV-Iに対する抗体で処理したPU表面；
- 3)VSV-Iおよび単純ヘルペスなどの非特異的ウイルスに対する抗体で処理したPU表面；
- 4)VSV-Iに対する抗体、およびVSV-Iウイルスで処理したPU表面；および
- 5)非特異的抗体(例えば抗ビオチンIgG)およびVSV-Iウイルスで処理したPU表面。

【0279】

5種のセル全てのふたつの電極間のキャパシタンスの比較は、VSV-Iの表面への特異的結合時のキャパシタンスの変化の定量的測定値を提供する。アッセイ測定のために使用される最終装置を実行する場合、本発明者らは、キャパシタンスを測定するために、MS3110 Universal Capacitive Readout(MicroSensors Inc. CA)に類似した、示差的容量測定システムを使用した。MS3110に似たシステムは、VSVに標的化された抗体で処理された電極と対照表面(例えば非特異的抗体を提示している表面)の間の示差的キャパシタンスの変化の手軽な測定が可能である。このようなシステムの出力電圧は、それに供給されたふたつの入力示差的キャパシタンスの変化の線形関数である。一連のウイルス濃度を試験し、結合したウイルス濃度と液晶フィルムのキャパシタンスの変化の間の相関を確立した。

10

【0280】

最適液晶材料の選択

LCを基にしたアッセイ感度は、ウイルスの結合時に平面からホメオトロピック構成への配向遷移を受けるLCの能力に左右されることが企図されている。この配向遷移を受ける傾向は、LC分子とウイルス粒子の詳細な分子レベルの相互作用に左右される。本発明者らは、5CB、E7、MLC 1400-100、MLC10000-100、TL-205を含む様々なLC材料を、配向遷移を受けるそれらの適用性および有効性に関して評価した。予備的試験において、14種の液晶を、脂質に対するそれらの反応について試験し、脂質への反応においてホメオトロピック配向を呈するものとしてそれらを同定した(表1)。2個の電極の間のキャパシタンスの変化も、LC材料の誘電体異方性により左右され、これは市販のLC材料について最大30である。しかしいくつかの報告書は、少量の極性材料の添加が、LC材料の誘電体異方性を有意に増加することを示唆している。従って、アッセイ感度を究極的に増大するLCの誘電体異方性の増強のためのドーパントとして、 $\text{Sn}_2\text{P}_2\text{S}_6$ などの既知の強誘電性材料を含む装置が構成された(0uskovaら、Dielectric relaxation spectroscopy of a nematic liquid crystal doped with ferroelectric $\text{Sn}_2\text{P}_2\text{S}_6$ nanoparticles、Liquid Crystals、30:1-5(2003))。

20

【0281】

実施例21 ウイルス大量輸送の二元電気泳動による増強

キャパシタンス測定のために利用した電極の存在は、全表面ベースの分析法に立ち向かう基礎となる挑戦に取り組む機会を提供する。すなわち、分析物の試料マトリックスから分析表面への輸送は一般に、表面ベースの分析において律速段階である(時々、十分な結合を生じるために延長されたインキュベーション時間が必要なことがある)。本発明のある方法は、二元電気泳動を介した表面へのウイルス輸送を促進するために、分析表面上に存在する電極を利用する。従って装置内の電極は、多機能であり—これらは、表面へのウイルス輸送速度を増加し(以下に説明されるように、二元電気泳動を介して)、および結合したウイルスの存在を報告するために感度のある方法の基礎を形成する(実施例1~20に説明されたように)の両方の機能がある。

30

【0282】

二元電気泳動は、非均一な交流(AC)電界内で分極可能な粒子が、正味の力(net force)を受け、高いまたは低い電界強度の領域へ移動する現象である。粒子が懸濁媒体よりもより分極可能であるならば、これは強力な電界領域に移動し、および粒子がその媒体よりもより分極可能でないならば、これは低い電界領域に移動する。二元電気泳動力の大きさは、粒子および媒体の誘電特性に加え、電界の勾配および粒子サイズに左右される。勾配 $\nabla |E_{rms}|^2$ を伴う電界内で半径 r_p の粒子に関して、平均二元電気泳動力は下記式で与えられる：

40

$$F_{DEP} = 2\pi r_p^3 \epsilon_m \text{Re}[K_e] \nabla |E_{rms}|^2$$

ここで ϵ_m は、媒体の誘電率であり、 E_{rms} は、電界強度の二乗平均平方根であり、および $\text{Re}[K_e]$ は、下記式で与えられるクラウジス-モソティ因子の実数部であり、

$$K_E = \frac{(\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*)}{(\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*)}$$

