

(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2005-502873

(P2005-502873A)

(43) 公表日 平成17年1月27日(2005.1.27)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/573	GO 1 N 33/573	2 G O 4 5
B 8 1 B 3/00	B 8 1 B 3/00	4 B O 2 9
C 1 2 M 1/34	C 1 2 M 1/34	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/34	C 1 2 Q 1/34	
GO 1 N 33/15	GO 1 N 33/15	Z
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く		

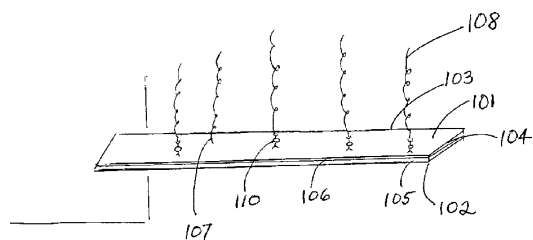
(21) 出願番号	特願2003-527389 (P2003-527389)	(71) 出願人	500214336 プロウティヴァリス、インク アメリカ合衆国メリーランド州 2085 O、ロックヴィル、グレート・セニカ・ハ イウェイ 9700
(86) (22) 出願日	平成14年9月11日 (2002. 9. 11)	(74) 代理人	100071010 弁理士 山崎 行造
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月11日 (2004. 3. 11)	(74) 代理人	100104086 弁理士 岩橋 越夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/028920	(74) 代理人	100121762 弁理士 杉山 直人
(87) 国際公開番号	W02003/023363	(74) 代理人	100126767 弁理士 白銀 博
(87) 国際公開日	平成15年3月20日 (2003. 3. 20)	(74) 代理人	100122839 弁理士 星 貴子
(31) 優先権主張番号	09/951, 131		
(32) 優先日	平成13年9月12日 (2001. 9. 12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素検出のためのマイクロカンチレバー装置及び方法

(57) 【要約】

酵素のための基質を含むマイクロカンチレバーの偏向の変化を測定することにより酵素を検出するための装置及び方法を提供する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

酵素を検出する方法であって、該方法は以下を含む：少なくとも 1 のマイクロカンチレバーの第 1 の表面上にコーティング物質を溶着する工程；酵素と相互作用できる少なくとも 1 の基質をコーティング物質に加える工程；基質を含むマイクロカンチレバーをサンプルに暴露する工程；及びマイクロカンチレバーの偏向を測定する工程であって、該偏向はサンプル中の酵素の存在を示す。

## 【請求項 2】

基質の添加は少なくとも 1 の生体物質の添加を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

生体物質の添加は、核酸、タンパク質、脂質、炭化水素及び多糖類からなる群より選択される物質を加える、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

加える基質が薬物である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

偏向がマイクロカンチレバー表面上の応力変化により生じる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

偏向測定が、光学的手段、電子トンネル手段、静電容量手段、圧電手段及びピエゾ抵抗手段からなる群より選択される手段により変化を観測する、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

偏向測定が光学的手段を用いる、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

光学的手段がレーザーを含む、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

さらに、マイクロカンチレバー偏向をマイクロカンチレバーがサンプルに暴露された時間から決定される時間パラメータの関数として分析することを含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

偏向分析が、時間パラメータの関数としてマイクロカンチレバーの偏向を比較、計算及び記憶するように適応させた超小型演算装置を用いることを含む、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

偏向分析がさらに、酵素濃度、基質濃度、共同因子の存在及び阻害物質の存在より選択されるパラメータを分析することを含む、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 12】

マイクロカンチレバーが長さ約 100  $\mu\text{m}$  ~ 約 750  $\mu\text{m}$ 、幅約 20  $\mu\text{m}$  ~ 約 300  $\mu\text{m}$ 、及び厚さ約 0.1  $\mu\text{m}$  ~ 約 10  $\mu\text{m}$  である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 13】

コーティング物質の溶着は、さらに金属の溶着を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 14】

金属が、アルミニウム、銅、金、クロム、チタニウム及び銀からなる群より選択される少なくとも 1 つである、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

金属が金である、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

コーティング物質の溶着は、さらに複数の金属の溶着を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 17】

複数の金属の溶着がさらに、クロムの第 1 の層及び金の第 2 の層を溶着することを含む、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 18】

10

20

30

40

50

複数の金属の溶着がさらに、チタニウムの第1の層及び金の第1の層を溶着することを含む、請求項16に記載の方法。

【請求項19】

金属がアマルガムまたは合金である、請求項13に記載の方法。

【請求項20】

マイクロカンチレバーが酸化アルミニウム、酸化イリジウム、シリコン、酸化シリコン、窒化シリコン、五酸化タンタラム及びプラスチックポリマーからなる群より選択される第2の表面を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項21】

第1の表面に基質を加える前に、さらに基質と反応できる二官能性架橋剤と第1の表面を反応させる工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。 10

【請求項22】

二官能性架橋剤が、ジチオビス(スクシンイミドウンデカノエート)(DSU);長鎖スクシンイミド-6-[3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサノエート(LCSPDP);スクシンイミジル-6-[3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサノエート(SPDP);及びm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)からなる群より選択される、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

二官能性架橋剤がDSUである、請求項21に記載の方法。 20

【請求項24】

基質の添加により、加水分解酵素、酸化還元酵素、転移酵素、リアーゼ、及びリガーゼからなる群より選択される酵素を検出するためのマイクロカンチレバーに設計する、請求項1に記載の方法。

【請求項25】

酵素が加水分解酵素である、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

加水分解酵素がプロテアーゼである、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

酵素がキナーゼ、ホスファターゼ、エンドペプチターゼ、エキソペプチターゼ、制限エンドヌクラーゼ、エキソヌクラーゼ及びポリメラーゼからなる群より選択される、請求項1に記載の方法。 30

【請求項28】

プロテアーゼがメタロプロテアーゼまたはセリンプロテアーゼである、請求項26に記載の方法。

【請求項29】

転移酵素がグリコシルトランスフェラーゼ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、アセチルトランスフェラーゼ及びDNAメチルトランスフェラーゼからなる群より選択される、請求項24に記載の方法。

【請求項30】

リアーゼが多糖リアーゼ、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルCoAリアーゼ、アルギニノスクシネートリアーゼ及びイソシトレートリアーゼからなる群より選択される、請求項24に記載の方法。 40

【請求項31】

酸化還元酵素がヒドロキシルアミン・オキシドレダクターゼ、グリホスフェート・オキシドレダクターゼ、キニーネ・オキシドレダクターゼ、ユビキノン・オキシドレダクターゼ及びタンパク質ジスルフィド・オキシドレダクターゼからなる群より選択される、請求項24に記載の方法。

【請求項32】

サンプルが十分に精製された酵素を含む、請求項1に記載の方法。 50

## 【請求項 33】

サンプルが生体液を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 34】

生体液が細胞溶解物、培養基、使用済み媒体、動物抽出物及び植物抽出物からなる群より選択される、請求項 33 に記載の方法。

## 【請求項 35】

生体液が脊椎動物の体液を含む、請求項 33 に記載の方法。

## 【請求項 36】

脊椎動物が哺乳類である、請求項 35 に記載の方法。

## 【請求項 37】

哺乳類が人間である、請求項 36 に記載の方法。

## 【請求項 38】

体液が、血液、リンパ液、組織液、尿、胆汁、汗、滑液、羊水、腹水、心嚢液、胸膜液、脳脊髄液、胃液、腸液、関節腔液、涙液及び鼻汁からなる群より選択される、請求項 35 に記載の方法。

## 【請求項 39】

酵素が脊椎動物の病状に関連するものである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 40】

病状が遺伝的欠陥である、請求項 39 に記載の方法。

## 【請求項 41】

病状が、ファブリー病、ゴーシェ病、テイ - サックス病、レッシュ - ナイハン病、マンノシドーシス病、X連鎖性糸球体病、及びムコ多糖症からなる群より選択される、請求項 40 に記載の方法。

## 【請求項 42】

病状が癌である、請求項 39 に記載の方法。

## 【請求項 43】

癌が脳、肝臓、すい臓、肺、前立腺または乳癌からなる群より選択される、請求項 42 に記載の方法。

## 【請求項 44】

癌が前立腺癌であり、酵素が前立腺特異抗原である、請求項 43 に記載の方法。

## 【請求項 45】

癌が乳癌であり、酵素がコラゲナーゼである、請求項 43 に記載の方法。

## 【請求項 46】

病状が病原菌の存在によるものである、請求項 39 に記載の方法。

## 【請求項 47】

病原菌が、ウイルス、細菌、真菌、原生動物、ぜん虫からなる群より選択される、請求項 46 に記載の方法。

## 【請求項 48】

少なくとも 1 のマイクロカンチレバーが複数のマイクロカンチレバーを有するブロックアレイである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 49】

基質に結合するサンプル中の関連物質を検出する方法であって、該物質検出はマイクロフォースに応答するように構成された少なくとも 1 のマイクロカンチレバーを含み、該方法は以下を含む：マイクロカンチレバーの第 1 の表面上にコーティング物質を溶着する工程；該物質と相互作用できる少なくとも 1 の基質をコーティング物質に加える工程；基質を含むマイクロカンチレバーをサンプルに暴露する工程；及びマイクロカンチレバー表面上の最終的な自由表面エネルギー電荷を測定する工程であって、表面エネルギー電荷はサンプル中の関連物質が基質へ結合したことを示す。

## 【請求項 50】

関連物質が、結合タンパク質、酵素、共同因子、受容体配位子、抗体、多糖類、脂質、核

10

20

30

40

50

酸及びステロイドからなる群より選択される、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

関連物質が酵素である、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 2】

酵素が基質に結合して分離しない、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

酵素が基質上で活性を有さない、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

基質が非切断型偽基質である、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 5】

基質が複数の生体物質である、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 6】

基質が酵素活性の阻害物質を含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

コーティングを有するマイクロカンチレバー上の酵素含有基質の阻害物質をスクリーニングする方法であって、該方法は以下を含む：第 1 のマイクロカンチレバー及び第 2 のマイクロカンチレバーの第 1 の側面に酵素と相互作用できる基質を加える工程；候補阻害物質と酵素を含むサンプルに基質を有する第 1 のマイクロカンチレバーを暴露する工程；及び第 1 のマイクロカンチレバーの偏向を、候補阻害物質を含まない同一の酵素に暴露した第 2 のマイクロカンチレバーの偏向と比較して測定する工程。

【請求項 5 8】

第 1 のマイクロカンチレバーがマイクロ流体工学装置の第 1 の相互作用細胞中に位置し、及び第 2 のマイクロカンチレバーが第 2 の相互作用細胞中に位置する、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

第 3 の相互作用細胞中に位置する第 3 のマイクロカンチレバー及び第 4 の相互作用細胞中に位置する第 4 のマイクロカンチレバーが第 1 及び第 2 の細胞と異なる濃度の酵素に暴露される、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

第 3 の相互作用細胞中に位置する第 3 のマイクロカンチレバー及び第 4 の相互作用細胞中に位置する第 4 のマイクロカンチレバーが、第 1 の相互作用細胞中の候補物質と異なる候補阻害物質を含有するサンプルに暴露される、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 1】

酵素と生体物質間の相互作用により生じるマイクロフォースを測定するための装置であって、少なくとも 1 のマイクロカンチレバーを含み、該マイクロカンチレバーは長さ、幅及び厚みを有し、マイクロカンチレバーの第 1 の表面上に溶着されるコーティング物質、コーティング物質に付着させる生体物質、及び少なくとも 1 の相互作用細胞を含有するマイクロカンチレバーであり、相互作用細胞含有マイクロカンチレバーはサンプルを受け取るためにマイクロ流体装置中に収納され、及びマイクロフォース測定はサンプル中の酵素の存在によりマイクロカンチレバーが偏向することにより示される、装置。

【請求項 6 2】

生体物質は酵素基質を含む、請求項 6 1 に記載の装置。

【請求項 6 3】

生体物質は酵素偽基質を含む、請求項 6 1 に記載の装置。

【請求項 6 4】

少なくとも 1 のマイクロカンチレバーが複数のマイクロカンチレバーを有するブロックアレイをさらに含む、請求項 6 1 に記載の装置。

【請求項 6 5】

マイクロカンチレバーが長さ約 1 0 0  $\mu\text{m}$  ~ 約 7 5 0  $\mu\text{m}$ 、幅約 2 0  $\mu\text{m}$  ~ 約 3 0 0  $\mu\text{m}$ 、及び厚さ約 0 . 1  $\mu\text{m}$  ~ 約 1 0  $\mu\text{m}$  である、請求項 6 1 に記載の装置。

10

20

30

40

50

## 【請求項 66】

コーティング物質が銅、金、アルミニウム、クロム、チタニウム及び銀からなる群より選択される少なくとも1つである、請求項 64 に記載の装置。

## 【請求項 67】

コーティング物質が金である、請求項 66 に記載の装置。

## 【請求項 68】

マイクロカンチレバーの第2の表面が、シリコン、窒化シリコン、その他のシリコン化合物、金属化合物、ガリウム砒素、ゲルマニウム、二酸化ゲルマニウム、ガラス、酸化亜鉛、ダイヤモンド、石英、パラジウム及びプラスチックポリマーからなる群より選択される、請求項 61 に記載の装置。

10

## 【請求項 69】

装置が使い捨てである、請求項 61 に記載の装置。

## 【請求項 70】

装置が再利用可能である、請求項 61 に記載の装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 技術分野

本発明の分野は、サンプル中の酵素の存在をマイクロカンチレバーの偏向 (deflection) を測定することにより検出する装置及び方法に関し、マイクロカンチレバーの表面は酵素基質を有する。種々の実施態様において、本発明はプロテオミクス、ドラッグ・デリバリー、医学研究、医療、獣医学、歯科診断学、法医学及び軍事利用に有用である。

20

## 【0002】

## 背景

多数の酵素は医薬、産業及びその他の用途に重要である。新規な酵素の発見は特定の産業と同調して進展してきた。例えば、細菌性制限酵素の発見及び遺伝子工学の発展である。酵素は、新規な治療法として (米国特許第 6, 210, 667 号、2001 年 4 月 3 日発行)、新規な治療薬、例えば、HIV プロテアーゼ (米国特許第 6, 271, 235 号、2001 年 8 月 7 日発行) の開発のための目的として、様々な内科病理学において重要であり (Fang J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 3884 - 3889, 2000)、抗生物質の生合成などの産業プロセスにおいて (米国特許第 6, 258, 555 号、2001 年 7 月 10 日発行)、ポリウレタンなどの不要物質の分解 (米国特許第 6, 180, 381 号、2001 年 1 月 30 日発行)、及び食品産業 (米国特許第 5, 827, 712 号、1998 年 10 月 27 日発行) において重要である。新規な酵素活性を得る必要性は非常に大きく、従ってタンパク質工学研究は触媒抗体の開発に向けられてきた (米国特許第 5, 807, 688 号、1998 年 9 月 15 日発行)。

30

## 【0003】

薄い素子マイクロカンチレバーは暴露されるに従い差応力によりたわみ (偏向) を受け、その環境由来の化合物を例えば液体サンプル中で結合し得る。0.1 N/m 以下のバネ定数を有する軟らかいマイクロカンチレバーは非常に少量のマイクロカンチレバー表面上の基質とサンプル中の 1 以上の物質間の相互作用の結果として生じる応力差に敏感である。特別に設計したコーティング層を有する所定のマイクロカンチレバーは、その偏向によりマイクロカンチレバーが暴露された環境の成分についての情報を得る。マイクロカンチレバーは酵素媒介触媒生物学的熱量反応をフェムトジュール最小変位で検出することが可能である (Thundat et al., "マイクロカンチレバー・センサー", Microscale Thermophysical Engr., 1, 185 ~ 199 頁, 1997)。サンプル内のオリゴヌクレオチド相互作用は、サンプルが適用される表面上に形成された試験部位のモノリシック・アレイを用いて検出できる (米国特許第 5, 653, 939 号)。

40

50

## 【0004】

自由表面エネルギー及び結合エネルギーにおける変化により生じる応力に対するマイクロカンチレバーの反応を測定して、酵素とその酵素基質間の相互作用を検出する、または酵素活性を有するタンパク質または触媒抗体のような関連分子、または結合タンパク質を検出するための方法と装置が必要とされている。酵素と酵素様タンパク質の結合及び活性の検出及び分析のための医療及び獣医診断学、及び研究において必要性がある。

## 【0005】

概要

1の実施態様において、本発明は酵素の検出方法を提供し、該方法は以下を含む：少なくとも1のマイクロカンチレバーの第1の表面上にコーティング物質を溶着する工程；コーティング物質に少なくとも1の基質を加える工程であって、該基質は酵素と相互作用できる；基質を含むマイクロカンチレバーをサンプルに暴露する工程；及びマイクロカンチレバーの偏向を測定する工程であって、ここで偏向はサンプル中の酵素の存在を示すものである。関連実施態様において、基質の添加は少なくとも1の生体材料を添加することを含み、生体材料は例えば核酸、タンパク質、脂質、炭化水素、及び多糖類からなる群より選択される。他の関連実施態様において、基質は薬物である。

10

## 【0006】

本方法の関連実施態様において、偏向はマイクロカンチレバー表面上の応力変化により生じる。好ましい実施態様において、偏向は光学的方法により変化を観測することにより測定し、好ましくはレーザーなどである。もしくは、電子トンネル手段、静電容量手段、圧電手段またはピエゾ抵抗手段は偏向変化を観測するために用いることができる。

