

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 506683

(P2003 - 506683A)

(43)公表日 平成15年2月18日(2003.2.18)

(51) Int.CI ⁷	識別記号	F I	テ-マコード ⁸ (参考)
G 0 1 N 33/483		G 0 1 N 33/483	E 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
1/25		1/25	
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15	Z
33/50		33/50	Z

審査請求 有 予備審査請求(全282数) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2001 - 514566(P2001 - 514566)
(86)(22)出願日	平成12年7月27日(2000.7.27)
(85)翻訳文提出日	平成14年2月4日(2002.2.4)
(86)国際出願番号	PCT/US00/20420
(87)国際公開番号	W001/009606
(87)国際公開日	平成13年2月8日(2001.2.8)
(31)優先権主張番号	09/365,580
(32)優先日	平成11年8月2日(1999.8.2)
(33)優先権主張国	米国(US)

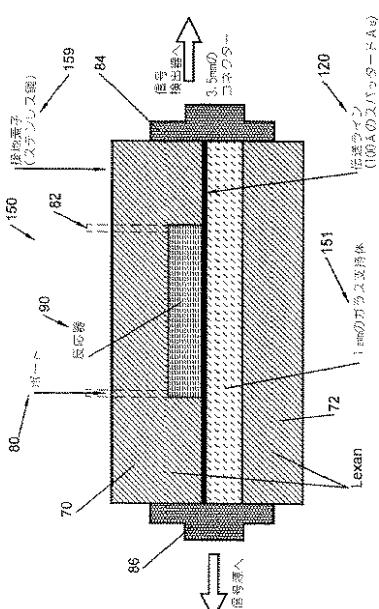
(71)出願人	シグネチャー バイオサイエンス, インコ ーポレイティド アメリカ合衆国, カリフォルニア 94545 - 1130, ヘイワード, キャボット ブールバー ド 21124
(72)発明者	ヘフティ, ジョン アメリカ合衆国, カリフォルニア 94131, サ ンフランシスコ, トゥエンティエイス スト リート 226
(74)代理人	弁理士 石田 敏 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 タンパク質結合事象を分析する方法

(57)【要約】

本発明は、タンパク質 / リガンド複合体の誘電性に基づいてタンパク質 / リガンド複合体を直接検出することができるシステムを使用して、タンパク質結合事象を分析する種々の方法を提供する。タンパク質結合事象を含む種々の分析、例えば、リガンドライブラーのスクリーニング、タンパク質結合相互作用、およびリガンドの同定において、このシステムを使用することができる。また、このシステムは多様な分析および診断の用途において利用することができる。



【特許請求の範囲】**【請求項1】 工程：**

(a) 注目のタンパク質をリガンドと接触させ、ここで前記注目のタンパク質または前記リガンドは連続伝送ラインの一部分に電磁的にカップリングされ；そして

(b) 前記注目のタンパク質と前記リガンドとの間で形成された結合性複合体についての応答シグナルを検出する；

を含んでなる、注目のタンパク質に結合する能力についてリガンドをスクリーニングする方法。

【請求項2】 前記リガンドがペプチド、オリゴ糖、核酸、脂質、抗体またはそのフラグメント、ステロイドおよび細胞から成る群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記リガンドが化合物のライブラリーである、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記ライブラリーがランダムペプチドのライブラリー、天然産物のライブラリー、レガシー(legacy)のライブラリー、コンビナトリアルライブラリー、オリゴ糖のライブラリーおよびファージディスプレイのライブラリーから成る群から選択される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記注目のタンパク質がレセプター、抗体またはそのフラグメント、酵素、および核酸結合性タンパク質から成る群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 前記検出工程が、

(a) 前記接触前に前記伝送ラインに沿って対照信号を伝搬させて基底信号を獲得し；

(b) 前記接触後に前記伝送ラインに沿って試験信号を伝搬させて前記応答信号を獲得し；そして

(c) 前記応答信号を前記基底信号と比較する；
を含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記注目のタンパク質または前記リガンドを前記伝送ライン

の前記一部分に直接結合させる、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 前記対照信号および前記試験信号がマイクロ波である、請求項6に記載の方法。

【請求項9】 前記注目のタンパク質および前記リガンドが非標識である、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 工程：

(a) 注目のタンパク質をリガンドと接触させ、ここで前記注目のタンパク質または前記リガンドは信号通路の一部分に電磁的にカップリングされ；

(b) 前記信号通路に沿って試験信号を伝搬させ、ここで前記信号通路の表面の接線は前記試験信号の信号伝搬方向に対して非直角であり；そして

(c) タンパク質／リガンド複合体についての応答信号を検出する；
を含んでなる、注目のタンパク質と結合する能力についてリガンドをスクリーニングする方法。

【請求項11】 信号通路に沿って試験信号を伝搬させ、そしてタンパク質／リガンド複合体についての応答信号を検出することによってタンパク質と試験リガンドとの間で形成されたタンパク質／リガンド複合体のスペクトルを獲得することを含んでなり、ここで前記タンパク質または前記試験リガンドは前記信号通路の一部分に電磁的にカップリングされ、そして前記伝搬工程は前記試験信号を経時的に変化させることを含んで成る、タンパク質の結合を分析する方法。

【請求項12】 前記タンパク質が既知タンパク質である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記既知タンパク質と特定リガンドとの間で形成された既知タンパク質／リガンド複合体特有の既知信号の存在について前記スペクトルを検査することをさらに含み、前記スペクトル中の前記既知信号の存在は前記試験リガンドが前記特定リガンドであることを示す、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 前記既知タンパク質上の特定部位における既知リガンドの結合特有の既知信号の存在について前記スペクトルを検査することをさらに含み、前記スペクトル中の前記既知信号の存在は前記特定部位における前記試験リガンドの結合を示す、請求項12に記載の方法。

【請求項15】 前記既知タンパク質および前記特定部位が活性部位およびアロステリック部位から成る群から選択される、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記タンパク質がレセプターであり、前記既知リガンドが前記レセプターの天然リガンドであり、そして前記特定部位が前記天然リガンドの結合部位である、請求項14に記載の方法。

【請求項17】 前記タンパク質が抗体またはそのフラグメントであり、前記既知リガンドが天然抗原であり、そして前記特定部位が前記天然抗原の抗原結合部位である、請求項14に記載の方法。

【請求項18】 前記既知タンパク質に対する特定クラスのリガンドの結合特有の既知信号の存在について前記スペクトルを検査することをさらに含み、前記スペクトル中の前記既知信号の存在は前記試験リガンドが前記特定クラスのメンバーであることを示す、請求項12に記載の方法。

【請求項19】 前記既知タンパク質がレセプターであり、そして前記特定クラスのリガンドがアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 前記既知タンパク質が酵素であり、そして前記特定クラスのリガンドが競合インヒビターまたはアロステリックエフェクターである、請求項18に記載の方法。

【請求項21】 前記試験信号がマイクロ波である、請求項11に記載の方法
。

【請求項22】 前記タンパク質および前記試験リガンドが非標識である、請求項11に記載の方法。

【請求項23】 前記信号通路が伝送ラインであり、そして前記タンパク質または前記試験リガンドが前記伝送ラインに直接結合されている、請求項11に記載の方法。

【請求項24】 前記信号通路の表面の接線が前記試験信号の信号伝搬方向に対して非直角である、請求項11に記載の方法。

【請求項25】 工程：

(a) 既知タンパク質と特異的に結合する特定リガンドを潜在的に含有する

試料と、連続伝送ラインの一部分に電磁的にカップリングした既知タンパク質を接觸させ；

(b) 十分な時間を経過させて、前記既知タンパク質および、前記試料の中に存在する場合、前記特定リガンドが結合性複合体を形成するようにさせ；そして

(c) 前記結合性複合体についての応答信号を検出し、前記応答信号は前記試料中の前記特定リガンドの存在を示す；
を含んでなる分析法。

【請求項26】 前記既知タンパク質が抗体またはそのフラグメント、レセプター、酵素、および核酸結合性タンパク質から成る群から選択される、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 前記試料が血液、尿、精液、痰、および組織ホモジネートから成る群から選択される、請求項25に記載の方法。

【請求項28】 前記特定リガンドが腫瘍マーカー、薬剤または薬剤代謝物質、ホルモン、オリゴ糖および脂質から成る群から選択される、請求項25に記載の方法。

【請求項29】 前記既知タンパク質が前記連続伝送ライン直接結合されている、請求項28に記載の方法。

【請求項30】 工程：

(a) 既知リガンドと特異的に結合する特定タンパク質を潜在的に含有する試料と、連続伝送ラインの一部分に電磁的にカップリングした既知リガンドを接觸させ；

(b) 十分な時間を経過させて、前記既知リガンドおよび、前記試料の中に存在する場合、前記特定タンパク質が結合性複合体を形成するようにさせ；そして

(c) 前記結合性複合体についての応答信号を検出し、前記応答信号は前記試料中の前記特定タンパク質の存在を示す；
を含んでなる分析法。

【請求項31】 工程：

(a) 既知タンパク質と結合性複合体を形成する特定リガンドを潜在的に含有する試料と、信号通路の一部分に電磁的にカップリングした既知タンパク質を接触させ；

(b) 前記信号通路に沿って試験信号を経時的に変化させながら伝搬させ、前記結合性複合体についての試験信号を検出することによって試験スペクトルを獲得し；そして

(c) 前記結合性複合体特有の既知信号の存在について前記試験スペクトルを検査し、前記既知信号の存在は前記試料中の前記特定リガンドの存在を示す；を含んでなる分析法。

【請求項32】 前記既知タンパク質が抗体またはそのフラグメント、レセプター、酵素および核酸結合性タンパク質から成る群から選択される、請求項31に記載の方法。

【請求項33】 前記試料が血液、尿、精液、痰、および組織ホモジネートから成る群から選択される、請求項31に記載の方法。

【請求項34】 前記特定リガンドが腫瘍マーカー、薬剤または薬剤代謝物質、ホルモン、オリゴ糖および脂質から成る群から選択される、請求項31に記載の方法。

【請求項35】 前記既知タンパク質が前記連続伝送ライン直接結合されている、請求項31に記載の方法。

【請求項36】 前記信号通路の表面の接線が前記試験信号の信号伝搬方向に対して非直角である、請求項31に記載の方法。

【請求項37】 工程：

(a) 複数の部位を含んでなるアレイとリガンドを含有する試料とを接触させ、各部位は連続伝送ラインと、その中に配された前記連続伝送ラインの一部分に電磁的にカップリングした複数の既知タンパク質とを含んでなり；そして

(b) タンパク質／リガンド複合体が形成されている部位のタンパク質／リガンド複合体についての応答信号を検出する；を含んでなる、注目のタンパク質に結合する能力を有するものについてリガンドをスクリーニングする方法。

【請求項38】 前記複数の部位が同一タンパク質を含有する、請求項37に記載の方法。

【請求項39】 前記複数の部位の各々が異なるタンパク質を含有する、請求項37に記載の方法。

【請求項40】 前記試料が複数の試料であり、そして前記接触工程が各部位を前記複数の試料のうちのいずれか1つと接触させることを含んでなる、請求項37に記載の方法。

【請求項41】 前記試料がリガンドのライブラリーを含んでなる、請求項37に記載の方法。

【請求項42】 前記リガンドおよび前記複数のタンパク質が非標識である、請求項37に記載の方法。

【請求項43】 前記複数のタンパク質が前記部位の各々とともに位置する前記連続的伝送ラインに直接結合されている、請求項37に記載の方法。

【請求項44】 工程：

(a) 複数の部位を含んでなるアレイと既知タンパク質を含有する試料とを接触させ、各部位は連続伝送ラインと、その中に位置する前記連続伝送ラインの一部分に電磁的にカップリングした複数の異なるリガンドとを含んでなり；そして

(b) タンパク質／リガンド複合体が形成されている部位のタンパク質／リガンド複合体についての応答信号を検出する；
を含んでなる、注目のタンパク質に結合する能力を有するものについてリガンドをスクリーニングする方法。

【請求項45】 工程：

(a) 複数の部位を含んでなるアレイとリガンドを含有する試料とを接触させ、各部位は信号通路と、その中に位置する信号通路の一部分に電磁的にカップリングした複数のタンパク質とを含んでなり；

(b) 信号通路に沿って前記複数の素子の各々に試験信号を伝搬させ、ここで各部位における信号通路の表面の接線は前記信号の信号伝搬方向に対して非直角であり；そして

(c) タンパク質／リガンド複合体が形成されている部位のタンパク質／リガンド複合体についての応答信号を検出する；
を含んでなる、注目のタンパク質に結合する能力を有するものについてリガンド
をスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、概略的に言えば、タンパク質と種々のタイプのリガンドとの間の結合相互作用を検出する方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、注目のタンパク質ターゲットに対して特異的アフィニティーを有するものについてリガンドの大コレクションをスクリーニングする方法に関する。それ自体、本発明は、基本的生物医学的および生化学的研究、特に薬剤の発見および医学的診断の分野において有効である。

【0002】

発明の背景

タンパク質は、生物学的プロセスおよび機能、例えば、触媒、生化学的経路のレギュレーター、レセプター、および免疫応答における重要な素子としての機能において種々の主要な役割を演ずる。タンパク質の多様なかつ重要な役割を考えると、タンパク質に結合するリガンドは薬学的研究者らにより治療剤の候補として見られてきていることは驚くべきことではない。薬剤発見の1つの伝統的アプローチは単に天然レギュレーターを修飾することを含む。構造機能の関係に関してより多くのデータが入手可能となるにつれて、例えば、酵素の活性部位に適合させるように調整した分子の合成を促進するためにコンピューターおよびX線構造を使用して、合理的薬剤を設計することが可能となった。しかしながら、このような進歩した技術を使用してさえ、薬剤のスクリーニングおよび開発はしばしば退屈な時間のかかるプロセスのままであった。

【0003】

より最近の薬剤発見法は異なるアプローチを取り、化合物の極めて大きいライブラリーを注目のタンパク質ターゲットに結合する能力についてスクリーニングすることを含む。このタイプのアプローチは典型的には潜在的タンパク質ターゲット、例えば、レセプターを同定することから開始される。次いでターゲットに結合する能力についてスクリーニングすべきリガンドを含有する、多様なライブラリーを調製する。ライブラリーはランダムペプチドライブラリー、炭水化物ラ

イブラリー、天然産物ライブラリー、およびその他であることができる。しばしばライブラリーは最近開発されたコンビナトリアル技術を使用して調製される。引き続いてこれらのライブラリーをハイスループットスクリーニングにかけて、ターゲットに結合するリガンドを同定する。このアプローチの主要な特徴は莫大な数の分子をスクリーニングすることであるので、このアプローチの成功はターゲットに結合するリガンドをすばやくスクリーニングし、同定することにある。ターゲットであると最初に同定されたリガンドを次いで使用して、いっそう収束されたライブラリーを作り、次いでこれを同一スクリーニングプロセスにかける。新しい収束されたライブラリーをスクリーニングし、調製するこのプロセスは、典型的には、先導化合物の比較的小さい集団が同定されるまで、数回反復される。次いでこれらの先導化合物を種々の薬学的分析にかけて、有用な薬剤候補を選択する。

【0004】

現在の方法の主要な制限はスクリーニング試験により結合を単に検出することであるが、特異的結合と非特異的結合とを区別することができないことがある。また、いくつかのアプローチはハイスループットのスクリーニング手順と完全には適合性ではない。そのうえ、多数の現在の方法はターゲットまたはリガンドのいずれかの標識化を必要とし、結合性複合体を直接検出することができない。

【0005】

本発明は、タンパク質／リガンド複合体の形成を直接検出することができる、タンパク質結合事象を分析する新規な方法を提供する。このシステムを使用すると、特異的結合相互作用に基づいてライブラリーをスクリーニングすることが可能である。また、本発明のシステムを使用して種々の分析的および診断的分析を実行することが可能である。

【0006】

発明の要約

本発明は、一般に、分子および結合性複合体、例えば、タンパク質／リガンド複合体の誘電性に対して感受性であるシステムを利用して、タンパク質と種々の異なるタイプのリガンドとの間の結合事象を検出する方法を提供する。他の方法

は、リガンドのライブラリーをスクリーニングして、注目のタンパク質に結合するリガンドを同定することを含み、このような方法は、例えば、薬剤スクリーニングプログラムにおいて特定の実用性を有する。他の方法は診断方法であり、この方法において、既知タンパク質に結合する特定リガンドの存在、または既知リガンドに結合する特定タンパク質の存在を検出するために、このシステムを使用する。スクリーニングおよび診断法は、複数の素子を有するアレイを使用して実行することができる。

【0007】

さらに詳しくは、いくつかの方法はタンパク質 / リガンド複合体のスペクトルを得ることを含む。このような方法は、タンパク質と試験リガンドとの間で形成されたタンパク質 / リガンド複合体についてのスペクトルを獲得することを含む。試験信号を信号通路に沿って伝搬させ、タンパク質 / リガンド複合体についての応答信号を検出することによってスペクトルを獲得し、ここでタンパク質または被験リガンドは信号通路の一部分に電磁的にカップリングされる。信号通路に沿って伝搬した試験信号を経時的に変化させてスペクトルを得る。試験信号は、例えば、経時的に周波数または波長を変更することによって、変化させる。

【0008】

ある種の方法は、ターゲットタンパク質または注目のタンパク質に結合する能力についてリガンドをスクリーニングすることを含む。この方法は注目のタンパク質をリガンドと接触させることを含む。タンパク質 / リガンド複合体の形成は、複合体から生ずる応答信号の形成により検出される。典型的には、注目のタンパク質または試験リガンドを連続伝送ラインの一部分に電磁的にカップリングさせる。

【0009】

本発明のいくつかのスクリーニング法はいっそう精巧化されており、既知タンパク質と試験リガンドとの間のタンパク質 / リガンド複合体についてのスペクトルを獲得することを含み、ここで既知タンパク質または試験リガンドのいずれかを信号通路の一部分に電磁的にカップリングさせる。信号通路に沿って経時的に変化する試験信号を伝搬させ、既知タンパク質と試験リガンドとの間の複合体に

についての応答信号を検出することによって、スペクトルを獲得する。次いで、既知タンパク質上の特定部位における既知リガンドの結合について特徴的である既知信号の存在について、生ずるスペクトルを検査する。スペクトル中の既知信号の存在は、既知リガンドが結合する特定部位における試験リガンドの結合を示す。既知タンパク質が酵素である試験について、特定部位は、例えば、活性部位またはアロステリック部位であることができる。既知タンパク質がレセプターであるとき、特定部位は天然リガンドが結合する部位であることができる。既知抗体を使用して実施した試験のための特定部位は典型的には既知抗原のための抗原結合部位である。

【0010】

関係するスクリーニング法において、既知タンパク質に対するリガンドの特定クラスの結合特有の既知信号の存在についてスペクトルを検査する。こうして、既知タンパク質が酵素である方法について、既知信号は、例えば、競合インヒビターまたはアロステリックインヒビターとの複合体についての信号である。既知タンパク質がレセプターである場合において、既知信号は、例えば、アゴニストまたはアンタゴニストとの複合体についての信号である。

【0011】

本発明は、また、試料中の特定タンパク質またはリガンドの存在を検出する種々の診断法を提供する。それゆえ、いくつかの方法は、連続伝送ラインの一部分に電磁的にカップリングした既知タンパク質と、既知タンパク質に特異的に結合する特定リガンドを潜在的に含有する試料とを接触させることを含む。十分な時間を経過させて、既知タンパク質および、存在する場合、注目の特定リガンドが結合性複合体を形成するようにさせる。結合性複合体についての応答信号の検出は、試料中の特定リガンドの存在を示す。あるいは、既知リガンドは伝送ラインの一部分に電磁的にカップリングさせ、次いで既知リガンドと結合性複合体を形成する特定タンパク質を潜在的に含有する試料と接触させることができる。

【0012】

いっそう精巧なスクリーニング法を用いるとき、ある種の診断法は試料中の特定タンパク質またはリガンドの存在を検出するために特徴的な信号を使用するこ

とを含む。さらに詳しくは、このような方法は、信号通路の一部分にカップリングした既知タンパク質と、既知タンパク質と結合性複合体を形成する特定リガンドを潜在的に含有する試料とを接触させることを含む。試験信号を信号通路に沿って伝搬させ、結合性複合体についての応答信号を検出することによって、試験スペクトルを獲得し、ここで伝搬工程は経時的に試験信号を変化させることを含む。次いで試験スペクトルを結合性複合体について特徴的である既知信号の存在について検査する；このような信号の存在は試料中の特定リガンドの存在を示す。あるいは、既知タンパク質よりむしろ既知リガンドを信号通路にカップリングさせる。この場合において、これらの方法は、既知リガンドと特定タンパク質との間で形成された結合性複合体について特徴的である信号の存在について、獲得した試験信号を検査することを含み、このような信号の存在は被験試料中の特定タンパク質の存在を示す。

【0013】

なお他の方法は、複数の部位または素子を含有するアレイの使用を含む。各素子は、連続伝送ラインと、素子内に位置する連続伝送ラインの一部分に電磁的にカップリングした既知タンパク質（または複数のタンパク質）とを含む。リガンドを含有する試料と、これらの素子を接触させる。既知タンパク質とリガンドとの間で形成された結合性複合体についての応答信号を検出し、この応答信号はリガンドがタンパク質に結合することができることを示す。他の方法において、既知タンパク質よりむしろ既知リガンドをアレイの各部位に結合させ、試料の中に含有されるタンパク質と接触させる。

【0014】

本発明の方法は結合事象の直接的検出を含むので、標識化されたタンパク質またはリガンドを使用することは不要であり、こうしてタンパク質／リガンドの結合事象をモニターする他のアプローチに比較して、これらの方法を簡素化し、コストを低下させる。異なるタイプの結合を区別することができるので、また、潜在的に治療的値を有する分子についてのスクリーニングを非常にいっそう迅速にすることができる。

【0015】

特定の態様の説明

I. 用語の定義

用語生物学的「結合相手」または「リガンド／抗リガンド」または「リガンド／抗リガンド複合体」は、他の分子を特異的に認識（例えば、結合）して「結合性複合体」、例えば、抗体 - 抗原、レクチン - 炭水化物、核酸 - 核酸、ビオチン - アビジン、およびその他を形成する分子を意味する。生物学的結合相手は、单一分子の対に限定する必要がない。こうして、例えば、單一リガンドは2またはそれ以上の「抗リガンド」の協同作用により結合することができる。

【0016】

用語「リガンド」または「被検体」または「マーカー」は、検出される任意の分子を意味する。それは抗リガンドとの相互作用を通して検出されるか、あるいはリガンドの特徴的な誘電性により検出される。ここで抗リガンドはリガンドに特異的または非特異的に結合する。一般に、リガンドは、リガンドのある部分の認識のために、前記リガンドに特異的または非特異的に結合する他の分子（すなわち、抗リガンド）がそれに対して存在する、任意の分子として定義された。抗リガンドは、例えば、抗体であることができ、そしてリガンドは抗体に特異的に結合する抗原のような分子である。抗原が表面に結合し、そして抗体が検出される分子である場合において、この書類の目的のために、抗体はリガンドとなり、そして抗原は抗リガンドである。リガンドは、また、細胞、細胞膜、オルガネラおよびそれらの合成アナローグから成ることができる。

【0017】

本発明を実施するために適当なリガンドは下記のものを包含するが、これらに限定されない：抗体、抗原、核酸（例えば、天然または合成のDNA、RNA、gDNA、cDNA、mRNA、tRNA、およびその他）、レクチン、糖、オリゴ糖、糖タンパク質、レセプター、増殖因子、サイトカイン、小分子、例えば、薬剤候補（例えば、ランダムペプチドライブラリー、天然産物ライブラリー、レガシーライブラリー、コンビナトリアルライブラリー、オリゴ糖ライブラリーおよびファージディスプレイライブラリーからの）、代謝物質、乱用の薬剤およびそれらの代謝副生物、酵素基質、酵素インヒビター、酵素コファクター、例えば、ビタミン、脂質、ス

テロイド、金属、酸素および生理学的流体、細胞、細胞成分、細胞膜および関連構造物の中に見出される他の気体、細胞接着分子、植物および動物源の中に見出される天然産物、腫瘍マーカー（すなわち、腫瘍に関連する分子）、他の部分的または完全に合成の産物、およびその他。「天然リガンド」は、天然に存在しあつ特定抗リガンド、例えば、タンパク質上の1またはそれ以上の特定部位に特異的に結合するリガンドである。例示であるかつ非限定的例は次の通りである：レセプターおよびレセプターに対して特異的なリガンド（例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト）、酵素およびインヒビター、基質またはコファクター；および抗体および抗原。

【0018】

「抗リガンド」は、他の分子（すなわち、リガンド）に特異的または非特異的に結合する分子を意味する。抗リガンドは、また、それが特異的に結合するリガンドとの相互作用を通して検出されるか、あるいはそれ自身の特徴的な誘電性により検出される。本明細書において使用するとき、抗リガンドは、通常、単独でまたは表面上に固定化される結合相手の1メンバーとして、表面上に固定化される。ある態様において、抗リガンドは信号通路または導性表面上の分子から成ることができる。あるいは、いったん抗リガンドがリガンドに結合されると、生ずる抗リガンド／リガンド複合体は引き続く結合の目的で抗リガンドと考えることができる。

【0019】

用語「特異的に結合する」は、タンパク質またはポリペプチド、核酸、またはレセプターまたは本明細書に記載する他の結合相手について言及するとき、タンパク質および／または他の生物学的物質の異種集団中の注目の同種リガンドを決定する結合反応を意味する。こうして、指定した条件（例えば、抗体の場合においてイムノアッセイ条件）下に、特定したリガンドまたは抗体は特定の「ターゲット」に結合し（例えば、ホルモンはそのレセプターに特異的に結合する）、そして試料の中に存在する他のタンパク質に、あるいはリガンドまたは抗体が生物または生物に由来する試料において接触するようになる他のタンパク質に、有意な量において結合しない。あるタンパク質に特異的に結合するリガンドは、天然

リガンドと同一部位において結合するリガンドである。

【0020】

用語「単離された」、「精製された」または「生物学的に純粋な」は、目的とする種が存在する優勢を占める種（すなわち、モル基準で、それは組成物中の他の個々の種よりも豊富に存在する）、好ましくは目的とする種が存在するすべての高分子種の少なくとも約50%（モル基準で）を構成する、組成物中の実質的精製された画分である。一般に、実質的純粋な組成物は組成物の中に存在するすべての高分子種の約80~90%を構成する。最も好ましくは、目的とする種は本質的に均質に精製され（汚染する種は慣用検出法により組成物において検出されない）、ここで組成物は单一の高分子種から本質的に成る。

【0021】

用語「核酸」は、一本鎖または二本鎖のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドポリマーを意味し、そして特記しない限り、天然に存在するヌクレオチドに類似する方法において機能することができる天然ヌクレオチドの既知アナローグを包含する。

【0022】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、「タンパク質」および「タンパク質ターゲット」は、アミノ酸残基のポリマーを互換的に意味するために使用される。これらの用語は、1またはそれ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工的化学的アナローグであるアミノ酸ポリマーに適用され、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用される。それらに対するリガンドを薬剤発見法においてスクリーニングする、タンパク質またはタンパク質ターゲットは、あるタイプのリガンドに結合することができる本質的に任意のタイプであることができ、下記のものを包含するが、これらに限定されない：酵素、レセプター、抗体およびそれらのフラグメント、ホルモン、および核酸結合性タンパク質。タンパク質またはペプチドは特定部位を含むことができ、この部位はリガンドおよびタンパク質がそこで結合性複合体を形成する部位である。酵素について、特定部位は活性部位またはアロステリック部位であることができる；レセプターの場合において、特定部位は天然リガンドがそこで結合する部位である。

【0023】

用語「抗体」は、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子のフラグメントにより実質的にコードされる1またはそれ以上のポリペプチドから成るタンパク質を意味する。認識される免疫グロブリン遺伝子は、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロンおよびミュー定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を包含する。軽鎖はカッパまたはラムダとして分類される。重鎖はガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンとして分類され、これらは引き続いて免疫グロブリンのクラス、それぞれ、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEを定義する。

【0024】

典型的な免疫グロブリンはテトラマーを含んで成ることで知られる。各テトラマーは2つの同一対のポリペプチド鎖から構成され、各対は1つの「軽鎖」（約25kD）および1つの「重鎖」（約50～70kD）を有する。各鎖のN末端は抗原認識に主として関係する約100～110またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を定義する。可変軽鎖（VL）および可変重鎖（VH）という用語は、それぞれ、軽鎖および重鎖を意味する。

【0025】

抗体は無傷の免疫グロブリンとして、または種々のペプチダーゼを使用する消化により產生される十分に特性決定された多数のフラグメントとして定義される。こうして、ペプシンは抗体をヒンジ領域においてジサルファイド結合の下で消化して、 $F(ab)'$ ₂、すなわち、それ自体ジサルファイド結合によりVH - CH1に結合された軽鎖であるFabの二量体、を產生する。 $F(ab)'$ ₂をヒンジ領域においてジサルファイド結合を破壊する温和な条件下に還元し、これにより($Fab)'$ ₂二量体をFab'モノマーに変換することができる。Fab'モノマーは本質的にヒンジ領域の一部分を有するFabである（他の抗体フラグメントのいっそう詳細な記載については、下記の文献を参照のこと：Fundamental Immunology、W. E. Paul、編、Raven Press、N. Y. (1993)）。種々の抗体フラグメントは無傷抗体の消化により定義されるが、当業者は理解するように、このようなFab'フラグメントは化学的にまたは組換えDNA法を利用することによってde novo合成することが

できる。こうして、抗体という用語は、本明細書において使用するとき、また、完全抗体の修飾により產生されるか、あるいは組換えDNA法を使用してde novo合成された、抗体フラグメントを包含する。好ましい抗体は、一本鎖抗体、より好ましくは可変重鎖および可変軽鎖が一緒に結合されて（直接的にまたはペプチドリンカーを介して）連續的ペプチドを形成している、一本鎖Fv（scFv）抗体を包含する。

【0026】

一本鎖Fv（「scFv」または「scFv」）ポリペプチドは共有結合したVH：VLヘテロダイマーであり、これは直接結合したまたはペプチドコードリンカーにより結合したVHおよびVLコード配列を包含する核酸から発現させることができる。Houston他（1998）Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85：5879 - 5883。自然に凝集されているが、抗体V領域から化学的に分離された軽および重ポリペプチド鎖をscFvに変換するための多数の構造物は、抗原結合部位の構造に実質的に類似する三次元構造に折りたたまれるであろう。例えば、下記の文献を参照のこと：米国特許第5,091,513号および米国特許第5,132,405号および米国特許第4,956,778号。

【0027】

「抗原結合部位」または「結合性部分」は、抗原結合に参加する免疫グロブリン分子の一部分を意味する。抗原結合部位は、重（「H」）および軽（「L」）鎖のN末端の可変（「V」）領域のアミノ酸残基により形成される。重鎖および軽鎖のV領域内の3つの高度に分岐したストレッチは「超可変領域」と呼ばれ、これらの領域は「フレームワーク領域」または「FR」として知られている、いっそう保存されたフランкиングストレッチの間に介在する。こうして、用語「FR」は免疫グロブリンにおける超可変領域の間およびそれらに隣接して自然に見出されるアミノ酸配列を意味する。抗体分子において、軽鎖の3つの超可変領域および重鎖の3つの超可変領域は互いに關して三次元空間で配置されて抗原結合「表面」を形成している。この表面はターゲット抗原の認識および結合を仲介する。重鎖および軽鎖の各々の3つの超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」と呼ばれ、例えば、Kabat他により、特性決定された。Sequence of proteins of i

mmunological interest、第4版、U. D. Dept. Health and Human Services、Public Health Services、マリイランド州ベセスタ(1987)。