ここで ε_p^* および ε_m^* は、各々、粒子および媒体の有効誘電率である。二元電気泳動の力の方向は、粒子および媒体の相対導電率および誘電率により左右される $\text{Re}[K_E]$ の相対符号により決定される。例えば、 $\sigma_m = 600 \text{ mS m}^{-1}$ 、および $\varepsilon_m = 80 \varepsilon_0$ を有する TSE のような生理的媒体中に懸濁された球形のウイルス粒子に関して、単独殻 (single shell) モデルは、10 MHz で $\text{Re}[K_E] = -0.46$ を生じる。この結果は、このウイルス粒子は、10 MHz でより低い電界領域に向かい移動することを示している。これは「負の (negative) 二元電気泳動」と称される。それらの間の $5V_{pp}$ の AC 電界強度で $10 \mu\text{m}$ 間隔の双曲電極により規定される電界勾配において、電極の端に配置された半径 250 nm のウイルス粒子に発揮された二元電気泳動力は、 3 pN である。比較のために、媒体内のこの粒子のブラウン運動に関連した力は、 $F_B = K_B T / (2r_p)$ の桁であり、ここで K_B はボルツマン定数であり、 T は絶対温度である。従って室温で、このウイルス粒子が経験した力は 10^{-2} pN の桁である。これらの結果は、二元電気泳動力は、ウイルス粒子の拡散輸送が原因である粒子に働く熱の力からよりも、大きさが少なくとも 2 桁より強力であることを明確に指摘している。粒子の運動式は、粒子に働くブラウン力および浮力を無視し、二元電気泳動力およびそれに作用する粘度抵抗により決定される。二元電気泳動力 3 pN を用い、ウイルス粒子の速度を、 $700 \mu\text{m s}^{-1}$ と推定した。従ってこの粒子が $100 \mu\text{m}$ の距離を移動するのに必要な時間は、 0.1 秒の桁である。水中に懸濁された粒子の拡散係数は、ストークス-アインシュタイン式を用い概算することができる； $D = K_B T / (6\pi\eta r_p)$ 、ここで η は媒体の粘度係数である。拡散係数は、 $10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ と概算される。ウイルス粒子が二元電気泳動力の非存在下で同じ $100 \mu\text{m}$ の距離を拡散するのに必要な時間は、 1.4 時間である。この簡単な概算推定値は、媒体内に懸濁されたウイルス粒子に働いた二元電気泳動力は、拡散プロセス単独によるものよりも、少なくとも 4 桁の大きさをより早くウイルス粒子を推進することを示している。これらの結果は、二元電気泳動力の印加は、表面上のウイルス粒子の大量輸送を著しく増強し、その結果リアルタイムウイルス検出の基礎を提供することを明確に示している。

【0283】

ウイルスの二元電気泳動のための電極幾何学的形状の最適化

ウイルス粒子に働く DEP 力は、ふたつの電極間の電界の勾配に強力に左右される。この課題において、交差指状、双曲、長方形および三角形などの異なる電極幾何学的形状を、電極間の領域に最大電界勾配を作成するそれらの能力について調べた。この研究は、異なる電極アレイにより形成された電界のコンピューターモデリングにより導かれる。このモデリングは、Coulomb 3D のような市販のソフトウェアを使用する。図 6 は、双曲電極のシミュレーションの結果を示している。これらの結果は、電界勾配は、負の二元電気泳動のためのウイルス収集区域である電極の中心に局所的最小を発揮することを示している。

【0284】

ウイルスの表面への二元電気泳動輸送

Morgan らの結果 (Separation of submicron bioparticles by dielectrophoresis, Biophysical Journal, 77:516-525(1999)) は、ウイルスは、電界周波数 (frequency) の関数として正および負の両二元電気泳動を発揮し、ならびにこの挙動は懸濁媒体の誘電特性に左右されることを指摘している。周波数領域中のこのクロスオーバー作用を、ウイルス粒子の異なる懸濁媒体を用いて調べた。Tris 生理食塩水 EDTA、リン酸緩衝生理食塩水などの緩衝液、10% ウシ胎仔血清に加え様々な動物およびヒト血清を含む最小必須培地などの増殖培地、ならびに標準ウイルス輸送媒体は、それらの誘電特性およびウイルスに働く二元電気泳動力に対するそれらの作用について試験した。最短の時間および最小量の試料で最大反応を生じる、印加された AC 場の強度および周波数、ならびに懸濁媒体のイオン強度などの変数の組合せを確定した。リアルタイムでこれらの事象をモニタリングするために、ウイルス粒子を標識した。Akin らにより最近公開された方法 (Real-time virus trapping

and fluorescent imaging in microfluidic devices、Nano Letters、4:257-259(2004))は、ワクシニアウイルスのエンベロープを標識するために親油性カルボシアニン色素を使用する方法を利用している。これらの色素(DiOC63およびDIL、Molecular Probes、CA)は、ウイルスの脂質膜およびキャプシドタンパク質を標識し、倍率400Xのデジタルエピ蛍光顕微鏡による表面結合したワクシニアの可視化を可能にした。

【0285】

先に説明されたように加工された一体化された微小電極を伴う抗体で機能化された表面を(図3)、標識されたVSV-Iの20 μ L液滴に曝した。電極間の領域の表面へのウイルス粒子の二元電気泳動による移動を誘導するために、AC電界を、電極を横切るように印加した。VSV-Iは、表面上で抗体へ結合していた。電界を停止し、未結合のウイルスを表面から洗

10

【0286】

VSV-Iの二元電気泳動の最適パラメータは、電界の中心領域内に認められる蛍光強度の観察により確定した。蛍光強度は、塗布された試料中のわかっているウイルス濃度と相関していた。5分間でウイルスの最小量の検出を可能にする印加された電界の強度および周波数を、生理的イオン強度の様々な懸濁媒体に対して試験することにより選択した。ウイルス輸送に必要な強度および周波数がどのようにしてこれらの一般的試料液体により影響を受けるかを決定するためには、このような媒体は、典型的には臨床材料、例えば血清、鼻スワブ液、およびウイルス輸送媒体を含む。

20

【0287】

実施例22 非特異的検出後の分析物捕獲のためのビーズの使用

ビーズの調製。Sera-Magビーズ(直径0.8 μ m)を、0.4mg/mL EDC(Aldrich)または1.1mg/mL Sulfo-NHS(Pierce)のいずれかで、機能化した。最初に5% Sera-Magビーズ27 μ lを、機能化剤1mL中に希釈した。15分間反応を実行し、その後2-メルカプトエタノールで停止した。ビーズを、25mM MESおよび37.5mM NaClで3回洗浄した。洗浄したビーズを、11,300rpmで5分間遠心した。緩衝液を除去し、その後新たな緩衝液を添加した。次に0.06 μ M aF1pAb(100 μ g/mL)を1.5~2時間添加し、その間ビーズを回転および混合した。ビーズに、最終濃度10mM D-グルコースアミンを添加することにより、アミンについて反応停止した。その後ビーズを、PBS+D-グルコースアミン(10mM)で20分間洗浄した。ビーズを、通常の微量遠心管に移し、BSAでブロックし、非標的分子のビーズへの非特異的結合を阻止した。