20

## 【0007】

関連実施態様において、本方法はさらに、マイクロカンチレバーがサンプルに暴露される時間から測定される時間パラメータの関数として、マイクロカンチレバー偏向を分析することを含む。偏向分析は、時間パラメータの関数としてマイクロカンチレバーの偏向を比較、計算及び記憶するように適応させた超小型演算装置を用いることを含む。偏向分析はさらに、以下から選択したパラメータを分析することを含む：酵素濃度、基質濃度、共同因子の存在、及び阻害物質の存在。

## 【0008】

関連実施態様において、本方法は長さが少なくとも約20 $\mu\text{m}$ 、少なくとも約20 $\mu\text{m}$ ～約150 $\mu\text{m}$ であるマイクロカンチレバーを含み、例えば、長さは約50 $\mu\text{m}$ ～約250 $\mu\text{m}$ 、約100 $\mu\text{m}$ ～約400 $\mu\text{m}$ 、約200 $\mu\text{m}$ ～約500 $\mu\text{m}$ 、または250 $\mu\text{m}$ ～約750 $\mu\text{m}$ である。さらに、幅は少なくとも約5 $\mu\text{m}$ ～約20 $\mu\text{m}$ 、約10 $\mu\text{m}$ ～約30 $\mu\text{m}$ 、約20 $\mu\text{m}$ ～約50 $\mu\text{m}$ 、約25 $\mu\text{m}$ ～約100 $\mu\text{m}$ 、または～約300 $\mu\text{m}$ である。高さは少なくとも約0.1 $\mu\text{m}$ であり、例えば、少なくとも約0.4 $\mu\text{m}$ 、約4 $\mu\text{m}$ ～約10 $\mu\text{m}$ である。コーティング物質の溶着は、さらに金属溶着も含む。金属はアルミニウム、銅、金、クロム、チタニウム及び銀からなる群より選択される少なくとも1つである。例えば、金属は金である。

30

## 【0009】

関連実施態様において、本方法はさらに複数の金属を溶着することを含む。複数の金属の溶着はさらに、クロムの第1の層及び金の第2の層を溶着することを含む。関連実施態様において、本方法はさらにチタニウムの第1の層及び金の第2の層を溶着することを含む。その他の実施態様における金属はアマルガムまたは合金である。

40

## 【0010】

関連実施態様において、マイクロカンチレバーは酸化アルミニウム、酸化イリジウム、シリコン、酸化シリコン、窒化シリコン、五酸化タンタラム及びプラスチックポリマーからなる群より選択される第2の表面を有する。

## 【0011】

関連実施態様において、本発明は複数個のマイクロカンチレバーを有するブロックアレイである少なくとも1のマイクロカンチレバーを提供するものである。

50

## 【0012】

関連実施態様において、本方法はさらに、基質を第1の表面に加える前に、マイクロカンチレバーと二官能性架橋剤を反応させる工程を含み、二官能性架橋剤はさらに基質と反応することができる。二官能性架橋剤は以下からなる群より選択される：ジチオビス（スクシンイミドウンデカノエート）（DSU）；長鎖スクシンイミド-6-[3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサノエート（LCSPPD）；スクシンイミジル-6-[3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサノエート（SPDP）；及びm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル。例えば、二官能性架橋剤はDSUである。

## 【0013】

本方法の関連実施態様において、マイクロカンチレバーは以下からなる群より選択される酵素を検出する：加水分解酵素、酸化還元酵素、転移酵素、リアーゼ、及びリガーゼ。例えば、酵素は加水分解酵素である。加水分解酵素はプロテアーゼである。例えば、プロテアーゼはメタロプロテアーゼまたはセリンプロテアーゼである。さらに、該酵素は以下からなる群より選択される：キナーゼ、ホスファターゼ、エンドペプチターゼ、エキソペプチターゼ、制限エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ及びポリメラーゼ。

## 【0014】

転移酵素は以下からなる群より選択される：グリコシルトランスフェラーゼ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、アセチルトランスフェラーゼ及びDNAメチルトランスフェラーゼ。例えば、リアーゼは以下からなる群より選択される：多糖リアーゼ、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルルCoAリアーゼ、アルギニノスクシネートリアーゼ及びイソシトレートリアーゼ。例えば、酸化還元酵素は以下からなる群より選択される：ヒドロキシルアミン・オキシドレダクターゼ、グリホスフェート・オキシドレダクターゼ、キナーゼ・オキシドレダクターゼ、ユビキノ・オキシドレダクターゼ及びタンパク質ジスルフィド・オキシドレダクターゼ。本発明の関連実施態様において、サンプルは十分に精製された酵素を含む。本方法の別の実施態様において、サンプルは生体液を含む。生体液は以下からなる群より選択される：細胞溶解物、培養基、使用済み媒体、動物抽出物及び植物抽出物。例えば、生体液は脊椎動物の体液であり、例えば人間またはその他の哺乳類である。本方法の実施態様によると、体液は以下からなる群より選択される：血液、リンパ液、組織液、尿、胆汁、汗、滑液、羊水、腹水、心嚢液、胸膜液、脳脊髄液、胃液、腸液、関節腔液、涙液、鼻汁。

## 【0015】

本発明の関連実施態様において、酵素は脊椎動物の病状に関連するものである。病状は遺伝的欠陥であり例えば、病状は以下からなる群より選択される：ファブリー病、ゴーシェ病、レッシュ-ナイハン病、テイ-サックス病、マンノシドーシス病、X連鎖性糸球体病、及びムコ多糖症。他の実施態様において、病状は癌であり、例えば、癌は脳、肝臓、すい臓、肺、前立腺または乳癌から選択される。関連実施態様において、癌は前立腺であり、酵素は前立腺特異抗原である。関連実施態様において、癌は乳癌であり、酵素はコラゲナーゼである。他の実施態様における病状は病原菌の存在によるものである。例えば、病原菌は以下からなる群より選択される：ウイルス、細菌、真菌、原生動物、ぜん虫。

## 【0016】

本発明の実施態様はサンプル中で基質に結合する関連物質を検出する方法を提供し、物質の検出はマイクロフォースにตอบสนองするように構成された少なくとも1のマイクロカンチレバーを含み、該方法は以下を含む：マイクロカンチレバーの第1の表面上でコーティング物質を溶着する工程；物質と相互作用することができる、少なくとも1の基質をコーティング物質に添加する工程；基質を含むマイクロカンチレバーをサンプルに暴露する工程；及びマイクロカンチレバー表面上の最終的な自由表面エネルギー電荷を測定する工程であって、表面エネルギー電荷はサンプル中の関連物質の基質への結合を示す。

## 【0017】

本発明の関連実施態様において、関連物質は以下からなる群より選択される：結合タンパ

10

20

30

40

50

ク質、酵素、共同因子、受容体配位子、抗体、多糖類、脂質、核酸及びステロイド。例えば、関連物質は酵素であり、該酵素は基質に結合し、かつ分離できない。他の例において、酵素は基質上で活性を有さない。さらに他の例において、基質は非切断型偽基質である。

#### 【0018】

関連実施態様において基質は複数の生体物質である。他の関連実施態様において基質は酵素活性の阻害物質を含む。

#### 【0019】

他の実施態様において、本発明は酵素阻害物質のスクリーニング方法を提供し、阻害物質の検出はマイクロカンチレバー上に酵素のための基質を有することを含み、該方法は以下を含む：コーティングを有する第1のマイクロカンチレバーの第1の側面へ、酵素及びコーティングと相互作用できる基質を添加する工程；基質を有する第1のマイクロカンチレバーを候補阻害物質と酵素を含むサンプルに暴露する工程；及び第1のマイクロカンチレバーの偏向を、候補阻害物質を含まない酵素に暴露した第2のマイクロカンチレバーの偏向と比較して測定する工程。本方法の関連実施態様において、第1のマイクロカンチレバー及び第2のマイクロカンチレバーは、マイクロ流体工学装置の第1の相互作用細胞及び第2の相互作用細胞中に位置する。関連実施態様において、第3のマイクロカンチレバー及び第4のマイクロカンチレバーは、第3の相互作用細胞及び第4の相互作用細胞中に位置し、第3の細胞及び第4の細胞は第1の細胞及び第2の細胞に比べて異なる酵素濃度を有する。関連実施態様において、第3のマイクロカンチレバー及び第4のマイクロカンチレバーは第3及び第4の相互作用細胞中に位置し、第3の細胞及び第4の細胞は第1の細胞及び第2の細胞とは異なる候補阻害物質のサンプルを有する。

10

20

#### 【0020】

本発明の実施態様は、酵素と生体物質間の相互作用により生じるマイクロフォースを測定するための装置を提供し、以下を含む：少なくとも1のマイクロカンチレバーであって、該マイクロカンチレバーは長さ、幅及び厚みを有する；マイクロカンチレバーの第1の表面上に溶着されるコーティング物質；コーティング物質に付着できる生体物質；及び少なくとも1の相互作用細胞、ここで、コーティング物質と生体物質を含むマイクロカンチレバーはサンプルに暴露され、該サンプルは酵素を含む。生体物質は酵素基質を含む。もしくは、生体物質は酵素偽基質を含む。特定の実施態様において、マイクロカンチレバーは複数のマイクロカンチレバーを有するブロックアレイを含む。マイクロカンチレバーの寸法は極微であり、長さが少なくとも約20 $\mu\text{m}$ であり、例えば、約50 $\mu\text{m}$ ～約150 $\mu\text{m}$ 、約50 $\mu\text{m}$ ～約250 $\mu\text{m}$ 、約100 $\mu\text{m}$ ～約400 $\mu\text{m}$ 、約200 $\mu\text{m}$ ～約500 $\mu\text{m}$ 、または250 $\mu\text{m}$ ～約750 $\mu\text{m}$ である。さらに、幅は少なくとも約5 $\mu\text{m}$ であり、例えば、幅は約5 $\mu\text{m}$ ～約20 $\mu\text{m}$ 、約10 $\mu\text{m}$ ～約30 $\mu\text{m}$ 、約20 $\mu\text{m}$ ～約50 $\mu\text{m}$ 、約25 $\mu\text{m}$ ～約100 $\mu\text{m}$ 、または約300 $\mu\text{m}$ 以下である。高さは少なくとも約0.1 $\mu\text{m}$ であり、例えば、少なくとも約0.4 $\mu\text{m}$ であり、約4 $\mu\text{m}$ ～約10 $\mu\text{m}$ である。マイクロカンチレバーのコーティングは銅、金、アルミニウム、クロム、チタニウム及び銀からなる群より選択される少なくとも1つである。例えば、コーティングは金コーティングである。本装置の別の実施態様において、マイクロカンチレバーの第2の表面は、シリコン、窒化シリコン、その他のシリコン化合物、金属化合物、ガリウム砒素、ゲルマニウム、二酸化ゲルマニウム、ガラス、酸化亜鉛、ダイヤモンド、石英、パラジウム及びプラスチックポリマーからなる群より選択される。1の実施態様において、該装置は使い捨てである。他の実施態様において、該装置は再利用が可能である。

30

40

#### 【0021】

##### 実施態様の説明

図1は第1の表面101、第2の表面105、高さ102、幅104、及び長さ109を有するマイクロカンチレバーを示す。第1の表面は少なくとも1のコーティング106を有することができる。酵素基質108は第1の表面に直接固定され107、または二官能性架橋剤110との共有反応により固定される。非共有結合性基質分子は架橋剤を用いた

50

反応により第1の表面から洗い流すことができ、例えば低pHまたは中性洗剤を有する緩衝液の使用である。基質分子の共有結合は、直接結合するよりもむしろ好ましい実施態様である。なぜなら、前者の方法は基質分子をより幾何学的に均一な配置とするからである。

#### 【0022】

図2は、マイクロカンチレバーへ酵素サンプルを追加することによる、マイクロカンチレバーの第1の表面上の酵素と基質分子の相互作用の種類を示すものである。サンプル添加の前は、全基質分子はパネルAで右から2番目の基質分子が示すように完全長である。パネルAで酵素は平行線模様の円で示され、基質分子(左の基質分子)の内面の認識部位に結合し、基質分子を切断し、表面に共有結合した短い生成物を残す(左から2、3、5、7番目等の基質分子)。この結果は例えばBamH1またはEcoR1の制限酵素などのエンドヌクレアーゼによるDNA基質分子の消化から得られ、またはトリプシンなどのプロテアーゼによるタンパク質基質分子の消化から得られる。パネルBで酵素は平行線模様の円で示され、結合末端からの基質分子末端の遊離端に結合し、さらに基質を切断する。この結果は例えば、それぞれエキソヌクレアーゼまたはスキソペプチダーゼによる核酸またはタンパク質基質分子の消化から得られる。パネルCは、基質分子を有する結合タンパク質(無地または点描の円)または不活性酵素の相互作用を示す。結合によって、基質分子の消化は得られない。

10

#### 【0023】

図3は初期位置Aからのマイクロカンチレバーの偏向を示す。第1の表面に基質分子を追加することにより、マイクロカンチレバーの位置を新たな位置に変えることができ、例えば、位置Bまたは位置Cである。図2、パネルAまたは図2、パネルBに示す続いて起こる酵素消化はさらに偏向を変えることができ、例えば、位置Bから位置Cまたは位置Cから位置Aである。基質への不活性酵素または結合タンパク質の結合は偏向を生じ、マイクロカンチレバーの位置を変化させることができ、例えば、位置Cから位置Bである。

20

#### 【0024】

図4はマイクロカンチレバー偏向の時間的経過を示し、第1の表面はタンパク質基質、IgG抗体分子溶液に共有結合している。共有結合した抗体を含むマイクロカンチレバーはまず対照緩衝液(下側の関数)に暴露し、結果として暴露による偏向の変化は観測されない。同じマイクロカンチレバーをそれから、実施例1に記載するようにプロテアーゼ・パ

30

#### 【0025】

#### 定義

文脈上異なる解釈を要する場合を除き、本明細書及び請求項に用いられる用語の意味は以下に示す通りである。

#### 【0026】

“マイクロカンチレバー”の語は構造上の用語であり、その用途により棒状、V型、またはその他の形状を取り得る曲がり易い梁(beam)をいう。マイクロカンチレバーの一端は支持ベースに固定され、他方の端は自由な状態である。マイクロカンチレバーは通常微視的な大きさであり、例えば、マイクロカンチレバーは寸法が極微であり、長さが少なくとも約20 $\mu\text{m}$ であり、約50 $\mu\text{m}$ ~約150 $\mu\text{m}$ 、例えば約50 $\mu\text{m}$ ~約250 $\mu\text{m}$ 、約100 $\mu\text{m}$ ~約400 $\mu\text{m}$ 、約200 $\mu\text{m}$ ~約500 $\mu\text{m}$ 、または250 $\mu\text{m}$ ~約750 $\mu\text{m}$ である。さらに、幅は少なくとも約5 $\mu\text{m}$ であり、例えば、幅は約5 $\mu\text{m}$ ~約20 $\mu\text{m}$ 、約10 $\mu\text{m}$ ~約30 $\mu\text{m}$ 、約20 $\mu\text{m}$ ~約50 $\mu\text{m}$ 、約25 $\mu\text{m}$ ~約100 $\mu\text{m}$ 、または約300 $\mu\text{m}$ 以下である。高さは少なくとも約0.1 $\mu\text{m}$ であり、例えば、少なくとも約0.4 $\mu\text{m}$ であり、約4 $\mu\text{m}$ ~約10 $\mu\text{m}$ である。シリコン及び窒化シリコンはマイクロカンチレバーを作るために用いられる最も一般的な分子である。マイクロカンチレバーを作るためのその他の分子も報告されており、圧電分子、プラスチック分子及び種々の金属である。

40

50

## 【0027】

特に、マイクロカンチレバーは種々の物質から製造でき、例えば、セラミックス、シリコン、窒化シリコン、その他のシリコン化合物、金属化合物、ガリウム砒素、ゲルマニウム、二酸化ゲルマニウム、酸化亜鉛、ダイヤモンド、石英、パラジウム、五酸化タンタラム及びプラスチックポリマーである。プラスチックは以下を含む：ポリスチレン、ポリイミド、エポキシ、ポリノルボルネン、ポリシクロブテン、ポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート、ポリフッ化ビニリデン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリフェニレンエーテル、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート、ポリピロール、及びポリチオフエン。従来から製造されているマイクロカンチレバーは例えば、D i f f r a c t i o n L t d .、W a i t s f i e l d、V T . ( ウ ェ イ ツ フ ィ ー ル ド、バ ー モ ン ト 州 ) などの製造元から得られる。

10

## 【0028】

自由末端上表面に固定化された化合物有するマイクロカンチレバーは受容体/配位子相互作用、抗体/抗原相互作用及び核酸相互作用を検出及びスクリーニングするために用いられてきた(米国特許第5,992,226号、1999年11月30日発行)。偏向は光学的及び圧電的方法を用いて測定する。マイクロカンチレバーは自然の共鳴周波数と適合できる位相差シグナルを検出する電気的手法を用いて濃度を測定できる(米国特許第6,041,642号、2000年3月28日発行)。公知の分子、例えばDNA、RNA及びタンパク質などの生体分子が配置されたマイクロカンチレバーの共鳴特性の変化を用いる標的種の濃度測定については、米国特許第5,763,768号に記載されている。

20

## 【0029】

サンプル媒体中の物理的及び化学的パラメーターを検出及び測定するための方法及び装置はマイクロメカニカル電位差センサーを用いる(米国特許第6,016,686号、2000年1月25日発行)。化学的検体の検出については米国特許第5,923,421号(1999年7月13日発行)に記載されている。マイクロカンチレバー偏向を生じる標的種に特異な抗体を用いるラジオイミュン・アッセイ(radioimmune assay)の磁気及び電氣的観測、例えば標的がマイクロカンチレバーに結合する電磁ビーズは米国特許第5,807,758号(1998年9月15日発行)に記載されている。