【0028】

「エピトープ」は、抗体と相互作用する抗原の部分である。

【0029】

用語「免疫学的結合」または「免疫学的結合性」は、免疫グロブリン分子と、免疫グロブリンがそれに対して特異的である抗原との間で起こるタイプの非共有結合的相互作用を意味する。

【0030】

「試料」は、核酸から得ることができる、本質的に任意の源を意味する。試料は本質的に任意の生物、例えば、動物および植物、ならびに細胞培養物、組換え細胞および細胞成分から獲得することができる。試料は生物学的組織、流体または検体からのものであることができ、そして疾患を有するまたは健康な生物から得ることができます。試料は下記のものを包含するが、これらに限定されない：痰、羊水、血液、血球（例えば、白血球）、尿、精液、腹膜液、胸膜液、組織または細い針のバイオプシー試料、および組織ホモジネート。典型的には、試料はヒトから採取される。しかしながら、試料は他の哺乳動物からも得ることができ、このような哺乳動物は、例えば、下記のものを包含するが、これらに限定されない：イヌ、ネコ、ヒツジ、畜牛、およびブタ。試料は、必要に応じて、適当な緩衝液中の希釀により前処理するか、あるいは、所望ならば、濃縮することができる。種々の緩衝剤の1つ、例えば、リン酸塩、Tris、またはその他を使用する、好ましくは生理的pHにおける多数の標準水性緩衝溶液の任意のものを使用することができます。

【0031】

生物学的試料は、よく知られている技術、例えば、静脈穿刺、腰椎穿刺、流体試料、例えば、唾液、または組織バイオプシーおよびその他を使用して患者から得ることができます。生物学的材料をヒト以外、例えば、商業的に関係する家畜から得るとき、血液および組織は家畜プロセシングプラントから入手することが好都合である。同様に、本発明において使用する植物材料は好都合には農業または

園芸源、または他の天然産物源から得ることができる。あるいは、生物学的試料は組織および／または血液が貯蔵されている細胞または血液バンクから、あるいはin vitro源、例えば、細胞培養物から得ることができる。生物学的材料源として使用するための細胞培養物を確立する技術は、この分野においてよく知られている。Freshney、Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Techniques、第3版、Wiley - Liss、NY(1994)は細胞培養物に対する一般的手引きを提供する。

【0032】

用語「信号通路」は、DC静電場等の任意の有効な周波数の電磁信号を支持することができるバイオ・電気的インターフェース伝いの伝送媒質を意味する。信号通路の非限定的例は下記のものを包含する：導電性および誘電性導波管、多重導体伝送媒質、例えば、横方向電磁(TEM)伝送ライン、TE、TMまたはTEMモード伝搬を支持する3以上の導電性素子を有する伝送ライン、例えば、四重極線および八重極線、結合導波管、結合されているか、あるいはされていないことができる共鳴空洞構造物、他の非モード構造物、例えば、ワイヤ、プリント回路、および他の分布回路および集中インピーダンス伝導構造物、およびその他。信号通路は構造的に、信号平面、接地平面、または両方の構造物の組合せを含んでなる。典型的には、信号通路はMBRの表面に対して非直角である方向に沿って形成される。信号通路が導電性層または領域から成る態様において、導電性領域はその領域にわたって連続的に延びる。信号通路が非金属である、すなわち、誘電性導波管である態様において、信号通路は信号損が最小である通路として、あるいは導電率が3mohs/mより大きい通路として定義される。

【0033】

「伝送ライン」は導電性素子であり、典型的には金メッキしたニッケルであり、これはある前もって決定された周波数において電磁信号の伝搬を支持することができる。「信号通路」は使用するより広い意味の用語である（すなわち、伝送ラインは信号通路の1つのタイプである）。

【0034】

「分子結合領域」または「MBR」は、バイオ・電気的インターフェースに沿つ

て信号通路にカップリングした少なくとも1つの分子構造物（すなわち、被験体、抗リガンド、またはリガンド／抗リガンド対、およびその他）を有する層を意味する。分子結合領域は、1またはそれ以上のリガンド、抗リガンド、リガンド／抗リガンド複合体、リンカー、ポリマーおよび他の物質のマトリックス、または本明細書に記載する他の分子構造物から成ることができる。さらに、分子結合領域は極めて多様性であり、1またはそれ以上の連鎖基を有することができる、マトリックス層および／または絶縁層を含む1またはそれ以上の成分を包含することができる。MBRは直接的または間接的物理的接続を介して、あるいはリガンドが信号通路から物理的に分離されるとき、電磁的カップリングを介して、信号通路にカップリングされる。MBRは、すべてはこの分野において実施されている標準に従い、例えば、チオールリンカー、ビオチニル化金属およびその他により、誘導化された表面を有することができる。

【0035】

用語「結合事象」は、最低2つの分子構造物、例えば、リガンドおよび抗リガンド間に相互作用または結合を意味する。2つの分子構造物が直接的または間接的に物理的に接触するとき、あるいは2つの分子構造物が物理的に分離されいるが、それらの間で電磁的にカップリングされるとき、相互作用は起こることができる。医学的関係における注目の結合事象の例は下記のものを包含するが、これらに限定されない：リガンド／レセプター、抗原／抗体、酵素／基質、DNA／DNA、DNA／RNA、RNA／RNA、核酸ミスマッチ、相補的核酸および核酸／タンパク質。あるいは、用語「結合事象」は、信号通路に結合した、本明細書に記載する単一分子または分子構造物、例えば、リガンド、または抗リガンド／リガンド複合体を意味することができる。この場合において、信号通路は第2分子構造物である。

【0036】

「リガンド／抗リガンド複合体」は、抗リガンドに結合したリガンドを意味する。結合は特異的または非特異的であることができ、そして結合は典型的には共有結合、水素結合、免疫学的結合、ファンデルワールス力、または他のタイプの結合である。

【0037】

「カップリング」は、直接的または間接的物理的接続を通して、あるいは任意の形態の信号カップリング、例えば、静電的または電磁的カップリングを通して、2つの構造物間のエネルギー移動を意味する。こうして、「電磁的カップリング」は、電磁的相互作用によるエネルギー移動を意味する。

【0038】

「試験信号」は、電磁スペクトル内で規定される任意の有効な周波数において伝搬する信号を意味する。例えば、試験信号の周波数は1MHzまたはそれ以上、例えば、5MHz、10MHz、20MHz、45MHz、100MHz、500MHz、1GHz、5GHz、10GHz、30GHz、50GHz、100GHz、500GHz、1000GHzおよびそれらの間の範囲の周波数である。

【0039】

「酵素」は、他の化合物又は「基質」中の化学反応の活性化工エネルギーを減少する触媒として作用するが、反応の最後産物ではないタンパク質を意味する。

【0040】

「溶液」は、リガンドがその中に存在する物質を包含する。溶液の非限定的例は、固体、液体または気体の状態の物質を包含する。固溶体は、炭水化物、タンパク質、オリゴヌクレオチド、あるいは、任意の有機ポリマー物質、例えば、ナイロン、レーヨン、ダクリオン、ポリプロピレン、テフロン（登録商標）、ネオプレン、デルリンまたはその他を包含する、天然に存在する分子または合成分子から構成することができる。液体溶液は、水性、有機または他の主成分、ゲル、気体、およびエマルジョンを含有する溶液を包含する。典型的な溶液は、セルロース、デキストラン誘導体、d-PBSの水溶液、Tris緩衝液、脱イオン水、血液、生理緩衝液、脳脊髄液、尿、唾液、水、有機溶媒を包含する。溶液は、リガンドおよび/または抗リガンドを結合性表面に適用するために使用する物質を意味するために、本明細書において用いられる。溶液は分析すべき試料を含有する。

【0041】

「連鎖基」または「リンカー」は、バイオアッセイ装置上で任意の2成分を結合するために使用する化学的構造物を意味する。こうして連鎖基は1つの成分に結合する第1結合部分、例えば、導電性表面を有し、そして他の成分、例えば、

抗リガンドのマトリックスに結合する第2結合部分を有する。

【0042】

用語「バイオアッセイ装置」は、分子結合領域が形成された構造物を意味する。バイオアッセイ装置は、すべてが特定のサイズまたは形状を有する、表面、溝付き区域、または気密シールされた囲いから成ることができる。

【0043】

「バイオアッセイシステム」は、バイオアッセイ装置を電磁的にプロービングしつつ検出するために必要な成分と組み合わせた、前述のバイオアッセイ装置を意味する。これらの成分は下記のものを包含するが、これらに限定されない：1またはそれ以上の信号通路、1またはそれ以上の基質、電子装置、例えば、信号発生器、オシロスコープ、およびバイオアッセイ装置からの信号をプロービングしつつ検出するために必要なベクター分析装置、電磁信号をプロービングしつつ検出し、そしてデータを解析することができるマイクロチップおよびマイクロプロセッサー。

【0044】

用語「共鳴する」または「共鳴」は、周波数の関数として急速に変化する誘電応答を一般に意味する。

【0045】

用語「バイオ - 電気的インターフェース」は、試験信号の伝搬を支持する信号通路と分子結合領域との間のインターフェース構造を意味する。

【0046】

用語「マトリックス」または「結合性マトリックス」は、スペーサーとして使用するか、あるいは結合に有効な表面積を増強するために、あるいは結合を増強するために分子の向きを最適化するために、あるいはバイオアッセイ装置を最適化するために結合の他の性質を増強するために使用するバイオアッセイチップ上の物質の層を意味する。マトリックス層は、炭水化物、例えば、デキストラン、ポリアミノ酸、架橋および非架橋タンパク質、およびその他から構成することができる。

A. 一般論

本発明は、一般に、種々のタイプのリガンド、例えば、インヒビター、アゴニスト、アンタゴニスト、薬剤、およびその他に対するタンパク質（例えば、レセプター、酵素、抗体、およびその他）の結合を包含する、タンパク質の結合事象を解析する方法を提供する。さらに詳しくは、ある種の方法は、分子の大きいライブラリーをスクリーニングして、注目の特定タンパク質に結合し、こうして注目の生物学的活性を潜在的に有する分子を同定することを含む；このような方法は、例えば、薬剤発見プログラムにおいて特定の実用性を有する。他の方法は、試料中の特定リガンドの存在についてアッセイするためにタンパク質を使用することを含む。なお他の方法は、ある種のタンパク質結合事象を区別し、同定し、または定量するために、あるいはタンパク質またはタンパク質の相互作用に関する構造の情報を提供するために、プロファイルを使用することを含む。

【0047】

ある種のスクリーニング法はタンパク質によるリガンドの結合のために発生した信号を観測することを含み、ここでリガンドまたはタンパク質が信号通路、例えば、伝送ラインに電磁的にカップリングされている。他のいっそう複雑なスクリーニング法は、タンパク質／リガンド複合体についてのスペクトルを獲得し、次いである種の構造的モチーフまたは結合相互作用特有の信号についてスペクトルを検査することを含む。このような方法を使用すると、例えば、リガンドのタイプおよび結合相互作用のタイプに関する情報を得ることができる。

【0048】

これらの方法は複数の素子または部位を含むアレイを使用して実施することができる。各素子または部位は異なるタンパク質またはリガンドを含む。アレイの各素子は、信号通路、例えば、伝送ラインを含む。タンパク質またはリガンド（またはそれらの複数）は、アレイの一部分である信号通路の各々に電磁的にカップリングされる。信号は複数の伝送ラインを通り、各伝送ラインはアレイの異なる素子を走行する。次いで伝送および／または反射された信号は、結合性複合体の存在により変調され、アレイ上の種々の素子における結合の特質を分析するために使用される。

【0049】

B. バイオアッセイシステム

本発明は、大部分の分子が示す独特の誘電性に基づいて、非常に大量の分子を区別することができるという観測を使用する。これらの区別する誘電性は、信号を結合した分子構造物にカップリングすることによって観測することができる。結合した分子構造物の独特的誘電性は信号を変調し、それに独特的信号応答を与える。次いでこの独特的信号応答を使用して、分子結合領域を構成するリガンドおよび他の分子を検出し、同定することができる。システムの下記の説明は、その広い適用可能性のために、リガンドおよび抗リガンドとの関連で往々にして記載されるが、リガンドおよび抗リガンドはタンパク質ターゲットおよびタンパク質ターゲットに結合することができる多数のリガンドの任意のもの特異的に含むことができることを理解すべきである。同様に、広く結合事象について言及するが、このような事象はタンパク質に対するリガンドの結合を含むことができる。

【0050】

第1A図は、本発明によるバイオアッセイシステムの1つの態様を図解する。システム100は、マイクロストリップ、ストリップライン、共平面導波管、スロットラインまたは同軸システムの中に集中素子回路または分布素子回路を含む多数の構成において実現することができる、2つの導体、信号平面接地平面、回路トポロジーにおいて図解されている。そのうえ、エレクトロニクスの当業者は容易に理解するように、このシステムは単一の導体導波管システム、または3またはそれより多い導体システムに容易に変更することができる。

【0051】

図解するように、システム100は、信号源110、伝送ライン120、接地平面130、バイオアッセイ装置150、および信号検出器160を含む。図解する態様はバイオアッセイ装置150にカップリングされた2つの伝送ライン120を示すが、別の態様において、単一の伝送ラインをバイオアッセイ装置にカップリングさせるか、あるいはさらに3またはそれより多い伝送ラインをバイオアッセイ装置150にカップリングすることができる。伝送ライン120は、操作の所望の周波数にわたって信号の伝搬を支持することができる材料から形成される。伝送ライン120は、慣用の

光リソグラフィーまたは半導体加工技術を使用して支持体、例えば、アルミナ、ダイヤモンド、サファイア、ポリイミド、またはガラス上に配置された導電性層、例えば、金として実現することができる。

【0052】

システム100は、伝送ライン120にカップリングしたバイオアッセイ装置150を含む。バイオアッセイ装置150は、導電性層153がその上に配置されている支持体151を含有する。導電性層153は、試験信号の伝搬を支持するインターフェースを形成する。支持体151は、任意の絶縁材料、例えば、ガラス、アルミナ、ダイヤモンド、サファイア、シリコン、ヒ化ガリウムまたは半導体のプロセッシングにおいて使用される他の絶縁材料から成ることができる。

【0053】

分子結合領域(MBR)156は、インターフェース伝送ライン153の1またはそれ以上の区域にカップリングされている。エレクトロニクスの当業者は容易に理解するように、カップリングは図解するようにインターフェース伝送ライン153とMBR156との間の直接的接続を通して、あるいはさらに後述するように、信号カップリングを通して行うことができる。

【0054】

MBR156は1またはそれ以上のリガンドから主として構成されるが、本明細書において記載するように、他の分子および構造物を含めることもできる。MBR156は、例えば、一次結合の場合において、ただ1つの結合したリガンド列から成ることができるか、あるいは二次またはそれより高次の結合事象が発生する場合、2、3、4、5またはそれ以上のリガンド列であることができる。複数のリガンド列は同一インターフェース伝送ライン153にわたって異なる結合表面153に存在することができる。

【0055】

図解する態様において、誘電性支持体158は溶液157と接地平面159との間に位置する。図解する態様において、誘電性支持体158および接地平面159はバイオアッセイ装置150内に位置するが、別の態様において、一方または両方は外部に位置することができる。さらに、MBR156および溶液157の配置は、インターフェー

ス伝送ライン153に対するこれらの層の近接の他に、又はそれに加えて、接地平面に向かって入れ替え、移動させることができる。

【0056】

システム100は、試験信号を伝送ライン120上にかつバイオアッセイ装置150に向かって発射させる信号源110を含む。信号検出器160は伝送路に沿って位置して、生ずる信号（反射または伝送されたまたは両方の）を検出する。信号がバイオアッセイ装置150のインターフェース伝送ライン153に沿って伝搬するとき、MBR156の誘電性は試験信号を変調する。次いで変調された信号を取り、バイオアッセイ装置内で起こる分子結合事象を検出し、同定するために使用する。これについてはさらに後述される。

【0057】

本発明の別の態様において、リガンド、抗リガンド／リガンド複合体（例えば、タンパク質ターゲットとリガンドとの間の結合性複合体）または本明細書に記載する他の分子構造物がインターフェース伝送ライン153から物理的に分離されるとき、その検出および同定は可能である。この態様において、リガンドは伝送ライン153に物理的に接続されておらず、インターフェース伝送ライン153に電気的にまたは電磁的にカップリングされている。インターフェース伝送ライン153と懸垂されたリガンドとの間のカップリングはインターフェース伝送ライン153に沿って伝搬する試験信号の応答を変更し、これによりそれは検出および／または同定する手段を提供する。インターフェース伝送ライン153と懸垂されたリガンドとの間の最大距離は、因子、例えば、インターフェース伝送ライン153とリガンドとの間の媒体の有効誘電定数、全カップリング面積、信号検出器の感度、溶液のリガンドの濃度、および所望の検出時間により決定される。分離距離は典型的には 10^{-1} m、 10^{-2} m、 10^{-3} m、 10^{-4} m、 10^{-5} m、 10^{-6} m、 10^{-8} m、 10^{-9} m、 10^{-10} mまたはそれらの間の範囲内の程度である。

【0058】

ある態様、例えば、細胞をベースとするアッセイにおいて、溶液を通して信号通路にMBRを電磁的にカップリングさせることができる。こうして、細胞および特に細胞膜および膜をベースとする構造物を信号にカップリングさせることができ

きる。

【0059】

第1B図は、共鳴マイクロストリップ回路170のアレイを含んでなるバイオアッセイシステムの第2態様を図解する。各共鳴回路170は解放回路スタブ176において終わる伝送ライン172から成る。回路設計の当業者は理解するように、集中素子または分布回路のトポロジー、またはそれらの組合せにおいて、他の共鳴構造物を使用することができる。

【0060】

第1C図は1つの共鳴回路170の断面図を図解する。解放回路スタブ176は第1A図に示す共鳴回路170のバイオ - 電気的インターフェースを形成し、バイオ - 電気的インターフェースに密接して並列する。特に、解放回路スタブ176は誘電層176b上に配置されたインターフェース伝送ライン176aから成り、接地平面176cより上に位置する。

【0061】

この態様において、MBR176dは直接的接続を介して伝送ライン176aにカップリングされている。MBR176dは特異的または非特異的方法でインターフェース伝送ラインに沿って結合することができる。前述したように、主題の分子構造物をインターフェース伝送ライン176aから懸垂させるが、インターフェース伝送ライン176aに電気的または電磁的にカップリングさせて、結合事象の検出および同定の情報を得ることができる。

【0062】

インターフェース伝送ライン176aの寸法は、例えば、所望の測定時間（より大きい面積はより速い検出時間を生ずる）、所望の共鳴周波数 f_{res} 、より高い効率を達成するか、あるいは不連続を引き起こして結合事象を際立たせるための一定のインピーダンス整合条件および全アレイが形成されるプロセスを考慮して変えてよい。例えば、慣用のマイクロ波光リソグラフィーを使用する場合、比較的厚い誘電層、例えば、アルミナ、ダイヤモンド、サファイア、デュリオッド(duriod)または他の慣用支持体材料を使用して、結合表面積を $10^{-1}m^2 \sim 10^{-6}m^2$ の範囲にすることができる。あるいは、半導体加工を使用する場合、シリコンまたはヒ

化ガリウムの他の比較的薄い誘電層を使用して、結合表面積を $10^{-6}\text{m}^2 \sim 10^{-12}\text{m}^2$ の範囲にすることができる。

【0063】

慣用マイクロ波またはCADツール、例えば、Microwave SpiceTM、EEsof TouchstoneTMおよびLibraTMを使用して、共鳴構造物が所望の共鳴周波数点 f_{res} において応答信号の応答を示すように、伝送ライン172の長さおよびインピーダンス、インターフェース伝送ライン176aの寸法、および誘電層176bの厚さおよび誘電定数を選択する。典型的には、所望の共鳴周波数 f_{res} 点は注目の分子がそれらの誘電性の劇的变化を示す周波数の範囲であり、それらの測定はそれらの検出を可能とするであろう。あるいは、共鳴周波数点 f_{res} は最も広い範囲の信号検出器を可能とする所望の試験周波数範囲の中心として定義することができる。図解する態様において、共鳴周波数 f_{res} は10MHz、20MHz、45MHz、100MHz、500MHz、1GHz、5GHz、10GHz、30GHz、50GHz、100GHz、500GHz、1000GHzおよびそれらの間の範囲の周波数を包含する。

【0064】

測定の間に、溶液176eは1またはそれ以上の解放回路スタブ172上に適用する。溶液中の1またはそれ以上の分子がインターフェース伝送ライン176aに結合するとき、MBR176dが形成する。この場合において、MBR176dおよび溶液は、さらに後述するように、パラシスチックとして電気的に挙動し、これは共鳴周波数点 f_{res} をその本来の共鳴周波数点より上または下にシフトさせる。この周波数のシフトを検出することができ、そして分子結合事象の発生を示すために使用することができる。また、後述するように、信号応答を広いスペクトルにわたって問合せ、結合した分子構造物の同定を確認することができる。各共鳴回路170は異なる分子構造物に結合するように製作し、そして各共鳴回路170をアドレス可能とし、これにより同一溶液中の多数の分子構造物を同時に検出しつつ同定できるようにする。別の態様において、明確な共鳴周波数を示すように各共鳴回路170を設計することができ、この場合において共鳴回路170のすべてに連続的周波数範囲にわたって問合せして、分子の結合を決定することができる。

【0065】

バイオ - 電気的インターフェース領域は、所望の試験周波数における電磁信号を支持するように設計された信号通路から成る。多数の構成が可能であり、1つの例はDCおよび110GHzの間で操作可能なスパッタード金伝送ラインである。他の態様において、信号通路は誘電媒体、例えば、MBRそれ自身から成る。この態様において、信号通路はDC電圧および電流をブロックするが、そうでなければ、例えば、下記の周波数において発生する所望の試験信号の伝搬を支持する：1MHz、5MHz、10MHz、20MHz、45MHz、80MHz、100MHz、250MHz、500MHz、750MHz、1GHz、2.5GHz、5GHz、7.5GHz、10GHz、12GHz、18GHz、20GHz、22GHz、24GHz、26GHz、30GHz、33GHz、40GHz、44GHz、50GHz、80GHz、96GHz、100GHz、500GHz、1000GHz、またはそれらの間の範囲の周波数。したがって、この分野において知られている高周波数回路設計技術を使用して信号通路を設計する。このような設計技術は、信号通路を相互に接続する構造物に整合させ、信号通路の挿入損失を最小にし、そして信号通路の電圧定常波比（VSWR）を最小にするインピーダンスを含む。本発明の好ましい態様において、信号通路およびMBRは非直角に向いている。

【0066】

本発明は、信号通路に取付けられた予測された大きさおよび構造の分子の検出に限定されない。MBRは、信号通路に取付けられているか、あるいはそれから分離しているが、信号通路にカップリングされた1、2、3、4、5、10、20、30、50、100、1000通り、またはそれ以上の分子長さから成ることができる。さらに、MBRは均質分子の複数層、単一であるが不均質の分子層、または複数の不均質分子層から成ることができる。

【0067】

C. 伝送ラインおよびMBR

システムの結合相互作用は一般にバイオアッセイ装置内で、特に導電性層（第1A図～第1C図においてインターフェース伝送ライン）に沿って起こる。導電性層は、導電性であって高周波数の試験信号の伝搬を支持する形態を有する材料から製作される。導電性表面は、前述したように、所望の試験周波数範囲にわたって適当な導電性を示しかつすぐれた分子結合性を有する材料から製作される。このような材料は下記のを包含するが、これらに限定されない：金、酸化インジウム

錫(ITO)、銅、銀、亜鉛、錫、アンチモン、ガリウム、カドミウム、クロム、マグネシウム、コバルト、イリジウム、白金、水銀、チタン、アルミニウム、鉛、鉄、タングステン、ニッケル、タンタル、レニウム、オスミウム、タリウムまたはそれらの合金。また、導電性層は半導体材料から形成することができる。半導体材料は、結晶質または非晶質であることができ、化学的にドーピングされたまたは純粋な炭素、シリコン、ゲルマニウム、ガリウム-ヒ素、ヒ化インジウム-ガリウム、またはその他を包含する。導電性材料は、また、ポリマー、特に導電性であるポリマー、例えば、ポリアセチレン、ポリチオフェンおよびその他から形成することができる。導電性層は用途に依存して厚いか、あるいはわずかに数分子層深さであることができる。導電性層は、ヒ化ガリウムまたは既知半導体加工技術により導電性される他の半導体材料の蒸着された薄い金属層、またはエピタキシャル層から構成することができる。さらに、導電性層は誘導化することができ、そのプロセスはよく知られており、例えば、下記の文献を参照のこと：Kumar他、Patterned Self-Assembled Monolayer and Mesoscale Phenomena, Accounts of Chemical Research, 28: 219 - 226 (1995)。

【0068】

さらに、導電性層は、分子の結合に対して導電性である形態を有する材料から製作される。リガンドは直接的に、他の分子構造物を通して間接的に、または両方の立体配置を通して導電性層に結合することができる。導電性層に結合することができる分子の範囲は下記のものを包含するが、これらに限定されない：タンパク質、核酸、小分子、サッカリド、脂質、および注目の任意の他の分子。この化学は、表面に取付けられた分子のわずかに單一種、表面に取付けられた分子の全アレイ、または表面に直接取付けた種と溶液中の注目のリガンドとの間の多数の結合事象を含むことができる。

【0069】

導電性層ヘリガンドを取付けるとき関係する典型的な化学は、一般に、リガンドおよびそれに結合する抗リガンドの特質、およびアッセイにおけるそれらの機能に依存するであろう。表面上で起こることがある相互作用の可能なタイプのリストは下記のものを包含するが、これらに限定されない：タンパク質／タンパク

質の相互作用、DNA / タンパク質の相互作用、RNA / タンパク質の相互作用、核酸のハイブリダイゼーション、例えば、塩基対誤対合の分析、RNA / RNAの相互作用、tRNAの相互作用、酵素 / 基質システム、抗原 / 抗体の相互作用、小分子 / タンパク質の相互作用、薬剤 / レセプターの相互作用、固相リガンドのコンフォメーションの変化、タンパク質 / サッカリドの相互作用、および脂質 / タンパク質の相互作用。

【0070】

一般的用語において、1つの態様である結合事象を一次結合および二次結合として記載することができる。また、分子結合の追加の層があってもよい。一次結合は導電性表面への抗リガンドの取付けを意味し、これはリンカー分子の助けにより実施することができる。二次結合は抗リガンドへのリガンドの結合を意味し、抗リガンドはMBR中の他の分子であるか、あるいは二次結合は導電性表面それ自体へのリガンドの直接的結合を意味する。典型的には、結合は固定化された固相抗リガンドへの液相リガンドの結合を包含する。例えば、一次結合はバイオアッセイ装置の導電性層への特異的抗体の取付けができる、そして二次結合は抗体に対する試料溶液中の特異的抗原の結合を包含するであろう。あるいは、二次結合は導電性表面に対するタンパク質の直接的取付けができる、例えば、タンパク質のアミノ末端は金導電性層に直接的に結合する。

【0071】

前述の結合は、導電性層の1またはそれ以上の区域に沿って分子結合領域（MBR）180を形成し、その態様の1つは第1D図に図解されている。この態様において、MBR180は、必要に応じて第1リンカー181、絶縁体182、第2リンカー183、マトリックス184、第3リンカー185、抗リガンド層186、およびリガンド層187から成る。

【0072】

第1リンカー181は絶縁体182と導電性層（図示せず）との間の取付けを提供する。第1リンカー181は、分子、例えば、チオール、アミン、アミド、または金属、例えば、クロムまたはチタンから成る。絶縁層182は導電性層およびMBR180および溶液（図示せず）との間のバリヤーを提供する。絶縁層182は、MBRおよび/ま

たは溶液に対する暴露のための導電性層の構造的劣化を防止する気密バリヤーを提供する。選択的に、または追加的に、絶縁層182は非導電性層から成ることができる。この非導電性層は、測定を妨害するであろう、導電性層からMBRおよび／または溶液へのDCまたは低周波数のエネルギーの流れを防止する。絶縁層は、ポリイミド、アルミナ、ダイヤモンド、サファイア、非導電性ポリマー、半導体絶縁材料、例えば、二酸化ケイ素またはヒ化ガリウム、または気密および／または電気的絶縁特性を提供する他の材料を包含することができる。絶縁層は、また、空気、または他の気体物質から成ることができ、この場合においてリンクー181を検出することができる。

【0073】

第2リンクー183は絶縁層182とマトリックス184との間の取付けを提供し、そして第1リンクー181と同一であるか、あるいはそれに類似する分子から成る。マトリックス層184はポリマー層から成るが、また、必要に応じて炭水化物、ポリアミノ酸層またはその他である。第3リンクー185はマトリックス層を抗リガンド186に取付けるために適当な分子から成り、そして第1リンクー181および／または第2リンクー183と同一であるか、あるいはそれに類似する分子から成る。

【0074】

抗リガンド186を使用して、溶液中のリガンド187と特異的または非特異的に結合させおよび／または溶液の物理的性質を測定する。物理的性質のいくつかの例は、温度、pH、イオン強度、およびその他である。抗リガンドは、リガンド187に特異的または非特異的に結合する分子または分子構造物から成る。例えば、リガンドが抗原から成る場合、抗リガンドは抗体から成るであろう。リガンド187は、抗リガンド186に特異的または非特異的に結合する分子または構造物から成る。

【0075】

一般に、MBRは、本明細書に記載するように、結合した信号通路に沿った電磁試験信号と測定可能にほどに相互作用するのに十分である。こうして、変化する誘電性を示す本質的に任意のMBR組成物を分析することができる。大部分の態様において、MBRは約1～5～1cmの範囲の厚さを有するであろう。簡単な分子結合

事象について、この厚さの範囲は通常約10 ~ 10,000 、典型的には100 ~ 5,000 、または500 ~ 1,000 であろう。より大きい相互作用（例えば、細胞）において、MBRは1 μm ~ 100 μm、好ましくは5 μm ~ 50 μmの範囲であろう。絶縁体、マトリックスおよびその他では、サイズは有意により高い範囲であろう。

【0076】

第1D図の態様はすべての可能なMBR立体配置を網羅することを意図しない。当業者は理解するように、MBRを構成する非常に多数の組合せは、特定の用途に従い、設計可能である。例えば、他の態様において、第1リンカー181、第2リンカー183、第3リンカー185、絶縁層182、およびマトリックス層184を利用せず、こうしてMBRは抗リガンド186およびリガンド187から成る。さらに選択的に、第1リンカー181および絶縁層182を欠失させることができる。記載した層の1またはそれ以上が欠失されているか、あるいは追加の層が付加されている他の選択的態様は、当業者にとって明らかであろう。

【0077】

さらに、MBRを不均質分子から構成することができる。不均質分子は、特定のアレイフォーマットに依存して空間的にまとめるか、あるいはランダムに層状化または分布させることができる。例えば、第1E図は空間的に分離されている、4つの異なる抗リガンド190、191、192および193を有するMBR180の上面図を図解する。第1F図は、4つの異なる抗リガンド190、191、192および193が全体を通じてランダムに分布している、MBR180を図解する。別の態様において、第1G図は、MBR180が信号通路153にカップリングされた溶液157中に細胞194を含有する、断面図を図解する。別の態様において、膜結合構造（図示せず）を有する細胞膜195は信号通路153にカップリングされた溶液の中に存在する。層は、例えば、リンカー、マトリックス、抗リガンド、リガンドおよび1またはそれ以上の絶縁層を包含することができる。ある態様において、1またはそれ以上の膜、例えば、イオン移動、サイズまたは電荷の選択をコントロールするか、あるいは抗リガンドまたは他の分子構造物の取付けを支持する膜を使用することができる。