30

【0288】

ペスト菌からのF1抗原の検出。磁気ビーズを、前述のように抗F1ポリクローナル抗体で機能化した。結合液を、PBS、Tween 0.05%、ヘパリン50 μ g/mL、および100mM追加のNaClから調製した。洗浄液を、PBS/Tween 0.05%およびPBS/Tween 0.05%+200mM追加のNaClから調製した。ビーズは機能化し、かつPBS中で0.135% w/vで貯蔵し、これはビーズを使用する濃度と同じであった。この実験において、ビーズ溶液1mLを用い、F1最大5 μ g/mLと99.0%以上結合させた。ビーズへの捕獲前および後に適用されたF1試料にELISAを行った。F1試料を、ELISAストリップウェル上に配置し、抗F1ポリクローナル抗体を用いF1タンパク質のレベルを測定した。次に出発材料および枯渇した材料のふたつの条件で、ELISA比色アッセイの結果を、450nmの吸光度に対し図示した。これは、機能化されたビーズにより捕獲されたF1の割合(%)の概算を可能にする。このデータは、全F1のほとんどが、ビーズに吸収されたことを示した。次にF1抗原を、ポリイミドを含む検出基板表面へ溶離した。ポリイミド表面は下記のように調製した：未希釈のポリイミド7511液を、スライドに塗布し、スピンコーティングし、80°Cで15分間予備硬化し、180°Cで1時間硬化し、RTで貯蔵した。更にこのプロトコルの最終段階で、0.1M pH2.4グリシン10 μ Lを、粒子ビーズと混合し、その後このチューブを微量遠心においてボルテックスし、磁気スタンド上に配置し、上清からビーズの分離を得た。低pHグリシンは、結合したF1およびその抗体複合体のビーズ表面からの溶離に役立つ。溶離液10 μ Lを、LCアッセイのためにポリイミド表面に塗布した。溶離後、薄いMylarフィルムにより検出基板から分離した第二の基板を追加

40

50

することにより、光学セルを形成した。その後メソゲン(5CB)を光学セルに導入した。

【0289】

ポリイミド7511Lで機能化された表面は、結合した分析物の非存在下で、液晶をホメオトロピック配列で配向させる。分析物が存在する場合、ホメオトロピック配向は破壊される。交差分極レンズを通して目視する場合、図8に示したように、ホメオトロピック配向は、暗視野により示されるが、破壊された配向は明視野により示される。デジタル画像は、2枚のポラロイドフィルターにより交差分極構成 0° で撮影された。ポリイミド7511Lスライドは、40%の未希釈ストック液から調製した。これらのスライドは、タンパク質非存在下で、暗いバックグラウンドで示されるように、ホメオトロピック配列を呈した。タンパク質結合時には、ホメオトロピック配列は破壊され、白色のバックグラウンドが示された。上側の列において、左から右へ、aFlpAbビーズからの溶離試料は、BSA 400ng/mL、F1 500pg/mLおよび2.5ng/mLで処理されたRNase Aにより、最初にブロックされた。下側の列は、F1の濃度25,100、および400ng/mLを示している。結合液PBS/T/H/N中の最初のタンパク質結合後、aFlpAbビーズを、PBS/Tween 0.05%、200mM追加のNaCl(PBS/T/N)洗浄液で洗浄した。

10

【0290】

追加の例は、標的分子の存在および量を決定する方法を明らかにしている。次の図9は、増加するF1濃度は、ホメオトロピックに配列しているポリイミド表面上の配列したLC黒色バックグラウンドに対する白色シグナルの増加により示されるような、ホメオトロピック配列の破壊を増加することを明らかにしている。この種のアッセイは、F1抗原のレベルを定量するために使用することができる。

20

【0291】

図9において、デジタル化された図は、交差分極フィルター(0°)を伴う偏光顕微鏡により撮影した。ポリイミド7511Lスライドは、40%未希釈ストック液から調製した。タンパク質の非存在下で、これらのスライドは、暗色バックグラウンドにより示されるホメオトロピック配列を呈した。タンパク質結合時には、ホメオトロピック配列は破壊された(白色バックグラウンドにより示される)。下記の試料を分析した：溶離緩衝液、BSA(200ng/mL)、ならびに10、50および200ng/mLの濃度のF1に曝されたビーズのF1溶離液。条件は先に説明したものである。これらの実験は3つ組で実行し、図9は、シグナルの他の2個の反復(示さず)に対する中間レベルである。認められるように、5ng/mLの分析物を検出することが可能であった。

30

【0292】

図10は、図9に示された実験に関する輝度指数を示す図である。これらの実験は、3つ組で行い、先に選択した図は、シグナルの他の2個の反復に対する中間レベルである。溶離緩衝液も、下記グラフにおいて示される輝度指数の参照として使用するために、ひとつの区域に塗布した。