## 【0030】

ここで用いる“第1の表面”の語は、酵素のための基質分子を受け取り、結合するために設計されたマイクロカンチレバーの幾何学的表面をいう。この第1の表面上に1以上のコーティングを溶着することができる。従って、“第2の表面”の語はコーティングまたは酵素基質を含まないように設計されたマイクロカンチレバーの反対側の領域をいう。通常第2の表面はコーティングされないので、第1の表面にコーティング手順が適用される前の、一般にマイクロカンチレバーまたはマイクロカンチレバー・アレイが作られる物質からなる。もしくは、第1の表面のコーティングとは異なる物質でコーティングされてもよい。

30

## 【0031】

マイクロカンチレバーの第1の表面は中間層を有するように組み立ててもよく、例えば金を含んだ第1の表面と例えば窒化シリコンを含んだ第2の表面間にはさまれた中間層である。中間層は複数の金属を含んだ合金であってもよく、例えば、中間層はクロム、銀及びチタニウムの少なくとも1つと水銀とを含んだアマルガムである。水銀は通常、酵素のようなタンパク質を有する環境とは適合性がないが、いくつかの実施態様において、中間層のアマルガムまたは合金は水銀を含んでもよい。

40

## 【0032】

米国特許第6,096,559号(2000年8月1日発行)及び第6,050,722号(2000年4月18日発行)はマイクロカンチレバーの組み立てについて記載しており、セラミックス、プラスチックポリマー、石英、窒化シリコン、シリコン、酸化シリコン、酸化アルミニウム、五酸化タンタラム、ゲルマニウム、二酸化ゲルマニウム、ガリ

50

ウム砒素、酸化亜鉛及びシリコン化合物などの物質の使用を含む。様々な相互作用分子を含むマイクロメカニカル・センサーのコーティングは米国特許第6,118,124号(2000年9月12日発行)に記載されている。

#### 【0033】

第1の位置から少なくとも第2の位置へのマイクロカンチレバーの偏向またはたわみは、第2の表面と比較したマイクロカンチレバーの第1の表面上の差応力によるものであり、表面応力の変化はマイクロカンチレバーを特定の環境成分へ暴露することに起因するものである。マイクロカンチレバーは第1の環境から第2の環境への変化に従って屈折し得る。例えば、環境は以下の多くの可能な方法において変化し得る：酵素の添加または削除、または酵素濃度の低下または上昇；特異な酵素共同因子の添加または削除、または共同因子濃度の低下または上昇；特異な酵素阻害物質の添加または削除、または阻害物質の濃度の低下または上昇；マイクロカンチレバーへの暴露前、暴露の間、または暴露後のサンプルの希釈または濃縮；マイクロカンチレバーへの暴露前、暴露の間、または暴露後のサンプルの温度変化；マイクロカンチレバーへの暴露前、暴露の間、または暴露後のサンプルのpH変化；マイクロカンチレバーへの暴露前、暴露の間、または暴露後のサンプルの伝導性の変化；及びマイクロカンチレバーへの暴露前、暴露の間、または暴露後のサンプルの粘度変化。

10

#### 【0034】

偏向測定は最初に占有していた位置から変化した、マイクロカンチレバーの動いた位置または位置変化の距離を測定する。環境中における、マイクロカンチレバーの第1の表面上に生体物質を含むマイクロカンチレバーがまだ酵素と結合または反応していない最初の位置から、酵素を含むマイクロカンチレバー上で生体物質の結合または反応によりその位置を変化させた後のマイクロカンチレバーにより占有された第2の位置であり、及び生体物質の変化の結果である。

20

#### 【0035】

偏向特性は運動距離の及ぶ範囲で再生可能なマイクロカンチレバーの偏向パターンであり、例えばnm、及び単位時間当たりの頻度で測定する。偏向特性は酵素と基質の特異条件を識別でき、さらに温度、濃度、イオン強度、イオンまたはその他の共同因子の存在、プロテアーゼ阻害物質などの保存料の存在のような反応条件、及び酵素学の当業者に公知なその他の細胞条件を識別できる。これら条件の特定の組み合わせ下における偏向範囲は特定反応のサインとなり得る。偏向特性は、サンプル添加時間の関数として、または酵素濃度、基質濃度、阻害物質濃度、共同因子濃度、pHまたは温度等の関数としての運動範囲として、マイクロカンチレバーの運動範囲を測定することにより測定する。

30

#### 【0036】

装置または方法において超小型演算装置を含むことができ、例えば計算能力、ロジック、及びコンピュータープログラムからの指示を解釈及び実行するために必要なコントロール回路を含んだ集積回路などがある。測定装置の超小型演算装置部品はマイクロカンチレバー偏向を検出するための装置内にある。

#### 【0037】

##### 環境内の酵素検出

“環境”の語はマイクロカンチレバーが暴露される、全体的な因子の集合体を意味する。例えば、因子の集合体は以下のような物質を含んだサンプルを含む；実質的に純化された酵素；少なくとも1の酵素を含む体液；実質的に純粋な阻害物質；阻害物質を含む体液、及びこれら成分の組み合わせ等。“環境”の語は酵素活性に影響を与え得るサンプルの任意の各成分の濃縮物も含む。環境温度のような因子は、応力に寄与するが、標準的手段、当業者に公知の細胞によって制御し、例えば、分離した熱的に制御可能なハウジングの使用であり、及び基質、酵素または必須の共同因子のいずれかを削除するために設計した環境中で基準マイクロカンチレバーの偏向を観測することにより制御する。基準マイクロカンチレバーは不活性酵素に暴露してもよく、またはサンプル中に見られる酵素と比較する対照酵素を含んでもよい。基準マイクロカンチレバーと実験マイクロカンチレバーの環境

40

50

間の差は、その他全てのマイクロカンチレバー偏向を測定する際の背景としての基準環境で見られる偏向と比較した、実験マイクロカンチレバーによって得られる偏向量の測定結果となる。

【0038】

ここで用いる、第1の位置から少なくとも第2の位置へのマイクロカンチレバーの偏向は、酵素活性により、マイクロカンチレバー表面に対する酵素基質分子結合の物理的または化学的变化により起こり得るものである。例えば、センサー物質、例えば、基質分子の表面伸張応力における変化である物理的变化は、DNA基質がエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼなどのDNAヌクレアーゼ、またはDNAリガーゼと反応した際に起こり得る。第1のケースにおいて、変化はマイクロカンチレバー上の物質量の減少である。第2のケースにおいて、変化はマイクロカンチレバー上の物質量の増加である。マイクロカンチレバー表面上の表面応力は基質上で作用する酵素活性の結果として変化する。マイクロカンチレバーの偏向はヌクレアーゼ酵素分子がDNA分子に結合する際にも変化する。基質の消化及び酵素の放出または除去に従い、他の位置へのマイクロカンチレバー偏向が観測され得る。同様にマイクロカンチレバー偏向は、基質が酵素と相互作用して結合する際の表面上の物質増加による、機械応力における変化により第1の位置から第2の位置へ変化し得る。偏向は例えば、DNAからDNA基質分子の長さ増加を生じるリガーゼ分子の活性に従い、第2の位置から少なくとも第3の位置に変化し得る。偏向はリガーゼがDNA基質から分離する際、第3の位置から少なくとも第4の位置に変化し得る。

10

【0039】

マイクロカンチレバー偏向の他の実施態様は、例えばDNA基質がDNAエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼと反応した際に基質分子の物理的变化が起こった場合に観測される。マイクロカンチレバーの偏向は、基質が酵素と相互作用した際における表面上の物質量の増加により、第1の位置から少なくとも第2の位置に変化できる。偏向は、ヌクレアーゼがDNA基質分子からDNAを取り除いた場合に第2の位置から少なくとも第3の位置に変化できる。偏向は、ヌクレアーゼがDNA基質から分離した場合に第3の位置から少なくとも第4の位置に変化できる。しかし、これらの相互作用は $n$  (ナノ) 秒 $\sim$  $\mu$  (マイクロ) 秒速度で起こるため偏向を測定する実際の時間は、酵素の酵素的活性による基質量及び表面上の酵素量を含む、マイクロカンチレバー表面上全てにおける全体的な変化の測定となる。

20

30

【0040】

マイクロカンチレバーの偏向は容量性手段、圧電性手段、ピエゾ抵抗手段、または光学的手段により測定できる。“容量性”の語は物質表面上の力または応力から生じる非導電性物質中のエネルギー保存を意味する。この力または応力はマイクロカンチレバーの偏向を生じ得る。“圧電性”の語は、機械的応力を適用した際の、固体非導電性物質の表面間に生じる圧力及び/または電流を意味する。“ピエゾ抵抗”の語は、圧力または力が物質表面上に与えられた際の物質の電気抵抗変化を意味する。光学的手段は周辺光の使用及びレーザーなどその他の光源の使用を含む。光学的、電氣的及び機械的手段によるマイクロカンチレバー偏向の検出は、1997年8月5日に発行された米国特許第5,653,939号に示されている。レーザー光源の使用については、2000年1月25日に発行された第6,016,686号、及び2000年9月26日に発行された第6,123,819号に記載されている。Majumdarら(国際公開公報第WO01/14823 A1、2001年3月1日)は、一連の固定フレーム・フィンガーに関連して偏向し得る一連のマイクロカンチレバー・フィンガー配列単位のマイクロフォースを測定するために入射光線の回折測定を用いる。偏向検出のための磁気及び電氣的手段は1998年9月15日に発行された米国特許第5,807,758号、1992年10月20日に発行された第5,156,810号、及び1999年11月9日に発行された第5,981,297号及び2000年8月22日に発行された第6,107,000号にそれぞれ示されている。偏向測定のための圧電的手段は1998年9月29日に発行された米国特許第5,814,525号; 1995年8月29日に発行された第5,445,008号; 及び19

40

50

98年2月17日に発行された第5,719,324号にそれぞれ示されている。

【0041】

時間パラメータは第1の時点から少なくとも第2の時点、及び第3、第4等の時点の事象または発生を測定するための時間間隔である。通常、第1の時点はマイクロカンチレバーをサンプルに暴露した時間を意味する。

【0042】

応力は、表面上の分子間相互作用に関連するマイクロカンチレバー表面上に与えられる力であり、例えば：酵素放出に従う、マイクロカンチレバーの第1の表面上基質の酵素的変化；またはサンプル中のタンパク質の基質への不可逆的結合である。応力は、特異酵素基質または特定酵素阻害物質または潜在的基質と酵素との相互作用から得られるマイクロカンチレバー表面上に与えられるいかなる種類の力も含む。マイクロカンチレバーは、第1の物質表面のコーティング層に添加された1以上の物質を含むサンプル成分の様々な相互作用による応力差に敏感である。

10

【0043】

“応答”の語は、すべてのコーティング及び酵素のための基質のようなセンサー物質を含むマイクロカンチレバーが酵素が特異的に基質と相互作用した際に生じる相互作用力により発生した応力の結果として偏向できるということを意味する。得られる力は化学・機械的力、熱機械力、静電気力、磁力及びその他の種類の力を単独または組み合わせて含む。

【0044】

酵素

“酵素”の語は多数のタンパク質生物学的触媒を包含し、反応を触媒するものとして知られ、または予測されるものである。最も一般的には、酵素は生物学的経路を含む可能性のある多数の生物学的反応のうち少なくとも1つを触媒することができる。さらに、酵素はエタノールから酢酸への変換のような有機化学反応または分子窒素の還元のような無機反応を触媒することができる。

20

【0045】

酵素的触媒反応の結果である分子は“生成物”と呼ばれる。酵素、基質及び生成物の語は酵素学及び生化学の当業界において標準用語である。酵素の語は例えば、マイクロカンチレバー上で酵素生成物を生じるためにその酵素基質を修飾できるサンプル中の活性酵素；触媒異常を有する遺伝子組換え酵素；触媒活性に必須の共同因子が欠如した酵素；及び偽基質に不可逆的に結合するサンプル中の酵素を含み得る。基質分子上の酵素活性により生じる相互作用力は化学・機械力、熱機械力、静電気力、磁力及びその他の種類の力を含む。

30

【0046】

酵素は触媒する反応に基づき6つに大別される：異性化酵素、酸化還元酵素、転移酵素、加水分解酵素、リアーゼ及びリガーゼ。異性化酵素は化合物である基質変換を触媒し、同じ数及び種類の原子を含むが異なる構造構成を有する異なる化合物生成物にする。酸化還元酵素は酸化、還元を伴い、基質の電子またはプロトン移動反応を伴う。転移酵素は原子群を基質分子から、または基質分子へ移動させる反応を触媒する。加水分解酵素は加水分解により基質の様々な共有結合の1以上を切断する。リガーゼは共有結合を形成するために2以上の基質成分を結合し、各成分が基質複合体の一部となる。当業者に公知の酵素は酵素を精製するために採取及び濃縮された細胞から精製できる。細胞は微生物学及び細胞生物学の当業者に通常用いられる方法により破裂させ、例えば、高周波による分解、加圧型細胞破壊装置、凍結融解及び洗剤溶解である。

40

【0047】

分泌型微生物酵素は使用済み培養基、すなわち細胞の培養及び成長に従い除去した細胞由来の成長培地から得られる。酵素はカラムクロマトグラフィー、特に親和性カラムクロマトグラフィー及びイオン交換カラムクロマトグラフィー、サイズ排除カラムクロマトグラフィーなどの手順により精製でき、融合タンパク質として、高特異性の親和性配位子を用いて精製できる (New England Biolabs Catalog、2000

50

- 2001、第142～143頁を参照)。

【0048】

酵素はジチオトレイトールまたはメルカプトエタノールなどの酸化防止剤を含んだ適当な緩衝液中で精製及び保存し、削減条件下で天然システインジスルフィド結合を保持する。また、EDTAなどのキレート剤を用いて重金属不活性化から酵素を保護する。酵素は水結晶形成を防止するためにグリセロールまたはDMSOなどの試薬を用いて、または適当な緩衝液中において-20 または-70 で保存できる。関連する酵素の多くは市販されている(Sigma Aldrich、Inc.、セントルイス、ミズーリ州; Calbiochem、サンディエゴ、カリフォルニア州; New England Biolabs、Inc.、ベバリー、マサチューセッツ州)。また、保存及び濃縮反応のために適当な緩衝液も市販されており、最適な酵素活性のために処方して混合し、適当なイオンを含む。もしくは、酵素は精製結晶として入手可能であり、使用前に特有の適当な濃度で適当な緩衝液中に溶解できる。

10

【0049】

ここでの酵素は、化学的变化を促進するためのその他の分子、例えば触媒抗体と反応できる遺伝子組換えまたは半合成ペプチド含有分子の範囲を含む。酵素の語はさらに、特性は明らかにされていないが、基質及び分析システムが考察できる活性を含むものとして想定され、例えば、10以上のヌクレオチドからなる反復性または非反復性配列を認識及び結合するDNA制限エンドヌクラーゼである。さらに、酵素の語は、公知の活性を有する酵素の天然または遺伝子組換え誘導体を含み、活性の減少した、または不活性の誘導体を含む。

20

【0050】

公知の活性を有する酵素は、本方法及び装置を用いてその活性パラメーターにより、特定の酵素基質に関連した特性を示し、基質への親和力及び生成物を生じるための基質の代謝回転速度などである。パラメーターは基質への親和力測定に関するものは $K_m$  (ミカエリス定数) 及び最大速度 $V_{max}$  として知られる。これらのパラメーターは酵素と基質濃度の関数として酵素活性を分析することにより、及び時間の関数として反応を観測することにより測定する。酵素阻害物質の存在下における変異酵素及び活性酵素は、特定の基質に関してより低い親和性(増加した $K_m$ ) またはより低い回転数(減少した $V_{max}$ ) を示す。本発明の方法及び装置は酵素誘導体の $K_m$  及び $V_{max}$  の変化を測定するために、及び酵素阻害物質の同定及び分析のために最適化することができる。

30

【0051】

酵素活性のための基質

“基質”の語は酵素の生化学における当業者により具体的に選択された分子を意味し、目的の酵素と反応する物質として知られるものである。基質分子または異なる基質分子の混合物は少なくとも1種の分子が特異的に酵素の活性部位に結合することが知られていることにより選択でき、従って酵素が基質を変化させる化学反応を触媒作用する。例えば、基質はプロテアーゼ酵素のための特定のタンパク質であり; または基質は制限エンドヌクラーゼ分子により認識できる特定のヌクレオチド配列を有するDNA分子である。

【0052】

基質は新規な酵素活性を検出するために設計でき、すなわち、多数の天然生成物サンプルの1つに存在する可能性があるが、現在は存在することが知られていない酵素活性、または変異酵素ライブラリー由来の酵素活性である。“基質”の語は工学技術において他の物質の担体として働く表面を示すために通常使用され、例えば、2000年9月26日に発行された米国特許第6,123,819号である。本明細書中の“基質”の語は、最初の基質物質と化学的に異なる生成物を生じるために、選択した酵素と特異的に相互作用できる分子からなる特定の分類の一部、及び酵素に結合でき、さらに酵素に触媒された反応により化学的に変化する分子の特定分類の一部についてのみ言及するために用いるものである。