【0078】

電気的に、MBRは独特の誘電性を示す。誘電性は単離された結合した分子、お

より環境的変化、例えば、結合事象、pH変化、温度、イオン強度およびその他の存在下における結合した分子の両方の一部分構造的およびコンフォメーション的性質に寄与する。結合した分子構造物の誘電性は、溶媒和媒質（溶液）の局所的構造と一緒に、また、一次または他の高次の結合により引き起こされる分子内および分子間の結合の変化、および導電性層付近における溶媒和媒質の変位に寄与することができる。

【0079】

バイオ-電気的インターフェース領域は、所望の試験周波数における電磁信号の伝搬を支持するように設計された信号通路から成る。多数の構成が可能であり、1つの例はDCおよび110GHzの間で操作可能なスパッタード金伝送ラインである。他の態様において、信号通路は誘電媒体、例えば、MBRそれ自体から成る。この態様において、信号通路はDC電圧および電流をブロックするが、そうでなければ、例えば、下記の周波数において発生する所望の試験信号の伝搬を支持する：1MHz、5MHz、10MHz、20MHz、45MHz、80MHz、100MHz、250MHz、500MHz、750MHz、1GHz、2.5GHz、5GHz、7.5GHz、10GHz、12GHz、18GHz、20GHz、22GHz、24GHz、26GHz、30GHz、33GHz、40GHz、44GHz、50GHz、80GHz、96GHz、100GHz、500GHz、1000GHz、またはそれらの間の範囲の周波数。したがって、この分野において知られている高周波数回路設計技術を使用して信号通路を設計する。このような設計技術は、信号通路を相互に接続する構造物に整合させ、信号通路の挿入損を最小にし、そして信号通路の電圧定常波比（VSWR）を最小にするインピーダンスを含む。本発明の好ましい態様において、信号通路およびMBRは非直角に向いている。

【0080】

本発明は、信号通路に取付けられた予測された大きさおよび構造の分子の検出に限定されない。MBRは、信号通路に取付けられているか、あるいはそれから分離しているが、信号通路にカップリングされた1、2、3、4、5、10、20、30、50、100、1000通り、またはそれ以上の分子長さから成ることができる。さらに、MBRは均質分子の複数層、単一であるが不均質の分子層、または複数の不均質分子層から成ることができる。

III. バイオアッセイ装置

A. 装置の構造

構造的に、バイオアッセイ装置は信号通路およびバイオ - 電気的インターフェースを含む。信号通路は、単一の入力 / 出力信号ポート、1つの入力信号ポート通路および1つの出力信号ポート通路、または複数の入力および / または出力信号ポート通路から成ることができる。1またはそれ以上の信号通路は、多数の異なる構成、例えば、導電性ワイヤ、伝送ライン、導波管構造物、共鳴空洞、または所望の周波数範囲にわたって試験信号の伝搬を支持する任意の他の伝送媒体において実現することができる。可能態様について、下記の文献を参照のこと : R. E. Collins, Foundations for Microwave Engineering, MacGraw - Hill Publishing Co., 1966 ; および S. March, Microwave Transmission Lines and Their Physical Realizations, Les Besser and Associates, Inc., 1986。さらに、バイオアッセイ装置はまた種々の異なる立体配置において実現することができる。立体配置の非限定的例は、慣用製造技術、慣用エッチングおよび光リソグラフィー、または半導体加工技術を使用する大型～小型の構造物を包含する。

【0081】

第2A図は、断面図で示すバイオアッセイ装置の1つの態様を図解する。バイオアッセイ装置230は、上部プレート231、接触端子237、および下部プレート239から成る。上部プレート231は、その上に配置されたインターフェース伝送ライン233を有する下部表面を含む。誘電性支持体240および接地平面250はバイオアッセイ装置に対して外部に位置する。上部プレート231および / または誘電性支持体240は、絶縁材料、例えば、ガラスから形成され、好ましくは慣用光リソグラフィーまたは金スパッタリング、エッチングまたは化学的蒸着 (CVD) 加工法と適合性である。他の材料、例えば、アルミナ、シリコン、ヒ化ガリウムまたは他の絶縁材料を選択的に使用できる。

【0082】

第2A図に図解されているように、インターフェース伝送ライン233の下部表面は分子結合領域 (MBR) 234と接触している。図解するように、MBRは異なる層ま

たはタイプの結合した分子構造物ならびに溶液中に存在する分子構造物から成ることができる。別の態様において、MBR234はインターフェース伝送ライン233の小さいまたは大きい部分にわたって延び、そして示すように異なる結合した分子構造物から成ることができる。第1D図に示すように、MBRは抗リガンド／リガンド構造物、またはリンカー、マトリックス、および絶縁層の種々の中間体のみから成ることができる。実行するとき、絶縁層182（第1D図）は、他の慣用絶縁材料に加えて、空気、ポリイミド、アルミナ、ダイヤモンド、サファイア、または半導体絶縁材料、例えば、二酸化ケイ素またはヒ化ガリウムまたは非導電性材料から成ることができる。絶縁層の厚さおよび誘電定数は、MBR234およびインターフェース伝送ライン233が信号伝送の間に一緒に緊密にカップリングされるようなものである。絶縁層182の厚さは、必要なカップリングの量、絶縁層の誘電定数、および全カップリング面積に依存して、 10^{-1} m、 10^{-2} m、 10^{-3} m、 10^{-4} m、 10^{-5} m、 10^{-6} m、 10^{-7} m、 10^{-8} m、 10^{-9} m、 10^{-10} mまたはそれより小さい、またはそれらの間の範囲内の値であることができる。カップリングは、多数の異なる立体配置、例えば、多層、共平面、または導波管回路のトポロジーの横形およびオフセットカップルド立体配置により達成することができる。溶液媒質からインターフェース伝送ラインを気密シールするためにおよび／または溶液中で起こる分子結合事象を妨害することがある溶液の中へDCまたは低周波数の電流の流入を防止するために、絶縁層を使用することは好都合である。

【0083】

インターフェース伝送ライン233は、信号伝搬を支持することができかつMBR234に結合することができる材料から成る。材料はMBRの構成に依存して変化するであろうが、いくつかは金、酸化インジウム錫（ITO）、銅、銀、亜鉛、錫、アンチモン、ガリウム、カドミウム、クロム、マンガン、コバルト、イリジウム、白金、水銀、チタン、アルミニウム、鉛、鉄、タンクステン、ニッケル、タンタル、レニウム、オスミウム、タリウムまたはそれらの合金を包含する。あるいは、インターフェース伝送ライン233は、1またはそれ以上のターゲット分子（リガンド）との結合を形成するために、1またはそれ以上の分子構造物（抗リガンド）（これらはMBR234の一部分を形成する）を包含することができる。インターフェ

ース伝送ラインを構成する材料は、また、リンカーの取付けを促進しつつ信号伝搬を支持するように選択することができる。インターフェース伝送ライン233を形成するために使用できる他の材料は、当業者にとって容易に明らかであろう。

【0084】

溶液260、例えば、種々の緩衝化溶液（例えば、ダルベッコリン酸塩緩衝液（d-PBS））を使用してリガンドをMBR234に移すことができる。種々の技術、例えば、吸上げ作用、ピペットティング、浸漬、滴下、毛管作用による直接的接触、または種々の流体装置を介する技術を使用して、注目のリガンド、例えば、タンパク質を結合表面に適用することができる。

【0085】

特定の態様において、低い信号損失および外部の伝送ライン270に対する密接なインピーダンス整合を提供するように、インターフェース伝送ライン233を設計する。導電性材料、例えば、金、銅、アルミニウム、酸化インジウム錫（ITO）または前述の他の導電性材料からインターフェース伝送ライン233を製作することによって、低い信号損失は達成される。支持体、溶液、およびMBRの相対的誘電性に依存して、インターフェース伝送ライン233の幅をほぼ外部の伝送ライン270の幅に定めることによって、密接なインピーダンス整合は達成される。インターフェース伝送ライン232と外部の伝送ライン270との間の信号連続性は接触端子237を介して提供される。前述したように、MBR234および溶液媒質260は、選択的に、あるいはインターフェース伝送ライン232に近接したこれらの層の位置に加えて、接地平面250に近接させることができる。

【0086】

集中素子の形態、分布した形態、または両方の組合せの追加のアナログおよび/またはデジタル回路をバイオアッセイ装置の入力および/または出力ポートに含めることができる。例えば、インピーダンス整合回路および/または緩衝増幅器回路を入力ポートにおいて使用することができる。あるいは、またはさらに、インピーダンス整合回路および1またはそれ以上の出力増幅器を利用して出力信号を増強することができる。エレクトロニクスの当業者は理解するように、他の型のコンディショニング回路をその上別の態様において使用することができ

る。

【0087】

第2B図はバイオアッセイ装置の第2態様を図解する。この態様において、溶液は下部プレート239の上面に形成されたインターフェース伝送ライン233より上の空間を占有する。インターフェース伝送ライン233の上側は、MBR234が付着する結合表面を形成する。誘電層240はインターフェース伝送ライン233と接地平面250との間に配置される。接触端子237は、外部の伝送ライン270への信号通路を提供する。インターフェース伝送ライン、上部プレート、下部プレート、接触端子、および誘電層を前述の材料およびプロセスから形成することができる。また、MBRを第1D図に記載したように、またはその変形体へと構成することができる。さらに、MBR234および溶液媒質260は、選択的に、あるいはインターフェース伝送ライン233に近接したこれらの層の位置に加えて、接地平面250に近接させることができる。

【0088】

第2C図は、本発明の他のバイオアッセイ装置150の垂直断面図を描写する。このバイオアッセイ装置150は、第1A図に示す立体配置に類似する2素子のストリップ線路の立体配置を含んでなる。バイオアッセイ装置150はガラス（ほぼ1mmの厚さ）から作られた支持体151を含み、その上面に金伝送ライン120がスパッタリングされている。LEXAN（DuPont製のポリカーボネート材料）から作られた反応器90（6.0cm×1.5cm×0.5mm）が、伝送ライン120の区画に対してシールされている。支持体151および取付けられた伝送ライン120を、伝送ライン120に取付けられた反応器90と一緒に、それぞれ、誘電材料の上層70および下層72の間に挟む。この特定の態様において、誘電材料70、72は、反応器と同様に、LEXANから構成されている。誘電層またはスペーサー70、72は、システムにおいて所望のレベルのインピーダンスを得るように機能する。こうして、同様な結果を達成することができる他の材料はLEXANの代わりに使用することができる。この特定の態様において、35 の公称広帯域インピーダンスを与えるように設計し、1.5cmの幅、7.5cmの長さおよびほぼ100オングストロームの厚さを有した。

【0089】

ガラス支持体151、伝送ライン120、反応器90および誘電層70、72を含むサブアセンブリーをステンレス鋼カバープレートまたは接地素子159の中に包んで、伝送ライン120を電磁的に遮蔽し、機械的支持および圧力を提供して、バイオアッセイ装置150をシールして保持する。コネクター（例えば、3.5mmのコネクター）84、86がバイオアッセイ装置150の2つの端の各々に取付けられている。コネクターのセンターピン（図示せず）は、導電性エポキシ（図示せず）により伝送ライン120および50μlのゴムカスケットを有する支持体151に取付けられている。入ポート80および出ポート82はカバープレート159、誘電材料70の上層を通して延び、反応器90に別々に接続されている（典型的には反応器90の対向する端において）。これらの2つのポート80、82は溶液を反応器90に流入および流出させる。

【0090】

次いで45MHz～40GHzのS-パラメーターを測定できる分析装置または検出器（図示せず）に、一方のコネクター84を介して、バイオアッセイ装置150を接続することができる。他方のコネクター86は信号源（図示せず）に接続されている。

追加の構造的態様は、多素子伝送ライン、導波管、および共鳴空洞を有するバイオアッセイ装置を包含し、ここで検出特異性および感受性を増強する方法で、MBRを1またはそれ以上のラインまたは空洞に取付けることができる。このような構造は、並列に配置された信号コンバイナー、共鳴空洞、または導波管を包含し、導波管に沿って1つの素子上の結合MBRは結合構造を含まない他の並列素子に比較して信号伝搬性質を変更し、こうして組合わされた信号のモード性質を変化させる働きをし、容易に検出可能な出力信号の性質を生ずる。これらの後者の効果により、よく知られている技術を使用して、周波数、周波数安定性、および周波数の非常に小さい変化を超高精度で測定できる。

【0091】

B. 結合表面

第3図は、バイオ-電気的インターフェースの導電性層に沿って起こる結合表面の化学の1つの態様を図解する。バイオ-電気的インターフェースは、支持体320、導電性層330、MBR340、および溶液350を包含する。支持体320は本明細書に記載する任意の誘電層または支持体材料、例えば、アルミナ、ダイヤモンド、サ

ファイア、プラスチック、ガラスおよびその他であることができ、そして導電性層320に対して構造的支持を提供する。別の態様において、支持体320を除去し、絶縁層342により構造的支持を提供する。

【0092】

導電性層330は、前述したように、所望の周波数にわたって信号伝搬を促進しつつMBR340の結合を促進する形態を有する材料から成る。2導体回路のトポロジーにおいて、導電性層330は信号平面または接地平面を含んでなることができる。しかしながら、いずれの場合においても、第2導電性層（信号平面または接地平面、示されていない）は支持体320より下に位置する（第2B図の配置）か、あるいは溶液350から除去された少なくとも1つの支持体層に位置する（第2A図の倒立配置）。あるいは、導電性層はこれらの両方のレベルに位置決定することができる。

【0093】

溶液350をMBR340にカップリングさせて、リガンドをMBR340に流れさせる。溶液350からMBR340へのリガンドの流れは指向性または非指向性であることができる。溶液は任意の輸送媒質、例えば、気相、液相、または固相の物質から成り、いくつかの例は水性d-PBS、Tris緩衝液、リン酸塩緩衝液、およびその他である。

【0094】

バイオ-電気的インターフェースに沿って、MBRは溶液と信号通路との間の少なくとも一部分に位置し、MBRはその部分において溶液よりも信号通路に対していっそう近接させる。第3図の態様において、MBR340は溶液350と導電性層330との間に、後者により密接に近接して、配置されている。他の態様（第2A図に示す）において、溶液は信号平面と接地平面との間に配置されている。第2態様（第2B図）において、溶液は信号-接地平面領域の外側に配置されている。

【0095】

MBRは、リガンド、リガンド/抗リガンド複合体、または本明細書に記載する他の分子構造物から成ってよい。典型的には、リガンドは機能的に無傷であり、できるだけ表面に密接し、そして抗リガンドの表面密度は最大の誘電効果を提供

するために十分であるが、例えば、立体障害性または付近の分子による固定化抗リガンドの活性結合部位の物理的ブロッキングにより、結合機能を損傷するほど高くない。

【0096】

リガンドは、第3図に示すように、導電性層320または中間構造物に特異的または非特異的に直接的に結合することができる。特異的に結合したリガンドを望む場合、リンカーを必要に応じて使用して結合、例えば、すべてのタンパク質の結合を促進し、こうして導電性層320が溶液に暴露されるようにする。結合性層を密に詰めることを確実にするために、チオール基、Fab、またはタンパク質、例えば、プロテインAを使用して、導電性層320に沿った抗体または他の抗リガンドの結合を促進することができる。多数の方法、例えば、光リソグラフィー、半導体加工、または任意の他の変換適用技術により、物質を導電性層320に適用することができる。

【0097】

さらに、いくつかのリガンドおよび抗リガンドを多数の方法で結合させることができます。典型的には、これらのリガンドは統計学的優勢を占める結合モードを有するか、あるいは部位特異性方法で結合するように操作することができる。いくつかの抗リガンドは必要に応じて部位特異性方法で表面に結合する。例えば、オリゴヌクレオチドを1つの末端に結合させることができます。一般に、抗リガンドの機能を損なわない方法で、例えば、好ましくは表面変性を最小とする濃度で、抗リガンドを取付ける。

【0098】

結合表面上の抗リガンドの濃度は、特定の被検体に依存して、変化するであろう。例えば、タンパク質について典型的な濃度は、 $10^7 / \text{cm}^2$ 、 $10^8 / \text{cm}^2$ 、 $10^9 / \text{cm}^2$ 、 $10^{10} / \text{cm}^2$ 、 $10^{11} / \text{cm}^2$ 、 $10^{12} / \text{cm}^2$ 、 $10^{13} / \text{cm}^2$ 、 $10^{14} / \text{cm}^2$ 、 $10^{15} / \text{cm}^2$ 、またはそれらの間の範囲内の濃度である。核酸について典型的な濃度は、 $10^7 / \text{cm}^2$ 、 $10^8 / \text{cm}^2$ 、 $10^9 / \text{cm}^2$ 、 $10^{10} / \text{cm}^2$ 、 $10^{11} / \text{cm}^2$ 、 $10^{12} / \text{cm}^2$ 、 $10^{13} / \text{cm}^2$ 、 $10^{14} / \text{cm}^2$ 、 $10^{15} / \text{cm}^2$ 、 $10^{16} / \text{cm}^2$ 、 $10^{17} / \text{cm}^2$ 、 $10^{18} / \text{cm}^2$ 、 $10^{19} / \text{cm}^2$ 、 $10^{20} / \text{cm}^2$ 、またはそれらの間の範囲内の濃度である。全血中の被検体について典型的な濃度

は、55M、25M、10M、1M、0.5M、 10^{-1} M、 10^{-2} M、 10^{-3} M、 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、 10^{-13} M、 10^{-14} M、 10^{-15} M、 10^{-16} M、 10^{-17} M、 10^{-18} M、またはそれらの間の範囲内の濃度である。

【0099】

バイオ-電気的インターフェースを通る信号の伝送を変更するために十分なりガンドがMBR内で付着すべきである。結合表面に付着するリガンドの量は、1、10、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、またはそれより多いリガンド、ならびに導電性層の表面積に依存してそれらの間の任意の数から成ることができる。リガンドは導電性層に沿って前もって定めた範囲に適用する必要がない。なぜなら、バイオアッセイ装置またはチップ上の配置とは異なりMBRの固有の誘電性により信号の応答は決定されるからである。MBRは一般に $10^{10}\text{cm}^2 \sim 10^{24}\text{cm}^2$ 、典型的には $10^{15}\text{cm}^2 \sim 10^{20}\text{cm}^2$ の範囲の小分子のための表面密度を有するであろう。リガンド層は1層程度に薄くあることができるが、2、3、4、5または10またはそれより多い層を必要に応じて使用する。

【0100】

いったんリガンドが導電性層に結合されると、システムの化学および／または構造的生物学は働くようになる。リガンドの誘電性は1またはそれ以上の結合した構造物の特徴を示す信号応答を生じ、これにより結合事象の検出、ならびに構造物中の注目の他の性質の検出が可能となる。結合事象により提供される独特の応答は、固定化された抗リガンド、そのターゲットリガンド、および近くの溶液分子（例えば、水および遊離イオン）の転移に依存するであろう。表面に結合する分子の範囲は下記のものを包含するが、これらに限定されない：タンパク質、核酸、小分子、サッカリド、脂質、および注目の任意の他の分子。

【0101】

典型的には、MBRの分子は溶液の中に配置される。溶液は、水、d-PBS、Tris、血液、生理緩衝液、脳脊髄液、尿、汗、唾液、他の体分泌物、有機溶媒、およびその他の水溶液から成ることができる。他の溶液は、気体、乳濁液、ゲル、および有機および無機の化合物を包含することができる。

【0102】

バイオアッセイ装置のMBRにおいて、二次結合反応が起こる。溶液中のリガンドはバイオアッセイ装置を横断し、こうしてリガンドは結合層の抗リガンドと接触する。溶液中のリガンドの濃度は様々であってよく、 $10^{-1}M$ 、 $10^{-2}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $10^{-13}M$ 、 $10^{-14}M$ 、 $10^{-15}M$ 、 $10^{-16}M$ 、 $10^{-17}M$ 、 $10^{-18}M$ 、 $10^{-19}M$ 、 $10^{-20}M$ から成ることができる。相互作用、例えば、結合がリガンドと抗リガンドとの間で起こるとき、リガンドは、結合事象の化学的平衡特性により支配されるように、次いで必要に応じて結合層の一部分となる。

【0103】

MBRは結合したリガンドを含み、また、溶液分子を含むことができる。結合したリガンドは、タンパク質、炭水化物、脂肪、核酸、および本明細書に記載するすべての他の分子を包含する任意の分子であることができる。さらに、MBRは結合性表面層への抗リガンドの結合を促進するリンカーを含むことができる。

【0104】

さらに、抗リガンドとリガンドとに相互作用は、結合した抗リガンドのみを有する結合層の特徴的な誘電応答を変化させる。例えば、抗リガンドAが結合層を形成する抗リガンドである場合、伝送ラインに沿って伝搬する試験信号の誘電応答は抗リガンドAの構造の特性を反映する。リガンドBが抗リガンドAに結合するとき、BへのAの結合のために結合層の構造および/または誘電性は変化するであろう。BがAに結合するとき、Aの構造は変化し、異なる信号応答を提供することがある。結合相互作用による信号の変化はBへのAの結合の特徴を示すであろう。したがって、結合相互作用の存在は信号の変化から決定することができる。

【0105】

そのうえ、結合または構造のタイプおよび/または結合時のコンフォメーションの変化についての情報は、相互作用のために信号応答のどの部分が変化したを注目することによって得られる。リガンドBが抗リガンドAに結合するときの信号の変化により、リガンドBを必要に応じて検出し、同定する。抗リガンドAへのリガンドBの結合は、抗リガンドAおよびその環境における、コンフォメーションの変化、または分子構造または取り囲む溶液の変化を誘導する。これらの変化はMB

Rの誘電性を変更し、これにより信号通路に沿って伝搬する試験信号の信号応答を変更する。試験信号の変化を使用してリガンドBの結合事象を検出することができ、そして変化の詳細を使用してリガンドBを同定することができる。分子の構造と機能との間の関係が、例えば、酵素、抗体、レセプターおよびその他の場合において、既知であるかぎり、結合したリガンドの機能をその構造の同定から推定することができる。

【0106】

1つの態様において、1つのタイプの抗リガンドを結合表面に適用してMBRを形成し、MBRにわたってリガンドを適用して、2つの分子間の結合事象を検出する。例えば、抗リガンドはターゲットタンパク質であり、そしてリガンドは種々の分子の任意のもの、例えば、ライブラリーからの分子、ホルモン、核酸、およびその他であることができる。他の態様において、抗リガンドは混合物であることができ、そして結合層にわたって適用するリガンドは既知被検体である。信号応答の特異的变化を検出することによって、リガンドまたは抗リガンドにおいて誘導されたコンフォメーションおよび他の変化、およびそれらから生ずるスペクトル応答のために、抗リガンドが相互作用した特定リガンドを決定することができる。このような態様は特定の抗リガンドの各々の空間的単離を必要とせず、むしろスペクトル応答から所望レベルの特異性を誘導するので、アッセイのどの部分に結合事象が起こるかを注目するよりむしろ電磁的応答を見ることによって、所定の結合相互作用が決定される。

【0107】

他の態様において、抗リガンドは結合層上の既知分子であることができ、そしてリガンドは未知分子の混合物としてバイオアッセイ装置にわたって適用することができる。これに関して、信号をバイオアッセイ装置に通過させることから生ずるスペクトル中の特定のピークおよび信号の存在または非存在により、特定リガンドの存在は検出される。あるいは、リガンドが結合するときの抗リガンドまたはリガンドのスペクトルの変化により、リガンドを検出することができる。信号は結合事象の特質についての情報を含有するので、このような態様は結合化学単独のそれよりも検出の特異性を増加させる。こうして、特異的結合は非特異的

結合と区別することができ、そして化学単独の特異性を超えて検出の全体の特異性を大きく改良することができる。

【0108】

バイオアッセイ装置を使用して形成される検出システムは、検出を必要に応じて実時間で実施しつつ多数の試料をすばやく分析することができるので、ハイスループット検出システムを提供する。応答期間は必要に応じてナノセカンドの時間目盛りでモニターされる。分子が互いに結合するとすぐに、検出を行う。低い濃度を測定するか、あるいは低い結合アフィニティーを有する分子間の結合事象を測定するために、より多くの時間を必要とすることがある。実際の時間は拡散速度により制限されることがある。これらの潜在的制限以外に、数千の分子を必要に応じて非常に迅速に、例えば、1時間でシステムを通して走行させる。例えば、チップ製作技術を使用して、10,000チャンネルのデバイス（出現するミクロ流体技術のいくつかを使用する）が可能であり、小さい体積、それ故短い拡散時間、および反応の初期のみを測定する反応速度論的測定を使用して、 1×10^7 試料/時を必要に応じて測定する。既知濃度を使用して、結合アフィニティーを必要に応じて反応速度論から計算し、こうしてデバイスを非常に速い時間目盛りでプロビングすることができ、そして反応速度論的曲線の勾配からアフィニティーを計算しおよび／または推定することができる。反応速度論およびアフィニティーについての論及は標準的生化学および化学のテキスト、例えば、下記の文献において見出すことができる：Mathewsおよびvan Holde、Biochemistry、Benjamin Cummings、New York、1990。

【0109】

C. バイオ - 電気的インターフェース

バイオ - 電気的インターフェースは、MBRおよび信号通路がそれに沿って形成されている構造物である。前述したように、信号通路はこの分野において知られている導電性または誘電性導波管構造物、2導体構造物、例えば、慣用信号／接地平面構造物、または3またはそれより多い導体構造物から成ることができる。一般に、信号通路の導電性領域の厚さは最小信号損失を提供するように設計される。例えば、金伝送ラインの典型的な厚さは0.1～1000 μm程度、好ましくは約1

~10 μmである。

【0110】

信号通路はMBRに対して非直角である方向に沿って形成される。1つの態様において、試験信号はMBRが形成された表面上の接線に対して並列に伝搬する。他の態様において、試験信号はMBR結合表面に関して±1°、±2°、±3°、±4°、±5°、±10°、±15°、±20°、±30°、±40°、±45°、±50°、±60°、±70°、±80°、または±85°、またはそれらの間の範囲の任意の角度で伝搬する。第1態様において、信号通路は2導体構造物中の伝送ラインから成り、そして信号通路の方向は電磁の分野において知られているポインティング(Poynting)ベクターにより定められる。第2態様において、伝送ラインはバイオ-電気的インターフェース領域に沿って連続的に延びる導電性領域または層から成ることができる。第3態様において、信号通路は所望の操作周波数範囲にわたってバイオ-電気的インターフェースに沿って最小の信号損失を有する通路として定義することができる。第4態様において、信号通路は3mhos/mより大きい交流導電率を有する、すなわち、塩類溶液のそれより大きい、例えば、5mhos/mより大きいが、理想的には100~1000mhos/mおよびそれより大きい範囲の導電率を有するとして定義することができる。

【0111】

こうして、本発明のある種の方法は、リガンドまたは抗リガンド、例えば、タンパク質が信号通路にカップリングされるように、それを配置することを含む。このような方法において、信号通路に沿って伝送される信号は、例えば、1つの電気的接触から他の電気的接触に、溶液を通過する必要はない。これは重要である。なぜなら、いっそ詳しく後述するように、水溶液は水を通過する電磁信号を有意に減衰し、これによりこのような方法の感度を大きく減少させるからである。

【0112】

バイオ-電気的インターフェース領域は、所望の試験周波数における電磁信号の伝搬を支持するように設計された信号通路から成る。多数の構成が可能であり、1つの例はDCおよび110GHzの間で操作可能なスパッタード金伝送ラインである

。他の態様において、信号通路は誘電媒体、例えば、MBRそれ自体から成る。この態様において、信号通路はDC電圧および電流をブロックするが、そうでなければ、例えば、下記の周波数において発生する所望の試験信号の伝搬を支持する：1MHz、5MHz、10MHz、20MHz、45MHz、80MHz、100MHz、250MHz、500MHz、750MHz、1GHz、2.5GHz、5GHz、7.5GHz、10GHz、12GHz、18GHz、20GHz、22GHz、24GHz、26GHz、30GHz、33GHz、40GHz、44GHz、50GHz、80GHz、96GHz、100GHz、500GHz、1000GHz、またはそれらの間の範囲の周波数。したがって、この分野において知られている高周波数回路設計技術を使用して信号通路を設計する。このような設計技術は、信号通路を相互に接続する構造物に整合させ、信号通路の挿入損失を最小にし、そして信号通路の電圧定常波比（VSWR）を最小にするインピーダンスを含む。本発明の好ましい態様において、信号通路およびMBRは非直角に向いている。

【0113】

本発明は、信号通路に取付けられた予測された大きさおよび構造の分子の検出に限定されない。MBRは、信号通路に取付けられているか、あるいはそれから分離しているが、信号通路にカップリングされた1、2、3、4、5、10、20、30、50、100、1000通り、またはそれ以上の分子長さから成ることができる。さらに、MBRは均質分子の複数層、単一であるが不均質の分子層、または複数の不均質分子層から成ることができる。

【0114】

バイオ - 電気的インターフェースの操作に関する追加の詳細は、同時継続中の、普通に所有された米国特許出願第09 / 243,194号、1999年2月1日提出（前に引用することによって本明細書の一部とされた）に記載されている。

IV. 測定法

A. 一般的外観

本発明の測定法において、非常に大きい数の分子は分散効果、共鳴効果、および分子を取り囲む溶液に対する効果を包含する、それらの独特的の誘電性に基づいて互いに区別可能であるという観察を使用する。本発明において、試験信号がMBRにカップリングするとき、MBRは試験信号のエネルギーと相互作用し、独特の信

号応答を生ずる。次いで独特の信号応答を使用して、MBRを構成する分子を検出し、同定することができる。

【0115】

当業者は理解するように、大部分の分子は異なる周波数にわたって誘電性の変動を示す。例えば、分子は電磁スペクトルの1またはそれ以上の領域において周波数の関数としてその誘電性を劇的に変化させることができる。分子が劇的な誘電性変化を示す周波数バンドは、しばしば分子分散レジームと呼ばれる。これらのレジームにわたって、分子の誘電定数、誘電率、双極子および／または多重極モーメント、および感受率は周波数の関数として劇的に変化する。これらの数値はしばしば複雑であり、信号応答において起こる大きさおよび相の変化の両方を説明するために現実および想像の両方の部分を有する。分散レジームは、RF、マイクロ波、ミリメートル波、遠赤外、および赤外周波数を包含する、種々の周波数にわたる範囲である。

【0116】

分子の誘電性は、試験信号を分子にカップリングさせ、生ずる信号を観測することによって観測することができる。試験信号は分子分散レジーム内の周波数、特に共鳴周波数において分子を励起するとき、分子は信号と強く相互作用し、生ずる信号は測定した振幅および相の劇的変動を示し、これにより独特の信号応答を発生する。この応答を使用して、結合した分子構造物を検出し、同定することができる。さらに、大部分の分子は同一または異なる周波数帯域にわたって異なる分散性を示すので、各分子は独特の信号応答を示し、これを用いて分子構造物を同定することができる。

【0117】

分子結合事象の検出および同定は、分子レベルにおいて誘電性を検出し、測定することによって達成することができる。分子レベルにおける誘電性は分子の多重極モーメントにより定義することができ、この分野において知られているように、そのポテンシャルエネルギーは無限級数として表すことができる：

【0118】

【数1】

$$\Phi(\mathbf{x}) = \frac{q}{r} + \frac{\mathbf{p} \cdot \mathbf{x}}{r^3} + \frac{1}{2} \sum_{i,j} Q_{ij} \frac{x_i x_j}{r^5} + \dots$$