【0293】

更なる実験において、ラビングされたポリイミド表面を用いた。図11は、交差分極フィルター(0°)を伴う偏光顕微鏡により撮影したデジタル画像を示す。ポリイミドSE 7210 1.5%スライドを、テーブルスピード4.0cm/s、ホイールスピード343rpmで、2.55ml/mの設定でラビングした。図11は、様々な濃度のF1または対照としてのBSAで処理された機能化されたaFlpAbビーズからポリイミド表面への溶離の結果を示している。洗浄時に、ビーズは、追加のウサギ抗マウスIgG($5\mu\text{g/mL}$)および抗マウスFc IgG($6\mu\text{g/mL}$)で処理した。この複合体を、0.1Mグリシン(pH2.3)の10 μl 酸溶離液で、ビーズから溶離した。溶離した試料を、1M Tris(pH7.5)の1 μl の添加により中和した。試料は、ポリイミド基板と接触させ、ブルドッグクランプで最初に別の基板にクランプ締めしている基板上にMylarスペーサーを配置することにより、光学セルを構成した。5CBを液相に塗布し、冷却後、デジタル画像を撮影した。

40

【0294】

図12は、複合培地(ニワトリ血清)から分析物(F1)を検出することを明らかにしている更

50

なる実験の結果を提供する。これらの実験において、ニワトリ血清(CS)は、結合溶液PBS/T/H/Nにより20%に希釈した。先のように機能化されたBSAでブロックしたビーズを使用した。6個のaF1pAbビーズの0.5mL懸濁液(濃度0.135%)を、希釈したCSと接触させた。結合後、全てのチューブを、PBS/Tween緩衝液で洗浄した。これらのビーズは、その後100 μ Lの0.5XPBS+2mM SDSまたは100 μ Lの0.1Mグリシン(pH4.0)により、2回目洗浄した。混合後、洗浄緩衝液を、PBS/Tween 0.05%中でビーズをペレット化することにより除去した。ビーズは次に、PBS/Tween/NaCl(追加の200mM)で洗浄した。その後aF1mAbの3 μ g/mLを、0.5mLチューブ中のビーズに添加した。この反応液を混合し、上清を除去した。次に5 μ g/mLのRAMおよび抗マウスFC IgGの両方の0.75mLを、5分間添加した。ビーズを、PBS/Tween/NaClで、次にPBSで洗浄した。溶離緩衝液(10 μ L)を各チューブに添加し、3~4分間ボルテックスすることにより混合した。溶離緩衝液(2 μ Lアリコート)を、7511Lホメオトロピックポリイミドスライドに塗布した。スライドは、液滴が蒸発するまで、加熱したプレート上に2~3分間放置した。その後スライドを、dH₂Oで洗浄し、窒素ガスで乾燥した。ブルドッククランプを用い、間にmylarスパーサーを伴い、処理した基板と他の基板を一緒にクランプ締めし、光学セルを構成した。ネマチック相の5CBを、室温で適用した。5分後、ホメオトロピック液晶を認めた。

10

【0295】

図12は、交差分極フィルター(0°)で撮影したデジタル画像である。上列において、処理したビーズからの溶離液は、20%CSと接触させ、追加洗浄なし、SDS洗浄、および0.1Mグリシン(pH4.0)洗浄である。下列において、ビーズからの溶離液は、20%CS+F1 50ng/mLと接触させ、追加洗浄なし、SDS洗浄、または0.1Mグリシン(pH4.0)洗浄である。図13は、偏光顕微鏡で分析した同じ実験の結果を示している。デジタル画像を、偏光顕微鏡により撮影し、ここでポラロイドフィルターは、交差分極0°であった。処理の順序は、図12と同じであった。

20

【0296】

SDSおよび0.1Mグリシン洗浄を行い、機能化されたビーズからBSAブロッカーを除去し、その結果F1検出と干渉するBSAシグナルは存在しなかった。図12および図13(偏光顕微鏡画像)において認められるように、SDSおよびグリシンの両洗浄は、対照の上列の2番目および3番目のスポット(20%ニワトリ血清)からのシグナルを排除した。機能化されたビーズはBSAでブロックされたので、恐らくシグナルを生じるBSAブロッカーが1番目のスポットで認められたのであろう。

30

【0297】

実施例23 細胞による液晶のホメオトロピック配向

表2および3は、様々な液晶が、培養細胞によりホメオトロピック配向されるそれらの能力について調べた実験の結果を示している。多くの液晶は、リン脂質およびコレステロールに対する反応において、ホメオトロピックに配列する。リン脂質(2 μ L; クロロホルム中0.01M)を、ガラススライド上の区切られた印を付けた区域に塗布した。リン脂質は、ジオレオイルアルキル鎖および下記のヘッド基を有した：ホスファチジルセリン(DOPS)、ホスファチジルグリセロール(DOPG)、ホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、ホスファチジルセリン(DOPS)、ホスファチジル酸(DOPA)、およびリソホスファチジルコリン(DOLPC)。溶媒を乾燥した後、光学セルを、ネマチックに適用した液晶と共に集成し、かつ等方性に加熱した。ホメオトロピック配列を、コノスコープ分析により確認した。Chol=コレステロール; C=コレステリック配列; Bkg=バックグランド配列; U=未配列; H=ホメオトロピックな配列; NDはバックグランドのために行わなかったことを示す; 40CB、4-オクチル-4-ビフェニル-カルボニトリル(Aldrich); 6CHBT、1-(trans-4-ヘキシルクロヘキシル)-4-イソチオシアナト-ベンゼン。他の液晶は全てEM Industries/Merckから得た。