40

【0053】

50

基質は酵素の天然基質である必要はなく、使用者の特定の目的に従って設計でき、例えば診断、阻害物質調査、純度モニタリング、または新規酵素の発見などである。基質は天然型であってもよく、例えば、野生型構造のタンパク質であり、または変性、及びさらに化学的に修飾したものでよい。基質はさらにその他の検出手段で用いるために修飾してもよく、例えば基質は、発色性 (colorigenic)、蛍光発生性、または放射性であってもよいが、これらの修飾はマイクロカンチレバー偏向側面に影響を与える必要はない。

#### 【0054】

ある環境において、基質分子の配置が密度の高いものであることは望ましく、例えば、より長い基質分子の低密度配置とは対照的に短い基質分子である。マイクロカンチレバー表面上の基質の酵素消化運動は、例えば酵素のストークス半径など特定酵素の大きさに依存し、従って、基質分子の密度及び大きさの最適範囲は使用者の実験により決定されるべきである。マイクロカンチレバーの第1の表面上の基質密度は、酵素濃度、酵素と架橋剤の反応温度または該反応の継続時間など1以上の因子を変化させることにより調整できる。さらに、基質は、酵素学の当業者により決定される適当な分子の混合物であってもよい。

10

#### 【0055】

センサー物質はマイクロカンチレバー表面上に溶着でき、サンプル成分と相互作用できる。例えば、センサー物質は生体物質である。他の実施態様において、センサー物質はタンパク質、特に酵素と相互作用できる任意の物質であり、マイクロカンチレバー上に固定化できるものである。

20

#### 【0056】

“生体物質”の語は天然源から単離できる有機物質を意味し、または有機出発物質を用いて化学合成により合成または半合成して生成される有機物質を意味する。例えば、生体物質は動物組織、植物などの天然源から、または細菌性細胞から当業者に公知の細胞技術を用いて単離できる。タンパク質などの生体物質は組換えDNA技術を用いて半合成的に合成でき、または当業者に公知の細胞方法により真核無細胞系において合成できる。タンパク質は固体状態または溶液ペプチド合成化学を用いて、ペプチド合成の当業界において公知の市販の装置及び基質細胞により新規に合成できる。生体物質は細胞全体または細胞の一部であってもよい。微小構造上の抗体を用いる固定化された結合大腸菌の検出のためのセンサーはIlicら“Mechanical resonant immunospecific biological detector (機械的共鳴免疫特異性の生物学的検出器)” (Appl. Phys. Lett. Vol. 77, No. 3, 第450-452頁、2000年7月17日)に開示されている。生体物質及びその他のセンサー物質は市販で手に入り、または研究室内で当業者により生成できる。

30

#### 【0057】

“非切断型偽基質”の語は天然酵素基質に化学的に類似する分子を意味し、酵素に結合できるが、偽基質は化学的に変化しない。偽基質は酵素活性部位に共有結合または非共有結合できるが、化学反応の最終生成物に変換できない。例えば、タンパク質プロテアーゼ阻害物質はプロテアーゼのための偽基質として作用でき、例えば、合成阻害物質はcAMP依存型タンパク質キナーゼのための偽基質として作用できる。

40

#### 【0058】

“実質的に純粋”の語は、目的の酵素が他の非酵素物質に対して初期濃度と比較した最終濃度を増加させるために物理的に操作されたことを意味し、例えば、酵素溶液が溶液の非酵素成分に対して少なくとも80%純粋であり、少なくとも90%純粋、少なくとも95%純粋または少なくとも99%純粋となるようにする。

#### 【0059】

##### サンプル

“サンプル”の語は流体状態で溶解また分散させた成分を意味する。目的のサンプルはテーマから診断上重要なサンプル中の酵素の存在に関して分析できる；あるいは、サンプルは新規酵素活性の存在に関して分析できる。

50

## 【0060】

“体液”の語は動物の体から生成または分泌される液体、血液、リンパ液、組織液、尿、胆汁、汗、滑液、羊水、腹水、心嚢液、胸膜液、脳脊髄液、胃液、腸液、関節腔液、涙液、鼻汁を意味する。

## 【0061】

“病状”の語は正常な機能が損なわれた、対象の健康状態を意味する。病状は例えば、遺伝的欠陥、感染、白血病などの癌または腫瘍等を含む。

## 【0062】

“感染”の語は、集合的に病原体と呼ばれる病気を引き起こす有機体である、細菌、ウイルス、真菌、または原生動物の1種以上により引き起こされる人間または動物対象の疾患を含むことを意味する。“真菌”の語は酵母菌を含むことを意味する。本発明において病原体は、限定されないが、以下のものが例示される：エンテロコッカス・フェカリス、ヘモフィルス肺炎病原菌、リステリア・モノサイトゲネス、ヒト型結核菌、ハンセン菌、プロピオニバクテリウム・アクネス、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、スタヒロコッカス・インターメディア、溶血性連鎖球菌、肺炎連鎖球菌などのグラム陽性細菌；フラボバクテリウム・メニンゴセプチカム、ヘリコバクター・ピロリ、ヘモフィルス肺炎病原菌、インフルエンザ菌、肺炎桿菌、淋菌、緑膿菌、シゲラ・ディゼンテリエ、チフス菌、パラチフス菌、大腸菌抗原型O157:H7、クラミジア属などのグラム陰性細菌；HIV-1、-2及び-3、HSV-I及びII、非A型、非B型、非C型肝炎ウイルス、ポックス・ウイルス、狂犬病ウイルス、及びニューカッスル病ウイルスなどのウイルス；カンジダ・アルビカンス、カンジダ・トロピカリ、カンジダ・krusei、カンジダ・pseudotropicalis、カンジダ・パラブシローシス、カンジダ・quillermondii、カンジダ・stellatoidea、アスペルギルス・フミガーツス、黒色アルベルギルス、アスペルギルス・nidulans、アスペルギルス・フラブス、アスペルギルス・テレウス、アブシディア・コリンピフェラ、アブシディア・ramosa、クリプトコッカス・neoforms、ヒストプラズマ・カプスラーツム、コクシジオイデオ・イミティス、ニューモシスティス・カリニ、リゾプス・アリツス(Rhizopus arrhizus)(クモノスカピ)、リゾプス・オリゼー、ムコール・プシルス及びその他の真菌などの真菌；及び赤痢アメーバ、大腸アメーバ、ランブル鞭毛虫、ジアルジア(G. intestinalis)、アイメリア属、トキソプラズマ属、クリプトスポリジウム・パルヴム、クリプトスポリジウム・ムリス、クリプトスポリジウム・ベイレイ、クリプトスポリジウム・メレアグリディス、クリプトスポリジウム・wrairi及びクリプトスポリジウム・nosarumなどの原生動物。これらの有機体から、タンパク質をスクリーニングすることにより、及びin vitroでペプチドを分析することにより固有のエピトープを得ることは当業者に公知である。

## 【0063】

“遺伝的欠陥”の語は変異対立遺伝子または病気遺伝子の存在により生じる遺伝による病的状態を意味する。例としては、限定されないが、ファブリー病、ゴーシェ病、テイ・サックス病、レッシュ・ナイハン病、マンノシドーシス病、X連鎖性糸球体病、及びムコ多糖症が挙げられる。

## 【0064】

架橋剤

酵素基質及びマイクロカンチレバーの第1の表面に関する“結合”の語は共有結合またはマイクロカンチレバーの第1の表面上のコーティング物質に結合したその他の物理的な基質結合分子を意味する。好ましい実施態様において、結合は基質から化学的リンカー原子への共有結合であり、例えば、異なる原子を通じて第1の表面に共有結合する、二官能性架橋剤または架橋剤である。また結合は、第1の表面または生体分子が変化しない、生体物質が第1の表面上のコーティング物質へ直接非共有結合するものであってもよい。このような結合は形、電荷の相補性及び/または水の水和、疎水性の排除、または第1の表面と特定の基質の特定の組み合わせのその他の特性に起因する(米国特許第6,123,8

10

20

30

40

50

19号、2000年9月26日発行)。

【0065】

“二官能性架橋剤”の語は、第1の成分から第2の成分へ結合できる物質を意味し、架橋剤は炭素鎖からなり、該物質の第1の末端に第1の化学反応基及び該物質の第2の末端に第2の生物反応基を有する。第1の成分と該物質の第1の末端との化学反応、及び第2の成分と該物質の第2の末端との化学反応は本発明の第1及び第2の成分の架橋を生じる。二官能性架橋剤は基質分子をマイクロカンチレバーの第1の表面に結合するために用い、例えば、コラーゲンなどのタンパク質基質を金コーティングを有する第1の表面に結合する。

【0066】

例えば、二官能性架橋剤は以下の化合物を含むことができる：ジチオビス(スクシンイミジル-ウンデカノエート)(DSU)、Pierce Endogen, Inc. (ロックフォード、イリノイ州)から市販；スルフトリル基及びアミノ基と反応するピリジルジチオ及びNHSEステル反応基を含む、長鎖スクシンイミド-6-[3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサン酸(LCSPDP)、Pierceから市販；スルフトリル基及びアミノ基と反応するピリジルジチオ及びNHSEステル反応基を含む、スクシンイミジル-6-[3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサン酸(SPDP)、Pierce (ロックフォード、イリノイ州)から市販；及びスルフトリル基及びアミノ基と反応するNHSEステルとマレイミド反応基を含むm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、Pierce (ロックフォード、イリノイ州)から市販。

【0067】

ここで用いる“タンパク質”、“ポリペプチド”及び“ペプチド”の語は同じ意味を持つものとする。

【0068】

本発明の上述の実施態様を十分に説明するために、以下の実施例及び請求項により具体的に説明するが、さらに限定することを意図するものではない。言及した参考文献の内容はここに引用することとする。

【0069】

実施例

実施例1 免疫グロブリンIgG抗体基質のパパイン消化

金コーティングを有するマイクロカンチレバー表面を10分間オゾン濃縮雰囲気により消毒した。架橋剤をDSUの0.1%(w/v)ジオクサン溶液中に60分間マイクロカンチレバーを浸すことにより付着させた。マイクロカンチレバーをジオクサンで3回洗浄し、続いてリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、pH7.6で洗浄した。

【0070】

マイクロカンチレバーをさらにPBS溶液中で60分間、免疫グロブリンG溶液を用いて培養し、パパイン酵素のためのタンパク質基質をマイクロカンチレバーの第1のコーティング表面に共有結合させた。マイクロカンチレバーを抗体溶液から取り除き、pH8.5の炭酸緩衝液に30分間浸して非反応DSUを加水分解した。

【0071】

マイクロカンチレバーを原子間力顕微鏡(AFM)の細胞中に取り付け、マイクロカンチレバー偏向測定を開始した。安定基準に到達後、洗剤Tweenの0.1%(w/v)溶液を含んだPBS溶液100マイクロリットルのサンプルを細胞中に注入した。マイクロカンチレバー偏向を時間の関数として観測し、“対照”として図4に描いた。次に、100マイクロリットルのパパインサンプル(100µg/mL; CalBiochem、サンディエゴ、カリフォルニア州)を細胞中に注入した。マイクロカンチレバー偏向を時間の関数として観測し、結果を“パパイン”と示して図4に描いた。

【0072】

図4に示すマイクロカンチレバーの安定上昇したたわみは、マイクロカンチレバー第1の

10

20

30

40

50

金コーティング表面からのタンパク質基質の変化によるマイクロカンチレバー上の表面張力の変化を意味する。データは1の実施例のいくつかの観測結果を示し、同じ結果を有する。データはパピインの酵素活性観測を時間の関数として示す。さらに、これらのデータは酵素活性を測定するためのマイクロカンチレバー性能を示す。

【0073】

実施例2 I g G基質の淋菌分泌プロテアーゼ消化

金コーティングを有するマイクロカンチレバー表面を10分間オゾン濃縮雰囲気により消毒する。架橋剤をDSUの0.1% (w/v) ジオクサン溶液中に60分間マイクロカンチレバーを浸すことにより付着させる。マイクロカンチレバーをジオクサンで洗浄し、続いてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、pH 7.6で洗浄する。

10

【0074】

マイクロカンチレバーをさらにPBS溶液中で60分間、免疫グロブリンG溶液 (1 mg/mL; CalBiochem、サンディエゴ、カリフォルニア州) を用いて培養し、I g Gタンパク質基質を表面に共有結合させる。マイクロカンチレバーを抗体溶液から取り除き、pH 8.5の炭酸緩衝液に30分間浸して非反応DSUを加水分解する。

【0075】

マイクロカンチレバーをAFMの細胞中に取り付け、偏向測定を開始する。安定基準に到達後、洗剤Tweenの0.1% (w/v) 溶液を含んだPBS溶液100マイクロリットルのアリコート細胞中に注入する。マイクロカンチレバー偏向を時間の関数として観測する。次に、淋菌分泌プロテアーゼを含んだ100マイクロリットルのアリコートサンプルを細胞中に注入した。マイクロカンチレバー偏向をさらに時間の関数として観測する。

20

【0076】

マイクロカンチレバーの安定上昇するたわみは金コーティング側のマイクロカンチレバーからタンパク質基質の表面張力が変化することを示す。その他の多くの細菌病原体が、病気の過程に類似の抗体特異性タンパク質分解酵素を分泌し、マイクロカンチレバーの使用により酵素を検出できる。

【図面の簡単な説明】

【0077】

【図1】マイクロカンチレバーの上面図の一部の略図であり、3次元の、第1及び第2の表面、及び第1の表面上に溶着させた基質分子を表す。

30

【図2】マイクロカンチレバー表面及び生体物質に付着した二官能性架橋剤分子及びマイクロカンチレバー表面に直接結合した生体物質を有するマイクロカンチレバーの側面図の概念図である。さまざまな酵素及び結合形態及び消化基質分子を表す。

【図3】様々な偏向位置の可能性及び本来の位置への戻りを示すマイクロカンチレバーの概略図である。

【図4】緩衝液のみに暴露した同じマイクロカンチレバーを用いた事前の対照 (下側の関数) と比較した、I g Gがパピインを消化した結果の (上側の関数)、マイクロカンチレバー (nm、縦軸) の時間的経過 (秒、横軸) である。

【 図 1 】

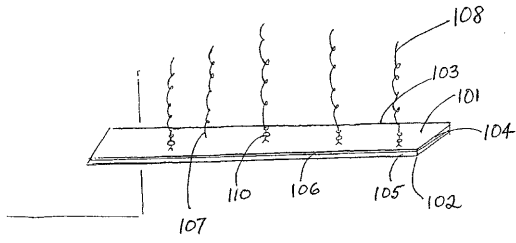


図 1

【 図 2 】

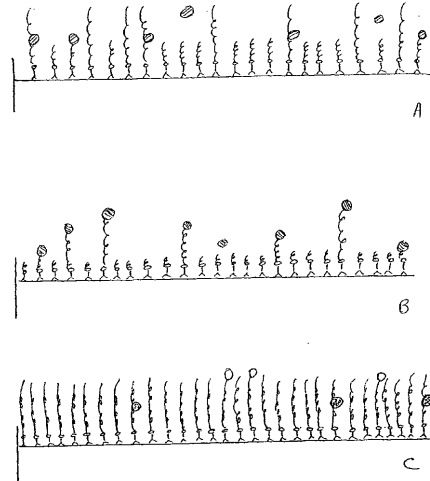


図 2

【 図 3 】

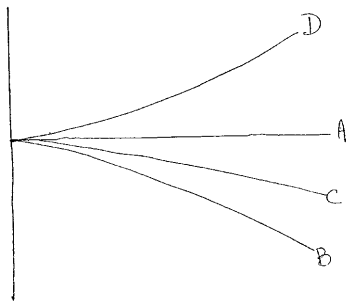


図 3

【 図 4 】

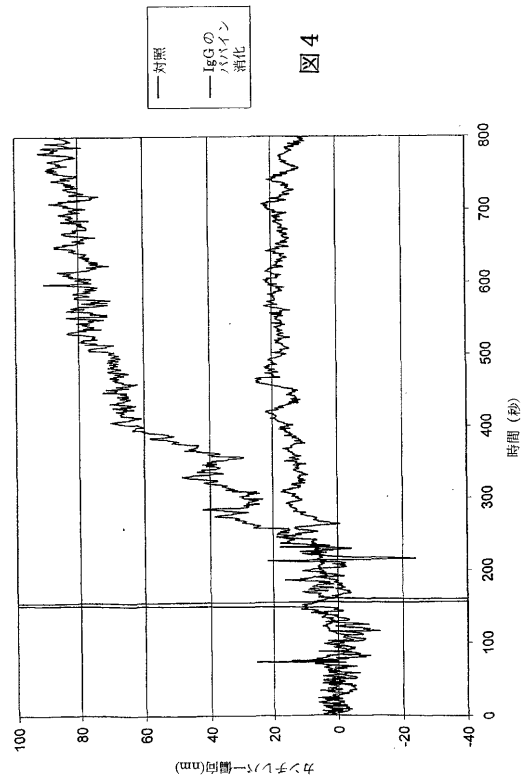


図 4

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
20 March 2003 (20.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/023363 A2

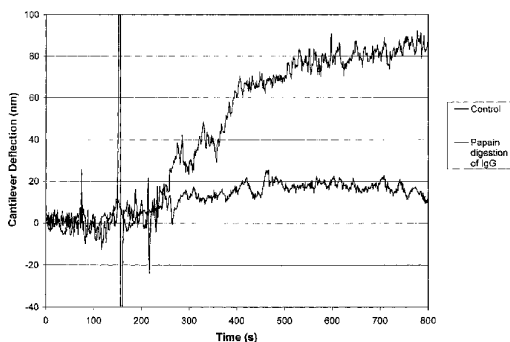
- (51) International Patent Classification: **G01N** Lawrenceville, GA 30044 (US). GHOSH, Madhusree [IN/US]; 12782 Torrey Bluff Drive, Apt. 99, San Diego, CA 92130 (US). SHEN, Shunxiang [US/US]; 4500 Greta Street, Bethesda, MD 20814 (US). SAUL, Richard [US/US]; 6 Goshen Court, Gaithersburg, MD 20882 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/28920
- (22) International Filing Date: 11 September 2002 (11.09.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/951,131 12 September 2001 (12.09.2001) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: 09/951,131 (CIP) US 12 September 2001 (12.09.2001)
- (71) Applicant (for all designated States except US): **PRO-TIVIERIS, INC.**, [US/US]; 9700 Great Seneca Highway, Rockville, MD 20850 (US).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): **BOTTOMLEY, Lawrence, A.** [US/US]; 3361 Connemara Trace,
- (74) Agent: **GUTERMAN, Sonia, K.**; Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky and Popeo, P.C., One Financial Center, Boston, MA 02111 (US).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HK, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SK, SL, ST, SV, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,

[Continued on next page]



WO 03/023363 A2

(54) Title: MICROCANTILEVER APPARATUS AND METHODS FOR DETECTION OF ENZYMES



(57) Abstract: An apparatus and a method are provided for detecting an enzyme by measuring a change in deflection of a microcantilever having a substrate for the enzyme.