【0119】

無限級数は多項から成り、各項は電場、磁場または電磁場の存在下に分子の誘電性を変化する程度で記載する。第1項は単極子モーメントと呼ばれ、分子上の全電荷から発生する静電ポテンシャルエネルギーのスカラー量を表す。第2項または「双極子モーメント」はベクトル量であり、3自由度から成る。第3項または「四重極モーメント」は順位-2テンソルであり、9自由度にわたる分子の応答を記載する。一般に、N番目の項は 3^{N-1} 自由度を有する順位N-1のテンソルであるが、対称性は自由度の総数を減少することがある。理解できるように、より高い次数のモーメントは分子の誘電性についてより大きい詳細を提供し、こうしてより多い分子の独特的な誘電サインを明らかにする。ポテンシャルの勾配は電場を生ずるので：

$$\mathbf{E} = - \nabla \Phi \quad (\times)$$

より高い次数のモーメントは距離の関数として急速に減じ、こうしてそれらの寄与は測定が困難となる。例えば、双極子モーメントによる場は r^{-3} として減じ、そして四重極モーメントによる場は r^{-4} として減じる。こうして、このアプローチは結合性分子と試験信号通路との間の密接な近接性およびそれらの間の低い信号損失を必要とする。分子結合事象の検出が信号吸収性の強い溶液、例えば、全血試料またはイオン溶液中で起こることがしばしばあるので、結合事象と信号通路との間の信号損失は非常に高くなり、より高い次数のモーメントの検出は非常に困難となる。

【0120】

さらに、各多重極の項は異なる態様で電場にカップリングする。これは所定の静電システムのエネルギーを最初に調べることによって証明される：

【0121】

【数 2】

$$W = \int \rho(\mathbf{x}) \Phi(\mathbf{x}) d^3x$$

【0 1 2 2】

テイラー級数において静電ポテンシャルを展開すると、下記が得られる：

【0 1 2 3】

【数 3】

$$\Phi(\mathbf{x}) = \Phi(\mathbf{0}) + \mathbf{x} \cdot \nabla \Phi(\mathbf{0}) + \frac{1}{2} \sum_i \sum_j x_i x_j \frac{\partial^3 \Phi(\mathbf{0})}{\partial x_i \partial x_j}$$

【0 1 2 4】

$E = -$ (x) であるので、

【0 1 2 5】

【数 4】

$$\Phi(\mathbf{x}) = \Phi(\mathbf{0}) - \mathbf{x} \cdot \mathbf{E}(\mathbf{0}) - \frac{1}{2} \sum_i \sum_j x_i x_j \frac{\partial E_j}{\partial x_i}$$

【0 1 2 6】

さらに、外部場について、 $\cdot E = 0$ であるので、下記が得られる：

【0 1 2 7】

【数 5】

$$\Phi(\mathbf{x}) = \Phi(0) - \mathbf{x} \cdot \mathbf{E}(0) - \frac{1}{6} \sum_i \sum_j (3x_i x_j - r^2 \delta_{ij}) \frac{\partial E_j}{\partial x_i}$$

【0128】

これを上で得られたエネルギーの方程式の中に挿入し戻すと、下記の方程式が生ずる：

【0129】

【数6】

$$W = q\Phi(0) - \mathbf{p} \cdot \mathbf{E}(0) - \frac{1}{6} \sum_i \sum_j Q_{ij} \frac{\partial E_j}{\partial x_i}$$

【0130】

これは各多重極項が問合せ場と相互作用する方法を示す：全電荷qはポテンシャルと、双極子pは電場と、四重極Q_{ij}は電場の勾配と相互作用する、およびその他。これはより高次の多重極モーメントの検出の第2の困難性を例示する：大量の試料において、より高い次数のモーメントにカップリングさせるために十分な場の勾配を達成することは困難である。

【0131】

本発明は、記載したバイオ-電気的インターフェースを供給することによって、前述の障害を克服する。このインターフェースは、信号通路に沿ってカップリングされたMBRを包含する。MBRは非常に薄い、高度に不均質な層（誘電的観点から）から成り、こうして電磁的にプロビングする構造物に対する必要な近接性ならびにより高い次数のモーメントにカップリングさせるために十分な場の勾配を提供する。これらの量は、分子の誘電性の大きく増強された見解を提供する、より高い次数のモーメントの検出を可能とする。信号平面および/または接地平面に対してMBRを近接させて配置すると、その上を伝搬される信号が溶液中に吸

収されるのを防止するように隔離し、これにより信号損失は減少し、より高い試験周波数の使用が可能となり、結合事象を精確に検出し、同定することができる。このようにして、本発明は、分子の双極子および他より高度の多重極モーメントに由来する因子を包含する信号応答の回収をより大きい程度に可能とする。

【0132】

本発明の記載したバイオアッセイ装置を使用すると、MBRに関連する多数の性質を検出することができる。第4A図はこの方法の1つの態様を図解する。最初に工程602において、MBRを形成し、信号通路の一部分に沿ってカップリングさせる。記載したように、MBRはリガンド、抗リガンド／リガンド複合体、およびその他から成り、そして信号通路と直接的または間接的に接触させるか、あるいはそれに電磁的にカップリングさせることができる。信号通路は2導体伝送トポロジーにおいて信号平面または接地平面から成ることができる。

【0133】

次に工程604において、試験信号を信号通路に沿って伝搬させる。試験信号は任意の周波数、例えば、10MHzの信号周波数、または45MHz～20GHzの周波数範囲の任意の時間変動信号であることができる。次に工程606において、試験信号はMBRにカップリングし、応答においてカップリングに対して信号応答を発生する。次いで信号応答を回収し、これは分子結合領域の1またはそれ以上の性質について情報を提供する。

【0134】

バイオアッセイ装置を使用して、MBRの多数の性質の情報、例えば、分子結合事象の検出および同定、リガンド濃度、MBRの誘電性の変化、検出された結合事象の分類、およびその他を提供することができる。さらに、バイオアッセイ装置は、使用時点品質のコントロールおよび保証において有効である自己較正能力を含む。これらの方法および能力の各々はさらに後述される。記載した方法および構造に基づいて、修飾および追加の使用は当業者にとって明らかであろう。

【0135】

溶液中の分子の双極子、四重極、およびより高次の多重極モーメントを検出し、測定する能力は、多数の理由でこの分野における有意な進歩を表す。第1に、

注目の生物医学の多数の分子、例えば、タンパク質は非常に独特な構造を有し、したがって独特な多重極モーメントを有する。こうして所定の分子についての多重極モーメントの同定は独特である前記分子の性質を明らかにし、こうして前記分子の同定を可能とする。第2に、生物医学的関連性を有する多数の分子、例えば、タンパク質において、構造および因子は緊密に関係する。こうして、所定の分子の機能に直接関係する前記分子の性質を検出する能力は、活性の全範囲について機能性をモニターすることができるこことを意味する。第3に、局所的生理学的環境は所定の分子の構造および機能において重要な役割を演ずるので、前述の物理的性質を検出する能力は、所定のシステムにおける変化を測定する目的のモニターまたはプローブとして分子を使用できることを意味する。こうして、分子および細胞のシステムについての複雑な、情報を与える性質を検出可能な電子的データのフォーマットに翻訳する能力を使用すると、非常に多数の新しい可能性が本明細書に論ずる領域において発生する。

【0136】

B. 結合した分子構造物の検出

本明細書に記載するバイオアッセイ装置は、信号通路に沿って起こる分子結合事象の検出を可能とする。検出可能な結合事象は、一次、二次、およびより高い次数の結合事象を包含する。例えば、既存するMBRをもたない2導体バイオ-電気的インターフェースにおいて、導電性層の分子はリガンドに結合させる抗リガンドを形成し、リガンドはMBRを形成する。他の態様において、抗リガンドおよびリガンドの両方をMBRの中に含める。この態様において、第1D図に示すように、リンカー、マトリックス分子、絶縁層または各々の組合わせを介してMBRを信号通路の表面に取付ける。

【0137】

第4A図はこのプロセスの1つの態様を図解する。最初に工程602において、操作の所望の周波数にわたって信号の伝搬を支持することができる材料から、MBRを形成する。信号通路は、本明細書に記載するバイオアッセイ装置の1つ内の、单一ポートの通路、2つのポートの通路、または複数のポートの通路から成ることができる。さらに、信号通路は伝送ライン、共鳴空洞、または導波管構造物とし

て実現することができる。

【0138】

次に工程604において、主題の分子または分子構造物を含有する溶液を準備する。工程606において、リガンドから成るMBRを溶液から形成し、信号通路の少なくとも一部分と溶液との間にカップリングさせる。次に608において、信号通路に沿って試験信号を伝搬させる。あるいは、結合事象の結果として起こる信号応答を実時間で観測するために、溶液を適用する間に試験信号を発射することができる。工程610において、試験信号はMBRにわたって伝搬し、MBRにカップリングし、リガンドの存在を示す信号応答を発生する。次に工程612および614において、試験信号を回収し、その存在はリガンドの検出を示す。

【0139】

MBRの誘電性はある数の信号応答を誘導することに寄与し、信号応答の各々は分子結合を示すことができる。例えば、MBRの分散特性は周波数を著しく変えうる。この場合、分子結合事象が結合表面に沿って起こるとき、試験信号応答は周波数にわたって振幅および／または相の応答の大きい変化を示し、これにより結合表面に沿って分子結合事象を検出する手段を提供する。

【0140】

他の態様において、MBRの誘電緩和性は入力信号のパルス期間の関数として変化するであろう。この場合において、試験信号応答は、特定のパルス期間またはその付近での、吸収された力の値の変化、または試験信号のいくつかの他のパラメーター、例えば、相または振幅の変化を示すであろう。吸収された力または他のパラメーターの変化を観測することによって、結合表面伝いの結合事象を検出することができる。他の量、例えば、特性インピーダンス、伝搬速度、振幅、相、分散、損失、誘電率、感受率、周波数、および誘電定数はまた分子結合事象の可能なインジケーターである。

【0141】

前述の方法を使用して、信号通路に沿って直接的または間接的に抗リガンドまたはリガンドの一次結合を検出することができる。同様に、第4A図のプロセスをまた使用して、抗リガンドに対するリガンドの二次結合を検出することができる

。第4A図の方法は、信号通路に沿って起こる一次または二次結合事象の検出に限定されない。事実、信号通路に沿ってまたは溶液中に懸濁させて起こる三次、およびより高い次数の結合事象をまたこの方法により検出することができる。

【0142】

第4B図は、信号通路に沿って起こる二次およびより高い次数の結合事象を検出する第2プロセスを図解する。最初に工程620において、一次結合事象を検出し、信号応答を測定し、その1つの態様を工程602～612に示す。引き続いて工程622において、一次結合事象の信号応答を記憶し、基底応答として使用する。次に工程624において、第2分子溶液をバイオアッセイ装置に添加し、結合表面にわたって循環させる。次に工程626において、第4A図の工程608～612を反復して第2信号応答を得る。次に工程628において、第2信号応答および基底応答を比較する。変化がほとんど、あるいはまったくないことは、2つの信号応答が非常に近くMBRの構造的または誘電的性質が新たな溶液中への分子の添加によって変化されなかったことを示す。この場合において、二次結合は有意な程度に起こらなかった（工程630）。比較が前もって決定された範囲外の変化をもたらすなら、MBRの構造および／または誘電性は変更されており、これにより二次結合事象を示す（工程632）。二次結合事象を示すために使用できる量は、前述の量、例えば、振幅、相、周波数、分散、損失、誘電率、感受率、インピーダンス、伝搬速度、誘電定数ならびに他の因子に匹敵することを示す。三次またはより高い次数の結合事象をこのアプローチにより検出することができる。

【0143】

二次またはより高い次数の結合事象を検出する別法は、特定の一次結合事象の事前知識を必要としない。この態様において、アッセイ開発段階において既知パラメーターが取り扱われるようバイオアッセイ装置を設計し、こうしてこれらのパラメーターのいずれかにおける前もって定めた変化が例えば使用時点において検出されたなら、1またはそれ以上の結合事象が起ったことがわかるようになる。この態様において、一次特性決定が製作時または設計時に既に実施されているので、一次結合事象を前もって測定すること不必要である。

【0144】

また、一次結合分子の構造の変化を検出することによって、二次結合事象を達成することができる。分子が結合すると、分子はその非結合状態と比べコンフォメーションの変化および分子構造の他の変化を伴う。これらの変化は一次結合性分子の誘電性に影響を与え、そして取り囲む溶液の中に変化を誘導し、これらの変動は前述の第4B図の工程620～628により検出することができる。一次結合した分子の誘電性の変化を示すためにモニターできる量は、前述の量、例えば、振幅、相、周波数、分散、損失、誘電率、感受率、インピーダンス、伝搬速度、誘電定数ならびに他の因子を包含する。

【0145】

C. 分子結合層の誘電性の変化の検出

また、本明細書に記載するバイオアッセイ装置を使用して、温度、pH、イオン強度およびその他の生ずる変化として、MBRの誘電性の変化を測定することができる。

【0146】

第4C図はこのプロセスの典型的な態様を図解する。このプロセスは結合事象を同定する開示した方法に密接に匹敵し、例外はこの方法はMBRの誘電性の変化を検出し、定量できることである。

【0147】

このプロセスは工程641において開始し、初期誘電性を有する溶液をバイオアッセイ装置に添加するとき、信号応答を測定し、記録する。1つの態様において、この工程は工程602～612に従い実行される。前もって決定された時間または操作後、再び工程602～612に従う他の態様において、第2測定を実施し、第2信号応答を記録する（工程642）。工程643後、比較を第1信号と第2信号との間で実施して、前もって定めた範囲内で2つの信号が相關するかどうかを決定する。そのような場合において、溶液の性質は誘電性を変化させなかったと見なす（工程644）。

【0148】

信号応答が前もって定めた範囲内で相關しない場合、溶液の1またはそれ以上の誘電性は変化しなかったものと見なす（工程645）。必要に応じて、誘電性の

変化は下記の方法で定量することができる。工程646において、第2信号を記憶し、既知信号応答に相関させる。最も密接に相関した応答は溶液の誘電性を特定し、第1信号応答を誘電性の初期値に相関させることができ、それらの差を使用して、特定された誘電性の変更された量を決定することができる（工程647）。

【0149】

D. 結合した分子構造物の同定

記載したバイオアッセイ装置を使用して、既知リガンドを特性決定し、引き続き未知のリガンド組成を有する溶液中でそれを同定することができる。第4D図はこのプロセスの1つの態様を図解する。最初に工程652において、下記の通りにして、1またはそれ以上の測定システムを使用して、多数の分子構造物を測定し、それらの応答を記憶する。1つの態様において、この工程を工程602～612に従い実行する。各記憶した応答は、溶液の中に存在する單一リガンドまたは同一溶液の中に存在する複数のリガンドに対応することがある。引き続いて工程654において、未知溶液について測定を行う。1つの態様において、この工程を工程602～612に従い実行する。次に工程656において、溶液の信号応答を記憶された信号応答と比較して、それとの相関の程度を決定する。工程658において、未知応答に対して最も密接な相関を示す記憶された応答を選択することによって、未知分子構造物を同定する。1またはそれ以上のデータ点を使用する比較を実行して、1またはそれ以上の記憶された応答間の相関を決定する。この比較はパターン認識ソフトウェアまたは同様な手段を使用して相関を決定することを含む。このプロセスを使用して、一次、二次またはより高い次数の結合した分子構造物を同定することができる。

【0150】

E. 結合した分子構造物のクラスの同定

また、既知分子の下位構造、例えば、タンパク質の同様なクラスまたは核酸中の配列相同性に対して共通するドメインまたは他の構造的相同性を特性決定することが可能である。1つの態様において、このプロセスは第4D図に示すように進行するが、ただし工程652において、N数の分子下位構造を測定し、それらの応答を記憶させる。各記憶した信号応答を1またはそれ以上の下位構造に対応させる

ことができる。十分な数の構造が検出されかつ特性決定されて未知化合物が同定されるまで、このプロセスは工程654、656および658において記載するように連続する。十分な数の相関ができたなら、未知分子構造物を分類することが可能である。

【0151】

第4E図は、未知リガンドを分類できる他のプロセスを図解する。このプロセスは、未知化合物上の構造モチーフに対する結合を検出することによって、未知リガンドを同定する。最初に、工程660において、複数のアドレス可能なアレイを有するバイオアッセイ装置を準備し、アレイの各々は特定のリガンド下位構造物に対する抗リガンドを有する。次に工程662において、特定構造物の各々がそれぞれの抗リガンドに結合すること、および引き続く特性決定により、特定構造物の存在は検出される。1つの態様において、この工程は工程602～612に従い実行される。引き続いて工程664において、量、例えば、アフィニティー、反応速度論、およびスペクトルの応答を同定することによって、結合事象の各々を特性決定する。工程666において、既知応答と未知応答との間で相関を行う。未知応答の各々が既知応答に対して相関するとき、リガンドは既知応答に対応するリガンドとして同定される。下位構造物が相関された応答および非相関応答の両方を示す場合、相関された応答を使用して、未知リガンドのいっそう一般的な分類を構築することができる。このプロセスを使用して、同一クラス内の存在するか、あるいは再生構造的相同性を有する、任意の分子構造物、例えば、タンパク質を同定することができる。

【0152】

また、既知構造物と比較するとき、所定の未知化合物の集中的スペクトル解析は構造および機能に対する洞察に導くことができ、そして外挿はあるレベルの分類に導くであろう。

【0153】

F. 特異的vs非特異的結合

結合事象のスペクトルの「サイン」または「プロファイル」により、特異的リガンド結合は非特異的リガンド結合と区別される。注目のリガンドとMBR上の前

記リガンドに対して特異的な抗リガンドだけを含有する精製された溶液中で、注目の所定の結合事象、例えば、抗原に対する抗体の結合を最初に特性決定することができる。次いで広いスペクトル研究を実施して、スペクトルの中に最も強い応答が見出されるときを見る。次いで複雑な用途において典型的には見出される溶液、例えば、全血中で、このアッセイを反復して、応答に対する非特異的結合の効果が何であるかを決定する。次いで特異的結合を決定する種々の点が見出され、非特異的結合を決定する別の組の点が見出され、そしてこれらの周波数点のサブセットを実際のアッセイ用途のために選択する。特異的結合に基づく応答を非特異的結合に基づく応答と比較することによって、特異的結合の程度を決定することができる。

【0154】

G. 所定のリガンドの特性決定

ある量の所定の分子を決定することはしばしば望ましい。例はタンパク質が属するクラスを決定することを包含する。これは多数の方法で実施することができる。

【0155】

所定の分子の誘電性が前記分子の電荷分布のジオメトリーにより完全に決定され、さらに大部分のタンパク質が独特の構造またはジオメトリーを有するとすると、各タンパク質の誘電性を測定することによって各タンパク質をユニークに決定することができる。こうして簡単な誘電性サイン、例えば、本発明により発生されたものは所定のタンパク質をユニークに同定する働きをし、さらに、タンパク質のいくつかの以前に知られているクラスへのタンパク質の分類を可能とする。

【0156】

所定のタンパク質の特定下位構造物に対して特異的である、バイオアッセイ装置上の抗リガンドのグループを使用することによって、分類法をさらに改良することができる。例えば、特定下位構造物、例えば、ドメインに対して特異的である抗体のグループを利用して、前記下位構造物の存在または非存在を決定することができる。こうして、ある種の下位構造物の存在および非存在ならびにタンパ

ク質それ自体の誘電性の両方を決定することによって、任意の所定のタンパク質を特性決定することができる。この分類法に対するそれ以上の改良は、温度、pH、イオン強度、ならびに前述の性質に対する他の環境の作用の検査を包含することができる。

【0157】

同様な方法において、薬剤 - レセプターの相互作用を特性決定して、所定の結合事象の特質、例えば、所定の相互作用がオン・オフされるレセプターをもたらすか（すなわち、薬剤がアゴニストまたはアンタゴニストとして作用するか）、いくつかの部分的アゴニストおよび／またはアンタゴニストの作用をもたらすか、またはいくつかの他の形態のアロステリック作用または非特異的結合をもたらすかどうかを決定することができる。例えば、所定のレセプターを抗リガンドとして使用し、そして既知アゴニストを第1リガンドとして使用することができる。次いで誘電応答に従い相互作用を特性決定し、そしてこの応答を保存しておく。引き続いて、次いで薬剤候補についてスクリーニングされる化合物を前記レセプターとの結合特性に関して観測する。かくして、結合しあつ同様な誘電応答を生ずる分子は、既知アゴニストと同様な作用をレセプターに対し有することがわかり、したがってアゴニストである非常に高い確率を有するであろう。このパラダイムは注目のターゲット - レセプターの結合事象の任意のタイプを事実上特性決定するために使用ことができ、そして結合事象が起こるか否かのみを決定する現在の検出方法を越えた、有意な改良を表す。

【0158】

所定の薬剤レセプター（例えば、オーファンレセプター）について有効な既知アフィニティーリガンドが存在しない場合、同様な構造的相同性を有するシステムにおいて、前記レセプターに対する未知リガンドの応答を薬剤 - レセプターの結合事象と比較することができる。例えば、Gタンパク質のカップリングされたレセプターは同様な構造的特徴および応答を有するレセプターの大きいクラスを包含するので、このようなクラスのオーファンレセプターをよりよく理解されたGタンパク質のカップリングされたレセプターシステムと比較して、所定の結合事象の特質に関して決定することができる。当業者は容易に理解するように、本

発明を適用できる多数の他の結合事象のクラスが存在する。

【0159】

タンパク質の同一または類似するクラスにおいて見出される構造的相同性、または特定の下位構造の数およびタイプにより、タンパク質はしばしば分類される。例えば、細胞膜の中に普通に見出されかつ細胞外環境と細胞内環境との間の信号トランスダクション経路を仲介するGタンパク質は、細胞膜を数回横切る構造を常に有する。このような構造はGタンパク質の事実上の決定因子である。タンパク質の他のクラスは同様な構造的相同性を有し、これらの相同性に基づいてタンパク質の1つのクラスを他のクラスと区別することができる方法は、それ自体、多数の生物医学的研究分野において極めて多くの用途を有する。

【0160】

前述の方法において使用できる下位構造の例は下記のものを包含する：タンパク質の二次および三元構造、例えば、ヘリックス、シート、三重ヘリックス、ドメイン、バレル構造、ターン、および第四級構造の中に見出される種々の対称基、例えば、C₂対称性、C₃対称性、C₄対称性、D₂対称性、立方体対称性、および二十面体対称性。（G. Rose (1979)、Heirarchic Organization of Domains in Globular Proteins、J. Mol. Biol. 134 : 447 - 470）。

【0161】

H. 濃度の定量

また、本明細書に記載するバイオアッセイ装置は、リガンド濃度を定量するために使用することができる。第4F図はこのプロセスの1つの態様を図解する。装置が前もって較正されていない（工程679）場合において、最初に工程670において、測定した被検体について適当な結合性質、例えば、結合アフィニティーまたは反応速度を有する抗リガンドを選択する。抗リガンドの平衡化定数がその線形作用範囲の中心付近にあるように、これらの性質を選択する。単一抗リガンドを使用するために濃度範囲が広過ぎる用途のために、異なるアフィニティーおよび/または線形作用範囲を有するいくつかの抗リガンドを使用し、これにより非常に広い範囲にわたる濃度値を生ずることができる。

【0162】

次に工程672において、抗リガンドをバイオアッセイ装置またはチップに取付け、装置を測定システムに接続する。工程674において、応答が最大特異性についての特性決定を必要とするかどうかに関して決定を行う。そうである場合、スペクトル解析を実行し、ここで被験体結合が最大結合を有する周波数を測定し（工程675a）、非特異的結合が最大作用を有する範囲を測定し（工程675b）、そして被験物結合に基づく固有の応答を測定する（工程675c）。特性決定が不需要である場合、または必要である場合、その完結後、装置を較正する。この工程は、1つの態様において、既知濃度のリガンドをバイオアッセイ装置に適用し、生ずる応答を測定することによって実行される（工程676a）。あるいは、較正工程のためのより多くのデータ点を必要とする場合（工程676b）、異なる濃度のサンプルを選び（工程676c）、そしてこの濃度に対する応答を測定することができる（工程676a）。1つの態様において、測定は工程602～612に従い実施する。引き続いて工程677において、前の応答からの較正点を記録することによって、外挿アルゴリズムを発生させる。次に工程678において、未知リガンド濃度の試料を測定する。この工程は、1つの態様において、未知試料をバイオアッセイ装置に供給し、滴定アルゴリズムに対して応答を相關させ、それからリガンド濃度を決定することによって達成される。

【0163】

所定のバイオアッセイ装置が前もって較正されているか、あるいは設計により較正されている場合、必要な唯一の工程はリガンドまたは被験体を表面に適用し、応答を測定することである。このようなバイオアッセイ装置は多数の異なる方法で実現することができる。例えば、結合事象が起こるとき、前もって決定した態様で変化するようにいくつかの回路パラメーター、例えば、共鳴回路のインピーダンスまたは特性周波数をデザインすることができ、そしてこれらのパラメーターによる変化量は用量 - 応答を有するようにさらに設計することができる。こうして、前記回路パラメーターの測定は、適当なアルゴリズムを介して解析するとき、所定の被験体またはリガンドの濃度の定量値を生ずるであろう。

【0164】

I. バイオアッセイ装置の自己較正

記載したバイオアッセイ装置は自己診断能力を有し、こうして使用時点の品質コントロールおよび保証を有する。所定の手の込んだ用途のために、特定の抗リガンド（一次結合種）は溶液中のいくつかの注目のリガンド（二次結合種）の抗リガンドとして作用するであろう。一次結合種は製作時点において取付けができる、そして二次結合種は使用時点において取付けることができる。こうして、製作の変動 - 特に一次種の取付け - は装置のその特異的リガンドに結合する能力を変動させるであろう。しかしながら、結合したリガンドの量は結合した抗リガンドの量に正比例し、こうして2つの比率測定的測定が可能である。

【0165】

第4G図はこのプロセスの1つの態様を図解する。最初に工程680において、適当な抗体を種々の濃度で結合させることによってシグナル通路伝いに分子結合表面を形成し、これらの濃度の各々に対して発生した応答を特性決定し、各濃度についていくつかの値「 x 」を得る。次に、工程682において、リガンドのいくつかの異なる濃度に対する抗体 / リガンド結合の応答を測定することによって同様な滴定曲線をリガンドについてつくり、そしてリガンド滴定曲線を前もって決定する。次に、工程684において、リガンド結合に対する抗体結合の応答の比を取ることによってスケールファクターAを得る。使用時において、非較正アッセイはまずプローピングして（工程686）結合した抗体「 x 」の量を測定し、それからスケールファクター「 y 」を得る。次いでリガンドをアッセイに適用し、応答を測定し（工程689）、応答および前もって決定した滴定曲線をスケールファクター「 y 」により作製して（工程690）未知濃度を測定する。

【0166】

また、溶液中のリガンドを定量できるように第4F図のプロセスを変更することができる。変更において、バイオアッセイ装置の結合表面は前もって定めたアフィニティーおよびリガンド特異性を有する抗リガンドを含む。引き続いて溶液を装置に適用し、応答を測定する。信号応答は結合したリガンドの量に比例するであろう。こうして、適当な線形作用範囲（平衡化定数が検出すべき所望濃度範囲のいくつかの対数単位内である範囲）を有する抗リガンドを選択することによって、任意の所定のリガンドの滴定を実施することができる。前述したのと同一の

比率測定的分析を適用して、信頼性を保証するために必要な内部のコントロールおよび較正を有する、耐久力の大きい、正確な定量的アッセイを発生させることができる。

V. 測定システム

前述の方法を実行するために、種々の測定システムを使用することができる。第5図～第8図は可能な測定システムの3つの例を図解する：周波数ドメイン試験システム、時間ドメイン試験システムおよび誘電緩和測定システム。

【0167】

A. 周波数測定システム

第5A図は、本発明による周波数測定システムの1つの態様を図解する。システム800は、バイオアッセイ装置の入力852にカップリングされた信号源810およびバイオアッセイ装置の出力858にカップリングされた信号検出器890を包含する。必要に応じて、追加の信号源をバイオアッセイ装置の出力858にカップリングさせ、そして追加の信号検出器を試験回路の入力852にカップリングさせて、完全な2ポート測定能力を提供することができる。信号検出器が反射した信号を受取る信号通路にカップリングされている1ポート試験システムに、このシステムを変更することができる。特定の態様において、前述の周波数測定システムはネットワーク分析装置、例えば、ヒューレット・パッカード・カンパニー (Hewlett - Packard Company) からのモデルNo.8510Cから成る。伝送され、反射された信号に基づく信号情報を提供する、他の高周波数測定システム、例えば、スカラーネットワーク分析装置を選択的に使用することができる。

【0168】

測定は前述の方法に従いなされる。最初に、入射信号860を試験回路に向けて発射し、伝送された信号870および／または反射された信号890それを引き続いて回収する。生ずる信号応答は独特の周波数応答または「スペクトルサイン」の形態を取り、それらの2つの例は第5B図および第5C図に示されている。第5B図は、共鳴が周波数 f_{res} において起こる、周波数応答の1つのタイプを図解する。ここで、応答870は急低下または急上昇し、信号エネルギーがこの周波数において出力ポートにほとんど、あるいはまったく到達しないことを示す。周波数 f_{sta}

f_{start} から周波数 f_{stop} にわたって変化するMBRの誘電性およびインピーダンスにより、共鳴が発生する。異なるリガンドは異なる周波数点において共鳴するであろう。さらに、いくつかのリガンドは測定した帯域 $f_{\text{start}} \sim f_{\text{stop}}$ にわたって複数の共鳴周波数点を示すことがある。いったんリガンドが1またはそれ以上の独特に発生する共鳴点を有するとして特性決定されると、このデータを使用して未知溶液中のリガンドの存在を同定することができる。この特性決定は実験的データから、あるいは多重極モーメントおよび共鳴周波数の理論的計算から確認することができる。さらに、二次結合事象の存在を検出するとき、このデータは1またはそれ以上の独特的な共鳴点の変化により被験体がリガンドに結合するときを示すことができる。

【0169】

第5C図は、分子構造物の検出または同定に使用できる、周波数応答の他のタイプを図解する。この場合において、周波数応答はある程度の振幅変動とともに一般的に単調に増加または減少する傾向を示す。応答の勾配および/または振幅変動を使用して、結合した分子を検出しおよび/または独特に特性決定することができる。こうして記載した方法において、試験信号の相の共鳴周波数点、勾配、傾向、および変動を使用して分子結合事象を独特に同定することができる。周波数応答を入力ポート852、出力ポート858または両方のポートにおいて測定して、結合した分子構造物を独特に同定することができる。

【0170】

第6図は、本発明による周波数測定システムの第2の典型的な態様を図解する。試験下のバイオアッセイ装置920は、中央導体921、空洞922aを有する第1絶縁体922、第2絶縁体923、および外側導体924を有する同軸トポロジー（第5G図に示す）から成る。溶液926は空洞922aを占有する。もちろん、他の回路トポロジーの装置をその上試験することができる。

【0171】

いったん溶液926が空洞922aに添加されると、溶液926中の分子は中央導体921に近接してMBR921aを形成する。測定の間に、信号源910は中央導体921に対して入射試験信号912を発射する。MBR922aは入射試験信号912を変調し、そして反射

した試験信号932は独特の信号応答を提供し、この信号を使用してリガンドを同定することができる。1ポート同軸立体配置は、例えば、皮下注射用針の構造として実現することができる。