40

【0298】

(表2) 細胞および媒体に曝されたスライドによる配列に関する液晶の研究

液晶	FBS/DMEM	3T3細胞
4OCB	破壊された	ホメオトロピック
5CB	破壊された	ホメオトロピック
6CHBT	欠損のある平面	ホメオトロピック
E7	破壊された	ホメオトロピック
ZLI-1221	平面、筋状	破壊された
ZLI-1557	筋状の欠損がある平面	ホメオトロピック
ZLI-2222	小さい欠損のある平面	ホメオトロピック
ZLI-3225	筋状の欠損がある平面	ホメオトロピック (傾いた)
ZLI-3497	筋状の欠損がある平面	ホメオトロピック (傾いた)
ZLI-4431	筋状の欠損がある平面	ホメオトロピック (傾いた)
ZLI-4446	欠損のある平面	ホメオトロピック
ZLI-5070	筋状の欠損がある平面	ホメオトロピック (傾いた)
MLC-6080	ねじれた欠損のある平面	ホメオトロピック
MLC-6466	筋状の欠損がある平面	ホメオトロピック
MLC-6710-080	筋状の欠損がある平面	ホメオトロピック
MLC-15700-000	平面、筋状	ホメオトロピック
TL205	若干平面	ホメオトロピック

10

20

【0299】

(表3) 液晶配列に対するリン脂質の影響の研究

液晶	Bkg	DOPS	DOPG	DOPC	DOPE	DOPA	DOLPC	Chol
4OCB	H	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5CB		U	H	H	H	平面	H	U
6CHBT		U	H	H	H	H	H	U
E7		捻れた平面	H	H	H	捻れた平面	H	H
ZLI-1221		H	H	H	H	H	H	H
ZLI-1557		H	H	H	H	H	H	H
ZLI-2222		H	H	H	H	H	H	H
ZLI-3225		U	H	H	H	H	H	H
ZLI-3497	H	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ZLI-4431	Chol	U	U	U	U	U	U	U
ZLI-4446	H	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ZLI-5070		捻れた平面	H	H	H	H	H	H
MLC-6080		U	H	H	H	H	H	H
MLC-6466		U	H	H	H	H	H	H
MLC-6710-080		U	H	H	H	H	H	H
MLC-15700-000		H	H	H	U	H	H	U
TL205		U	H	H	H	H	H	H

30

【0300】

実施例24 タグ付き脂質による分析物の検出

この実験は、液晶を用いる、固定された抗ビオチン抗体に対するビオチンで標識したりポソームの結合の検出を説明している。抗ビオチン抗体が固定されたガラス基板は、下記のように調製した。プラズマ集塵機(20分間、275ワット、200millitor)中で洗浄したPrecisionCTスライド(Bioslide Technologies; カタログ番号BSP-SC02-C)を、無水アセトン中の2% APES(3-アミノプロピルトリエトキシシラン; Pierce)中に2分間含浸した。スライドを、純粋なアセトンに移し、5分間攪拌し、アセトンで洗浄し、過剰なシランを除去した。スライドを、窒素で乾燥し、110℃の炉の中に45分間放置した。スライドを炉から取り出し、これらが室温に達した後、スライドの片側に区域に印を付けた。BS3(ビス(スルホスクシンイミジル)スベレート; Pierce)架橋剤1mg/mlを、印を付けた区域に10μl液滴と

40

50

して塗布し、室温で15分間インキュベーションした。水で過剰な架橋剤をすすいだ後、表面を窒素ガスで乾燥した。100ug/mlおよび20ug/ml抗ビオチン抗体(Sigma; ヤギにおいて産生した抗ビオチン抗体)を、BS3処理した表面に塗布し、室温で2時間または室温で1時間インキュベーションし、その後4℃で一晩移した。抗体が固定された表面を、ミリQ水ですすぎ、未結合のタンパク質を除去し、N₂で乾燥した。ビオチンで標識したリポソーム(17.84 μmolリン脂質/ml)および未標識のリポソーム(18.7 μmolリン脂質/ml)を、PBS緩衝液で100倍希釈し、リポソーム10ulを抗ビオチン抗体処理した表面に塗布した。PBS緩衝液を、緩衝液対照としてひとつの区域に添加した。室温で1.5時間インキュベーションした後、表面を、水ですすぎ、N₂で乾燥した。2種のタンパク質で処理した表面を、二つの側に20 μm Mylarスパーサーを挿入することにより離れて維持し、ふたつの表面を、逆平行に配列した。ふたつの表面は、Mylarを配置した側に沿って配置したブルドッグクリップを用い、互いに一緒に保持した。セルを、ホットプレート上に配置することにより、~40℃で加熱した。同じく熱空気を使用し、セルの周囲の空気を温めた。5CBを、ガラスシリンジ内でその等方相に加熱した。5CBの液滴を、毛管力により、ふたつの表面の間の洞に垂らした。一旦5CBが充填されると、セルはホットプレートから取り除いた。室温に達した後、5CBの等方相は、ネマチック状態に変換した。光学画像を、偏光顕微鏡を用い、交差分極位置で撮影した。前記実験を、3つ組で行った。1回の実験のデータを、図15に示した。

【0301】

ビオチン標識したリポソームの固定された抗ビオチン抗体への結合は、破壊された表面をホメオトロピック(黒色)に変化させ、そこで非標識のリポソームによる変化は認められなかった。この実験は、受容体-リガンド相互作用を研究するための、標的分子で標識したリポソームの使用を明らかにしている。

【0302】

ビオチン標識したリポソームは、100 μmol(75mg)卵ホスファチジルコリン; 1 μmol(1.28mg)ホスファチジルエタノールアミン-N-(リサミンローダミンB; スルホニル)アンモニウム塩; 1 μmol(1.05mg)1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-(capビオチニル)ナトリウム塩から調製した。対照リポソームは、100 μmol(75mg)卵ホスファチジルコリン; 1 μmol(1.28mg); ホスファチジルエタノールアミン-N-(リサミンローダミンBスルホニル)アンモニウム塩から調製した。