---

**WO 03/023363 A2** 

TR), OAPI patent (BI, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG). *For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

**Published:**

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

WO 03/023363

PCT/US02/28920

MICROCANTILEVER APPARATUS AND METHODS  
FOR DETECTION OF ENZYMESTechnical field

5 The general field of the invention relates to an apparatus and a method for detecting the presence of an enzyme in a sample by measuring a deflection of a microcantilever, the surface of the microcantilever having a substrate for the enzyme. In various embodiments, the invention is of use in proteomics, drug discovery, medical research, medical, veterinary, dental diagnostics, forensics, and military applications.

Background

10 A large variety of enzymes are important in medicine, industry, and other applications. Discovery of novel enzymes has gone hand-in-hand with development of certain industries, for example the discovery of bacterial restriction enzymes and the development of genetic engineering. Enzymes are important in various medical pathologies  
15 (Fang J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 97: 3884-3889, 2000), as novel therapeutics (U.S. patent number 6,210,667 issued April 3, 2001), as targets for development of novel therapeutic agents, for example, HIV protease (U.S. patent number 6,271,235 issued August 7, 2001), in industrial processes such as antibiotic biosynthesis (U.S. patent number 6,258,555 issued July 10, 2001), degradation of unwanted materials such as polyurethane  
20 (U.S. patent number 6,180,381, issued Jan.30, 2001) and in the food industry (U.S. patent number 5,827,712, issued Oct. 27,1998). The need to obtain novel enzyme activities is so great that protein engineering research has been directed toward development of catalytic antibodies (U.S. patent number 5,807,688, issued Sep. 15, 1998).

Thin bimorph microcantilevers can undergo bending (deflection) due to differential  
25 stresses following exposure to and binding of a compound from their environment, for example in a fluid sample. Soft microcantilevers having spring constants less than 0.1 N/m are sensitive to stress differentials that arise as a result of interactions between extremely small amounts of a substrate material on a surface of the microcantilever and one or more materials in a sample. For a given microcantilever with a specially designed coating layer,  
30 the deflection yields information about components of the environment to which the microcantilever is exposed. Microcantilevers are capable of detecting calorimetric enzyme-mediated catalytic biological reactions with femtoJoule resolution. (Thundat et al., "Microcantilever Sensors", Microscale Thermophysical Engr. 1, pgs. 185-199, 1997.) Oligonucleotide interactions within a sample can be detected using a monolithic array of

WO 03/023363

PCT/US02/28920

test sites formed on a surface to which the sample is applied (U.S. patent number 5,653,939).

There is a need for methods and an apparatus for detecting an interaction between an enzyme and its enzymatic substrate, or detecting a protein having an enzymatic activity or a related molecule, such as a catalytic antibody, or a binding protein, as measured by a response of a microcantilever to a stress caused by changes in free surface energy and bonding energy. There is a need in medical and veterinary diagnostics, and in research, for detection and analysis of binding and activities of enzymes and enzyme-like proteins.

#### Summary

The invention in one embodiment provides a method for detecting an enzyme, the method comprising: depositing a coating material on a first surface of at least one microcantilever; adding at least one substrate to the coating material, the substrate capable of interacting with the enzyme; exposing the microcantilever with the substrate to a sample; and measuring a deflection of the microcantilever, wherein the deflection indicates the presence of the enzyme in the sample. In a related embodiment, adding the substrate comprises adding at least one biomaterial, a biomaterial selected from the group consisting of a nucleic acid, a protein, a lipid, a hydrocarbon, and a polysaccharide, for example. In another related embodiment, the substrate is a drug.

In a related embodiment of this method, the deflection is caused by a change in stress on the surface of the microcantilever. In a preferred embodiment, the deflection is measured by observing the change by an optical means, which preferably includes a laser. Alternatively, an electron tunneling means, a capacitive means, a piezoelectric means or a piezoresistive means may be used to observe the change in deflection.

In a related embodiment, the method further comprises analyzing the deflection of the microcantilever as a function of a time parameter determined from the time of exposing the microcantilever to the sample. Analyzing the deflection comprises using a microprocessor adapted for comparing, calculating, and storing the deflection of the microcantilever as a function of a time parameter. Analyzing the deflection further comprises analyzing a parameter selected from the group of: concentration of enzyme, concentration of substrate, presence of a cofactor and presence of an inhibitor.

In a related embodiment, the method comprises the microcantilever having a length that is at least about 20 $\mu$ m, at least about 20 $\mu$ m to about 150 $\mu$ m, the length is for example about 50 $\mu$ m to about 250 $\mu$ m, about 100 $\mu$ m to about 400 $\mu$ m, about 200 $\mu$ m to about 500 $\mu$ m, or about 250 $\mu$ m to about 750 $\mu$ m. Further, the width can be at least about 5 $\mu$ m to about

WO 03/023363

PCT/US02/28920

20µm, about 10µm to about 30µm, about 20µm to about 50µm, about 25µm to about 100µm, or to about 300µm. The height can be at least about 0.1µm, for example, at least about 0.4µm, about 4µm to about 10µm. Depositing the coating material further comprises depositing a metal. The metal is selected from at least one of the group consisting of

5 aluminum, copper, gold, chromium, titanium, and silver. For example, the metal is gold.

In a related embodiment, the method further comprises depositing a plurality of metals. Depositing a plurality of metals further comprises depositing a first layer of chromium and a second layer of gold. In a related embodiment, the method further comprises depositing a first layer of titanium and a second layer of gold. The metal in other

10 embodiments is an amalgam or an alloy.

In a related embodiment, the microcantilever has a second surface selected from the group consisting of aluminum oxide, iridium oxide, silicon, silicon oxide, silicon nitride, tantalum pentoxide, and a plastic polymer.

In a related embodiment of the invention provides at least one microcantilever which

15 is a block array having a plurality of microcantilevers.

In a related embodiment, the method further comprises, prior to adding the substrate to the first surface, reacting the microcantilever with a bifunctional cross-linker, the bifunctional cross-linker capable of further reacting with the substrate. The bifunctional cross-linker is selected from the group consisting of: dithiobis(succinimido undecanoate (DSU); long chain succinimido-6-[3-(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoate

20 (LCSPDP); succinimidyl-6-[3-(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoate (SPDP); and *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester. For example, the bifunctional cross-linker is DSU.

In a related embodiment of the method, the microcantilever detects an enzyme

25 selected from the group consisting of: a hydrolase, an oxidoreductase, a transferase, a lyase, and a ligase. For example, the enzyme is a hydrolase. The hydrolase is a protease. For example, the protease is a metalloprotease or a serine protease. Further, the enzyme is selected from the group of consisting of: a kinase, a phosphatase, an endopeptidase, an exopeptidase, a restriction endonuclease, an exonuclease, and a polymerase.

The transferase is selected from the group consisting of: a glycosyl transferase, a

30 glutathione S-transferase, an acetyl transferase, and a DNA methyl transferase. For example, the lyase is selected from the group consisting of: a polysaccharide lyase, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase, an argininosuccinate lyase and an isocitrate lyase. For example, the oxidoreductase is selected from the group consisting of: a hydroxylamine

WO 03/023363

PCT/US02/28920

oxidoreductase, a glyphosphate oxidoreductase, a quinine oxidoreductase, a ubiquinone oxidoreductase, and a protein disulfide oxidoreductase. In a related embodiment of the invention, the sample comprises an enzyme that is substantially purified. According to a further embodiment of the method, the sample comprises a biological fluid. The biological fluid is selected from the group consisting of: a cell lysate, a culture medium, a spent medium, an animal extract, and a plant extract. For example, the biological fluid comprises a bodily fluid from a vertebrate animal, such as a human or other mammal. According to an embodiment provided by this method, the bodily fluid is selected from the group consisting of: blood, lymph, tissue fluid, urine, bile, sweat, synovial fluid, amniotic fluid, abdominal fluid, pericardial fluid, pleural fluid, cerebrospinal fluid, gastric juice, intestinal juice, joint cavity fluid, tears, and nasal discharge.

In a related embodiment of the invention, the enzyme is associated with a medical condition in a vertebrate animal. The medical condition is a genetic defect for example, the medical condition is selected from the group consisting of: Fabry disease, Gaucher disease, Lesch-Nyhan disease, Tay-Sachs disease, mannosidosis disease, X-linked glomerular disease, and mucopolysaccharidosis. In another embodiment, the medical condition is a cancer, for example, the cancer is selected from a cancer of the brain, liver, pancreas, lung, prostate, or breast. In a related embodiment, the cancer is prostate, and the enzyme is prostate specific antigen. In a related embodiment, the cancer is breast cancer, and the enzyme is a collagenase. The medical condition in another embodiment is the presence of an infectious agent. For example, the infectious agent is selected from the group consisting of: a virus, a bacterium, a fungus, a protozoan, and a helminth.

An embodiment of the invention provides a method for detecting in a sample an associating substance that binds to a substrate, wherein detecting the substance involves at least one microcantilever configured to be responsive to a micro-force, the method comprising: depositing a coating material on a first surface of the microcantilever; adding at least one substrate to the coating material, the substrate capable of interaction with the substance; exposing the microcantilever with the substrate to the sample; and measuring a resulting free surface energy change on the surface of the microcantilever, wherein the surface energy change indicates binding to the substrate by the associating substance in the sample.

In a related embodiment of the invention, the associating substance is selected from the group consisting of: a binding protein, an enzyme, a cofactor, a receptor ligand, an antibody, a polysaccharide, a lipid, a nucleic acid, and a steroid. For example, the

WO 03/023363

PCT/US02/28920

associating substance is an enzyme wherein the enzyme binds the substrate and fails to dissociate. In another example, the enzyme has no activity on the substrate. In yet another example, the substrate is a non-cleavable pseudosubstrate.

The substrate in a related embodiment is a plurality of biomaterials. The substrate in another related embodiment comprises an inhibitor of enzymatic activity.

In one embodiment, the invention provides a method of screening for an inhibitor of an enzyme, wherein detecting the inhibitor involves having a substrate for the enzyme on a microcantilever, the method comprising: adding the substrate to a first side of a first microcantilever having a coating, the substrate capable of interacting with the enzyme and with the coating; exposing the first microcantilever with the substrate to a sample, the sample containing a candidate inhibitor and the enzyme; and measuring a deflection of the first microcantilever in comparison to a deflection of a second microcantilever exposed to the enzyme in the absence of the candidate inhibitor. In a related embodiment of the method, the first microcantilever and the second microcantilever are located in a first interaction cell and a second interaction cell of a microfluidics device. In a related embodiment, a third microcantilever and a fourth microcantilever are located in a third interaction cell and a fourth interaction cell, the third cell and fourth cell having different concentrations of enzyme than the first cell and the second cell. In a related embodiment, a third microcantilever and a fourth microcantilever are located in a third and fourth interaction cell, the third cell and the fourth cell having different samples of candidate inhibitors than the first cell and the second cell.

An embodiment of the invention provides an apparatus to measure a microforce generated by an interaction between an enzyme and a biomaterial, comprising: at least one microcantilever, wherein the microcantilever has a length, a width, and a thickness; a coating material deposited on a first surface of the microcantilever; a biomaterial capable of attachment to the coating material; and at least one interaction cell, wherein the microcantilever with the coating material and the biomaterial is exposed to a sample, the sample comprising the enzyme. The biomaterial comprises an enzymatic substrate. Alternatively, the biomaterial comprises an enzymatic pseudosubstrate. The microcantilever in certain embodiments comprises a block array having a plurality of microcantilevers. The microcantilever has dimensions that are microscopic, having a length that is at least about 20 $\mu\text{m}$ , for example, about 50 $\mu\text{m}$  to about 150 $\mu\text{m}$ , about 50 $\mu\text{m}$  to about 250 $\mu\text{m}$ , about 100 $\mu\text{m}$  to about 400 $\mu\text{m}$ , about 200 $\mu\text{m}$  to about 500 $\mu\text{m}$ , or about 250 $\mu\text{m}$  to about 750 $\mu\text{m}$ . Further, the width is at least about 5 $\mu\text{m}$ , for example, the width is about 5 $\mu\text{m}$

WO 03/023363

PCT/US02/28920

to about 20 $\mu$ m, about 10 $\mu$ m to about 30 $\mu$ m, about 20 $\mu$ m to about 50 $\mu$ m, about 25 $\mu$ m to about 100 $\mu$ m, or up to about 300 $\mu$ m. The height can be at least about 0.1 $\mu$ m, for example, at least about 0.4 $\mu$ m, about 4 $\mu$ m to about 10 $\mu$ m. The microcantilever coating is selected from at least one of the group consisting of copper, gold, aluminum, chromium, titanium, and silver. For example, the coating is gold coating. According to a further embodiment of this apparatus, a second surface of the microcantilever is selected from the group consisting of silicon, silicon nitride, other silicon compounds, metal compounds, gallium arsenide, germanium, germanium dioxide, glass, zinc oxide, diamond, quartz, palladium and a plastic polymer. The apparatus in one embodiment is disposable. In another embodiment, the apparatus is reusable.

#### Brief description of the drawings

Figure 1 is a schematic representation of a partial top view of a microcantilever showing three dimensions, first and second surfaces, and substrate molecules deposited on the first surface.

Figure 2 is a schematic diagram of a side view of a microcantilever having molecules of a bifunctional cross-linking agent attached to the surface of the microcantilever and to a biomaterial, and the biomaterial bound directly to the surface of the microcantilever. Various types of enzymes and modes of binding to and digesting substrate molecules are shown.

Figure 3 is a schematic view of a microcantilever showing various potential positions of deflection and return to an original position.

Figure 4 is a time course (in seconds, on the abscissa) of microcantilever deflection (in nm, on the ordinate) as a result of papain digestion of IgG (upper function), compared to a prior control using the same microcantilever exposed to buffer only (lower function).

#### Description of specific embodiments

Figure 1 shows a microcantilever having a first surface **101**, a second surface **105**, a height **102**, a width **104**, and a length **109**. The first surface can have at least one coating **106**. An enzymatic substrate **108** is affixed to the first surface directly **107**, or by covalent reaction with a bifunctional cross-linking agent **110**. Non-covalently bound substrate molecules can be washed from the first surface following a reaction with the cross-linking agent, for example by use of a buffer having a low pH, or a mild detergent. Covalent linking of substrate molecules, rather than direct binding, is a preferred embodiment, as the former process produces a more geometrically homogeneous array of substrate molecules.

WO 03/023363

PCT/US02/28920

Figure 2 illustrates the interaction of classes of enzymes with substrate molecules on a first surface of a microcantilever, following addition of an enzyme sample to the microcantilever. Prior to addition of sample, all substrate molecules are full-length, as shown in Panel A, second substrate molecule from right. Panel A shows an enzyme as a cross-hatched circle, binding to a recognition site on the interior of the substrate molecule (substrate molecule at left), and cleaving the substrate molecule, leaving a shorter product covalently attached to the surface (second, third, fifth, seventh, etc., substrate molecules from left). This result would be obtained from digestion of a DNA substrate molecule by an endonuclease such as a restriction enzyme, e.g., BamH1 or EcoR1, or from digestion of a protein substrate molecule by a protease such as trypsin. Panel B shows an enzyme as a cross-hatched circle, binding to a free end of a substrate molecule distal from the attached end, and cleaving the substrate processively. This result would be obtained from digestion of a nucleic acid or a protein substrate molecule by, for example, an exonuclease or an exopeptidase, respectively. Panel C shows interaction of binding proteins (open or stippled circles), or inactive enzymes, with substrate molecules. Following binding, no digestion of substrate molecules is obtained.

Figure 3 shows deflection of a microcantilever from an initial position, A. Addition of substrate molecules to a first surface can alter the position of the microcantilever to a new position, e.g., position B or position C. Subsequent enzyme digestion as in Fig. 2, panel A, or Fig. 2, panel B, can further alter the deflection, e.g., from position B to position C, or from position C to position A. Binding of inactive enzyme or of a binding protein to the substrate can alter the position of the microcantilever, causing deflection, for example, from position C to position B.

Figure 4 shows a time course of deflection of a microcantilever, the first surface of which has been covalently attached to a protein substrate, a solution of IgG antibody molecules. The microcantilever having covalently attached antibody is first exposed to a control buffer (lower function), as a result of which exposure no change is observed in the deflection. The same microcantilever is then exposed to an appropriate concentration of the protease papain, as described in Example 1. The data show a significant change in deflection, of about 60nm, occurring over a time course of several minutes following exposure to the papain.