【0172】

B. 時間ドメイン測定システム

第7図は、本発明による時間ドメイン測定システム1000の1つの態様を図解する。このシステムは、パルス源1002と試験回路入力1022にカップリングされた検出器1004とを含む。別の態様において、追加のパルス源および検出器を出力ポート1028にカップリングして完全な2ポート測定能力を供することができる。さらに選択的に、システムは信号検出器が反射された信号を受取る信号通路にカップリングされた1ポート試験システムを含んでなることができる。特定の態様において、時間ドメイン測定システムは時間ドメイン反射計、例えば、テクトロニックス・コーポレーション (Tektronix Corporation) 製のモデルNo.11801から成る。他の高周波数測定システム、例えば、伝送された信号パルスおよび反射された信号パルスに基づく信号情報を提供する時間ドメイン測定モードを有するネットワーク分析装置を選択的に使用することができる。

【0173】

時間ドメイン測定システムにおいて、入力試験信号1060は時間ドメインパルスから成り、その反射部は経時的に表示することができる。この態様において、アッセイ表面に緊密にカップリングされた伝送部分に向かって入射パルス1060を発射する。MBRの誘電性のために、入射パルス1060の一部分は検出器1004に向かって反射される。反射されたパルス1070は、MBRの誘電性固有の独特な形状および／または時間遅延を示し、これらは引き続いてリガンド、抗リガンド、および取り囲む溶液の誘電性により主として定められる。こうして、反射されたパルス1070のパルスの形状および遅延を使用してリガンドを特性決定し、同定することができる。時間ドメイン試験システムは別々に使用するか、あるいは高周波数試験システムと組み合わせて使用して1またはそれ以上の未知リガンドを同定することができる。

【0174】

C. 誘電緩和測定システム

この分野において知られているように、リガンドの誘電緩和周波数は、電場が分子に加えられるとき、分子レベルの誘電性が変化する速度である。リガンドの誘電性を使用するとき、誘電緩和周波数は各分子独特の構造および結合ジオメトリーにより主として定められる。こうしていったん測定されると、リガンドの誘電緩和周波数を使用するそれを同定することができる。

【0175】

リガンドが周波数にわたって電力を吸収する速度を測定することによって、誘電緩和周波数を定量できる。第8図は、この測定を行うシステム1100の1つの態様を図解する。測定システム1100は第7図に図解する時間ドメイン測定システム1000に類似し、パルス源1102と、試験フィクスチュア入力1122にカップリングされた検出器1104とを含む。追加のパルス源および検出器を出力ポート1128にカップリングさせて、完全な2ポート測定能力を提供することができる。特定の態様において、時間ドメイン測定システムは時間ドメイン反射計、例えば、テクトロニックス・コーポレーション (Tektronix Corporation) 製のモデルNo.11801から成る。他の高周波数測定システム、例えば、伝送された信号パルスおよび反射された信号パルスに基づく信号情報を提供する時間ドメイン測定モードを有するネットワーク分析装置を選択的に使用することができる。

【0176】

入力試験信号1160は別々のパルスグループから成り、各グループは2またはそれ以上の入射パルスおよび異なるパルス間隔を有する。パルスグループ1162および1164は結合表面に緊密にカップリングされた伝送ラインの部分に向かって発射される。パルスグループ1162が誘電緩和期間（緩和周波数の逆数）に実質的に等しい間隔を有するなら、MBRは連続するパルスにおける徐々に弱まるエネルギーを吸収するであろう。信号吸収の減少は、入力ポート1122または出力ポート1128における反射された応答1170において測定することができる。別の測定量として、残留信号電力を入力ポート1122または出力ポート1128において測定することができる。

【0177】

変化が起こる信号吸収およびパルス間隔の変化速度を次いでプロットし、1またはそれ以上の未知の結合した分子を特性決定し、同定するために使用することができる。これはシステム特性決定を独立に使用するか、あるいは前述の時間および／または周波数ドメイン試験システムと組み合わせて使用することができる。

【0178】

前述のシステムのすべてにおいて、当業者は容易に理解するように、このようなシステムはマイクロ波モリシック集積回路（MMIC）およびその他のような技術に従いチップレベルに縮小することができる。このような最小化されたシステムは、数百、数千、または数万の化合物を同時に検出し、測定することができる、高度に並列のシステムに容易に拡張することができる。これらのシステムは「論理ゲート」を生ずるように構成することができる。論理ゲートを結合事象それ自体により、例えば、特性インピーダンス、こうして伝送および／または反射係数を変化させるか、あるいはこのような回路のバンドパス性を変化させることによってスイッチし、そしてこれをオン／オフゲートとして使用する。

VI. チップ技術を使用して検出システムの統合

A. 一般論

前述のバイオアッセイ装置を安価な、使い捨てチップ上に含めることができる。小型化が容易であるために、数千または数万のアドレス可能なバイオアッセイ装置をその中に有する、非常に小さいチップを製造することができる。以後詳細に記載するように、アッセイを含有するチップを使用して、試料中の種々の注目の被験体の存在を検出し、分子のライブラリーをスクリーニングする。

【0179】

チップは種々の安価な材料、例えば、プラスチックまたはガラス支持体から製作することができる。第1D図～第1F図に関して前述したように、チップは種々の形状および大きさを有し、そして結合層の構造を変化させることができる。典型的には、チップそれ自体は複数の素子または部位を含有するアレイを含む。アレイの各アレイは、素子をアドレスするための信号通路、例えば、伝送ラインおよび適当な回路を含む。各素子において、タンパク質またはリガンド（しばしば複

数のタンパク質またはリガンド)を素子内に位置する信号通路にカップリングさせる。

【0180】

タンパク質の結合事象に分析にチップを使用する現在の方法において、試料の中に含有されるリガンドは典型的には標識化される。本発明は、伝送された信号の変調により結合事象を直接検出できるので、リガンドおよびターゲットタンパク質を標識化することおよびこのような標識化に関連する問題を排除する。

【0181】

B. アレイ素子のアドレス

一般に、種々の素子に走行する信号通路の各々に信号を伝搬させ、特定素子におけるタンパク質 / リガンド複合体の形成から生ずる信号を検出することによって、アレイの各素子を問合せることが可能である。ある場合において、ターゲットのみを信号通路にカップリングさせ、基底信号を測定するとき、信号検出は信号通路に信号を伝送させることを含む。ターゲットを試料および必要に応じてリンスしたアレイと接触させた後、他の信号を伝送ラインに伝搬させ、測定した信号を基底信号と比較して信号間の差を得る。また、複数の信号通路に信号を同時に伝送させることができると - 1つの信号通路は試験素子に延び、そして他の信号通路はプローブおよび / またはターゲットを欠如する対照素子に走行する。種々の信号通路に伝搬させる信号は、同時にまたは連続的に、すなわち、異なる時間に発射することができる。

【0182】

アレイは、各結合事象のアフィニティー、反応速度、および独特の誘電プロファイルを同時に測定し、そしてアレイ上の複数のアドレス可能な部位においてこれらの測定を行う方法の独特の能力を使用する。アドレスの正確な特質は用途に依存するが、一般的な方法の例は次の通りである。ベクトル空間は変数 K_{eq} 、 k_A 、および $= (1, 2, 3, \dots)$ により定義され、ここでこれらの変数は平衡定数、反応速度定数、および誘電性がプロビングされるときのN周波数の基本的組を表す。こうして、N + 2次元空間が定義され、その中ですべての結合事象がマッピングすることができる。引き続いて、注目の結合事象のスペクトルを

表す対照分子（例えば、タンパク質）のグループ、例えば、異なる結合特異性を有する抗体のグループを選択する。次いで、これらの対照分子をチップ上のアドレス可能な点に取付ける。分子の特定種または種のグループ（例えば、対照分子として働くタンパク質に結合する被験体）をチップに導入し、次いで各アドレスを上に定義したベクトル空間中の点の各々（またはそれらの適当なサブセット）の値についてプロビーニングする。次いでベクトル空間中のアドレスにより、各種を表すことができる。システムの複雑さはベクトル空間の大きさ、および表面上の異なる固定化されたリガンドの総数に依存するであろう。

【0183】

上記の例として、4つの異なる周波数において分析される2つの異なるタンパク質から構成された簡単なシステムを考慮する；そしてさらに、これらの周波数の各々を10の異なる振幅に解剖する。このようなシステムは 10^8 の可能なアドレスを有するであろう。システムの中に配置された未知のものは形式 [(1, 5, 3, 7) (4, 8, 6, 7)] の独特的アドレスにより表すことができ、ここで最初の4つの数は4つの選択された周波数におけるタンパク質の1つのスペクトル応答を表し、そして後者の4つの数は4つの選択された周波数における他のタンパク質のスペクトル応答を表す。こうしてちょうど2つのプローブおよび4つの周波数を使用して、 10^8 の独特的アドレスを発生させることができる。

【0184】

C. 検出

試験信号を信号通路または伝送ラインに発射し、次いで試験信号と結合性複合体との相互作用から生ずる応答信号を検出することによって、信号を検出する。いくつかの方法において、検出はまず対照信号を伝搬させ、結合性複合体の1またはそれ以上の成分が存在しないときの基底信号を測定することを含む。例えば、緩衝化溶液だけを使用して基底信号を獲得することができる；他の場合において、信号通路にカップリングされたタンパク質またはリガンドを使用するが、両方を使用しないで、基底信号を得る。ある態様において、伝送された信号はマイクロ波である。

【0185】

種々の部位においてタンパク質／リガンド複合体が形成した結果発生した信号をコンピューターにより追跡して、種々の素子からの信号をモニターし、記憶する。このようにして、どの素子がタンパク質／リガンド複合体を含むかを同定することが可能である。リガンドがアレイに取付けられる場合において、各素子は個々にアドレスされ、モニターされるので、ターゲットタンパク質に結合するリガンドを同定することが可能である。

【0186】

しばしば信号測定はある範囲の周波数または波長を走査することを含む。上に示したように、信号は一般にMHzから数百GHzのレベルの範囲である。ある態様において、信号はマイクロ波である。ある場合において、例えば、信号を1~21GHzで走査する。

【0187】

変調された信号の検出器は「論理ゲート」のバージョンを包含することができる。この論理ゲートにおいて、所定の用途に適当であるように、特定リガンドまたは被験体の存在がゲートをオンまたはオフにする作用を有する。このようなゲートは任意の数の方法で実現することができる。このような方法において、結合事象を電磁信号に翻訳し、この信号をオフおよびオン、1または0、およびその他に対応する2つの可能な状態の1つに割り当てることができる。2つの状態は結合および非結合に対応する共鳴空洞または導波管の異なる周波数、または結合および非結合に対応する伝送ラインまたは導波管における振幅の変化、または特定回路のバンドパスの変化、またはその他であることができる。

【0188】

D. 特定のアレイの態様

1. 試験システム

第13図は、本発明によるN×Mアレイ試験システム1500の1つの態様を図解する。試験システムは、さらに後述される試験フィクスチュア1600、1×N入力スイッチ1530、測定システム1540、M×1出力スイッチ1550、およびコンピューター1560を含む。測定システム1540は、入力試験ケーブル1524aおよび1×N入力スイッチ1530を介して試験フィクスチュア1600に試験信号を送る。引き続いて試験フ

ィクスチュアからM×1出力スイッチ1550および出力試験ケーブル1524bを介して、試験信号は受取られる。コンピューター1560は、制御バス1550を介して1×N入力スイッチ1530、測定システム1540、およびM×1出力スイッチ1550をコントロールする。

【0189】

1つの態様において、測定システム1540は、S - パラメーター試験モジュールモデルNo.8516A、周波数シンセサイザー（図示せず）モデルNo.8341B、およびベクトルネットワーク分析装置No.8510B（それらのすべてはHewlett Packard Company、カリフォルニア州パロアルト製である）（www.hp.com）を含む。この態様において、測定システム1540は周波数45MHzと40GHzとの間の測定能力を有する。別の態様において、測定システム1540は5Hzと500MHzとの間の測定能力を有するモデルNo.HP8751Aネットワーク分析装置から成ることができる。それ以上の態様において、測定システムは33GHzと110GHzとの間の測定能力を有するモデルNo.HP85106Dネットワーク分析装置（両方はHewlett Packard Company製である）から成ることができる。また、他の測定システム、例えば、スカラーネットワーク分析装置、時間ドメイン反射計、他の同様な測定システムを使用して試験信号の変化検出することができ、この信号はMBRの誘電性に寄与する。

【0190】

試験ケーブル1524は、所望の周波数における試験信号の伝搬を支持する。1つの態様において、試験ケーブルはモデルNo.6Z PhaseFlexTM Microwave試験ケーブル（W. L. Gore and Associates, Inc. of Newark Delaware製（www.gore.com））から成る。制御バス1550は試験システムとコンピューター1560との間の通信を提供し、図解する態様において、汎用計装バス（GPIB）から成る。別の態様において、測定システム1540およびコンピューター1560は単一の自動化測定ユニット内に統合することができる。

【0191】

コンピューター1560は、測定システム1540をコントロールして、1またはそれ以上の周波数、出力電力レベル、信号形状、相オフセットまたは他の測定設定において試験信号を発生させる。好ましい態様において、コンピューター1560は

a + 450MHzのマイクロプロセッサー、例えば、インテル・コーポレーション (Intel Corporation of Santa Clara、カリフォルニア州 (www.intel.com)) 製のマイクロプロセッサーを含む。試験システムのコントロール、データ獲得、および解析は、グラフィカル・プログラミング・ソフトウェア・ツール、例えば、LabVIEW® (National Instruments Corporation of Austin、テキサス州 (www.natinst.com)) を使用して実行することができる。

【0192】

選択的にまたはさらに、測定システム1540は、時間ドメイン反射計 (TDR) システム、例えば、必要に応じて前述のネットワーク分析装置を使用して入手可能であるか、あるいは引用することによって本明細書の一部とされた出願第09/243,194号、発明の名称「分子結合事象を検出する方法および装置」、に記載されているTDRシステムを含む。本質的に、TDRシステムは信号パルスを試験下のユニットに向けて伝送する。戻り信号（試験下のユニットから反射したまたは試験下のユニットを通して伝送された）を解析して、試験下のユニットについての情報を確認することができる。詳しくは、この態様において、MBRの誘電性は信号パルスを変調し、これによりその中の分子結合事象を検出し、同定することができる。

【0193】

前述のシステムを使用してフィクスチュアーレベルで、あるいはマイクロ波モリシック回路 (MMIC) 技術の標準技術の1またはそれ以上を利用してバイオアッセイ装置レベルで、TDR測定を行うことができる。TDR測定を装置レベルで実施するとき、時間ドメイン試験信号をバイオアッセイ装置に密接に近接させて発生させる。次いでMMIC技術において使用する標準導電性ジオメトリーを介して信号通路に沿って、この信号をバイオアッセイ素子に伝搬させる。分子結合領域は時間ドメイン試験信号を変調し、次いで変調された信号を回収して解析する。

【0194】

1×N入力スイッチ1530は、試験信号を入力試験ケーブル1524aからN試験フィクスチュアーフィード入力の1つに送る。M×1出力スイッチ1550は、試験信号をM試験フィクスチュアーフィード出力の1つから出力試験ケーブルに送る。入力スイッチ1530およ

び出力スイッチ1550は、所望の試験信号の伝搬を支持する任意のスイッチまたはマルチブレクシング手段から成ることができる。例えば、入力スイッチ1530および出力スイッチ1550は低周波数スイッチ (DC ~ 2GHz)、例えば、アンプリフィオニックス・インコーポレーテッド (Amplifonix, Inc. of Philadelphia、ペンシルバニア州 (www.amplifonix.com)) 製のスイッチから成ることができる。より高い周波数 (2 ~ 18GHz)において使用するためのスイッチ、例えば、ジェネラル・マイクロウェイブ・コーポレーション (General Microwave Corporation of Amityville、New York (www.generalmicrowave.com)) 製のスイッチを選択的に使用することができる。絶縁ケーブル、ワイヤ結合、または操作の試験周波数に適当な他の慣用相互接続手段を使用して、バイオアッセイ装置および入力スイッチ1530および出力スイッチ1550の間の接続を行うことができる。

【0195】

別の態様において、入力スイッチ1530および出力スイッチ1550およびバイオアッセイアレイはモノリシック集積回路を形成する。例えば、GaAs半導体加工技術を使用してバイオアッセイアレイを製作するとき、入力スイッチ1530および出力スイッチ1550は、バイオアッセイアレイにカップリングされる、一体的に形成されたPINダイオードから成ることができる。さらに選択的に、入力スイッチ1530および出力スイッチ1550は統合されたアセンブリーを形成することができ、ここで入力スイッチ1530および出力スイッチ1550は、バイオアッセイアレイに接続された(ワイヤまたはリボン結合を介して)離散成分である。両方の選択的態様は、相互に接続する構造物が小型化または排除され、これによりそれらに関連する信号損が減少または排除されるという利点を提供する。

【0196】

説明したように、バイオアッセイアレイは半導体加工技術を使用してウェーハの形で製作することができる。この態様において、アレイ試験システム1500はウェーハプローブ試験ステーション、例えば、カスケード・マイクロテク・インコーポレーテッド (Cascade Microtech, Inc. of Beaverton、オレゴン州 (www.cascademicotech.com)) 製のものから成ることができ、これは前述の入力スイッチ1530および出力スイッチ1550、およびコンピューター1560を含むか、ある

いはそれらにカップリングされる。ウェーハプローブステーションは1またはそれ以上のプローブカードを利用し、それらの各々は多数の低損失、低VSWR信号をバイオアッセイアレイに相互接続させる。

【0197】

1またはそれ以上のプローブカードを使用して、遠隔に位置する、それぞれ、入力スイッチ1530および／または出力スイッチ1550に対するNおよび／またはM信号の相互接続を提供する。選択的に、入力スイッチ1530および／または出力スイッチ1550をバイオアッセイアレイとモノリシックに製作することができ、この場合において、1またはそれ以上のプローブカードは入力および／または出力信号を測定システム1540に転移させる。この後者の態様において、1またはそれ以上のプローブカードはスイッチ制御電圧をモノリシックに形成されたスイッチに印加する。

【0198】

選択的にまたはさらに、測定システム1540は時間ドメイン反射計(TDR)システム、例えば、必要に応じて前述のネットワーク分析装置を使用して入手可能であるか、あるいは引用することによって本明細書の一部とされた出願第09/243,194号、発明の名称「分子結合事象を検出する方法および装置」、に記載されているTDRシステムを含むことができる。

【0199】

2. アレイ試験フィクスチュア-

第14A図は、本発明によるN×M試験アレイフィクスチュア-1600の1つの可能な態様の断面図を図解する。試験フィクスチュア-1600は、上部プレート1602、下部プレート1604、および前述の反応器1610、バイオアッセイ装置1700(下の第15A図においてさらに記載する)および下部スペーサー1630の素子を保持する試料空洞1640を含む。N×Mアレイ試験フィクスチュアの態様において、試料空洞1640および相応して反応器1610および下部スペーサー1630の寸法は、バイオアッセイ装置より大きいか、あるいは小さいことができるバイオアッセイ装置1700を収容するように設計される。各アレイ素子は、各アレイ素子の信号通路との電磁通信において試料の一部分を保持するために、信号通路にわたってくぼみが形成さ

れた区域を形成する、小さい、モノリシックに配置された構造物を含む。

【0200】

第14B図はN×M試験アレイフィクスチュア-1600の端面図を図解する。試験フィクスチュア-1600はN入力コネクター-1660_{a1}～1660_{an}およびM出力コネクター-1660_{b1}～1660_{bm}を含む。また、試験フィクスチュア-1600は、フィクスチュアのNコネクター-1660_{a1}～1660_{an}とバイオアッセイのN入力との間の信号転移を提供するN入力伝送ライン（図示せず）を含む。さらに、試験フィクスチュア-1600は、バイオアッセイのM出力とフィクスチュアのM出力コネクター-1660_{b1}～1660_{bm}との間の信号転移を提供するM出力伝送ライン（図示せず）を含む。入力および出力伝送ラインは、絶縁された導電性ワイヤ、マイクロストリップ、ストリップ線路、誘電性支持体上に配置された共平面導波管伝送ライン、または他の普通に知られている信号通路構築物として実現することができる。伝送ラインの構築物の選択は、試験周波数およびバイオアッセイ装置の入力および出力のポート密度により影響を受けるであろう。

【0201】

3. バイオアッセイアレイ

第15A図は、本発明による統合されたバイオアッセイアレイ-1700の1つの態様を図解する。統合されたアレイ-1700に、測定システム-1540の信号源を介して試験信号を供給する。アレイ-1700は、半導体製作プロセスの間にモノリシックに形成される、統合された1×N入力スイッチおよびM×1出力スイッチを含む。入力の数は出力の数と同一であることができ、この場合においてM=Nであり、入力および出力の数は異なることができる。

【0202】

1×N入力スイッチは、入来する試験信号を所望のアレイ素子に送る。アレイ素子中のMBRは、MBRを構成する分子結合事象の誘電性に従い試験信号を変調する。M×1出力スイッチ-1550は試験信号を測定システム-1540の検出器に送る。測定システム-1540の分析装置は入力および変調された試験信号を比較して、測定された信号応答を決定する。各アレイ素子は2ポート装置として図解されているが、当業者は理解するように、1ポートまたは複数のポートのアレイ素子を選択的に使

用することができる。

【0203】

上に説明したように、アレイ1700および入力および出力スイッチは離散成分としてまたはウェーハ形で製作し、用途に依存して変化する程度に統合することができる。図解する態様において、アレイ1700および入力および出力スイッチは半導体ウェーハ上にモノリシック的に形成される。他の態様において、入力および出力スイッチはアレイ1700から別々にモノリシック的に形成され、ワイヤまたはリボン結合を介して接続される。それ以上の態様において、入力スイッチ1530および出力スイッチ1550およびアレイ1700の各々は離散ユニットである。また、当業者は理解するように、他の配置が可能である。

【0204】

第15B図は、直列に接続された、電子的にスイッチされる電界効果トランジスタ(FET)1710として示す、アレイ素子の1つの態様を図解する。FET1710は、GaAsを使用する製作された金属半導体の電界効果トランジスタ(MESFET)であることができる。また、他のトランジスタの構成が可能であり、これらは、例えば、高電子移動度トランジスタ(HEMT)、ヘテロ構造FET、均質またはヘテロ接合双極トランジスタ、またはPN接合デバイス、例えば、PINダイオードであるが、それらに限定されない。他の能動または受動アレイ素子を選択的にまたはこれらに加えてその上使用することができる。

【0205】

第15B図の態様において、FET1710の源端子1712およびドレイン端子1714を、それぞれ、入力ポート1711および出力ポート1715として用いる。MBR1716が源端子1712とドレイン端子1714との間に並列通路を提供するように、試料をFET1710の上に適用する。オフにしたとき、MBR1716を通る抵抗よりも非常に高い源抵抗(R_{ds})をドレインにFET1710が与えるように、FET1710を設計する。この場合において、信号通路はMBR1716を通して伝搬する。MBR1716は試験信号を変調する。変調された試験信号を回収し(DC阻止コンデンサを通してDCバイアスを除去する)、入力試験信号に対して比較して、MBR1716内で起こる分子結合事象を検出および/または同定する。FET1710が活性化されるとき、それはMBR1716の抵抗に比較して

非常に低い R_{ds} を提供する。この場合において、MBR1716は信号通路から効果的にスイッチアウトし、信号はそれにより大きく影響されないで伝搬する。こうして単にスイッチ開閉することによって、アレイ素子をアドレスすることができる。

【0206】

第15C図は、光学的にスイッチされるアレイ素子として使用するFETのそれ以上の態様を図解する。FET1720は第15B図に記載するFET1710と同様に接続され、そして感光性トランジスタ、ダイオードまたは他の感光性デバイスから成ることができる。ゲート接合1722を、例えば、正常の光、レーザー、発光ダイオード(LED)、またはFET1720が高い感受性を有する波長を有する他の源で照明することができる。入射光はFET1720を活性化して、MBR1722をスイッチアウトする。FET1720が失活されるとき、試験信号はMBR1722を通して伝搬し、それにより変調される。変調された試験信号を回収し(DC阻止コンデンサを通してDCバイアスを除去する)、解析して、MBR1722内の分子結合事象の存在を検出しおよび/またはそれを同定する。

【0207】

第15D図は、2またはそれ以上のFETが直列に接続されている、第15B図および第15C図のエクステンションを図解する。アレイ1750は第1試験通路1753を含み、それに沿ってアドレス可能なスイッチ1753aおよび1753cがカップリングされている。1つの態様において、前述したように、アドレス可能なスイッチは電子的または光学的に制御されるMESFETである。さらに、アレイ通路1753は試料領域1753bおよび1753dを含み、それらの各々は対応するアドレス可能なスイッチ1753aおよび1753cに対して並列信号通路を提供する。

【0208】

前述したように、アドレス可能なスイッチ1753aおよび1753cは、試料領域1753bおよび1753dをスイッチインおよびアウトするように作動する。こうして、単一のアッセイ部位がインピーダンス誤対合として現れる伝送通路の中に特定の列が作られる。必要に応じて、各アッセイ部位は回路の中にスイッチされるか、あるいは回路の外にスイッチされることができる。インピーダンス誤対合の特質は、MBRにおける結合および他の変化の関数である。追加の信号通路、例えば、信号

通路1754はアレイの中に含めることができ、そして他の低損失スイッチ（図示せず）を使用して他方の通路に対して交差ストラップして、試験信号が信号通路1753および1754の間で伝搬するようにすることができる。入力スイッチ1752および出力スイッチ1755を使用して、試験信号をアレイ1750の中に注入し／それから回収する。当業者は理解するように、記載したアレイを任意の数のN×M素子に拡張して、二次元のアレイ装置を構成することができる。

【0209】

第15E図は、第15D図に示すアレイの回路等価モデルを図解する。スイッチインピーダンス Z_s は信号通路の対照インピーダンス Z_0 と密接整合するように設計され、そしてアッセイインピーダンス Z^+ 、 Z^- はスイッチインピーダンスまたは参照インピーダンスと非常に異なるように設計される。こうして、アッセイインピーダンスの小さい変化は任意の所定の列の電気的性質を支配し、したがって容易に検出可能である。インピーダンスの正確な値は特定アレイについての設計基準に依存するであろうが、工学的適用のある種の一般原理、例えば、負荷（検出器）への電力供給に関して最大の効率は整合したインピーダンス設計を使用して得られ、そして参照インピーダンスはしばしば50Ωである。

【0210】

別の態様において、各アレイ素子は、ゲーティングの条件に依存して、2つの可能な状態の1つを占有することができる論理ゲートから成ることができる。1例として、ゲーティング条件は特定の結合事象が起こったか否かであることができる。このような条件は装置の表面上の特異的捕捉プローブに対する核酸物質のハイブリダイゼーション、または特定の薬剤 - レセプターの相互作用であることができる。いずれの場合においても、MBRにおける結合事象または構造の変化がゲーティングを引き起こすように、装置を操作する。本質的に任意の回路のパラメーターの変調はゲーティングを引き起こすことができる；必要なすべては、回路パラメーターが変調されたか否かに関して決定する代わりに、必要なハードウェアおよびソフトウェアを有することである。

【0211】

1例として、所定のシステム、例えば、共鳴構造物の特性周波数をモニターす

することができる。特定結合事象の結果としてこの周波数のシフトは、論理状態を信号する変調として働くことができる。結合の関数として変化する任意のパラメーターを使用して、論理ゲートをトリガーすることができる。このようなパラメーターは下記のを包含するが、これらに限定されない：周波数、電圧、電流、電力、相、遅延、インピーダンス、リアクタンス、アドミタンス、コンダクタンス、抵抗、キャパシタンス、インダクタンス、または他のパラメーター。

【0212】

第15F図は、二次元バイオアッセイアレイ1770の1つの態様を図解する。示されたように、アレイ1770は試験信号を入力／出力するための第1入力／出力(I/O)軸1772および第21／0軸1774を含む。

【0213】

アレイは慣用の外部の診断用ハードウェアでインターフェースされている。このハードウェアは1またはそれ以上の適当な周波数を発生し、検出し、次いで、上に例示したように、マルチプレクサを介してアッセイアレイにそれを通信し、アッセイアレイから通信することができる。このような外部的に支持されるシステムは任意の数の電磁源、例えば、ベクトルおよびスカラーネットワーク分析装置、時間ドメインデバイス、例えば、TDR分析装置および他のパルス技術から構成することができる；本明細書に記載する任意の検出スキーム、例えば、ベクトルおよびスカラーネットワーク分析装置を利用することができる；そして任意の数のよく知られている技術を使用して、標準および非標準のマルチプレクシング技術を介して信号をアッセイアレイに送り、アッセイアレイから送ることができる。

【0214】

一般に、このようなチップは標準半導体チップアプローチを使用する製作することができる。当業者は容易に理解するように、このような構成は1ポートフォーマット、2ポートフォーマットにおいて使用することができるか、あるいは2より多いポートを利用することができる。

【0215】

バイオ・電気的インターフェース領域は、所望の試験周波数における電磁信号

の伝搬を支持するように設計された信号通路から成る。多数の構成が可能であり、1つの例はDCと110GHzとの間で操作可能なスパッタード金伝送ラインである。他の態様において、信号通路は誘電媒体、例えば、MBRそれ自体から成る。この態様において、信号通路はDC電圧および電流を遮断するが、そうでなければ、例えば、下記の周波数で発生する、所望の試験信号の伝搬を支持する：1MHz、5MHz、10MHz、20MHz、45MHz、80MHz、100MHz、250MHz、500MHz、750MHz、1GHz、2.5GHz、5GHz、7.5GHz、10GHz、12GHz、18GHz、20GHz、22GHz、24GHz、26GHz、30GHz、33GHz、40GHz、44GHz、50GHz、80GHz、96GHz、100GHz、500GHz、1000GHz、またはそれらの間の範囲の周波数。したがって、信号通路はこの分野において知られている高周波数回路設計技術を使用する設計される。このような設計技術は、信号通路を相互接続構造物に整合させ、信号通路の挿入損を最小にし、そして信号通路の電圧定常波比（VSWR）を最小にするインピーダンスを包含する。本発明の好ましい態様において、信号通路およびMBRは非直交の向きに向いている。

【0216】

本発明は、信号通路に取付けられた予測される大きさまたは構造の分子の検出に限定されない。MBRは、信号通路に取付けられているか、あるいはそれから分離しているが、信号通路にカップリングされた1、2、3、4、5、10、20、30、50、100、1000、またはそれ以上の分子長さから成ることができる。さらに、MBRは均質分子の複数層、単一であるが不均質の分子層、または複数の不均質分子層から成ることができる。

【0217】

本発明のアレイに関する追加の情報は、下記の出願に記載されている：代理人の処理番号019501 - 000500USを有する発明の名称「分子結合事象を検出する試験システムおよびセンサー」の同時継続の、普通に所有された米国特許出願、これはこの出願と同時に提出され、そしてこれは以前にすべての目的のために引用することによって本明細書の一部とされた。

VII. 伝送ラインへのタンパク質の取付け

伝送ラインは、一般に、所望の試験周波数範囲にわたって適当な導電性を示しつつ前述したようにすぐれた分子結合性を有する材料から構築される。このよう

な物質下記のものを包含するが、これらに限定されない：金、酸化インジウム錫（ITO）、銅、銀、亜鉛、錫、アンチモン、ガリウム、カドミウム、クロム、マグネシウム、コバルト、イリジウム、白金、水銀、チタン、アルミニウム、鉛、鉄、タンゲステン、ニッケル、タンタル、レニウム、オスミウム、タリウムまたはそれらの合金。また、導電性層は半導体材料から形成することができる。半導体材料は、結晶質または非晶質であることができ、化学的にドーピングされたまたは純粋な炭素、シリコン、ゲルマニウム、ガリウム・ヒ素、ヒ化インジウム・ガリウム、ガラス、石英、セラミック、またはその他を包含する。導電性材料は、また、ポリマーから製作することができる。ポリマーは、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアセチレン、ポリチオフェンを包含するが、これらに限定されない。