【0303】

これらの脂質混合物を、クロロホルム溶液中で望ましい量の成分を一緒にすることにより調製した。その後各溶液は、リポソーム調製のために2分した。各バッチについて、溶液は、回転蒸発器上のB24/40煮沸チューブ中で乾燥した。得られたフィルムを、水和したイソプロピルエーテル5ml中に懸濁した。この脂質溶液に、緩衝液2mlを添加した。この段階で、緩衝液は、エーテル相とは混合しない。このチューブにストッパーを付け、混合物を浴型超音波処理装置(Laboratory Supply company, Hicksville NY)中で55℃で音波処理し、エーテル中水型エマルジョンを生じた。その後このエマルジョンからエーテルを、回転蒸発器、浴温度55℃を用いて蒸発させた。エーテル除去後、混合物は粘稠なゲルを生じ、これは攪拌時に破壊され、リポソーム懸濁液を生じた。リポソーム形成後、それぞれ試料および対照リポソームのためのふたつの50 μmolバッチを、次の段階のために一緒にした。

【0304】

次にリポソームのサイズを、規定された細孔径の一連のポリカーボネート膜を通過する押出として公知のプロセスにより、より小さくより均一な直径に減少した。押出チャンバーは60℃に加熱し、リポソームは、0.4 μmの細孔径ポリカーボネート膜を5回通過させ、その後0.1 μm細孔径のポリカーボネート膜を5回通過させた。押出プロセスは、懸濁液の濁度を著しく減少した。

【0305】

その後リポソームは、イソプロピルエーテルの微量残留物を除去するために、1Lの懸濁液緩衝液に対して4℃で一晩透析した。リポソームは、Bartlettリンアッセイを用い、そ

10

20

30

40

50

これらのリン脂質含量について分析し、以下を含むことがわかった：

試料(ビオチン)リポソーム：17.84 μmol リン脂質/ml

対照リポソーム：18.7 μmol リン脂質/ml

リポソームは、それらのサイズについて、Nicomp 380粒子選別器を用いて分析した。容積加重したガウス平均直径は以下であった：

試料(ビオチン)リポソーム：134nm

対照リポソーム：157nm。

【0306】

本明細書において言及された全ての刊行物および特許は、本明細書に参照として組入れられている。本発明の範囲および精神を逸脱しない、本発明の説明された方法およびシステムの様々な修飾および変動は、当業者に明らかであろう。本発明は特に好ましい態様に 10
関連付けて説明されているが、請求された本発明は、このような特定の態様に必要以上に制限されないことは理解されなければならない。実際、有機化学、材料科学、化学エンジニアリング、ウイルス学、生物学、遺伝学、または関連する分野の業者には明らかであるような、本発明を実行するために説明された様式の様々な修飾が、「特許請求の範囲」内であることが意図されている。

【図面の簡単な説明】

【0307】

【図1】結合したウイルスにより指示された液晶のホメオトロピック配向を表している、本発明のアッセイ装置の概略図である。 20

【図2】陽性ウマおよびウサギ血清中の西ナイルウイルス抗体の存在に関するトランスファーアッセイの写真を、陰性対照と共に提供する。

【図3】図3aおよび3bは、本発明の装置および好ましい電極の概略図を提供する。(a)LCを使用するウイルス粒子の検出の原理を示す概略断面図。抗体で被覆されたナノ構造表面に支持された液晶分子は、平面配向を呈している。表面上へのウイルスの結合時に、分子は、表面に対し垂直に配列し、ふたつの電極間のキャパシタンスに電荷を誘導する。(b)交差指状電極の概略。矢印のサイズは、500 μm の桁である。

【図4】本発明のPDMSスタンプの画像である。

【図5】本発明のアッセイ装置で行ったアッセイの画像である。

【図6】図6a、図6bおよび図6cは、双曲電極のシミュレーションの結果を示す。(a)双曲電極の概略、(b)3Dのラプラス式を解いて得られた電極面の電圧分布、(c)電極面上の $z=4\mu\text{m}$ での平面内の E^2 勾配、ならびに(d) $y=0$ 面 30

【図7】図7aおよび図7bは、二元電気泳動のために構成された装置の概略を示す。(a)二元電気泳動の構成の概略、(b)中心に穴を伴う厚さ2mmのPDMSシートは、「活性」領域に試料を閉込める。

【図8】分析物の非特異的検出のためにポリイミド被覆した基板を使用するアッセイの画像である。

【図9】分析物の非特異的検出のためにポリイミド被覆した基板を使用するアッセイの画像である。

【図10】図9に示された実験に関する輝度指数の図示である。 40

【図11】分析物の非特異的検出のためにポリイミド被覆した基板を使用するアッセイの画像である。

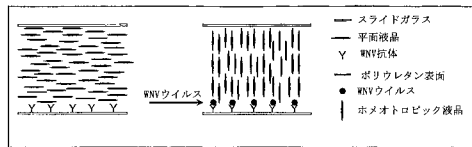
【図12】ニワトリ血清中のF1検出の結果の画像である。

【図13】偏光顕微鏡で撮影した図12と同じ実験の結果の画像である。

【図14】本発明の読取り装置の概略図である。

【図15】標識されたりポソームがリガンド結合を報告するために使用される実験の画像である。

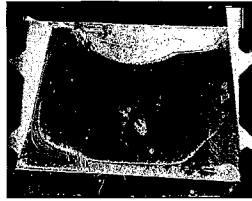
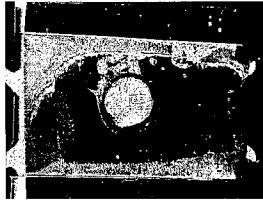
【図 1】



【図 2】

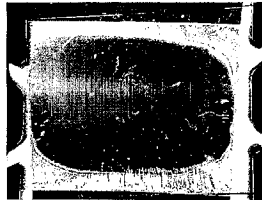
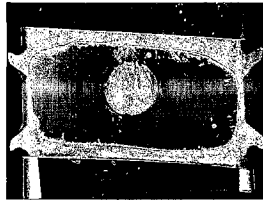
抗E ウサギポリクローナル抗体