#### Definitions

Unless the context otherwise requires, as used in this description and in the following claims, the terms below shall have the meanings as set forth below.

WO 03/023363

PCT/US02/28920

The term "microcantilever" is a structural term that refers to a flexible beam that may be bar-shaped, V-shaped, or have other shapes, depending on its application. One end of the microcantilever is fixed on a supporting base, another end standing freely.

Microcantilevers are usually of microscopic dimensions, for example, the microcantilever has dimensions that are microscopic, having a length that is at least about 20 $\mu$ m, about 50 $\mu$ m to about 150 $\mu$ m, for example, about 50 $\mu$ m to about 250 $\mu$ m, about 100 $\mu$ m to about 400 $\mu$ m, about 200 $\mu$ m to about 500 $\mu$ m, or about 250 $\mu$ m to about 750 $\mu$ m. Further, the width is at least about 5 $\mu$ m, for example, the width is about 5 $\mu$ m to about 20 $\mu$ m, about 10 $\mu$ m to about 30 $\mu$ m, about 20 $\mu$ m to about 50 $\mu$ m, about 25 $\mu$ m to about 100 $\mu$ m, or up to about 300 $\mu$ m. The height can be at least about 0.1 $\mu$ m, for example, at least about 0.4 $\mu$ m, about 4 $\mu$ m to about 10 $\mu$ m. Silicon and silicon nitride are the most common molecules used to fabricate microcantilevers. Other molecules have also been reported for making microcantilevers, including piezoelectric molecules, plastic molecules and various metals.

Specifically, microcantilevers can be manufactured from a variety of materials, including for example, ceramics, silicon, silicon nitride, other silicon compounds, metal compounds, gallium arsenide, germanium, germanium dioxide, zinc oxide, diamond, quartz, palladium, tantalum pentoxide, and plastic polymers. Plastics can include: polystyrene, polyimide, epoxy, polynorbornene, polycyclobutene, polymethyl methacrylate, polycarbonate, polyvinylidene fluoride, polytetrafluoroethylene, polyphenylene ether, polyethylene terephthalate, polyethylene naphthalate, polypyrrole, and polythiophene. Microcantilevers that are custom fabricated can be obtained for example from a manufacturer such as Diffraction Ltd., Waitsfield, VT.

Microcantilevers with a compound immobilized on the surface on the free end have been used to detect and screen receptor/ligand interactions, antibody/antigen interactions and nucleic acid interactions (U.S. patent number 5,992,226, issued on November 30, 1999). Deflection is measured using optical and piezoelectric methods. Microcantilevers can measure concentrations using electrical methods to detect phase difference signals that can be matched with natural resonant frequencies (U.S. patent number 6,041,642, issued March 28, 2000.) Determining a concentration of a target species using a change in resonant properties of a microcantilever on which a known molecule is disposed, for example, a biomolecule such as DNA, RNA, and protein, is described in U.S. patent number 5,763,768.

A method and apparatus for detecting and measuring physical and chemical parameters in a sample media uses micromechanical potentiometric sensors (U.S. patent

WO 03/023363

PCT/US02/28920

number 6,016,686, issued January 25, 2000). Detection of a chemical analyte is described in U.S. patent number 5,923,421, issued July 13, 1999. Magnetic and electrical monitoring of radioimmune assays, using antibodies specific for target species which cause microcantilever deflection, e.g., magnetic beads binding the target to the microcantilever, are described in U.S. patent number 5,807,758, issued September 15, 1998.

5 The term "first surface" as used herein refers to that geometric surface of a microcantilever designed to receive and bind to molecules of a substrate for an enzyme. One or more coatings can be deposited upon this first surface. Thus the term "second surface" refers to the area of the opposite side of the microcantilever which is designed not to contain coating or enzyme substrates. As the second surface is generally not coated, it is generally comprised of the material from which the microcantilever or microcantilever array is fabricated, prior to any coating procedure applied to the first surface. Alternatively, it may be coated with a material different from the first surface's coating.

15 A first surface of a microcantilever can be fabricated to have an intermediate layer, for example, sandwiched between the first surface comprising for example, gold, and the second surface, comprising for example silicon nitride. The intermediate layer may be an alloy comprising a plurality of metals, for example, the intermediate layer may be an amalgam comprising mercury with at least one of chromium, silver, and titanium. While mercury is not generally compatible with an environment having proteins such as enzymes, in some embodiments the amalgam or alloy of a middle layer may comprise mercury.

20 U.S. patent numbers 6,096,559 issued August 1, 2000, and 6,050,722 issued April 18, 2000, describe fabrication of a microcantilever, including use of material such as ceramics, plastic polymers, quartz, silicon nitride, silicon, silicon oxide, aluminum oxide, tantalum pentoxide, germanium, germanium dioxide, gallium arsenide, zinc oxide, and silicon compounds. Coating of micromechanical sensors with various interactive molecules is described in U.S. patent number 6,118,124, issued September 12, 2000.

30 Deflection or bending of a microcantilever from a first position to at least a second position may be due to differential stress on a first surface of the microcantilever in comparison to a second surface, the change in surface stress resulting from exposure of the microcantilever to a component of a particular environment. A microcantilever can be deflect following a change from a first environment to a second environment. For example, the environment can be altered in many possible ways including: an enzyme can be added or deleted or the enzyme concentration can be lowered or raised; a specific co-factor of an enzyme can be added or deleted or the concentration of the co-factor can be lowered or

WO 03/023363

PCT/US02/28920

raised; a specific inhibitor of an enzyme can be added or deleted or the concentration of the inhibitor can be lowered or raised; a sample can be diluted or concentrated prior to, during or after exposure to a microcantilever; a sample can experience a temperature change prior to, during or after exposure to a microcantilever; a sample can experience a change in pH prior to, during or after exposure to a microcantilever; a sample can experience a change in conductivity prior to, during or after exposure to a microcantilever; and a sample can experience a change in viscosity prior to, during or after exposure to a microcantilever.

Measuring a deflection is measuring the distance moved or change in position of a microcantilever that alters from a first occupied position, at which first position the microcantilever with the biomaterial on the first surface of the microcantilever has not yet bound or reacted with the enzyme, to a second position occupied by the microcantilever after it has altered its position because of binding to or reaction of the biomaterial on the microcantilever with the enzyme in the environment, and consequent alteration of the biomaterial.

A deflection characteristic is a pattern of deflection of a microcantilever which is reproducible in extent of distance traveled, for example as measured in nm, and frequency per unit time. The deflection characteristic can distinguish specific conditions of enzyme and substrate, and further reaction conditions such as temperature, concentration, ionic strength, presence of an ion or other co-factor, presence of a preservative such as a protease inhibitor, and other conditions well-known to one of skill in the enzymological arts. The extent of a deflection under a particular set of these conditions can become a signature for a specific reaction. A deflection characteristic is calculated from a measurement of extent of movement of the microcantilever, as a function of the time of addition of a sample, or as an extent of the movement as a function of concentration of an enzyme, of concentration of a substrate, of concentration of an inhibitor, of concentration of a co-factor, of pH, or of temperature, and the like.

A microprocessor can be included in an apparatus or a method, such as an integrated circuit containing the arithmetic, logic, and control circuitry required to interpret and execute instructions from a computer program. The microprocessor components of the measuring devices reside in an apparatus for detection of microcantilever deflection.

#### Detection of an enzyme in an environment

The term "environment" means the entire complex of factors to which the microcantilever is exposed. For example, the complex of factors may include a sample having a substance such as: a substantially purified enzyme; a bodily fluid containing at

WO 03/023363

PCT/US02/28920

least one enzyme; a substantially pure inhibitor; a bodily fluid containing an inhibitor, and combinations of such components, and the like. The term "environment" also includes the concentration of each of any of components of the sample that can affect enzyme activity. Factors such as temperature of the environment, while contributing to stress, are controlled  
5 by standard means, well known to one of ordinary skill in the art, such as use of an insulated and thermally controllable housing, and by monitoring of deflection of a reference microcantilever in an environment designed to omit either the substrate, the enzyme, or an essential co-factor. The reference microcantilever may be exposed to inactivated enzyme, or it may contain a control enzyme compared to that found in the sample. The difference  
10 between the environments of the reference microcantilever and the experimental microcantilever results in a measure of the amount of deflection experienced by the experimental microcantilevers compared to the deflection seen in the reference environment as the background against which all other microcantilever deflections are measured.

As used herein, deflection of a microcantilever from a first position to at least a  
15 second position can occur by a physical or chemical alteration of an enzyme substrate molecule linked to a surface of a microcantilever, due to enzyme activity. For example, a physical alteration which is a change in surface tension stress of the sensor material, e.g., of a substrate molecule, can occur when a DNA substrate reacts with either a DNA nuclease, such as an endonuclease or an exonuclease, or with a DNA ligase. In the first case, the  
20 alteration is a reduction in the amount of material on the microcantilever. In the second case, the alteration is increase in the amount of material on the microcantilever. Surface stress on the surface of the microcantilever will change as a result of the enzyme activity acting upon the substrate. Deflection of the microcantilever changes also when a nuclease enzyme molecule binds to the DNA molecule. Following digestion of the substrate and  
25 release or removal of the enzyme, deflection of the microcantilever to another position can be observed. Similarly, deflection of the microcantilever can change from a first position to a second position due to a change in mechanical stress from an additional amount of material on the surface when a substrate interacts with and binds the enzyme. Deflection can change from a second position to at least a third position, following, for example,  
30 activity of a ligase molecule results in addition of a length of DNA to the DNA substrate molecule. Deflection can change from a third position to at least a fourth position when the ligase dissociates from the DNA substrate.

Another embodiment of a deflection of a microcantilever is observed when, for example, a physical alteration of a substrate molecule occurs when a DNA substrate reacts

WO 03/023363

PCT/US02/28920

with a DNA endonuclease or exonuclease. Deflection of the microcantilever can change from a first position to at least a second position due to the increased amount of material on the surface when the substrate interacts with the enzyme. Deflection can change from a second position to at least a third position when the nuclease removes DNA from the DNA substrate molecule. Deflection can change from a third position to at least a fourth position when the nuclease disassociates from the DNA substrate. However, as these interactions occur at nsec to  $\mu$ sec speeds, real time monitoring of deflection is a measurement of an overall change in all of the material on the surface of the microcantilever, including amount of substrate due to the enzymatic activity of the enzyme, and amount of enzyme on the surface.

The deflection of a microcantilever can be measured by a means that is capacitive, piezoelectric, piezoresistive, or optical. The term "capacitive" means storage of energy in a non-conducting material resulting from a force or stress on the surface of the material. This force or stress can result in a deflection of the microcantilever. The term "piezoelectric" means a voltage and/or current produced between surfaces of a solid non-conducting material when a mechanical stress is applied to it. The term "piezoresistive" means a change in electrical resistance of a substance when a pressure or force is exerted on the surface of the substance. Optical means include use of ambient light and other sources of light, including lasers. Detection of microcantilever deflection by optical, electrical and mechanical means is shown in U.S. patent number 5,653,939 issued Aug. 5, 1997. Use of laser light sources is shown in 6,016,686 issued Jan. 25, 2000, and 6,123,819, issued Sept. 26, 2000. Majumdar et al. (WO 01/14823 A1 international publication date March 1, 2001) uses measurement of defraction of incident light to measure microforces with a set of microcantilever finger array blocks that can deflect relative to a set of fixed frame fingers. Magnetic and electrical means for detection of deflection are shown in U.S. patents 5,807,758 issued Sept. 15, 1998, 5,156,810 issued Oct. 20, 1992, and in 5,981,297, issued Nov. 9, 1999, and 6,107,000 issued Aug. 22, 2000, respectively. Piezoelectric means for measuring deflection are shown in U.S. patent numbers 5,814,525 issued Sept. 29, 1998; 5,445,008 issued Aug. 29, 1995; and 5,719,324, issued Feb. 17, 1998, respectively.

A time parameter is a time interval for measuring an event or an occurrence from a first point of time to at least a second point of time, and also a third, a fourth, etc., points in time. In general, the first point in time is noted as the time of exposing the microcantilever to the sample.

WO 03/023363

PCT/US02/28920

A stress is a force exerted on a surface of a microcantilever which can be associated with intermolecular interactions on that surface, such as: enzymatic alteration of a substrate on a first surface of a microcantilever, followed by enzyme release; or, irreversible binding of a protein in a sample to the substrate. Stress includes any type of force exerted on a

5 surface of a microcantilever resulting from the interaction of a specific enzyme substrate, or a specific enzyme inhibitor, or a potential substrate, with an enzyme. Microcantilevers are sensitive to stress differentials due to different types of interaction of a component of the sample with one or more materials that have been added to a coating layer on top of a first material.

10 The term "responsive" means that the microcantilever, including all coatings and sensor materials such as a substrate for an enzyme, is can deflect as a result of the stress generated by an interaction force that arises when an enzyme specifically interacts with the substrate. The resulting force may comprise chemical-mechanical forces, thermomechanical forces, electrostatic forces, magnetic forces, and other types of forces,

15 alone or in combination.

#### Enzymes

The term "enzyme" encompasses a large number of protein biological catalysts, which are known to or are predicted to catalyze a reaction. Most commonly, an enzyme can catalyze at least one of many different possible biochemical reactions that comprise

20 biological pathways. Further, an enzyme can catalyze an organic chemical reaction, such as conversion of ethanol to acetic acid, or an inorganic reaction, such as reduction of molecular nitrogen.

The molecules that are the results of an enzymatically catalyzed reaction are referred to as "products." The terms enzyme, substrate, and product are standard terms in the arts of

25 enzymology and biochemistry. The term enzyme can include, for example, an active enzyme in a sample capable of modifying its enzymatic substrate to yield an enzymatic product on a microcantilever; a genetically altered enzyme having a catalytic defect; an enzyme lacking a cofactor essential for catalytic activity; and an enzyme in a sample binding irreversibly to a pseudosubstrate. The interaction forces generated by enzyme

30 activity on a substrate molecule may comprise chemical-mechanical forces, thermal-mechanical forces, electrostatic forces, magnetic forces, and other types of forces.

Enzymes encompass six general classes based on the reaction being catalyzed, including: isomerases, oxidoreductases, transferases, hydrolases, lyases, and ligases. Isomerases catalyze the conversion of a substrate which is a chemical compound, to a

WO 03/023363

PCT/US02/28920

different chemical compound product that contains the same number and type of atoms, but in a different structural configuration. Oxidoreductases are involved in oxidation, reduction, and electron or proton transfer reactions of the substrate. Transferases catalyze reactions in which groups of atoms are transferred to or from substrate molecules. Hydrolases cleave one or more of a variety of covalent bonds of the substrate by hydrolysis. Ligases join two or more substrate components to form a covalent bond, each component being part of a substrate complex. Enzymes that are known in the art can be purified from cells that have been collected and concentrated as the enzymes are thus purified. Cells are ruptured by methods commonly employed by artisans in microbiology and cell biology, for example, sonication, French press, freeze thawing, and detergent lysis.

Secreted microbial enzymes can be obtained from spent culture medium, i.e., growth medium from which cells have been removed following culture and growth of cells. Enzymes can be purified by procedures including column chromatography, particularly affinity column chromatography, and also ion-exchange column chromatography, size exclusion column chromatography, and, as fusion proteins, can be purified using highly specific affinity ligands (see New England Biolabs Catalog, 2000-2001, pp. 142-143).

Enzymes are purified and stored in suitable buffers containing anti-oxidant agents, such as dithiothreitol or mercaptoethanol, to maintain native cysteine disulfide bonds in a reduced condition, and with chelators such as EDTA to protect the enzyme from heavy metal inactivation. Enzymes can be stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  or  $-70^{\circ}\text{C}$ , with an agent such as glycerol or DMSO to prevent water crystal formation, or in a suitable buffer. Many enzymes of interest are commercially available (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO; Calbiochem, San Diego, CA; New England Biolabs, Inc. Beverly, MA), as are suitable buffers for storage and concentrated reaction mixes that are formulated for optimal enzyme activity and include appropriate ions. Alternatively, enzymes are available as purified crystals, which can be dissolved in a suitable buffer at a specific appropriate concentration prior to use.

Enzymes herein include in scope any genetically engineered or semi-synthetic peptide-containing molecule capable of reacting with another molecule to promote a chemical change, for example, a catalytic antibody. The term enzyme is further envisioned to include an activity that has not yet been characterized, but for which a substrate and assay system can be devised, for example, a DNA restriction endonuclease that recognizes and binds to a palindromic or non-palindromic sequence consisting of 10 or more nucleotides. Further, the term enzyme includes naturally-occurring or genetically engineered derivatives

WO 03/023363

PCT/US02/28920

of an enzyme with known activity, including a derivative having reduced or essentially no activity.

Enzymes having a known activity are characterized using the methods and apparatuses herein by parameters of that activity associated with a particular enzymatic substrate, including affinity for the substrate, and rate of turnover of the substrate to yield product. The parameters are known as  $K_m$  (Michaelis constant) as a measure of affinity for a substrate and  $V_{max}$ , which is a maximum velocity. These parameters are determined by analyses of enzyme activity as a function of concentrations of enzyme and substrate, and by observing the reaction as a function of time. Mutated enzymes, and active enzymes in the presence of an enzyme inhibitor, can exhibit a lower affinity for a particular substrate (increased  $K_m$ ) or a lower turnover number (decreased  $V_{max}$ ). The methods and apparatus of the present invention can be optimized to determine changes in  $K_m$  and  $V_{max}$  of enzyme derivatives, and for identification and analysis of enzyme inhibitors.