【0218】

1つの態様において、伝送ラインは金である。金伝送ラインを製作する1つの方法は次の通りである。支持材料、例えば、ガラスまたは他の安価な、比較的平滑な材料を下に横たわる物理的構造物として使用する。この材料の上部の上に、チタンの薄層（10～100オングストローム）を熱的蒸発、スパッタリング、化学的蒸着または他の手段により載せる。チタンは金と支持体との間の接着層として作用する。チタンの析出に引き続いて、金（10～10000オングストローム）を熱的蒸発、スパッタリング、化学的蒸着または他の方法により載せる。

【0219】

ある態様において、ターゲットは伝送ラインに直接的にまたは種々のリンカーを介して取付けることができる。取付けは、例えば、静電相互作用、共有結合、および疎水性相互作用を包含することができる。多数の生物学的分子は結合を形成できる官能基を含有するので、しばしばターゲットは直接取付けることができる；特定の手順は表面に取付ける特定分子（例えば、タンパク質、抗体、糖タンパク質、核酸、レクチン、糖、炭水化物、およびその他）の化学構造に従い変化する。例えば、ポリペプチドは典型的には種々の官能基、例えば、カルボン酸（COOH）または遊離アミン（-NH₂）基を含有し、これらの基は伝送ラインの表面上の適当な官能基との反応にまたは適当なリンカーに対して有効である。同様に

、他の生物学的分子、例えば、核酸、糖および炭水化物は取付けに適當な点である他の官能基（例えば、-OH、-NH₂、-COOH、-SH、およびその他）を含有する。

【0220】

選択的に、ターゲットを誘導化して、追加の反応性官能基に対して暴露するか、あるいはそれと結合させることができる。誘導化はターゲットまたは伝送ラインの化学的処理を包含することができる。例えば、シリカまたはガラス支持体をシラン化して、その上に官能基を形成することができる。同様に、例えば、タンパク質抗体に取付けられた糖部分を過ヨウ素酸塩でグリコール切断して遊離アルデヒド基を発生させることによって、糖タンパク質を誘導化することができる。糖タンパク質上の遊離アルデヒド基を表面において遊離アミンまたはヒドラジンと反応させて、それに対する結合相手に結合させる（参照：米国特許第4,671,958号）。ポリペプチド、例えば、抗体または抗体フラグメント上に遊離スルフヒドリル基を発生させる手順もまた知られている（参照：米国特許第4,659,839号）。

【0221】

直接的に結合する代わりに、第1D図～第1F図に示すように、ターゲットを1またはそれ以上のリンカーを介して取付けることができる。リンカーは、生物学的結合相手（例えば、リガンドまたは抗リガンド）を下に横たわる（例えば、装置またはデバイスの）表面に結合させるために使用できる分子である。リンカーは核酸または伝送ラインと共有結合を形成することができる。伝送ラインの表面上の基と反応することができる1つの官能基、および核酸と反応性の他の基を有する二官能リンカーを使用して、所望の複合体を形成することができる。種々の金属、ガラス、およびプラスチックの支持体に種々の生物学的分子を取付ける多数の手順およびリンカーはこの分野において知られている。例えば、下記の文献を参考のこと：欧州特許出願第188,256号；米国特許第4,671,958号；米国特許第4,659,839号；米国特許第4,414,148号；米国特許第4,699,784号；米国特許第4,680,338号；米国特許第4,569,789号；米国特許第4,589,071号および米国特許第5,670,381号；およびBorlinghaus他、Cancer Res. 47: 4071 - 4075 (1987)、それ

らの各々は引用することによって本明細書の一部とされる。

【0222】

タンパク質は、種々の異なるプロトコルを使用して、伝送ラインに取付けることができる。ある場合において、タンパク質はタンパク質または伝送ラインを修飾しないで取付けることができる。例えば、タンパク質溶液を標準的緩衝液中で調製し、この溶液を裸の金と接触させ、次いで洗浄する。他のアプローチは、疎水性化合物、例えば、アルカンチオールを金表面に適用する（例えば、Bain他、Angew. Chem. 10 : 522 - 528、(1989)）。タンパク質は、また、種々のホモ機能またはバイオ機能のリンカーを使用して取付けることができる（例えば、下記の文献を参照のこと：Pierce Catalog and Handbook, Life Science and Analytical Research Products, 1994）。

【0223】

選択的に、伝送ラインへの取付けを促進する連鎖部位を含むように、タンパク質を操作することができる。好ましくは、連鎖部位がタンパク質結合機能を妨害しないように、連鎖部位を操作する。いったんタンパク質が伝送ラインに取付けられたときタンパク質が向く方向をコントロールするように、連鎖部位を操作することができる。この一般的アプローチの例は、取付けを促進するために比較的高い濃度のシステイン（およびこうして高いチオール濃度）またはアミノ基を含むように連鎖部位を操作することを包含する。また、第2タンパク質が連鎖部位に取付けられるように部位を操作することが可能であり、そして伝送ラインと実際に結合するのが第2タンパク質である。種々の他のこのようなアプローチはこの分野において知られている。

【0224】

抗体、タンパク質、および糖タンパク質を接合する方法はイムノトキシン文献に豊富に記載されており、例えば、下記の文献から見出すことができる： Monoclonal Antibody - Toxin Conjugates : Aiming the Magic Bullet, Thorpe他、Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine、Academic Press、pp. 168 - 190 (1982) ; Chapter4 in Monoclonal Antibodies : Principles and Applications、BirchおよびLennox、編、John Wiley & Sons, Inc.、NY

(1995) ; Waldmann, Sequence 252 : 1657 (1991) 、米国特許第4,545,985号および米国特許第4,894,443号。

VIII. 無標識検出

本発明の方法は、標識を利用しないでタンパク質／リガンド複合体の情報を検出することができる。分析する結合事象に関するリガンドのタイプに無関係に、これは真実である。大部分の現存する方法は、対照的に、結合性複合体の形成を検出するために標識の使用を必要とする。現存する方法において使用する標識のタイプは変化するが、しばしば放射性標識または蛍光標識を包含する。

【0225】

本発明の方法は直接的検出を含むので、標識化された化合物を使用することは不需要である。それゆえ、タンパク質／リガンド複合体を分析する方法の特定の場合において、実験を実施するために標識化されたタンパク質またはリガンドを調製することは不要である。また、標識をまったく使用しないで、タンパク質／リガンド複合体の形成を妨害することがある、標識の存在により引き起こされる立体障害性の非存在が保証される。さらに、他の方法と異なり、本明細書に記載する方法は非結合標識化分子から生ずるバックグラウンドの信号に対して不感受性である（例えば、非結合リガンドから生ずるバックグラウンドの蛍光）。これが意味するように、本発明の方法は実時間でタンパク質／リガンド複合体の形成をモニターすることができ、これにより反応速度論の研究を実行することができる。本発明において標識は不要であるので、検出システムの特質は標識化の使用を排除しない。

IX. タンパク質／リガンドのプロファイルを使用する分析

A. プロファイルまたはサインの獲得

本発明の検出システムを使用すると、ある種のリガンド／抗リガンド複合体またはある種のタイプの結合相互作用固有の信号を包含する、スペクトル走査を得ることが可能である。このような走査はここにおいてプロファイル、サインまたはフィンガープリントと称する。プロファイルは本質的に任意のタイプのリガンド／抗リガンド複合体について得ることができる。このようなプロファイルは、タンパク質／リガンド複合体を研究するとき特に有効である。いっそく詳細に後

述するように、特定複合体の形成を同定し、結合相互作用のタイプに従いリガンドを分類し、そして異なるタイプの結合相互作用を区別するとき、プロファイルを使用することができる。

【0226】

それゆえ、本発明のある種の方法は、種々のタイプのリガンド／抗リガンド複合体、特に種々のタイプのタンパク質／リガンド複合体についてプロファイルまたはサインを決定することを包含する。タンパク質の結合の研究において、このような方法は典型的にはリガンドに結合したタンパク質ターゲットをカップリングさせる信号通路を通して伝送された電磁信号をモニターすることを包含する。周波数または波長を所望の範囲にわたって走査して、周波数または波長の関数として測定した信号を描写するスペクトルを得ることで、信号（伝送および／または反射された）の変調は測定される。各タンパク質／リガンド複合体は異なるスペクトルを与えるので、スペクトルはその特定複合体のサインまたはプロファイルとして働くことができる。

【0227】

例えば、特定タンパク質／リガンド複合体に対して固有である、ある種のピークまたは信号を、スペクトル中で特定周波数において同定することが可能である。同様に、ある種の信号を特定下位構造物、例えば、ドメイン、結合部位、活性部位、アロステリック部位、およびその他と相關させることができる。こうして、このような特性ピークを検出し、モニターすることによって、種々の分析、例えば、試料中のある種の被検体の存在の明瞭な同定、結合相互作用のタイプの区別、定量的研究の実施および反応速度論的研究の実行を達成することができる。

【0228】

多数の異なる異なるタンパク質／リガンド複合体を使用してこの手順および分析を反復することによって、サインまたはプロファイルのデータベースを蓄積することができる。例えば、電子的記憶媒体の中にこれらのプロファイルを記憶することによって、プロファイルを実験の間に急速にアクセスし、実験スペクトルに対して比較して、ちょうど列挙した分析のタイプを促進することができる。

X. 定量分析

標識を使用しないで本検出方法は実行でき（前述したように信号を実時間で追跡することを可能にする）かつある種の信号を特定タンパク質／リガンド複合体と相関させること（すなわち、タンパク質／リガンド複合体のスペクトルのプロファイルまたはサイン中の特性信号を同定すること）が可能であるので、ある種の定量分析を実行することが可能である。例えば、特定タンパク質／リガンド複合体から発生することが知られているスペクトル中のある種の信号の変化から、特定複合体の濃度を経時的に測定することができる。測定できる変化は、例えば、ピーク振幅の変化またはピーク周波数の変化を包含するが、他の変化をその上モニターすることができる。

【0229】

特定タンパク質／リガンド複合体の特徴を示す信号をモニターすることによって、結合反応速度論を実行することができる。このような研究において、例えば、信号強度の変化を時間の関数としてプロットして結合曲線を得る。異なるリガンド濃度レベルにおいて得られた複数の結合曲線から、アフィニティー定数を決定することができる。アフィニティー定数および他の反応速度論のデータをこの分野において知られている方法に従い計算することができる。反応速度論およびアフィニティーについての解説は、任意の標準的生化学または化学のテキスト、例えば、下記の文献に記載されている：Mathewsおよびvan Holde、*Biochemistry*、Benjamin Cummings、New York、1990。

XI. ライブラリーの合成

種々の異なるタイプのライブラリーを本発明の方法とともに使用することができる。ライブラリーは、有機合成法を使用してまたは生化学的に調製される、意図的につくられたコレクションである。後者の場合において、分子はin vitroまたはin vivoでつくることができる。このような非限定的リストは、ランダムペプチドライブラリー、コンビナトリアル合成ライブラリー、ファージディスプレイライブラリー、天然産物ライブラリー、オリゴ糖ライブラリーおよびレガシーライブラリー（例えば、特定研究設備のグループにより、経時的に合成され、収集された分子の集合物）を包含する。

【0230】

また、細菌またはバクテリオファージ粒子中で分子生物学的技術により構築された、生物学的に合成されたライブラリーを使用して、本発明において使用するライブラリーを調製することができる。例えば、米国特許第5,270,170号および米国特許第5,338,665号（それらの両方は引用することによって本明細書の一部とされる）には、プラスミドのクローニング部位の中に挿入されたランダムオリゴヌクレオチドを使用してつくられた融合タンパク質をコードする組換えプラスミドの構築が記載されている。このクローニングはDNA結合性タンパク質をコードする遺伝子のコーディング領域、例えば、lacリプレッサー内に配置され、こうしてDNA結合性タンパク質の特異的結合機能は遺伝子の発現時に破壊されない。また、プラスミドはDNA結合性タンパク質により結合部位として認識される又クレオチド配列を含有する。こうして、適当な細菌細胞の形質転換および融合タンパク質の発現時に、タンパク質はそれを産生するプラスミドに結合する。次いで細菌細胞を溶解し、融合タンパク質を所定の生物学的活性についてアッセイする。そのうえ、各融合タンパク質はそれをコードする核酸と結合したままである；こうして核酸を增幅し、それ以上の特性決定のための選択されるタンパク質／プラスミド複合体の核酸部分をスクリーニングすることによって、候補化合物の正確な構造を決定することができる。

【0231】

しばしばディスプレイライブラリーと呼ばれる他のライブラリーを使用することもできる。これらのライブラリーは、一体的タンパク質のトランスマンプラン部分をコードする遺伝子の部分にランダムオリゴヌクレオチドが融合されている、核酸ベクターを使用して調製される。例えば、米国特許第5,223,408号（これは引用することによって本明細書の一部とされる）参照。融合タンパク質が発現されると、タンパク質のランダムポリペプチド部分を外方に向けて、外側細胞膜の中に融合タンパク質を埋め込む。こうして、この種類のライブラリーにおいて、試験すべき化合物を細胞それ自体に結合させる。また、細胞は融合タンパク質のランダム部分をコードする組換えベクターを含有するので、予備的スクリーンにおいて有望であると思われるランダムポリペプチドを支持する細胞を溶解し、

そして核酸配列決定、融合タンパク質のランダム部分のアミノ酸配列の検出、およびそれ以上の研究のためにそれらのベクターを抽出する。

【0232】

同様に、ファージディスプレイ技術を使用してランダムペプチドライブラリーを発生させることができる。一般に、このアプローチは、ファージコートタンパク質の1つをコードする遺伝子の融合物として、数百万のタンパク質の変異型またはそれらの官能基をファージゲノムの中にバッヂクローニングすることを含む。いったん発現されると、コートタンパク質の融合産物として宿主細菌中で組立てられる新しいファージ粒子の中に組込まれる。引き続いて融合タンパク質を成熟ファージコートタンパク質の中に組込むと、リガンド（例えば、ペプチドまたはペプチドフラグメント）はファージ表面上に提示されるが、対応する遺伝物質はファージ粒子内にとどまる。ディスプレイされたリガンドとリガンド遺伝子型との間のこの接続は、注目のターゲットに結合するリガンドをディスプレイするファージの濃縮を可能とする。このアプローチの概観について、例えば、下記の文献を参照のこと：PhizickyおよびFields、Microbiological Reviews、59：91 - 123 (1995) およびHoogenboom他、Immunotechnology 4：1 - 20 (1998)、これらの両方は引用することによって本明細書の一部とされる。また、下記の文献を参照のこと：Devlin他、Science 249：404 - 406 (1990)；ScottおよびSmith、249：386 - 390 (1990)；Cwirla他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87：6387 - 6382 (1990)；Fong他、Drug Development Research、33：64 - 70 (1994)；ScottおよびSmith、Methods of Enzymol. 217：228 - 257 (1993)；Smith、Science 228：1315 - 1317 (1985)；Sawyer他、4 Protein Engineering 947 - 53 (199)；Takamatsu他、151 J. Immunol. 4651 - 59 (1993)、およびDower他、米国特許第5,427,908号、それらの各々はその全体において引用することによって本明細書の一部とされる。

【0233】

コンビナトリアル化学は、ライブラリーの化学的メンバーを系統的方法に従い化学的サブユニットの組立てによりつくる合成法である。こうしてライブラリー中の各分子は、1またはそれ以上のこれらのサブユニットから構成される。化学

的サブユニットは、天然に存在するまたは修飾されたアミノ酸、天然に存在するまたは修飾されたヌクレオチド、天然に存在するまたは修飾されたサッカリドまたは有機または無機であるかどうかにかかわらず、他の分子を包含する。典型的には、各サブユニットは少なくとも2つの反応性基を有し、各サブユニットの最初に1つ、次いで他の基を反応させて、連続的にいっそう複雑な、潜在的に多様の分子を構築することによって、段階的構築またはより大きい分子を可能とする。固定された数の個々の構築ブロック、例えば、20の天然に存在するアミノ酸を合成の各工程において等しく利用可能とする方法を使用することによって、化合物の非常に大きいアレイまたはライブラリーを合成反応の数工程後にさえ組立てることができる。

【0234】

1つの一般的コンビナトリアルアプローチは、各ライブラリーの配置がその化合物の合成構造に関する情報を与えるように、組織的な前もって決定した方式で固体支持体上でコンビナトリアルライブラリーを化学的に合成することを包含する。例えば、下記の文献を参照のこと：米国特許第4,833,092号；WO 94/05394；およびGeysen他、J. Imm. Meth. 102 : 259 - 274 (1987)、それらの各々はその全体において引用することによって本明細書の一部とされる。他のアプローチは、標準的固相タンパク質化学および感光性保護基を使用する光リソグラフィーの組合せを包含する。例えば、下記の文献を参照のこと：Pirrungに対する米国特許第5,143,854号；WO 90/15070；WO 92/10092；およびFodor他、Science 251 : 767 - 773 (1991)、それらの各々はその全体において引用することによって本明細書の一部とされる。

XII. スクリーニング / 薬剤の発見

A. 一般論

現在の薬剤発見のプログラムは典型的には相互作用的プロセスを包含し、このプロセスにおいて、大きいライブラリーをスクリーニングして注目のターゲットに結合するターゲットを同定し、次いでターゲットを使用していっそう収束されたライブラリーを調製し、そしてこれらのライブラリーをさらにスクリーニングする。このようなアプローチを適切に働かせるために、急速なスクリーニングプ

ロトコルが必要である。多数のスクリーニング法の制限は、ターゲット／リガンド複合体を直接的に検出できることである。その代わりに、典型的には結合性複合体を同定するために標識を使用することが必要である。さらに、特異的結合と非特異的結合とを区別することは通常不可能である。こうして、収束されたライブラリーは、複数のラウンドのスクリーニング後でさえ、ターゲットに非特異的結合するリガンドをしばしば含む。それ以上の制限は、多数のスクリーニング法が、分離工程が不要である均質アッセイよりむしろ結合したリガンドを遊離リガンドから物理的に分離する洗浄工程を含む、分離に基づくアプローチであることである。

【0235】

B. 結合するリガンドを同定するためのスクリーニング

タンパク質に結合するリガンドについてスクリーニングする大部分の現存する方法は、注目のタンパク質に結合するリガンドを検出することを単に含む。スクリーニングの初期のラウンドの間に同定されたリガンドをスクリーニングの引き続くラウンドに付して、いっそう収束されたライブラリーを作り、このライブラリーから潜在的能力を有する主要な化合物を選択することができる。

【0236】

また、本発明の方法は、スクリーニングが単に注目のタンパク質とリガンドとの間に結合を検出することを含むようなスクリーニングプロトコルにおいて使用することができる。一般に、このような方法は、タンパク質ターゲットを信号通路にカップリングさせ、次いでリガンドを含有する試料とタンパク質ターゲットを接触させることを含む。信号を信号通路に沿って伝搬させ、次いでタンパク質／リガンド複合体により試験信号の変調から生ずる応答信号を検出する。ある方法において、タンパク質ターゲットを連続伝送ラインに直接取付ける。他の方法において、1またはそれ以上のリガンドを信号通路にカップリングさせ、タンパク質ターゲットをリガンドと接触させる。前述したように、このアッセイにおいて使用するリガンドは、例えば、下記のものを包含するタンパク質に結合することができる、事実上任意の化合物であることができる：抗体、ペプチド、核酸、全細胞、細胞表面レセプター、小胞、脂質、およびその他。

【0237】

C. 生物学的機能をベースとするスクリーニング

本発明の検出システムを使用して種々のスクリーニングアッセイ実施して、あるタイプの生物学的活性または機能に影響を与える分子を同定することができる。例えば、タンパク質ターゲットと他の化合物との間の結合、例えば、タンパク質ターゲットと他のタンパク質、核酸、または細胞との間の結合に影響を与えるリガンドについてスクリーニングすることが可能である。1つのアプローチにおいて、種々の異なる被験リガンド（典型的にはライブラリーからの）の各々をターゲットタンパク質に結合することが知られているリガンドと個々に混合する。次いで、この混合物をバイオアッセイ装置の信号通路にカップリングされたターゲットタンパク質と接触させる。ターゲットタンパク質 / 既知リガンドについての応答信号の検出は、試験リガンドが結合に有意に影響を与えないことを示す；応答信号の非存在は、他方において、試験リガンドがターゲットタンパク質と既知リガンドとの間の結合を阻害できることを示す。

【0238】

こうして、特定ターゲットとターゲットタンパク質に結合する既知核酸との間の結合を妨害するリガンドを同定するためにスクリーニングを実施する場合において、既知核酸を含有する試料を試験リガンドと混合する。次いで生ずる混合物を信号通路にカップリングされたターゲットタンパク質と接触させる。信号を信号通路に沿って伝送して、ターゲットタンパク質と核酸との間で形成された複合体と相互作用させる。応答信号の検出は、試験リガンドがターゲットタンパク質が核酸に結合するのを妨害しないことを示す；期待する信号の非存在は、試験リガンドが結合を妨害し、こうして潜在的に有用な生物学的活性を有しうることを示す。別のアプローチにおいて、ターゲットタンパク質および既知リガンドを最初に一緒に混合して、結合性複合体を形成し、引き続いて試験リガンドを添加する。応答信号の喪失は、試験リガンドがターゲットタンパク質および既知リガンドを含む結合性複合体を不安定にすることを示す。

【0239】

生物学的活性と相關する結合の検出を包含するスクリーニングアッセイの他の

例は、生物学的レセプターを通して信号を実際に伝達する試験リガンドの能力をスクリーニングする例である（例えば、WO 98 / 25146、これはその全体において引用することによって本明細書の一部とされる、参照）。このタイプのアッセイにおいて、試験リガンドが細胞中のレセプターに結合し、リポーター分子の発現を誘発することができ、次いでリポーター分子が結合して検出可能な結合性複合体を形成する場合においてのみ、検出可能な結合性複合体が形成される。

【0240】

また、当業者は理解するように、生物学的活性を有する結合性複合体の形成についてアッセイすることを包含する、広範な種類の他のこのようなスクリーニングメカニズムを開発することができる。

【0241】

D. プロファイルまたはサインを使用するスクリーニング

1. 特異的結合vs非特異的結合

多数の現在のスクリーニングアプローチは、試験リガンドがターゲットタンパク質に結合するかどうかしか示さないという制限を有する。このような情報は、現実の生物学的関係を有する試験リガンドについてのスクリーニングにおいて、多少制限された価値を有する。なぜなら、特異的結合と非特異的結合とを区別することが不可能であるからである。ある種の方法、例えば、細胞レセプターに結合し、発現を誘発する能力について試験リガンドをアッセイすることについてちょうど記載した方法が開発されたが、これらのアッセイは非常に複雑でありかつ時間を消費する傾向がある。

【0242】

本発明のいくつかの方法は、対照的に、一般的に前述したように、特異的結合と非特異的結合とを区別することができる。このような区別を行う能力は、ターゲットタンパク質上の生物学的に関係する部位に結合する試験リガンドをいつそ急速に同定することにおいて、大きい価値を有する。区別を行うことができる方法は、前述のプロファイルまたはサインに基づく方法を利用する。タンパク質およびそれに結合することができるリガンドを含むスクリーニング方法において、ターゲットタンパク質および特異的結合性複合体を形成することが知られてい

る天然リガンドについてプロファイルを得る。このようなプロファイルから、前述したように特異的結合の特徴を示す信号を同定することが可能である。こうして、スクリーニング実験の間に、本発明のある種の方法はターゲットタンパク質に結合する試験リガンドを単に同定するばかりでなく、かつまた天然リガンドが結合する部位に結合するものに結合するリガンドのグループを同定することができる。このような区別を行う能力により、最も価値を有すると思われる試験リガンドにいっそう急速に集中することができる。

【0243】

2. 相互作用の特質による分類

本発明のある種の方法を使用すると、特異的結合と非特異的結合とを区別するよりもいっそう進歩した生物学的に関係するレベルでスクリーニングすることが可能である。ここでも、プロファイルまたはサインを得ることについて前述したアプローチを使用して、本発明の方法を使用して、ターゲットタンパク質と結合したリガンドとの間に存在する相互作用の特異的タイプの特徴を示す信号を同定することが可能である。こうして、ある種の方法を使用すると、天然リガンドが結合する部位にリガンドが特異的に結合するかどうかを同定することが可能であるばかりでなく、かつまた相互作用の特質を区別することが可能である。こうして、いくつかの方法は特異的に結合するばかりでなく、かつまた特異的方法でターゲットタンパク質と結合するリガンドについてスクリーニングすることを含む。

【0244】

例えば、ある種の方法において、ターゲットタンパク質に対する種々のアゴニストの結合固有の信号または信号の組を同定することが可能である。信号のこの組または信号の組は、ターゲットタンパク質に対する種々のアゴニストの結合固有の信号または信号の組の存在について、ターゲットタンパク質と試験リガンドとの間の実験スペクトルを検査するとき有効である。このような信号または信号の組の存在は、試験リガンドがアゴニストであることを示す。特定ターゲットタンパク質に結合するインヒビターの特徴を示す信号を使用して、同様なタイプの分析を実施することができる。このような信号は試験リガンドのライブラリーを

特定のターゲットタンパク質の阻害複合体固有の信号についてスクリーニングするのに使用でき、このような試験リガンドがターゲットタンパク質を阻害する強い候補であることを示す。

【0245】

ある種の方法を使用して関連するタイプのリガンドを区別する、例えば、アゴニストとアンタゴニストとを区別する、更には競合インヒビターとアロステリックインヒビターとを区別することさえ可能である。例えば、アゴニストとアンタゴニストは結合時にターゲットタンパク質において異なるコンフォメーションの構造を誘導するので、アゴニストと特定ターゲットタンパク質との結合固有の信号または信号の組、およびアンタゴニストの結合固有の他の信号または信号の組を同定することが可能である。こうして、実験的スペクトルをアゴニストまたはアンタゴニストの信号の存在について検査して、結合する試験リガンドがアゴニストまたはアンタゴニストであるかどうかを決定することができる。同様なタイプの研究を使用して、競合インヒビターとアロステリックインヒビターとを区別し、それらについてスクリーニングすることができる。種々の他のタイプの区別を利用して同様なタイプの高度に精巧なスクリーニング分析を実施して、大部分の生物学的に関係するように見えるリガンドのみを同定することができる。

【0246】

3. 多重部位タンパク質

いくつかのタンパク質ターゲットはリガンドが結合する複数の活性部位または多重部位を有し、こうしてタンパク質のコンフォメーションを変更し、生理学的作用を誘導する。生理学的作用は各結合部位について固有であることができる。慣用技術、例えば、蛍光は結合事象しか同定できない；慣用アプローチを使用して、種々の部位における結合を区別することは困難である。しかしながら、本発明の方法を使用すると、異なる部位における結合を区別することが可能である。なぜなら、本発明の方法は結合性複合体の誘電性を変更する、構造的特徴および変化に対して感受性であるからである。特に、前述の方法を使用して、種々の部位における結合の特徴を示す、ある種の信号を同定することが可能である。このような信号の知識を使用して、種々の部位における結合事象を区別することが可

能である。

【0247】

E. オーファンレセプターのスクリーニング

「オーファンレセプター」は、既知リガンドが同定されてきていないレセプターを意味するためにこの分野において使用する用語である。このようなレセプターについての研究は多数の現存する方法では複雑化している。なぜなら、このような方法は注目のタンパク質ターゲットに結合できる試験リガンドを同定する競合的結合の研究をしばしば含むからである。競合的結合アッセイにおいて、ターゲットタンパク質に結合できる標識化リガンドは、ターゲットタンパク質に対する結合について試験リガンドと競合する。標識化リガンドの存在量および結合量についての知識から、ターゲットタンパク質に結合する試験リガンドの能力を評価するために使用できる標準的曲線を作ることが可能である。

【0248】

しかしながら、このような競合的研究はオーファンレセプターでは不可能である。なぜなら、定義によれば、タンパク質標的に結合できるリガンドは知られていないからである。本発明の方法を使用すると、対照的に、オーファンレセプターに結合できるリガンドを同定することができる。なぜなら、本発明の方法によれば、標識を使用しないで、ターゲットタンパク質とリガンドとの間の結合を直接的にモニターすることが可能であるからである。

XIII. アレイを使用するスクリーニング

A. 方法

本発明のある種の方法において、スクリーニングプロセスを実施するためにアレイを利用する。アレイの使用により、試料の処理量を大きく増加させることができる。構造的に、アレイは典型的には複数の素子または部位を含む固体支持体上に形成される。本発明のスクリーニング法において、アレイの各素子は、タンパク質ターゲットまたはリガンドが電磁的にカップリングされるか、あるいは直接的に取付けられる信号通路、例えば、伝送ラインを含む。多数のスクリーニング試験において、目標は1つのタンパク質ターゲットに対して多数の化合物をスクリーニングすることである。こうして、このような方法において、任意の素子

内に位置するすべてのタンパク質ターゲット、ならびに異なる素子におけるすべてのターゲットは同一である。各素子を異なる試料と接触させ、各試料は異なる化合物を含有する。このようにして、ライブラリー中の異なる化合物を共通のターゲットでスクリーニングすることができる。

【0249】

しかしながら、他の方法において、任意の特定の素子中のすべてのタンパク質ターゲットは同一であるが、異なる素子中のタンパク質ターゲットは互いと異なることが望ましいことがある。これにより、スクリーニングすべきリガンドまたはリガンドのグループをいくつかの異なるタンパク質ターゲットに対して試験することができる。それゆえ、例えば、10の異なるプロテアーゼインヒビターをターゲットとして使用することを仮定すると、アレイは10列または行の素子を含み、各素子は異なるプロテアーゼを有することが好ましい。

【0250】

種々のアレイ素子におけるターゲットの種類とは無関係に、各素子に走行する信号通路に信号を発射して、種々の素子の各々における結合をモニターする。発射した信号の変調を使用して、ターゲットおよび試料中のリガンドとの間の結合を検出する。アレイをミクロ流体装置と組み合わせて使用して、異なるアレイに微量の異なる試料をコントロール可能に添加することができる。すべてのターゲットが同一である場合、典型的には流体装置を使用して種々のアレイに異なる試料を小出しする；これに対して、種々の素子におけるタンパク質ターゲットが異なるとき、流体装置はアレイの異なる素子に同一の試料を小出しする。

【0251】

いくつかの方法において、前述したように固体支持体上で合成されたアレイを利用する。ある種の方法において、注目のタンパク質ターゲットに結合することが知られているリガンドの配列（「先導配列」）を利用して、アレイ上で合成されたスクリーニングの引き続くラウンドにおいて使用すべき配列の選択を知らせることによって、所望の生物学的活性を有する可能性が高いリガンドに向かってスクリーニングプロセスを集中させることが可能である。例えば、米国特許第5,770,456号（これはその全体において引用することによって本明細書の一部とさ

れる)参照。こうして、先導配列の1またはそれ以上の位置において系統的バリエーションをつくることによって、先導配列に関する1系列のリガンドを合成する。この理論は、ターゲットタンパク質に結合することが知られている配列(例えば、ペプチド)の小さい変更がより高い生物学的活性を有する配列を生ずることができるということである。

【0252】

B. アレイの設計

アレイ中の素子の数は、主としてアレイを使用するスクリーニング用途の種類に基づいて、広く変化する。ライブラリーのスクリーニングの初期段階において、多数の化合物が急速にスクリーニングできるように、多数の素子が好ましい。このような用途のためのアッセイは 10^6 までの素子を有することができる。他の場合において、アレイの中に 10^3 までの素子が存在する。なお他の方法において、例えば、初期ラウンドのスクリーニングから潜在的に療法上の価値を有する先導化合物のすぐれた候補であると思われる化合物を使用して、より高い分解能の研究を実施しようとするとき、単一の素子のみが存在することができる。それゆえ、一般に、アレイ中の素子の数は1、10、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、または 10^6 、またはそれらの間の任意の数または範囲であることができる。