-ウサギ血清



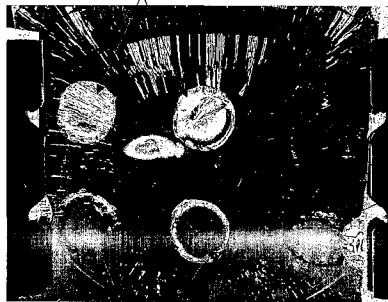
+ウマ血清

-ウマ血清



【図 5】

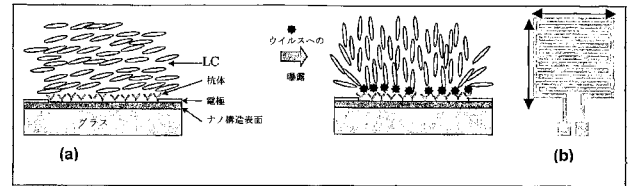
ビオチン化されたBSAおよび抗体混合物



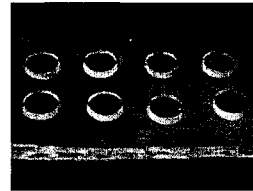
タンパク質および抗体混合物

陰性対照

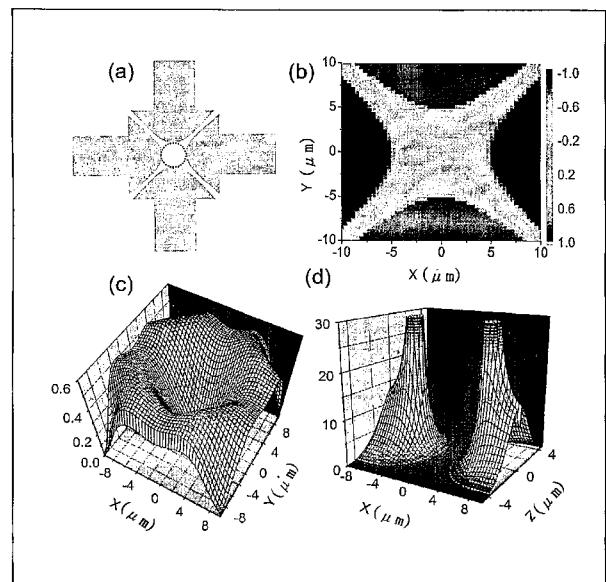
【図 3】



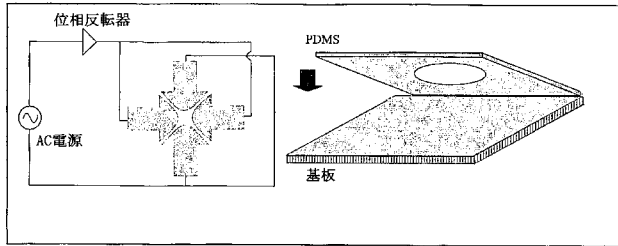
【図 4】



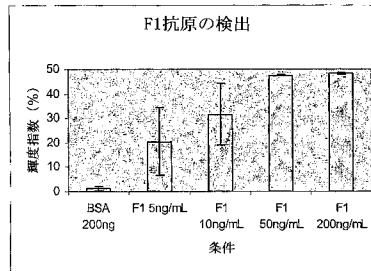
【図 6】



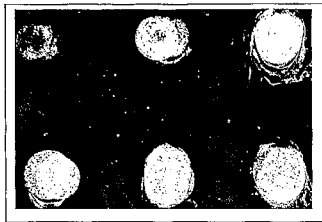
【図 7】



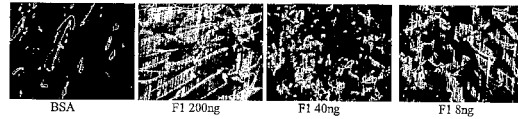
【図 10】



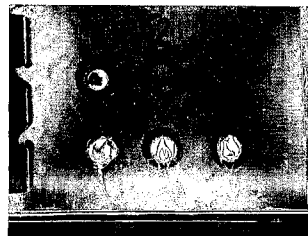
【図 8】



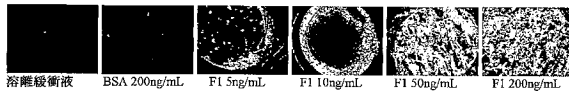
【図 11】



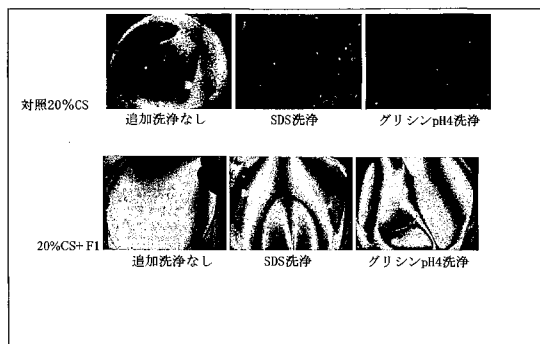
【図 12】



【図 9】



【図 13】



【図 15】

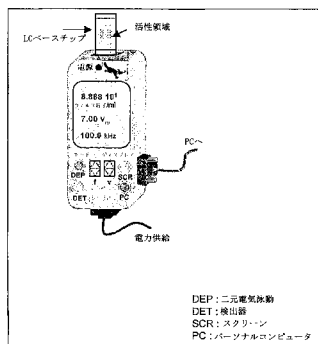
以下に示すものに曝露後、抗ビオチン抗体(100 μ g/ml)が固定された基板:



以下に示すものに曝露後、抗ビオチン抗体(20 μ g/ml)が固定された基板:



【図 14】



【国際調査報告】

60600980022



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/23823

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/70; C12N 7/00, 7/01; A61K 39/42 US CL : 435/5, 235.1; 424/149.1, 204.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/5, 235.1; 424/149.1, 204.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PUBMED, DERWENT, ELSEVIER BIOBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A		10, 32-52, 55, 58, 60-64, 77, 78, 86, 87, 94-96, 98, 100-104, 110-114, 117, 125, 126, 129-201, 204-209
X	GUPTA, V.K. Optical Amplification of Ligand-Receptor Binding Using Liquid Crystals. Science. 27 March 1998, Vol. 279, pages 2077-2080, entire document.	65-76, 83-85, 88-93, 97, 99, 105-109, 115, 116, 118-124, 127, 128, 202, 203
Y		1-9, 11-31, 79-82
X	US 4,297,879 A (PIDGEON) 22 May 1990 (22.05.1990), column 4, lines 11-18.	53, 54, 56, 57, 59
Y	US 5,298,394 A (ARRMA et al.) 29 March 1994 (29.05.1994), column 32, lines 12-67.	1-9, 11-31, 79-82
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 June 2005 (26.06.2005)		Date of mailing of the international search report 09 DEC 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Timothy M. Brown Telephone No. (571) 272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

26. 7. 2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	U
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 2 F	1/13	(2006.01)	C 1 2 M 1/34	B
			G 0 2 F 1/13	5 0 5

(31)優先権主張番号 10/897626

(32)優先日 平成16年7月23日(2004.7.23)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. ポラロイド

(72)発明者 アボット ニコラス
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 マディソン ジェファーソン ストリート 2 1 2 0

(72)発明者 マーフィー クリストファー
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 マディソン ウッド レーン 1 5 0 9

(72)発明者 ホリスター カーラ
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 マディソン フォードム アベニュー 1 6 1 8 アパート
メント 3 1 7

(72)発明者 ソルタニナザブ サイラス
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 マディソン レイモンド ロード 5 3 0 5

(72)発明者 ハンズマン ダグ
アメリカ合衆国 イリノイ州 リバティービル エイコーン レーン 1 8 5

(72)発明者 アチャーリヤ バラット ラジ
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 マディソン ノース オー クレール アベニュー 4 0 2
アパートメント 1 1 6

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA28 CA26 CB03 CB07 CB08 CB14 DA13 DA14 DA36
FA11 FB02 FB03
2H088 EA51 FA20 GA02 JA10 JA28 MA20
4B029 AA07 BB13 CC08 FA02
4B063 QA18 QA19 QQ10 QR32 QR48 QR55 QR66 QR82 QS33 QS34
QS36 QS39 QX02

专利名称(译)	基于液晶的分析物检测		
公开(公告)号	JP2007507688A	公开(公告)日	2007-03-29
申请号	JP2006521943	申请日	2004-07-23
[标]申请(专利权)人(译)	鸭嘴兽技术有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	鸭嘴兽技术有限责任公司		
[标]发明人	イスラエルバーバラ アボットニコラス マーフィークリストファー ホリスターカーラ ソルタニナザブサイラス ハンズマンダグ アチャーリヤバラットラジ		
发明人	イスラエル バーバラ アボット ニコラス マーフィー クリストファー ホリスター カーラ ソルタニナザブ サイラス ハンズマン ダグ アチャーリヤ バラット ラジ		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/483 G01N33/545 G01N33/53 G01N37/00 C12Q1/68 C12M1/34 G02F1/13 C12Q1/70 G01N G01N33/543		
CPC分类号	C12Q1/70 B82Y15/00 B82Y30/00 G01N33/54373 G01N33/56983 Y02A50/60		
FI分类号	G01N33/569.G G01N33/483.C G01N33/545.Z G01N33/53.D G01N37/00.102 G01N33/53.U C12Q1/68. A C12M1/34.B G02F1/13.505		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA28 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB08 2G045/CB14 2G045/ /DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB02 2G045/FB03 2H088/EA51 2H088/FA20 2H088/GA02 2H088/JA10 2H088/JA28 2H088/MA20 4B029/AA07 4B029/BB13 4B029/CC08 4B029/ /FA02 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ10 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/490122 2003-07-25 US 60/518706 2003-11-10 US 60/541516 2004-02-03 US 10/897626 2004-07-23 US		
其他公开文献	JP4950663B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及病毒检测领域，特别是使用液晶分析形式的病毒检测。在本发明中，检测区域内的病毒结合通过由与检测区域相关的任何形貌引起的与取向无关的病毒结合引起的液晶比对的变化来识别。

(表3) 液晶配列に対するリン脂質の影響の研究

液晶	Bkg	DOPS	DOPG	DOPC	DOPE	DOPA	DOLPC	Chol
4OCB	H	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5CB		U	H	H	H	平面	H	U
6CHBT		U	H	H	H	H	H	U
E7		捻れた平面	H	H	H	捻れた平面	H	H
ZLI-1221		H	H	H	H	H	H	H
ZLI-1557		H	H	H	H	H	H	H
ZLI-2222		H	H	H	H	H	H	H
ZLI-3225		U	H	H	H	H	H	H
ZLI-3497	H	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ZLI-4431	Chol	U	U	U	U	U	U	U
ZLI-4446	H	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ZLI-5070		捻れた平面	H	H	H	H	H	H
MLC-6080		U	H	H	H	H	H	H
MLC-6466		U	H	H	H	H	H	H
MLC-6710-080		U	H	H	H	H	H	H
MLC-15700-000		H	H	H	U	H	H	U
TL205		U	H	H	H	H	H	H