Substrates for enzymatic activity

The term "substrate" means a molecule specifically chosen by one of ordinary skill in the biochemistry of enzymes, because it is known to be a substance that reacts with an enzyme of interest. The molecule of substrate, or mixture of different molecules of different substrates, can be chosen because at least one of the types of molecules is known to bind specifically to the active site of the enzyme, such that the enzyme acts to catalyze a chemical reaction that alters the substrate. For example, the substrate can be a particular protein for an enzyme which is protease; or, the substrate can be a DNA molecule having a particular nucleotide sequence that can be recognized by a molecule of a restriction endonuclease.

A substrate can be designed to detect a novel enzymatic activity, i.e., an enzymatic activity that might be present but is not currently known to be present in one of a plurality of natural product samples, or from a library of mutated enzymes. The term "substrate" is commonly used in the engineering arts to indicate a surface which acts as a support for another material, for example, in U. S. Patent No. 6,123,819, issued Sept. 26, 2000. In the present application the term "substrate" is used to refer only to a member of that particular class of molecule which specifically can interact with an enzyme of choice, and which can be bound by the enzyme and be further chemically altered by a reaction catalyzed by the enzyme, to yield a product that is chemically different from the initial substrate material.

Substrates need not be the natural substrate of an enzyme, and can be designed according to the particular purpose of the user, including diagnostics, inhibitor search,

WO 03/023363

PCT/US02/28920

purity monitoring, or novel enzyme discovery. Substrates can be nature-identical, e.g., a protein in a native configuration, or can be denatured and further chemically modified. The substrate can also be further modified for use with other means of detection, for example, a substrate can be colorigenic, fluorogenic, or radioactive, although these modifications need not affect an aspect of microcantilever deflection.

Under some circumstances it is desirable to have a dense array of substrate molecules, for example, short substrate molecules, as opposed to a less dense array of longer substrate molecules. The kinetics of enzyme digestion of a substrate on a surface of a microcantilever can depend on the size of the particular enzyme, for example, the Stokes radius of the enzyme, so that an optimal extent of density and size of substrate molecules should be determined by the user experimentally. The density of the substrate on the first surface of the microcantilever can be adjusted by varying one or more of the factors, including the concentration of the enzyme, the temperature of the reaction of enzyme with cross-linking agent, or the duration of time of this reaction. Further, the substrate can be a mixture of suitable molecules, as can be determined by one of skill in the art of enzymology.

A sensor material can be deposited on the surface of a microcantilever, and can interact with a component of a sample, for example, the sensor material is a biomaterial. In another embodiment, the sensor material can be any substance with which a protein, particularly an enzyme can interact, and which can be immobilized on microcantilever.

The term "biomaterial" means any organic material isolated from a natural source, or produced synthetically, or produced semi-synthetically by chemical synthesis with an organic starting material. For example, a biomaterial can be isolated from a natural source such as an animal tissue, a plant, or from bacterial cells, using technology cell known to one skilled in the art. A biomaterial such as a protein can be synthesized semi-synthetically using recombinant DNA technology, or in a eukaryotic cell-free system, by methods which are cell known to one skilled in the art. A protein can also be synthesized de novo using solid state or solution peptide synthesis chemistry, with commercially available devices and substrates cell known to one skilled in the art of peptide synthesis. A biomaterial can be all or a portion of a cell. A sensor for the detection of bound *E. coli* cells immobilized using antibodies on microfabricated structures is disclosed in Ilic et al. "Mechanical resonant immunospecific biological detector", Appl. Phys. Lett. Vol. 77, No. 3, pgs. 450-452, 17 July 2000. Biomaterials and other sensor materials can be obtained commercially, or can be produced by the artisan in the laboratory.

WO 03/023363

PCT/US02/28920

The phrase "non-cleavable pseudosubstrate" means a molecule that is chemically similar to a natural substrate of the enzyme, which can bind the enzyme, but which pseudosubstrate is not altered chemically. A pseudosubstrate can bind covalently or non-covalently to the enzyme active site, but cannot be converted to the end product of the chemical reaction. For example, a proteinaceous protease inhibitor can act as a pseudosubstrate for a protease, for example, a synthetic inhibitor can act as a pseudosubstrate for a cAMP-dependent protein kinase.

The phrase "substantially pure" means that the enzyme of interest has been physically manipulated to increase the final concentration in comparison to the initial concentration, with respect to other non-enzyme materials, for example, so that the enzyme solution is at least 80% pure, is at least 90% pure, is at least 95% pure, or is at least 99% pure with respect to non-enzyme components of the solution.

#### Samples

The term "sample" means the components dissolved or dispersed in a fluid state. A sample of interest can be assayed for the presence of a diagnostically important enzyme in a sample from a subject; alternatively, a sample can be assayed for presence of a novel enzyme activity.

The term "bodily fluid" means any fluid produced or secreted within or by a body of an animal, blood, lymph, tissue fluid, urine, bile, sweat, synovial fluid, amniotic fluid, abdominal fluid, pericardial fluid, pleural fluid, cerebrospinal fluid, gastric juice, intestinal juice, joint cavity fluid, tears, and nasal discharge.

The phrase "medical condition" means any condition in which the health of a subject is impaired. The medical condition can include for example a genetic defect, an infection, a cancer which can be a leukemia or a tumor, and the like.

The term "infection" is meant to include disorders of a human or animal subject caused by one or more species of bacteria, viruses, fungi, or protozoans, which are disease-producing organisms collectively referred to as "pathogens." The term "fungi" is meant to include the yeasts. In this invention, pathogens are exemplified by, but not limited to: Gram-positive bacteria such as *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *S. intermedius*, *Streptococcus hemolyticus*, *S. pneumoniae*; Gram-negative bacteria such as *Flavobacterium meningosepticum*, *Helicobacter pylori*, *Hemophilus pneumoniae*, *H. influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*,

WO 03/023363

PCT/US02/28920

*S. paratyphi*, *Escherichia coli* serotype O157:H7, *Chlamydia* species; viruses such as HIV-1, -2, and -3, HSV-I and -II, non-A non-B non-C hepatitis virus, pox viruses, rabies viruses, and Newcastle disease virus; fungi such as *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. quillermondii*, *C. stellatoidea*, *Aspergillus* 5 *fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. flavus*, *A. terreus*, *Absidia corymbifera*, *A. ramosa*, *Cryptococcus neoforms*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Pneumocystis carinii*, *Rhizopus arrhizus*, *R. oryzae*, *Mucor pusillus* and other fungi; and protozoa such as *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli*, *Giardia lamblia*, *G. intestinalis*, *Eimeria sp.*, *Toxoplasma sp.*, *Cryptosporidium parvum*, *C. muris*, *C. baileyi*, *C. meleagridis*, *C. wrairi*, 10 and *C. nosarum*. Obtaining unique epitopes from these organisms by screening proteins and by assaying peptides in vitro are commonly known to those skilled in the art.

The phrase "genetic defect" means any inheritable pathological condition which is caused by the presence of a mutant allele or disease gene. Examples include but are not limited to: Fabry disease, Gaucher disease, Tay-Sachs disease, Lesch-Nyhan disease, 15 mannosidosis disease, X-linked glomerular disease, and mucopolysaccharidosis.

#### Cross-linking agents

The term "attachment" with respect to an enzymatic substrate and a first surface of a microcantilever, means a covalently bonded or other physically connected molecule of substrate that is connected to the coating material on the first surface of the microcantilever. 20 In a preferred embodiment, an attachment is a covalent bond from the substrate to an atom of a chemical linker, e.g., a bifunctional cross-linking reagent or "cross-linker", which is also covalently bonded through a different atom to the first surface. Attachment can also be by direct non-covalent connection of the biomaterial to the coating material on the first surface without modification of either the first surface or the biomolecule. Such connection 25 can be due to complementarity of shape, charge, and/or to exclusion of waters of hydration, hydrophobicity, or other characteristics of the particular combination of the first surface and the particular substrate (U.S. patent number 6,123,819, issued Sept. 26, 2000).

The phrase "bifunctional cross-linker" means a substance which can connect a first component to a second component, wherein the cross-linker consists of a carbon chain and 30 has a first chemically reactive group at a first end of the substance and a second bioreactive group at a second end of the substance. A chemical reaction between the first end of the substance with a first component, and a chemical reaction between the second end of the substance with a second component, results in the linkage of the first and second components of the invention herein. A bifunctional cross-linker is used to bind a substrate

WO 03/023363

PCT/US02/28920

molecule to a first surface of a microcantilever, for example, to bind a protein substrate such as a collagen to a first surface having a gold coating.

For example, bifunctional cross-linkers can include the following compounds: dithiobis(succinimidyl-undecanoate) (DSU), and can be purchased from Pierce Endogen, Inc. (Rockford, IL); long chain succinimido-6-[3-(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoate (LCSPDP), contains pyridyldithio and NHS ester reactive groups which react with sulfhydryl and amino groups, can be purchased from Pierce; succinimidyl-6-[3-(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoate (SPDP) contains pyridyldithio and NHS ester reactive groups which react with sulfhydryl and amino groups, can be purchased from Pierce (Rockford, IL); and m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS) contains NHS ester and maleimide reactive groups which react with amino and sulfhydryl groups, and can be purchased from Pierce (Rockford, IL).

The terms "protein", "polypeptide", and "peptide", as used herein, shall have the same meaning.

The above embodiments of the invention, having been fully described, are illustrated by the following Examples and claims, which are not intended to be further limiting. The contents of all cited references are hereby incorporated by reference herein.

#### EXAMPLES

Example 1. Papain digestion of an immunoglobulin IgG antibody substrate.

A surface having a gold-coated microcantilever was cleaned by exposure to an ozone-enriched atmosphere for 10 min. The cross-linking agent was attached by immersing the microcantilever in a solution of 0.1% (w/v) DSU in dioxane for 60 min. The microcantilever was washed three times with dioxane, followed by a wash with phosphate buffered saline (PBS), pH 7.6.

The microcantilever was further incubated with a solution of Immunoglobulin G (1 mg/mL; CalBiochem, San Diego, CA) in PBS solution for 60 min, to covalently attach a protein substrate for the enzyme papain to the coated first surface of the microcantilever. The microcantilever was removed from the antibody solution and immersed in a carbonate buffer solution, pH 8.5, for 30 min to hydrolyze any unreacted DSU.

The microcantilever was mounted in a cell of an atomic force microscope (AFM), and measurement of microcantilever deflection was initiated. After attainment of a stable baseline, a 100 microliter sample of a PBS solution containing a 0.1 % (w/v) solution of the detergent Tween was injected into the cell. Microcantilever deflection was monitored as a

WO 03/023363

PCT/US02/28920

function of time, as is depicted in Fig. 4 as "control." Next, a 100 microliter sample of papain (100 micrograms per mL; CalBiochem, San Diego, CA) was injected into the cell. Microcantilever deflection was monitored as a function of time, and the results are depicted in Fig. 4, labeled as "papain."

5 The steady upward bending of the microcantilever shown in Fig. 4 denotes a change in the surface tension on the microcantilever from a change in the protein substrate from the gold-coated first surface of the microcantilever. The data shown are one example of several observations, having the same result. The data show monitoring of enzymatic activity of papain as a function of time. Further, these data show the capability of the microcantilever to measure enzymatic activity.

10 Example 2. *Neisseria* secreted protease digestion of IgG substrate.

A surface having a gold-coated microcantilever is cleaned by exposure to an ozone-enriched atmosphere for 10 min. The cross-linking agent is attached by immersing the microcantilever in a solution of 0.1% (w/v) DSU in dioxane for 60 min. The microcantilever is washed with dioxane, followed by a wash with phosphate buffered saline (PBS), pH 7.6.

15 The microcantilever is further incubated with a solution of Immunoglobulin G (1 mg/mL; CalBiochem, San Diego, CA) in PBS solution for 60 min to covalently attach the IgG protein substrate to the surface. The microcantilever is removed from the antibody solution and immersed in a carbonate buffer solution, pH 8.5, for 30 min to hydrolyze any unreacted DSU.

The microcantilever is mounted in a cell of an AFM and measurement of deflection is initiated. After attainment of a stable baseline, a 100 microliter aliquot of a PBS solution containing 0.1% (w/v) solution of the detergent Tween is injected into the cell. Microcantilever deflection is monitored as a function of time. Next, a 100 microliter aliquot of a sample containing a *Neisseria* secreted protease is injected into the cell. Microcantilever deflection is further monitored as a function of time.

25 The steady upward bending of the microcantilever indicates change of surface tension of the protein substrate from the gold-coated side of the microcantilever. Many other bacterial pathogens secrete a similar antibody-specific proteolytic enzyme during a course of pathogenesis, which enzyme can be detected by use of a microcantilever.

WO 03/023363

PCT/US02/28920

What is claimed is:

1. A method for detecting an enzyme, the method comprising:  
depositing a coating material on a first surface of at least one microcantilever;  
adding at least one substrate to the coating material, the substrate capable of interacting with the enzyme;  
exposing the microcantilever with the substrate to a sample; and  
measuring a deflection of the microcantilever, wherein the deflection indicates the presence of the enzyme in the sample.
2. A method according to claim 1, wherein adding the substrate comprises adding at least one biomaterial.
3. A method according to claim 2, wherein adding the biomaterial is adding a substance selected from the group consisting of a nucleic acid, a protein, a lipid, a hydrocarbon, and a polysaccharide.
4. A method according to claim 1, wherein adding the substrate is adding a drug.
5. A method according to claim 1, wherein the deflection is caused by a change in stress on the surface of the microcantilever.
6. A method according to claim 5, wherein measuring the deflection is observing the change by a means selected from the group consisting of an optical means, an electron tunneling means, a capacitive means, a piezoelectric means, and a piezoresistive means.
7. A method according to claim 6, wherein measuring the deflection is using the optical means.
8. A method according to claim 7, wherein the optical means comprises a laser.
9. A method according to claim 1, further comprising analyzing the deflection of the microcantilever as a function of a time parameter determined from the time of exposing the microcantilever to the sample.
10. A method according to claim 9, wherein analyzing the deflection comprises using a microprocessor adapted for comparing, calculating, and storing the deflection of the microcantilever as a function of the time parameter.

WO 03/023363

PCT/US02/28920

11. A method according to claim 9, wherein analyzing the deflection further comprises analyzing a parameter selected from the group of: concentration of enzyme, concentration of substrate, presence of a cofactor and presence of an inhibitor.
12. A method according to claim 1, wherein the microcantilever has a length of about 100 $\mu$ m to about 750 $\mu$ m, a width of about 20 $\mu$ m to about 300  $\mu$ m, and a thickness of about 0.1 $\mu$ m to about 10  $\mu$ m.
13. A method according to claim 1, wherein depositing the coating material further comprises depositing a metal.
14. A method according to claim 13, wherein the metal is selected from at least one of the group consisting of aluminum, copper, gold, chromium, titanium, and silver.
15. A method according to claim 14, wherein the metal is gold.
16. A method according to claim 1, wherein depositing the coating material further comprises depositing a plurality of metals.
17. A method according to claim 16, wherein depositing a plurality of metals further comprises depositing a first layer of chromium and a second layer of gold.
18. A method according to claim 16, wherein depositing a plurality of metals further comprises depositing a first layer of titanium and a second layer of gold.
19. A method according to claim 13, wherein the metal is an amalgam or an alloy.
20. A method according to claim 1, wherein the microcantilever has a second surface selected from the group consisting of aluminum oxide, iridium oxide, silicon, silicon oxide, silicon nitride, tantalum pentoxide, and a plastic polymer.
21. A method according to claim 1, further comprising prior to adding the substrate to the first surface, reacting the first surface with a bifunctional cross-linker, the bifunctional cross-linker capable of further reacting with the substrate.
22. A method according to claim 21, wherein the bifunctional cross-linker is selected from the group consisting of: dithiobis(succinimido undecanoate (DSU)); long chain succinimido-6-[3-(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoate (LCSPDP); succinimidyl-6-[3-(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoate (SPDP); and m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS).
23. A method according to claim 21, wherein the bifunctional cross-linker is DSU.

WO 03/023363

PCT/US02/28920

24. A method according to claim 1, wherein adding the substrate is designing the microcantilever for detecting an enzyme selected from the group consisting of: a hydrolase, an oxidoreductase, a transferase, a lyase, and a ligase.
25. A method according to claim 24, wherein the enzyme is a hydrolase.
26. A method according to claim 25, wherein the hydrolase is a protease.
27. A method according to claim 1, wherein the enzyme is selected from the group of consisting of: a kinase, a phosphatase, an endopeptidase, an exopeptidase, a restriction endonuclease, an exonuclease, and a polymerase.
28. A method according to claim 26, wherein the protease is a metalloprotease or a serine protease.
29. A method according to claim 24, wherein the transferase is selected from the group consisting of: a glycosyl transferase, a glutathione S-transferase, an acetyl transferase, and a DNA methyl transferase.
30. A method according to claim 24, wherein the lyase is selected from the group consisting of: a polysaccharide lyase, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase, an argininosuccinate lyase and an isocitrate lyase.
31. A method according to claim 24, wherein the oxidoreductase is selected from the group consisting of: a hydroxylamine oxidoreductase, a glyphosphate oxidoreductase, a quinone oxidoreductase, an ubiquinone oxidoreductase, and a protein disulfide oxidoreductase.
32. A method according to claim 1, wherein the sample comprises an enzyme that is substantially purified.
33. A method according to claim 1, wherein the sample comprises a biological fluid.
34. A method according to claim 33, wherein the biological fluid is selected from the group consisting of: a cell lysate, a culture medium, a spent medium, an animal extract, and a plant extract.
35. A method according to claim 33, wherein the biological fluid comprises a bodily fluid from a vertebrate animal.
36. A method according to claim 35, wherein the vertebrate is a mammal.
37. A method according to claim 36, wherein the mammal is a human.
38. A method according to claim 35, wherein the bodily fluid is selected from the group consisting of: blood, lymph, tissue fluid, urine, bile, sweat, synovial fluid,

WO 03/023363

PCT/US02/28920

amniotic fluid, abdominal fluid, pericardial fluid, pleural fluid, cerebrospinal fluid, gastric juice, intestinal juice, joint cavity fluid, tears, and nasal discharge.