【0253】

また、アレイを構成するタンパク質ターゲットまたはリガンドの密度は有意に異なってよい。必要な密度は種々の因子、例えば、信号感度の程度、溶液中のリガンドの数、および研究下の特定複合体についての特性ピークが十分に規定されかつ他の複合体からの信号から解明されるかどうかに基づいて異なる。最適な状況において、本発明のシステムの感度およびある種の複合体と相關することが知られている信号を使用して分析を実施する能力は、素子が単一のターゲットまたはリガンドを含有できることを意味する。しかしながら、他の状況において、タンパク質ターゲットまたはリガンドの密度は100ターゲット/ cm^2 までであることができる。なお他の方法において、密度は 10^8 ターゲット/ cm^2 まで、 10^{12} ターゲット/ cm^2 までおよび 10^{18} ターゲット/ cm^2 までであることができる。それゆえ、一般に、ターゲットの数は1ターゲット/素子、または 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5

、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{16} 、 10^{17} 、または 10^{18} ターゲット / 素子まで、またはそれらの間の任意の数を含むことができる。

【0254】

C. アレイおよびミクロ流体装置のカップリング

アレイまたはミクロ流体技術に従い、本明細書に記載する方法をハイスループットのスクリーニングプロセス (HTS) において使用することができる。このようなアプローチにおいて、数十万の導電性材料を特定ターゲットに結合する能力についてスクリーニングするか、あるいは前述のより高いレベルの分析に従いスクリーニングする。例えば、高度に並列のスクリーニングプラットフォームを実現できるように、本明細書に記載する本発明を小型化することができる；何百も何千もの化合物を同時にスクリーニングすると同時に、結合効果（例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト）、アフィニティー、反応速度、およびその他を測定できるプラットフォーム。さらに、このような小型システムは非常に少量の化合物を必要とし、こうしてコンビナトリアルライブラリーから前記化合物を購入するコストを大きく節約する。

【0255】

バイオアッセイ装置を使用して形成された検出システムは、検出が必要に応じて実時間で行われかつ多数の試料を急速に分析することができるので、ハイスループット検出システムである。応答期間をナノセカントの時間目盛りで必要に応じてモニターする。分子が互いに結合するとすぐに、検出できる。低い濃度の測定または低い結合アフィニティーを有する分子間の測定に、必要に応じてより多くの時間を必要とする。実際の時間は必要に応じて拡散時間により制限される。潜在的制限以外において、数千の化合物を必要に応じてシステムを通して非常に急速に、例えば、1時間で走行させる。チップ製作技術を使用して、拡散時間を最小にするために小さい体積を使用しつつ結合反応の開始においてのみ反応速度の測定を行って、 10^7 の試料 / 時を必要に応じて測定する。濃度が知られているとき、結合アフィニティーを必要に応じて反応速度から計算し、こうして装置を非常に速い時間でプロービングし、そしてアフィニティーを反応速度曲線の勾配

から計算および／または推定することができる。

XIV. 収束されたスクリーニング

最も簡単なアプローチにおいて、スクリーニングの初期ラウンドはライプラリーネー中のどのリガンドが注目のタンパク質に結合するかを同定することを単に含む。ある場合において、次いでこの初期グループのリガンドを2回目に試験して第1ラウンドのスクリーニングからの結果を確認する。次いで再現性結合を証明する生ずるリガンドのサブグループを典型的には投与量応答試験に付す。投与量応答試験において、異なる濃度のリガンドを一定数のタンパク質ターゲットと接触させ、結合性複合体について生ずる信号を測定する。信号パラメーター（例えば、1またはそれ以上の特定ピークの強度）vs濃度のプロットを調製する。すぐれた投与量応答はシグモイド曲線を生じ、ここで典型的にはリガンドの非常に低い濃度において信号応答はほとんど存在せず、より高い濃度において急速な信号変化、次いで最後にタンパク質ターゲットが飽和するにつれて信号のプラトーが存在する。

【0256】

ある種の濃度において比較的小さい濃度変化で有意な信号変化が存在するようには、投与量応答はすぐれたダイナミックレンジをもつべきである。そうでなければ、所望の生理学的応答を達成するために大量のリガンドを与えることが必要である。より高い濃度において、望ましくない副作用および毒性の危険が増加する。アレイを使用して、投与量応答の研究を実施できる。このような場合において、例えば、異なる濃度のリガンドを有する溶液をアレイ中で異なる素子に対して暴露することができ、各アレイは同一数のペプチドターゲットを有する。タンパク質ターゲットの数が素子毎に変化する場合、異なる素子についての結果を正規化することが必要である。

【0257】

次いで、すぐれた投与量応答を示すリガンドを典型的には種々のアナローグ合成の基準として使用する。次いでアナローグを追加のラウンドのスクリーニングに付して、強い結合性リガンドを同定し、潜在的に療法上の価値を有するリガンドのいっそう収束された集合物を形成する。

【0258】

サインまたはプロファイルを使用するスクリーニングアプローチは試験を有意に合理化し、過度のスクリーニングラウンドを減少する。このような方法において、初期のスクリーニングラウンドは、例えば、特異的または非特異的にターゲットタンパク質に結合するとしてリガンドを分類するか、あるいは構造的特徴に従いリガンドを分類することを含む。こうして、初期のスクリーニングプロセスにおいて、所望のクラス内のリガンドのみを選抜する。こうして、スクリーニングプロセスがアゴニストを同定することである場合、スペクトルをアゴニスト固有の信号について検査する。アゴニスト結合固有の信号を表示できないすべてのリガンドを排除することによって、ライブラリー中のリガンドの非常に高い割合を無視することができる。プロファイルを使用することによって、単に結合しない化合物を排除することができるばかりでなく、かつまた結合性複合体を形成するが、誤ったタイプであるある種のリガンドを排除することができる。次いでリガンドのこのいっそう収束されたグループを投与量応答、合成および前述の追加のスクリーニング試験に付して、療法上の有望性を示すリガンドを同定することができる。スクリーニングプロセスにおいていっそう選択的な基準を使用することによって、治療剤として潜在的価値を有するリガンドを非常にいっそう急速に同定することが可能である。

XV. 抗体

A. 一般論

本発明は、種々の分析的および診断的用途において使用できる抗体またはそれらのフラグメントを使用する種々の方法を提供する。これらの方法は、完全な抗体またはそれらの任意の種々のフラグメント、例えば、 $F(ab)'$ 、Fab、またはscFvフラグメントを利用することができる。本明細書において使用するとき、抗体という用語はこのようなフラグメントを包含する。

【0259】

抗体を使用して伝統的研究は、競合結合の研究、ELISA（酵素結合イムノアッセイ）、およびサンドイッチ型アッセイは、例えば、抗原または抗原／抗体複合体の存在を検出する複雑な手順をしばしば含み、ほとんど常に標識の使用を含む

。上に示したように、本発明の方法はリガンド／抗リガンド複合体の直接的検出を含み、それゆえ大きく簡素化し、分析を実行できる速度を増加する。

【0260】

B. 伝送ラインへの取付け

一般に、伝送ラインに抗体を取付ける化学は、伝送ラインに一般的にタンパク質を結合することについて前述した化学と同一である。しかしながら、抗体よりもむしろ抗原を伝送ラインに取付ける場合において、特に抗原が小分子であるとき、抗体が結合できるように伝送ラインから抗原を取出すために、リンカーを介して伝送ラインに抗原を取付けることが望ましい。他の場合において、抗原を高分子、例えば、タンパク質（例えば、BSA）に結合し、次いでこれは伝送ラインに取付けることができる。

【0261】

C. 診断の用途

1. 一般論

本発明は、医学的に関係する特定抗原または抗体の存在を同定する診断試験を実施する方法を提供する。一般に、これらの方法は、信号通路の一部分にカップリングされた既知抗体を、既知抗体に特異的に結合する抗原を潜在的に含有する試料と接触させることを含む。応答信号の発生により、結合性複合体の形成を検出する。応答信号の検出は試料中の抗原の存在を示し、そして応答信号を検出できないことは抗原が試料中に存在しないことを示す。また、既知抗原を信号通路にカップリングさせ、抗原と特異的複合体を形成する抗体の存在について試料を検査することによって、分析を変更することができる。

【0262】

2. 潜在的抗原

潜在的に医学的意味を有しつつ本明細書に広く記載する方法を使用してアッセイできる潜在的抗原は、例えば、ペプチド、オリゴ糖、ステロイド、核酸および細胞または細胞成分を包含する。これらの方法は、病原体、例えば、ウイルスまたは細菌、代謝物質および異化物質、例えば、グルコース、脂質、肝臓酵素、電解質、凝固因子をモニターするとき重要であることがある。検出できる分子の1

つの重要なクラスには腫瘍マーカーが含まれる。このような腫瘍マーカーは、マーカー、例えば、CEA（絨毛膜胚抗原）またはPSA（前立腺特異的抗原）、ならびに広範な種類の他のマーカーを包含することができる。

【0263】

検出できる潜在的リガンドの他のグループは、乱用薬剤およびそれらの代謝副産物、例えば、コチニン、コカイン、ベンゾイルエクゴニン、ベンゾジアゼピン、テトラヒドロカンナビノール、ニコチン、エタノールを包含する。同様に、療法上の薬剤、例えば、テオフィリン、フェニトイン、アセトアミノフェン、リチウム、ジアゼパム、ノルトリプチリン、セコバルビタール、およびその他の存在を検出することができる。

【0264】

ホルモンは、検出できるリガンドの他の広いカテゴリーを構築し、非限定的例は下記のものを包含する：増殖因子、例えば、テステステロン、エストラジオール、17-ヒドロキシプロゲステロン、プロゲステロン、チロキシン、甲状腺刺激ホルモン、卵胞刺激ホルモン、黄体化ホルモン、形質転換因子アルファ、表皮成長因子、インスリン様成長因子IおよびII、成長ホルモン放出阻害因子、および性ホルモン結合性グロブリン。アッセイできる他の可能な分子は、グルコース、コレステロール、カフェイン、コルチコステロイド結合性グロブリン、DHEA結合性糖タンパク質およびその他を包含する。

【0265】

小分子に加えて、種々の大きい分子、さらには細胞および細胞成分を検出することができる。例えば、感染性病原体、例えば、ウイルス、細菌、真菌およびその他の存在を検出し、定量することができる。結合は抗体と相互作用することができる特徴的な表面マーカー（例えば、膜レセプターまたはレクチン）を通してしばしば形成される。病原体の例は、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、肝炎（例えば、A、BおよびC型肝炎）、麻疹、流行性耳下腺炎、および風疹を包含する。また、患者の血液中のHIVタンパク質の存在を検出することができる。同様に、特徴的なマーカー（例えば、IL-13レセプターを過剰に発現する腫瘍細胞（例えば、米国特許第5,614,191号参照））を有する細胞型（例え

ば、特定組織の特徴を示す細胞)を検出することができる。こうして、特定病原性、分化の特定状態(またはその欠如)または特定組織のタイプを示す細胞を検出および/または定量することができる。ある種の方法を使用すると、本発明は細胞をベースとするアッセイに拡張することができる。なぜなら、検出は試料の精製および増幅を必要とすることができるからである。これらのクラスの用途において、外部の発現を検出することによって、あるいは細胞を溶解して細胞質ゾル成分を解説し、1またはそれ以上の注目の被検体の存在を検出することによって、細胞システムを種々の変化についてモニターすることができる。

【0266】

抗原を信号通路にカップリングさせると、種々の抗体を検出することができる。例えば、HIVに対して特異的な抗原、特異的抗原、例えば、ANA(リウマチ学的疾患において使用される)およびアレルギー応答性抗体。

【0267】

3. アレイの使用

アレイを診断用途において使用して、いくつかの抗原の存在について試験するか、あるいは複数の試料を急速に試験することができる。しかしながら、一般に、比較的わずかの数の抗原または抗体が典型的なアッセイにおいてスクリーニングされるという事実により、診断用途における素子の数は比較的わずかの数である傾向がある。多数の方法は単一の抗原または抗体の検出を含む。このような場合において、種々の異なる試料の各々を特定の抗原または抗体についてスクリーニングすべき場合を除いて、単一の素子が十分であることがあり、この場合においてアレイは複数の素子を含み、各々は同一の抗体または抗原を含有する。あるいは、単一の試料中のいくつかの異なる抗原または抗体をアッセイすべき場合、複数の素子が望ましいことがある。最後に、対照として働く重複素子を含めるために、複数の素子が望ましいことがある。典型的には、素子の数は50より小さく、1~10であることができる。しかしながら、診断法における素子の数についての制限は分析の特質の反映であり、薬剤スクリーニングの節において前述したように、非常により多くの素子を有するアレイを調製する能力と無関係である。

【0268】

任意の所定の素子内の抗体または抗原の数は、薬剤発見法において前述したのを同一の考察および因子に依存する。

【0269】

D. 非臨床的用途

関係する方法は、非臨床的用途において種々のリガンドの存在を検出するために抗体を使用することを包含する。このような場合において、これらの方法は注目の特定リガンドの存在を検出するために使用される。例えば、この方法は排水処理分析において使用することができる。この場合において、検出するリガンドはトキシン、微生物または微生物が発生した産物であることができる。

【0270】

E. エピトープの決定

抗体またはそのフラグメントのエピトープは、本発明のある種の方法に従い決定することができる。1つのアプローチは系統的方法においてリガンドを合成して、変化する配列を有するリガンドの多様な組を得ることを含む。これらのリガンドをアッセイフォーマット、例えば、前述のフォーマットで合成し、次いで注目の抗体でスクリーニングすることができる。1またはそれ以上のリガンドのどれに抗体が結合するかを検出することによって、抗体が認識する配列を決定することが可能である。第2アプローチはプロファイルの使用を含む。この場合において、既知抗体／抗原複合体についてのプロファイルのデータベースを調製する。次いで、このデータベースを解析して、特定複合体に関連する明確な信号を同定する。エピトープ配列は既知複合体について知られているので、ある種のエピトープをある種の信号と相關させることができる。こうして、未知エピトープに結合する試験抗体の場合において、既知エピトープの特徴を示す信号についての実験的スペクトルを検査することによって、試験抗体が認識するエピトープを同定することが可能である。

【0271】

下記の実施例は本発明のある種の面を例示するが、本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではない。

【0272】

実施例1

(コラゲナーゼおよびリゾチームについてのサインプロファイル)

第2A図に示すバイオアッセイ装置を使用して、試験を実施した。バイオアッセイ装置の結合表面は、化学蒸着法(CVD)により載せたITOで処理したカバーガラスから構成された。ITO伝送ラインを注意して検査して、それが微小割れまたは破壊をその中に含有しないこと保証した。TDRモジュールを有するTektronix 11801信号解析器で伝送ラインを測定し、伝送ラインは32 の広帯域対照インピーダンスを有することが見出された。ライン長さは約2.6nsec長さであり、結合表面は34 のインピーダンスおよび約200psecの長さを有することが見出された。上部プレートと下部プレートとの間の距離は10ミルであり、そしてチャンバーは0.5インチの長さであった。側壁を使用しなかった；その代わりに、上部プレートおよび下部プレートの毛管作用は溶液を所定位置に保持した。

【0273】

次いでバイオアッセイ装置にd-PBSの溶液を充填した。充填したバイオアッセイ装置を使用して、基底伝送損失($S_{2,1}$)およびリターン損失($S_{1,1}$)S-パラメーターの測定を45MHz～1GHzの試験周波数範囲にわたって実施した。ネットワーク分析装置(Hewlett Packard Company製、HP8510B分析装置、HP8516A Sパラメーター試験セットを有する)を使用して、信号を発射し、測定し、記憶した。

【0274】

引き続いて、1～10GHzの周波数範囲にわたって異なるタンパク質の異なる応答を検査する1系列の実験を実行した。同一装置を各実験に使用した(装置間の製作におけるわずかな差を排除するために)が、タンパク質の各々を適用する間にSDSで十分に洗浄した。

【0275】

第9A図および第9B図は、1GHz～10GHzの試験周波数範囲にわたって、それぞれ、コラゲナーゼおよびリゾチーム試料の一次結合の効果の伝送損失の測定を図解する。両方の場合において、信号応答は山および谷のパターンを示し、このパターンを使用してリガンドを固有に検出し、同定する。特に、コラゲナーゼ試料の周波数応答は5GHz付近において強い陽性ピークを示した。リゾチーム試料の応答

は、5GHz付近において比較的平らな応答および8GHz付近において強い陽性ピークを示した。検査した他の多数のタンパク質の各々について、試験信号は各タンパク質について固有であり、グループ内の未知タンパク質の同定を容易に可能とした。

【0276】

この実施例において、特定のスペクトル信号を使用して、種々の物質、例えば、タンパク質を区別できる方法を例示する。種々の複合体についての応答を記憶させ、後に検索して未知試料を同定することができる。さらに、顕著さに劣るピークを集合的に検査して特定リガンドについてのパターンを決定する。

【0277】

実施例2

(二次結合：コンカナバリンA対デキストランの検出)

この実施例において、タンパク質に対するリガンドの結合を検出する本発明の方法の能力を証明する。バイオアッセイ装置は実施例1に前述した装置に類似し、同様な方法において調製し、特性決定した。また、伝送ラインは実施例1に記載したものと同一であり、公称32 の対照インピーダンスを有し、そして80 のDC抵抗および34 の公称TDRインピーダンスをもつITOカバーガラスを有した。

【0278】

コンカナバリンA (con - A) 、すなわち、タチナタマメの中に見出すことができるグルコース結合性タンパク質を一次結合性抗リガンドとして使用した。ここで使用したcon - Aは、シグマ・ケミカル・カンパニー (Sigma Chemical Co.) から入手した。デキストラン、すなわち、グルコース多糖をcon - Aに結合するリガンドとして使用した。デキストランの結合を逆転さ、特異性を証明するために、グルコースを競合因子として使用した。（デキストランおよびグルコースもまたシグマ・ケミカル・カンパニーから入手した。）

con - Aのほぼ15 μMの濃度の溶液をバイオアッセイ装置の中に直接入れ、平衡に到達させた。視的検査により確立されるように、蒸発損失はチャンバーを乾燥しなかった。システムをフラッシュし、安定化した後、デキストランを添加してcon - Aに結合させた。信号変化が検出された後、チャンバーを10mg / mlのd - PBS

でフラッシュし、2回目の信号応答の測定を実施した。この効果を第9C図に1GHzで示す。非結合応答を基底応答として使用した。示すように、結合した応答は非結合応答よりもノイズが0.25dBだけ低いように見える。結合したデキストランをグルコースと競合させ、次いでd-PBSでフラッシュしてグルコースを除去することによって、結合特異性を確認した。後者の工程はデキストランが装置に添加されてしまう前に得られた基底値に信号を戻し、こうして結合事象の特異性を証明した。

【0279】

実施例3

(タンパク質小分子の結合)

実施例1に前述した装置に類似し、同様な方法において調製し、特性決定したバイオアッセイ装置を使用し、バイオアッセイ試験フィックスチュアおよびネットワーク分析装置の構成を使用して、大きい分子、例えば、タンパク質に結合する小分子がまた本発明により検出できることを証明した。より高い周波数でバイオアッセイ装置をプロービングするために、装置は再現性がよく、ファラデーポックスの中に注意して入れて、外部の影響から装置を遮断した。これにより、装置は20GHzまでの周波数においてプロービングすることができた。最初に、con-Aをバイオアッセイ装置の中に添加し、バイオ-電気的インターフェースに結合させた。伝送損失を測定し、記憶させ、第9D図に示すように基底応答として使用した。

【0280】

次に、10mg / mlの濃度のグルコースをバイオアッセイ装置に添加し、con-A抗リガンドに結合させた。伝送損失を測定し、基底応答1252に対してプロットして、小分子の結合に基づく信号応答の変化を測定した。

【0281】

第9D図から理解できるように、con-Aへのグルコースの結合に対応する結合応答1254は基底の測定1252と区別される。特に、結合応答1254は16 ~ 20GHz間に2つの大きいピークを示し、これらのピークは基底応答1252において観測されない。測定した信号応答1252および1254における差は、グルコースがcon-A抗リガンド

に結合したとき、検出のための基準を提供する。次いで、d-PBS緩衝液のみでフラッシュし、con-Aから解離した結合グルコースとして応答を逆転させた。裸のチップ（すなわち、抗リガンドとしてcon-Aの非存在）に対するグルコースの効果を検査する別の実験において、前述の周波数スペクトルにおける電磁的問合せの応答に対するグルコースの効果は存在したとしても、ほんのわずかであることが示され、こうして示された結果は完全にcon-Aに結合するグルコースの効果のためであることが示される。

【0282】

実施例4

（定量的滴定）

これらの実験において、リガンドが抗リガンドに結合するときの信号変化の大きさは占有される部位数の関数であることを証明する。実施例1に前述した装置に類似し、同様な方法において調製し、特性決定したバイオアッセイ装置を使用する試験システムを使用し、con-Aに結合するデキストランを使用し、グルコースを競合インヒビターとして使用した。con-Aの結合定数付近に中心をなす、1系列の希釈物を調製した。100%の結合が起こるように、抗リガンドとしてデキストランをcon-Aに結合させた。分子結合表面上のデキストラン濃度が比例的に減少するように、1系列の競合グルコース濃度を使用してデキストランと競合させた。

【0283】

前述した標準伝送ラインの構成を使用した。con-Aを分子結合領域に結合させ、システムを安定化させた。次いでバイオアッセイ装置をd-PBSでフラッシュし、データを1GHzにおいて得た。この競合滴定の結果を第9E図に示す。グルコース濃度として信号変化が0mg/dlから15mg/dlに増加する方法をこれらの結果は示す。デキストランが解放され、グルコースが結合するとき、con-Aの信号は変化する（これは実際にはデキストランの結合活性を測定する）。また、グルコースのデキストラン結合効果の逆転により、特異性はまた証明された。

【0284】

いくつかの選択した濃度についてのグルコース濃度の関数として、伝送損失の

変化の大きさを表2に示す。

【0285】

【表1】

表2

完全に結合したデキストラン	+320milli-dB
1mg/mlのグルコース	+280milli-dB
1.33mg/mlのグルコース	+275milli-dB
2mg/mlのグルコース	+240milli-dB
5mg/mlのグルコース	+115milli-dB
10mg/mlのグルコース	-5milli-dB

【0286】

また、試料グルコースの滴定をcon-Aのスペクトル中の共鳴点において実施した。2つの効果を証明する、この共鳴点におけるグルコース濃度の関数として、リターン損失の変化を第9F図に示す：第1に、グルコースはリガンドとして投与量 - 応答効果を有し、これは抗リガンド（この場合において、これはcon-Aである）に対するその効果に基づく。第2に、スペクトルにおいて、リガンド / 抗リガンドの結合事象に対して他の領域よりも非常に高い感受性応答を示す領域が存在する。

【0287】

1ピコモル (10^{-15} モル)まで低下する濃度を取ったデキストラン溶液の1系列の連続希釈は、これらの低い濃度においてさえ、結合を示す有意な信号応答が起こったことを証明した。信号の蓄積に必要な時間は数分から10分までの範囲であったが、応答はより高い濃度においてデキストランの検出の特徴を示した。

【0288】

実施例5

(全血の検出)

トロポニン - 1 (TN - 1) の検出を全未処理ヒト血液中で実施し、複雑な環境中の検出能力を確認した。未処理ヒト血液をクエン酸ナトリウムで抗凝固処理した。TN - 1のエピトープに対応する抗TN - 1抗体を較正目的で使用した。バイオアッセイ装置のインターフェース伝送ラインを抗TN - 1Ab (抗リガンド) でコーティングした。血液試料を10ng / mlの濃度のTN - 1に対するスパイキングし、そして血液の第2の同一試料を対照としてスパイキングしないで放置した。

【0289】

実験は抗TN - 1Ab抗リガンドを装置に取付けることから成っていた；次いでまず非スパイキング試料を装置を横切って走行させた；試料チャンバーを数回フラッシュして、交換ノイズを見た；次いでスパイキングした試料をまた数回置換してノイズフロアーを確立した。各場合において、伝送損失の変化を測定した。チェックとして、抗TN - 1Ab抗リガンドを装置から除去した。引き続いて実験を対照として反復して、2つの血液試料の他の性質 (TN - 1スパイクを除外して同一であると仮定する) が変化に関係するかどうかを決定した。1GHzにおけるプローブ信号についてのこの実験の結果を下記表に示す。

【0290】

【表2】

	非スパイキング試料	スパイキングした試料
対照	<20millidB	<20millidB
抗TN-1	<20millidB	+275millidB

【0291】

第2系列の実験において、10種の血液試料を臨床実験室から入手し、ヘパリンで抗凝固に関するした以外未処理であった。試料の1つのを2つの部分に分割し、

その部分の1つを前節に記載したようにTN-1抗原でスパイキングした。次いで表面上で抗TN-1抗体を使用してバイオアッセイ装置を調製した。次いで各特異性をバイオアッセイ装置に系統的に通過させ、スパイキングした試料を最後のために取っておいた。これらの試料の各自についての応答を前の実験におけるように1GHzにおいてプローピングし、第9G図に示す。スパイキングした試料は（非スパイキング）試料の残部と明瞭に区別することができた。

【0292】

実施例6

（エストロゲンレセプターに結合するアゴニストおよびアンタゴニスト）

より大きい分子において構造的变化を誘導する小分子の効果を検出するために、エストロゲンレセプター（ER）および種々のエストロゲンアナローグをモデルシステムとして使用した。バイオアッセイ装置は第20図に記載されている通りであり、そして伝送および検出は実施例1に記載されている通りであった。50mMのTris-HCl（pH8.0）緩衝液中の β -ER（Pan Vera、ウイスコンシン州マディソン）（329pmol/mg）を37°において20分間加熱することによって金に結合させた。

【0293】

使用したステロイドエストロゲンアナローグは β -エストラジオールおよびヒドロキシタモキシフェン（HDT）（両方は異なる生理学的機能を有するステロイドエストロゲンアナローグである）、および非ステロイドエストロゲンアナローグ、ジエチルスチベストロール（DES）を誘導した。これらのアナローグは β -ERにおいて構造的变化を引き起こすことが知られている（例えば、下記の文献を参考のこと：Bourguet他、Nature 375: 377 - 382 (1995)）。異なるアナローグの各自により誘導されるものに対する変動を制限するために、実験を单一装置で継続的に実施した。これにより、金伝送ラインおよびアセンブリーの小さい差により誘導される変動の非存在下に、各アナローグが β -ERの誘電性に対して有する異なる効果をモニターすることができる。DESおよび β -エストラジオールは同一の構造的および生物学的機能を有する既知アゴニストである：HDTは β -エストラジオールおよびDESと同様であるが、同一でない、多数の構造的变化を

誘導する既知アンタゴニストである（例えば、下記の文献を参照のこと：Siau他、Cell 95 : 927 - 937 (1998)）。DESおよび - エストラジオールは、同様な機能を有するアナローグとして、実験の再現性の測度を提供するので、それらをこの実験のために選択した。また、それらはS - パラメーターを既知の構造的変化との相関を可能とする。HDTを使用して、S - パラメーターに対する結合複合体の異なる検出器の効果を決定した。

【0294】

引き続いて導入されるアナローグが前に結合したアナローグと競合するように（すなわち、アフィニティーが増加する順序で）、濃度（各化合物について10pM）および配列を選択した。さらに、各アナローグを緩衝液（Tris / HCl）でフラッシュして反応器をきれいにし、解離プロセスを開始した。実験全体を37 ℃において実施した。

【0295】

第10A図は、各化合物についての1~21GHzにおける全走査である。第10B図は、すべての3つの化合物についての信号を示す6~10GHzにおける拡大した走査である。プローピングしたスペクトルウインドウ全体にわたり、2つのアゴニスト（DESおよび - エストラジオール）の応答は非常に類似する。しかしながら、拡大した走査（第10B図）において最も明瞭に示すように、アンタゴニスト、HDT、は非常に異なるスペクトルを生ずる（9~9.25GHzにおいて、より大きい振幅を有する実線はDESである；より小さい振幅を有する実線はエストラジオールについてのものである）。対照実験において、 - ERに結合しないことが知られているビオチンを同様な条件下に - ERと接触させ、ビオチンはバックグラウンドに類似する信号を与えることが見出された（結果は示していない）。

【0296】

次いでこの実験において、本発明の方法がアゴニストおよびアンタゴニストの結合を区別できることが証明される。

【0297】

実施例7

(- エストラジオールを使用する滴定を含むエストロゲンレセプター投与量応

答実験)

より大きい分子において構造的变化を誘導することが知られている小分子の濃度を增加する効果を決定するために、試験システムとして - エストロゲンレセプターおよび - エストラジオールのモデルを使用して滴定を実施した。試験装置は実施例6に記載されている通りであり、信号伝送および検出は実施例1に記載されている通りであった。50mMのTris - HCl (pH8.0) 緩衝液中の - ER (Pan V era、ウイスコンシン州マディソン) (329pmol / mg) を37 °Cにおいて60分間金に結合させた。異なる濃度の - エストラジオールを含有する異なる溶液 (Tris - HCl緩衝液中の1picomolar ; 250picomolar ; 500picomolar ; 750picomolar ; 1000picomolar ; 100nanomolar ; および500nanomolar) を单一装置で継続的に試験した。各 - エストラジオール濃度を試験した後、システムをTris - HCl緩衝液で洗浄した；次いで10分の特定の時間間隔でS - パラメーターを測定した。

【 0 2 9 8 】

最も有効な投与量 - 応答効果は14 ~ 15GHzにおいて発生した（すなわち、このスペクトル範囲は滴定の間に最大の変動を示した）。第11図に示すように、信号測定値（伝送された力）を - エストラジオール濃度に対してプロットしたとき、1 ~ 250picomolarの濃度において効果はほとんど、あるいはまったく見られなかつた。 - ERに対する - エストラジオールの応答は750picomolar ~ 500nanomolarにおいて平らになった。曲線の全体の形状は、レセプターとそれに対して特異的であるリガンドとの結合について期待されるように、S字形である。

【 0 2 9 9 】

実施例8

(ウレアーゼに対する抗ウレアーゼ抗体の結合)

ウレアーゼ (Sigma Chemical Co.、ミズリー州セントルイス) を安価なモデルのタンパク質として使用して、抗原に対する抗体の結合を検出するシステムの能力を証明した。バイオアッセイ装置は実施例6に記載されている通りであった。アルカンジオールを介してウレアーゼを金伝送ラインに取付けた。取付けはまずガラスチップをコーティングする金表面を熱ピラナ (piranha) 溶液 (3.0% H₂O₂ / 濃H₂SO₄ の1.3混合物) で洗浄し、次いで蒸留水で rinsed し、次いでチップを

乾燥させることを含んだ。次いでチップをクロロホルム中の16 - メルカプトヘキサデカン酸 (Gateway Chemical Technology、ミズリー州セントルイス) の5mM 溶液の中に少なくとも12時間浸漬させ、クロロホルム中で短時間洗浄し、次いで空気乾燥した。PBS中の1.1mg / mlのスルホ - NHS (Pierce、イリノイ州ロックフォード) を試験フィクスチュアの中に入導入し、金表面に60分間結合させた。次いでチップをPBSで洗浄し、1×PBS pH7.4中のウレアーゼ (0.1mg / ml) をフィクスチュアの中に入導入し、金表面に10分間結合させた。