39. A method according to claim 1, wherein the enzyme is associated with a medical condition in a vertebrate animal.
40. A method according to claim 39, wherein the medical condition is a genetic defect.
41. A method according to claim 40, wherein the medical condition is selected from the group consisting of: Fabry disease, Gaucher disease, Tay-Sachs disease, Lesch-Nyhan disease, mannosidosis disease, X-linked glomerular disease, and mucopolysaccharidosis.
42. A method according claim 39, wherein the medical condition is a cancer.
43. A method according to claim 42, wherein the cancer is selected from the group consisting of a cancer of the: brain, liver, pancreas, lung, prostate, and breast.
44. A method according to claim 43, wherein the cancer is prostate cancer and the enzyme is prostate specific antigen.
45. A method according to claim 43, wherein the cancer is breast cancer, and the enzyme is a collagenase.
46. A method according to claim 39, wherein the medical condition is the presence of an infectious agent.
47. A method according to claim 46, wherein the infectious agent is selected from the group consisting of: a virus, a bacterium, a fungus, a protozoan, and a helminth.
48. A method according to claim 1, wherein the at least one microcantilever is in a block array having a plurality of microcantilevers.
49. A method for detecting in a sample an associating substance that binds to a substrate, wherein detecting the substance involves at least one microcantilever configured to be responsive to a micro-force, the method comprising:
- depositing a coating material on a first surface of the microcantilever;
  - adding at least one substrate to the coating material, the substrate capable of interaction with the substance;
  - exposing the microcantilever with the substrate to the sample; and
  - measuring a resulting free surface energy change on the surface of the microcantilever, wherein the surface energy change indicates binding to the substrate by the associating substance in the sample.

WO 03/023363

PCT/US02/28920

50. A method according to claim 49, wherein the associating substance is selected from the group consisting of: a binding protein, an enzyme, a cofactor, a receptor ligand, an antibody, a polysaccharide, a lipid, a nucleic acid, and a steroid.
51. A method according to claim 49, wherein the associating substance is an enzyme.
52. A method according to claim 51, wherein the enzyme binds the substrate and fails to dissociate.
53. A method according to claim 52, wherein the enzyme has no activity on the substrate.
54. A method according to claim 49, wherein the substrate is a non-cleavable pseudosubstrate.
55. A method according to claim 49, wherein the substrate is a plurality of biomaterials.
56. A method according to claim 55, wherein the substrate comprises an inhibitor of enzymatic activity.
57. A method of screening for an inhibitor of an enzyme having a substrate on a microcantilever having a coating, the method comprising:  
adding the substrate to a first side of a first microcantilever and a second microcantilever, the substrate capable of interacting with the enzyme;  
exposing the first microcantilever with the substrate to a sample, the sample containing a candidate inhibitor and the enzyme; and  
measuring a deflection of the first microcantilever in comparison to a deflection of a second microcantilever identically exposed to the enzyme and in the absence of the candidate inhibitor.
58. A method according to claim 57, wherein the first microcantilever is located in a first interaction cell and the second microcantilever is located in a second interaction cell of a microfluidics device.
59. A method according to claim 58, wherein a third microcantilever located in a third interaction cell and a fourth microcantilever located in a fourth interaction cell are exposed to a different concentration of enzyme than the first and second cells.
60. A method according to claim 58, wherein a third microcantilever located in a third interaction cell and a fourth microcantilever located in a fourth interaction cell are exposed to different samples comprising candidate inhibitors than the candidate in the first interaction cell.

WO 03/023363

PCT/US02/28920

61. An apparatus to measure a microforce generated by an interaction between an enzyme and a biomaterial, the apparatus comprising at least one microcantilever, wherein the microcantilever has a length, a width, and a thickness; a coating material deposited on a first surface of the microcantilever; a biomaterial attached to the coating material; and at least one interaction cell containing the microcantilever, wherein the interaction cell with the microcantilever is housed in a microfluidics device for receiving a sample, and detection of the microforce is indicated by deflection of the microcantilever due to the presence in the sample of the enzyme.
62. An apparatus according to claim 61, wherein the biomaterial comprises an enzymatic substrate.
63. An apparatus according to claim 61, wherein the biomaterial comprises an enzymatic pseudosubstrate.
64. An apparatus according to claim 61, wherein the at least one microcantilever further comprises a block array having a plurality of microcantilevers.
65. An apparatus according to claim 61, wherein the microcantilever has a length of about 100 $\mu\text{m}$  to about 750 $\mu\text{m}$ , a width of about 20 $\mu\text{m}$  to about 300 $\mu\text{m}$ , and a thickness of about 0.1 $\mu\text{m}$  to about 10 $\mu\text{m}$ .
66. An apparatus according to claim 64, wherein the coating material is selected from at least one of the group consisting of copper, gold, aluminum, chromium, titanium, and silver.
67. An apparatus according to claim 66, wherein the coating material is gold.
68. An apparatus according to claim 61, wherein a second surface of the microcantilever is selected from the group consisting of silicon, silicon nitride, other silicon compounds, metal compounds, gallium arsenide, germanium, germanium dioxide, glass, zinc oxide, diamond, quartz, palladium and a plastic polymer.
69. An apparatus according to claim 61, wherein the apparatus is disposable.
70. An apparatus according to claim 61, wherein the apparatus is reusable.

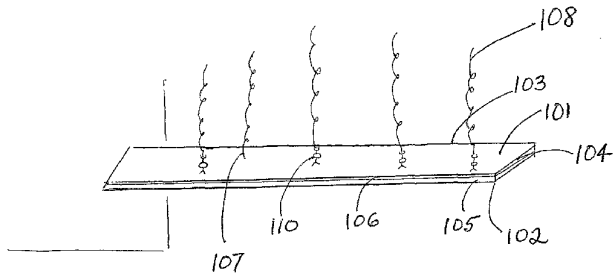


Figure 1

WO 03/023363

PCT/US02/28920

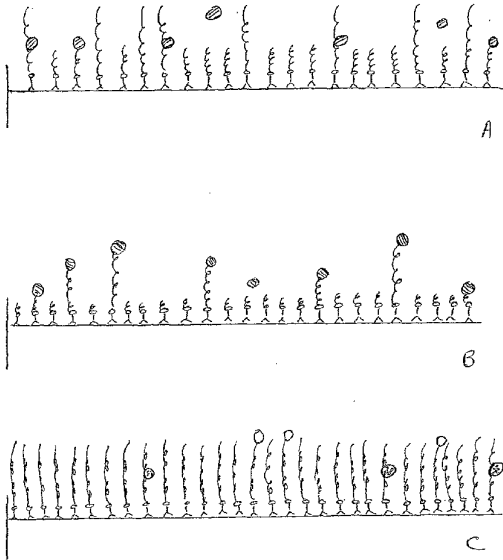


Figure 2

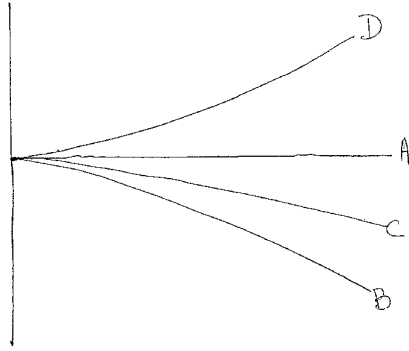


Figure 3

WO 03/023363

PCT/US02/28920

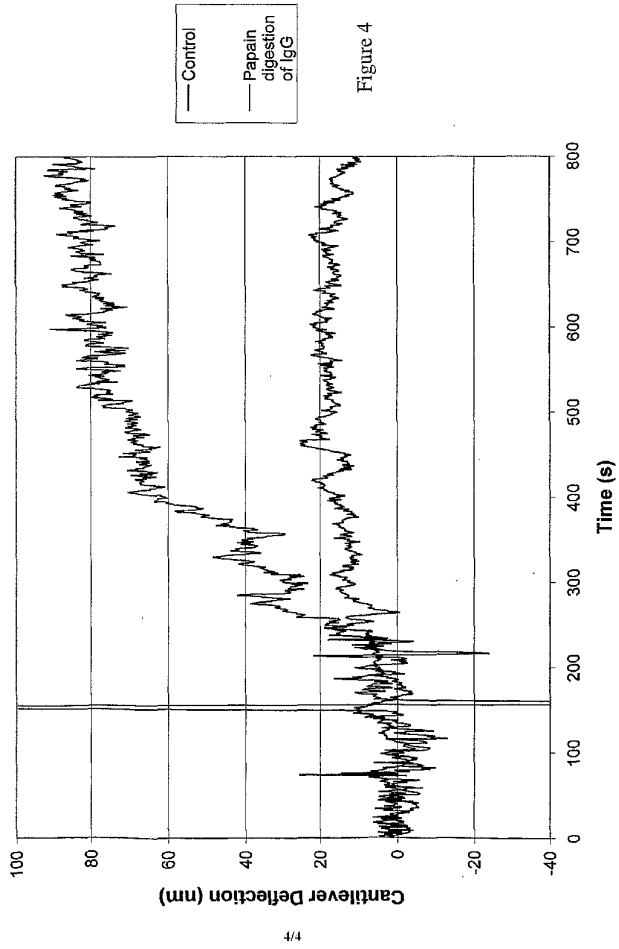


Figure 4

4/4

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
20 March 2003 (20.03.2003)

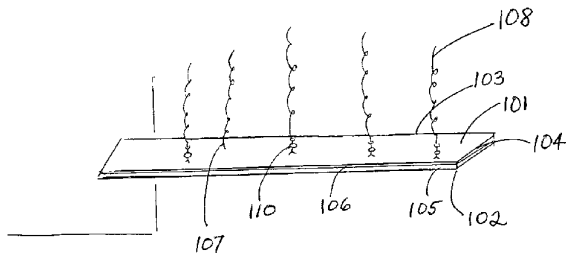
PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/023363 A3

- (51) International Patent Classification: **G01B 5/28**,  
G01N 25/20, 27/00, 27/26, 33/50, 33/53, 33/543
- (74) Agent: GUTERMAN, Sonia, K.; Mintz, Levin, Cohn,  
Petris, Giovsky and Popeo, P.C., One Financial Center,  
Boston, MA 02111 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/28920
- (81) Designated States (national): AR, AG, AI, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) International Filing Date:  
11 September 2002 (11.09.2002)
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,  
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
09/951,131 12 September 2001 (12.09.2001) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part  
(CIP) to earlier application:  
US 09/951,131 (CIP)  
Filed on 12 September 2001 (12.09.2001)
- (71) Applicant (for all designated States except US): PRO-  
TIVIERIS, INC. [US/US]; 9700 Great Seneca Highway,  
Rockville, MD 20850 (US).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): BOTTOM-  
LEY, Lawrence, A. [US/US]; 3361 Connemara Trace,  
Lawrenceville, GA 30044 (US). GHOSH, Madhushree  
[IN/US]; 12782 Torrey Bluff Drive, Apt. 99, San Diego,  
CA 92130 (US). SHEN, Shansiang [US/US]; 4500  
Gretna Street, Bethesda, MD 20814 (US). SAUL, Richard  
[US/US]; 6 Goshen Court, Gaithersburg, MD 20882 (US).
- Published:  
with international search report  
before the expiration of the time limit for amending the  
claims and to be republished in the event of receipt of  
amendments
- (88) Date of publication of the international search report:  
2 October 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MICROCANTILEVER APPARATUS AND METHODS FOR DETECTION OF ENZYMES



WO 03/023363 A3

(57) Abstract: An apparatus (Figure 1) and a method are provided for detecting an enzyme by measuring a change in deflection of a microcantilever having a substrate for the enzyme.

【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US02/28920		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>				
IPC(7) : G01B 5/28; G01N 25/20, 27/00, 27/26, 33/50, 33/53, 33/543 US CL : 435/4, 6, 7.1, 7.9, 287.1; 436/164, 172, 518, 524, 528 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/4, 6, 7.1, 7.9, 287.1; 436/164, 172, 518, 524, 528				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched STN, Derwent				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN, EAST				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	US 5,763,768 A (HENDERSON et al) 09 June 1998 (09.06.1998), whole document.	1-70		
A	US 5,992,226 A (GREEN et al) 30 November 1999 (30.11.1999), whole document.	1-70		
A	US 6,096,539 A (THUNDAT et al) 01 August 2000 (01.08.2000), whole document.	1-70		
A	US 6,123,819 A (PEETERS) 26 September 2000 (26.11.2000), whole document.	1-70		
A	WO 01/14823 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 01 March 2001 (01.01.2001), whole document.	1-70		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">         "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 reasons (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       </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">         "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with this application but cited to understand the principle 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          "&amp;" document member of the same patent family       </td> </tr> </table>			"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 reasons (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 this application but cited to understand the principle 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 "&" document member of the same patent family
"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 reasons (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 this application but cited to understand the principle 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 "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 09 October 2002 (09.10.2002)	Date of mailing of the international search report 04 AUG 2003			
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer K. H. Madmanabhan Telephone No. 703-308-0196			

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/483	G 0 1 N 33/483	C
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	M

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100118647

弁理士 赤松 利昭

(74) 代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(72) 発明者 ボトムリー、ローレンス・エイ

アメリカ合衆国、ジョージア州 3 0 0 4 4、ローレンスビル、コニマーラ・トレース 3 3 6 1

(72) 発明者 ゴウシュ、マドフシュリー

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 1 3 0、サン・ディエゴ、トリー・ブラフ・ドライブ  
1 2 7 8 2、アパート 9 9

(72) 発明者 シェン、シャンシアン

アメリカ合衆国、メリーランド州 2 0 8 1 4、ベスエスタ、グレットナ・ストリート 4 5 0 0

(72) 発明者 ソウル、リチャード

アメリカ合衆国、メリーランド州 2 0 8 8 2、ガイザーズバーグ、ゴージェン・コート 6

F ターム(参考) 2G045 AA01 AA24 AA25 BA11 BB50 CA25 CB03 CB12 DA13 DA20

DA30 DA36

4B029 AA07 BB16 BB20 FA13

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ36 QR57 QS39

专利名称(译)	微悬臂装置和酶检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005502873A</a>	公开(公告)日	2005-01-27
申请号	JP2003527389	申请日	2002-09-11
申请(专利权)人(译)	犁发球瓦莱州, 墨		
[标]发明人	ボトムリーローレンスエイ ゴウシュマドフシュリー シェンシャンシアン ソウルリチャード		
发明人	ボトムリー、ローレンス・エイ ゴウシュ、マドフシュリー シェン、シャンシアン ソウル、リチャード		
IPC分类号	G01N33/573 B81B3/00 C12M1/34 C12Q1/00 C12Q1/34 G01N33/15 G01N33/483 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	C12Q1/00 G01N33/54373		
FI分类号	G01N33/573.A B81B3/00 C12M1/34.E C12Q1/34 G01N33/15.Z G01N33/483.C G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M		
F-TERM分类号	2G045/AA01 2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/CA25 2G045/CB03 2G045/CB12 2G045/DA13 2G045/DA20 2G045/DA30 2G045/DA36 4B029/AA07 4B029/BB16 4B029/BB20 4B029/FA13 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ36 4B063/QR57 4B063/QS39		
代理人(译)	山崎 行造 杉山直人 白银 博 赤松俊明		
优先权	09/951131 2001-09-12 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了通过测量含有酶底物的微悬臂梁的偏转变化来检测酶的装置和方法。

		特許庁 (P200)	
		(43) 公表日 平成17年1月27日(	
.CL.7	F I	テーマコード (	
1 N 33/573	G O 1 N 33/573	A	2 G O 4 5
1 B 3/00	B 8 1 B 3/00		4 B O 2 9
2 M 1/34	C 1 2 M 1/34	E	4 B O 6 3
2 Q 1/34	C 1 2 Q 1/34		
1 N 33/15	G O 1 N 33/15	Z	
		審査請求 未請求	予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最
特許番号	特願2003-527389 (P2003-527389)	(71) 出願人	500214336
出願日	平成14年9月11日 (2002. 9. 11)		ブロクティヴアリス、インク
R文提出日	平成16年3月11日 (2004. 3. 11)		アメリカ合衆国メリーランド州
出願番号	PCT/US2002/028920		O、ロックビル、グレート...
公開番号	W02003/023363		イウェイ 9700
公開日	平成15年3月20日 (2003. 3. 20)	(74) 代理人	100071010
権利主張番号	09/951, 131		弁理士 山崎 行造
日	平成13年9月12日 (2001. 9. 12)	(74) 代理人	100104086
権利主張国	米国 (US)		弁理士 岩橋 勉夫
		(74) 代理人	100121762
			弁理士 杉山 直人
		(74) 代理人	100126767
			弁理士 白银 博
		(74) 代理人	100122839
			弁理士 星 貴子
			最終]

説明の名称] 酵素検出のためのマイクロカンチレバー装置及び方法