【0300】

マウスモノクローナル抗ウレアーゼクローンUR - 25 (IgG1) (Sigma) をPBS 中の1 : 10,000の使用希釈物に希釈し、前述のウレアーゼコーティングしたチップに適用した。S - パラメーターを1~21GHzの範囲にわたって測定し、60分間インキュベートした後、貯蔵した。差スペクトルを第12図に示し、抗原に対する抗体の結合を検出する能力が示される。

【0301】

本発明の可能な態様を上に完全に記載したが、種々の別の態様、変更、および同等の態様を使用することができる。例えば、当業者は理解するように、前述のバイオアッセイ装置の信号通路は伝送ラインに限定されない。他の伝送媒体、例えば、導電性または誘電性導波管を選択的に使用することができる。さらに、タンパク質を信号通路、例えば、伝送ラインにカップリングさせる、いくつかの方法を記載したが、また、多数の方法を使用して、最初に伝送ラインにカップリングさせるメンバーはリガンドであることができる。

【0302】

さらに、この出願に記載したすべての刊行物および特許文献は、各個々の刊行物および特許文献がそのように個々に意味するのと同一程度に、すべての目的に對してそれらの全体において引用することによって本明細書の一部とされる。前述の説明は本発明の典型的な態様としてのみ見るべきであり、本発明の境界は下記の特許請求の範囲により規定される。

【図面の簡単な説明】

【図1A】

本発明によるバイオアッセイシステムの1つの態様を図解する。

【図1B】

本発明によるバイオアッセイシステムの第2の態様を図解する。

【図1C】

第1B図に示すバイオアッセイシステムの断面を図解する。

【図1D】

本発明による分子結合領域の1つの態様を図解する。

【図1E】

本発明に従い空間的に分離した複数の抗リガンドを有する分子結合領域の1つの態様を図解する。

【図1F】

本発明による抗リガンドの複数のクラスを有する分子結合領域の1つの態様を図解する。

【図1G】

本発明による1またはそれ以上の細胞を含有する分子結合領域を図解する。

【図1H】

本発明による細胞膜と膜関連構造とを含んでなる分子結合領域を図解する。

【図2A】

本発明によるバイオアッセイ装置の1つの態様を図解する。

【図2B】

本発明によるバイオアッセイ装置の第2の態様を図解する。

【図2C】

本発明によるバイオアッセイ装置の断面図である。

【図3】

バイオ - 電気的インターフェースの導電性層に沿って起こる結合表面の化学の1つの態様を図解する。

【図4A】

本発明による分子結合事象を検出する方法の1つの態様を図解する。

【図4B】

本発明による二次およびより高次の結合事象を検出する方法の1つの態様を図解する。

【図4C】

本発明による分子結合領域の誘電変化を測定する方法の1つの態様を図解する。

◦

【図4D】

本発明による未知溶液中のリガンドを同定する方法の1つの態様を図解する。

【図4E】

本発明によるリガンドのクラスを同定する方法の1つの態様を図解する。

【図4F】

本発明による溶液のリガンド濃度を定量する方法の1つの態様を図解する。

【図4G】

本発明によるバイオアッセイ装置の自己診断能力を提供する方法の1つの態様を図解する。

【図5A】

本発明による周波数測定システムの1つの態様を図解する。

【図5B】

本発明による分子構造物を検出または同定するために使用することができる、測定した第1周波数応答を図解する。

【図5C】

本発明による分子構造物を検出または同定するために使用することができる第2周波数応答を図解する。

【図6】

本発明による周波数測定システムの第2態様を図解する。

【図7】

本発明による時間ドメイン測定システムの1つの態様を図解する。

【図8】

第8図は、本発明による誘電緩和測定システムの1つの態様を図解する。

【図9A】

コラゲナーゼおよびリゾチームの一次結合作用の伝送損失測定を図解する。

【図9B】

コラゲナーゼおよびリゾチームの一次結合作用の伝送損失測定を図解する。

【図9C】

結合および非結合のデキストランの伝送損失応答を図解する。

【図9D】

グルコースに対して結合しないおよび結合したcon-Aの応答を図解する。

【図9E】

デキストランとグルコースとの間の競合滴定の結果を図解する。

【図9F】

共鳴におけるグルコース濃度の関数としてcon-Aの反射減衰量を図解する。

【図9G】

複雑な環境中の検出能力を示す1GHzにおいてプロービングした全血の10試料についての伝送損失応答を図解する。

【図10A】

1~21GHzの走査であり、ジエチルスチベストロール(DES)、-エストラジオールおよびヒドロキシタモキシフェン(HDT)(破線)と-エストロゲンレセプターとの間で形成された複合体についての信号を示す。

【図10B】

第10A図に示す走査の拡大走査(6~10GHz)である。

【図11】

-エストラジオールを使用する-エストロゲンレセプターの滴定についての投与量応答のプロットである。

【図12】

抗ウレアーゼとウレアーゼとの間で形成された結合性複合体についての信号を示す異なるスペクトルである。

【図13】

本発明によるN×Mアレイ試験システムの1つの可能な態様を図解する。

【図14A】

本発明によるN×Mアレイ試験フィクスチュア（fixture）の種々の図面を図解する。

【図14B】

本発明によるN×Mアレイ試験フィクスチュア（fixture）の種々の図面を図解する。

【図15A】

本発明によるバイオアッセイアレイの1つの態様を図解する。

【図15B】

直列に接続された、電子的にスイッチされる電界効果トランジスタを含んでなる、本発明によるアレイ素子の1つの態様を図解する。

【図15C】

直列に接続された、光学的にスイッチされる電界効果トランジスタを含んでなる、本発明によるアレイ素子の1つの態様を図解する。

【図15D】

2つの直列に接続されたFET装置の2つの部分を含んでなる、本発明によるアレイの1つの態様を図解する。

【図15E】

本発明による第7D図に示すアレイの回路同等モデルを図解する。

【図15F】

本発明による二次元バイオアッセイアレイの1つの態様を図解する。

【図1A】

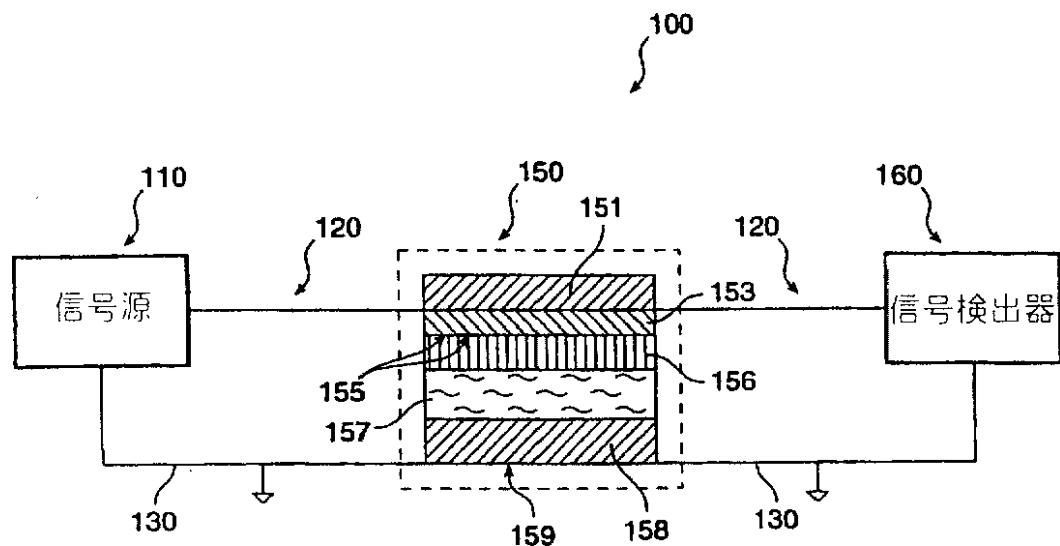


FIG. 1A

【図1B】

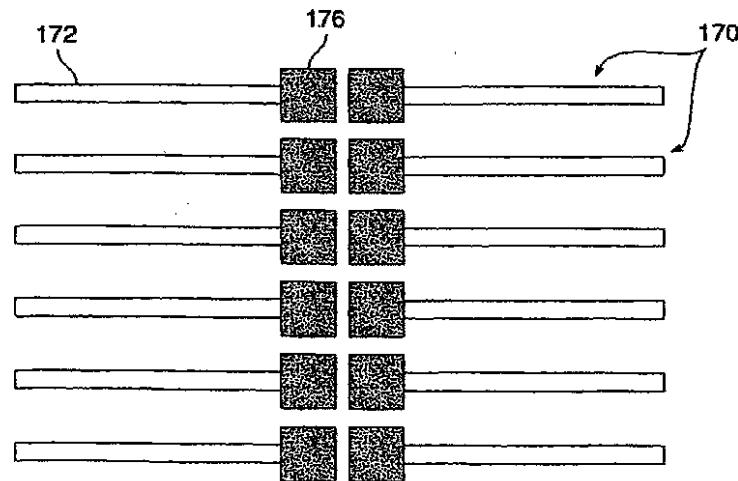


FIG. 1B

【図1C】

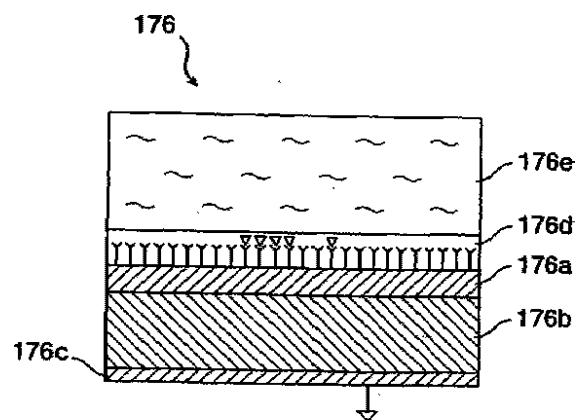


FIG. 1C

【図1D】

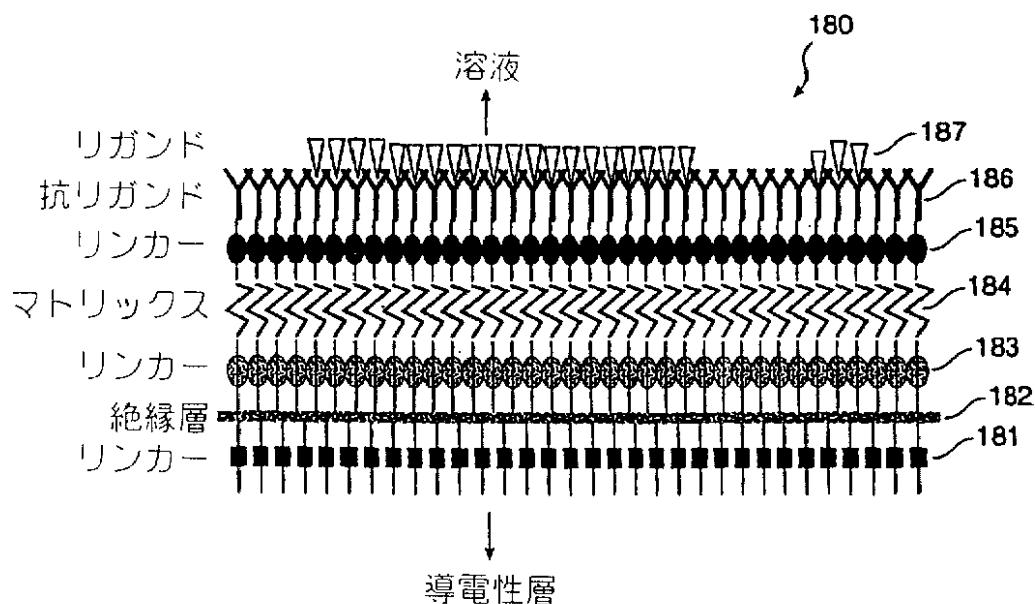


FIG. 1D

【図1E】

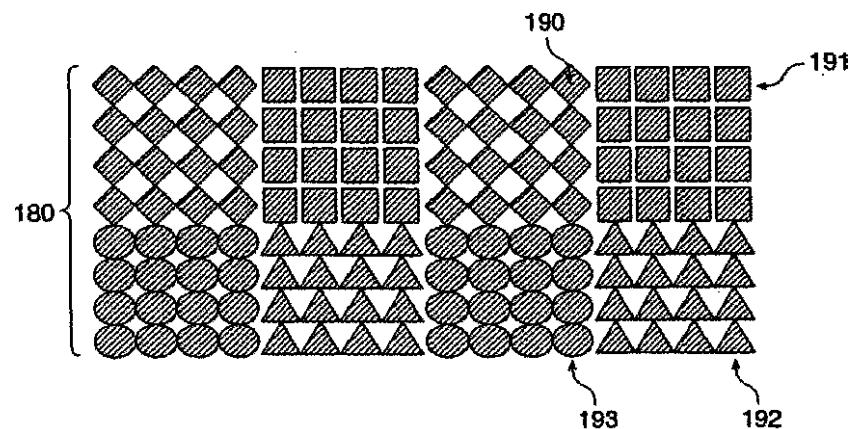


FIG. 1E

【図1F】

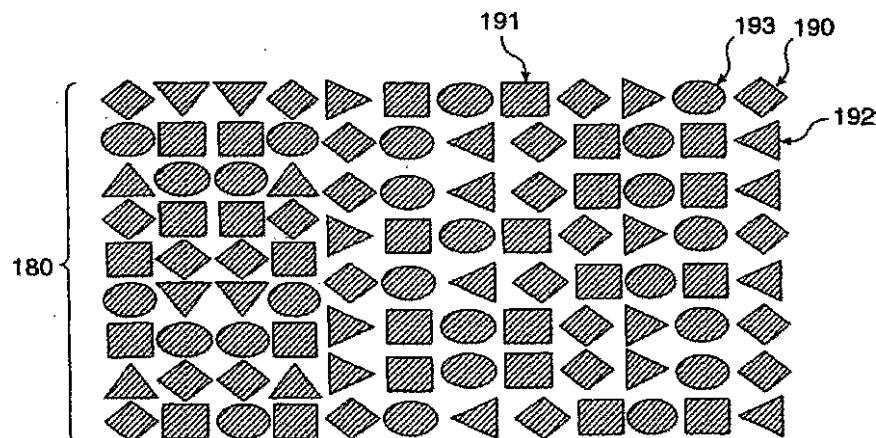


FIG. 1F

【図1G】

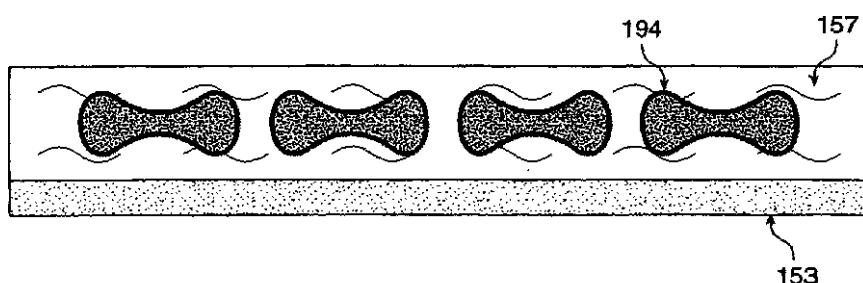


FIG. 1G

【図1H】

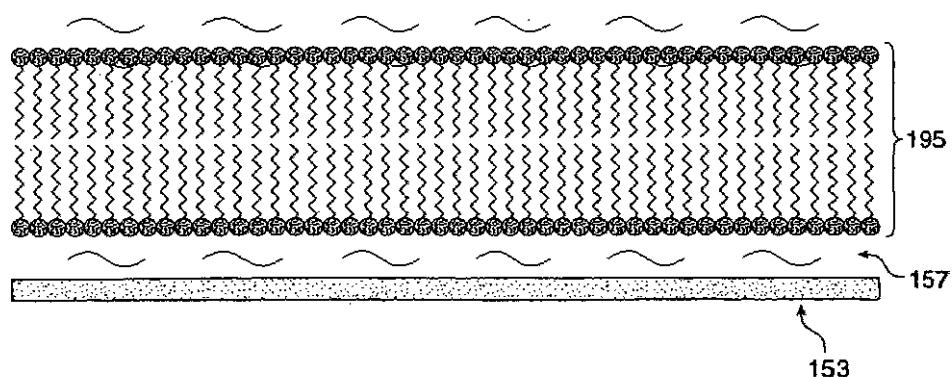


FIG. 1H

【図2A】

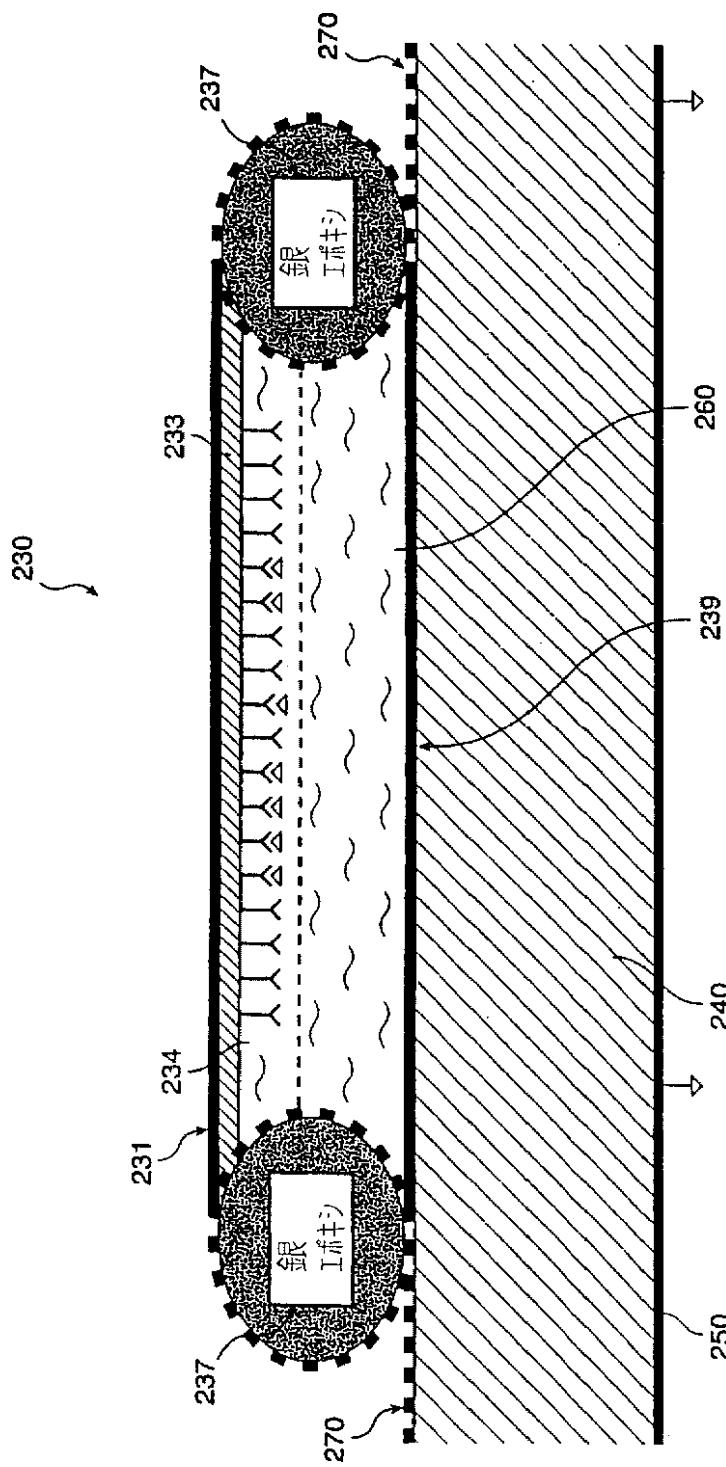


FIG. 2A

【図2B】

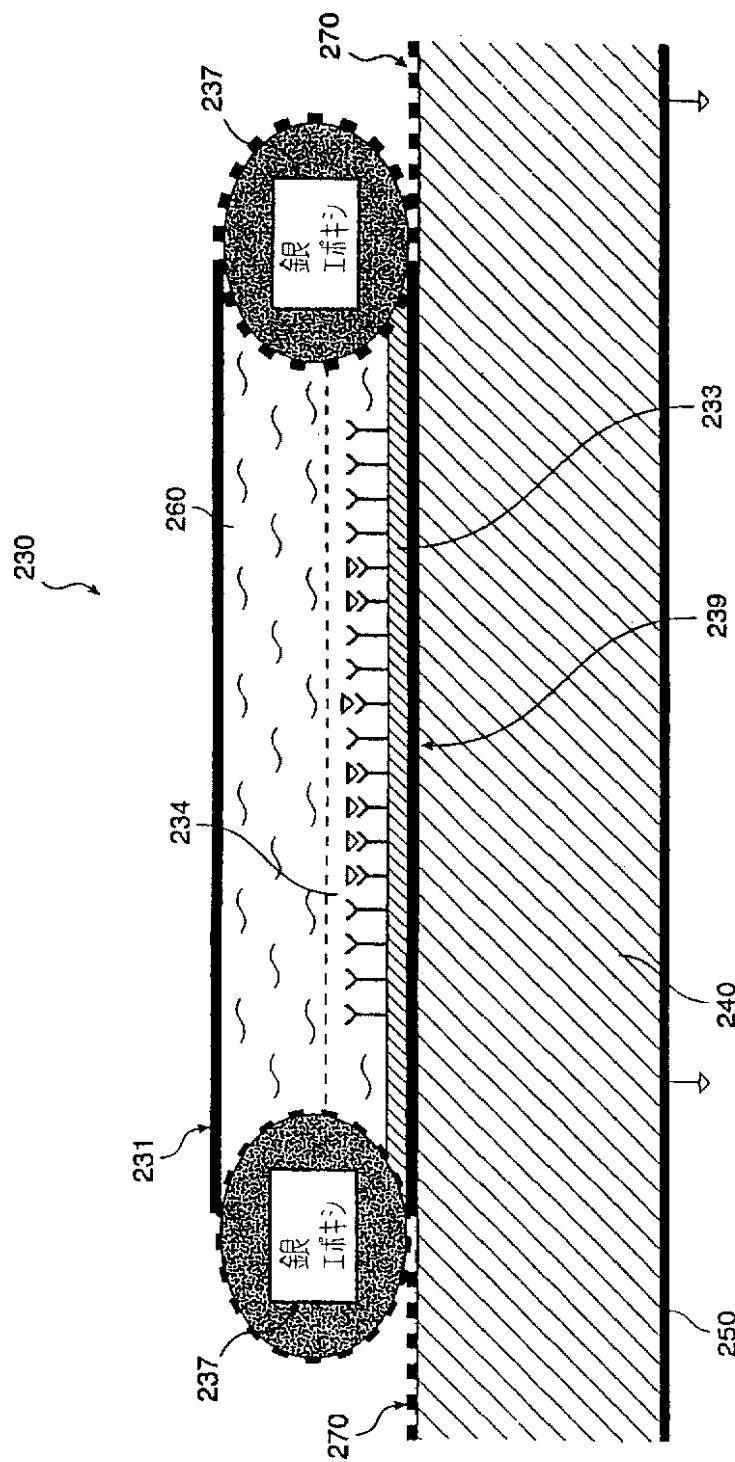


FIG. 2B

【図2C】

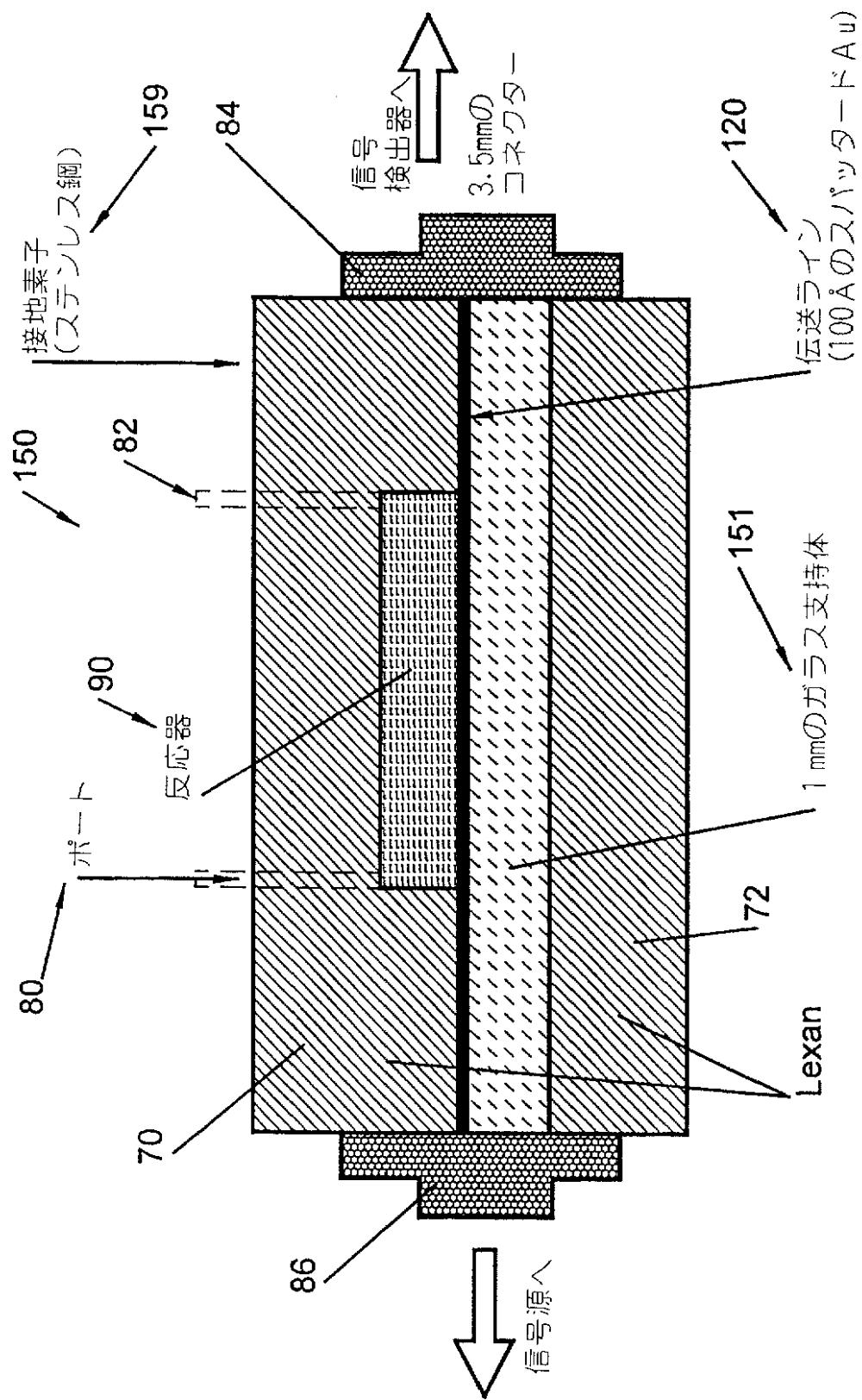


FIG. 2C

【図3】

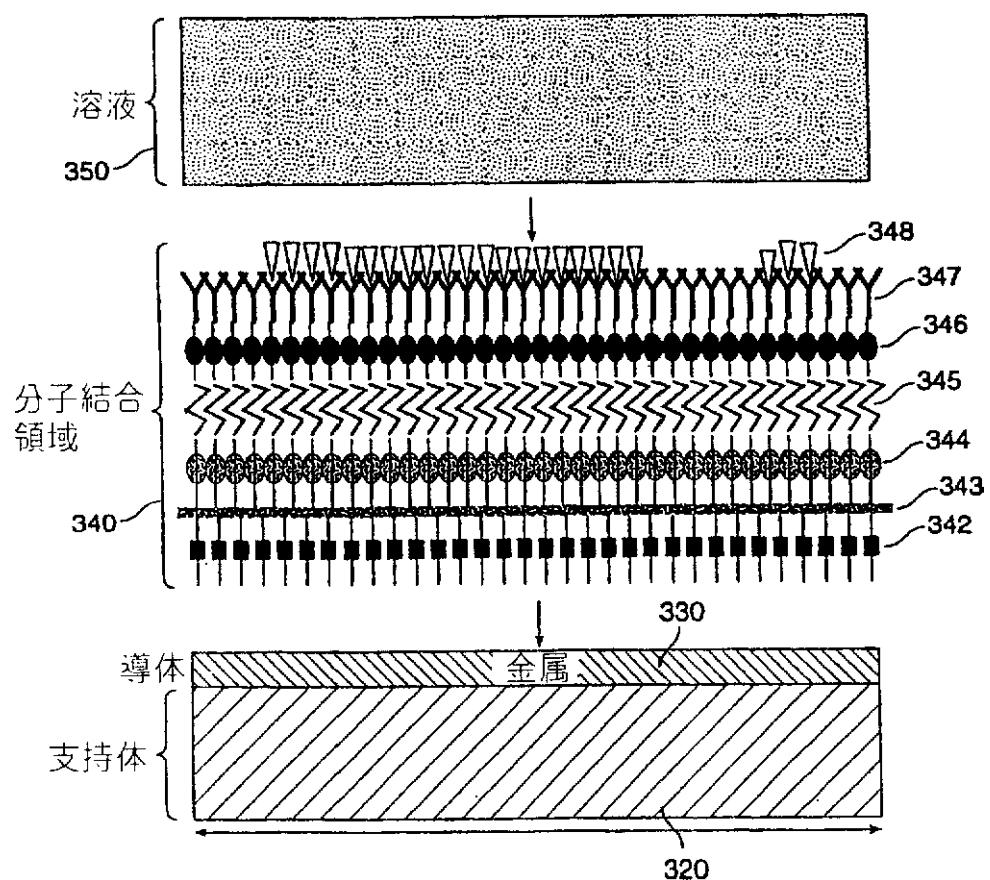
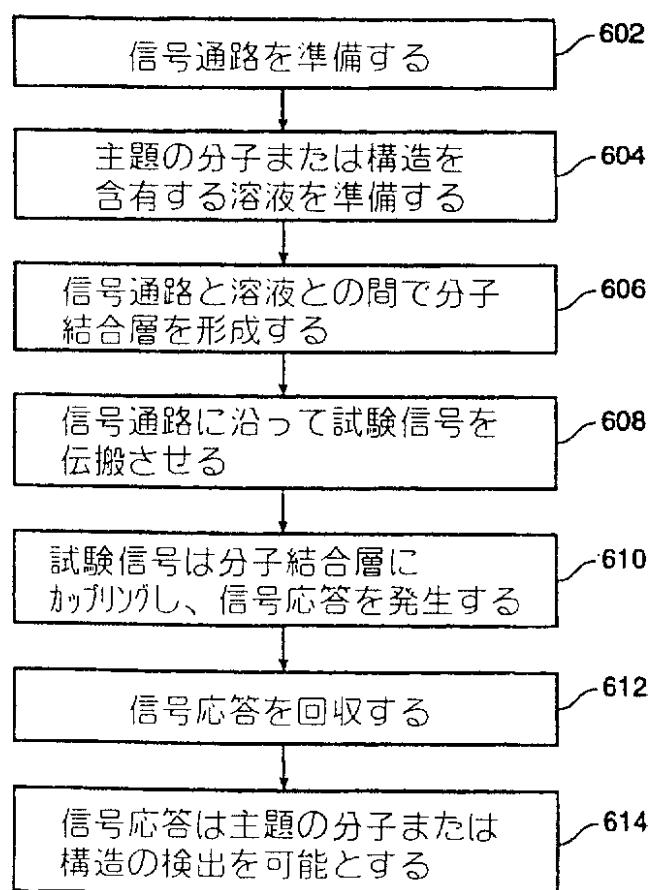


FIG. 3

【図4A】

FIG. 4A



【図4B】

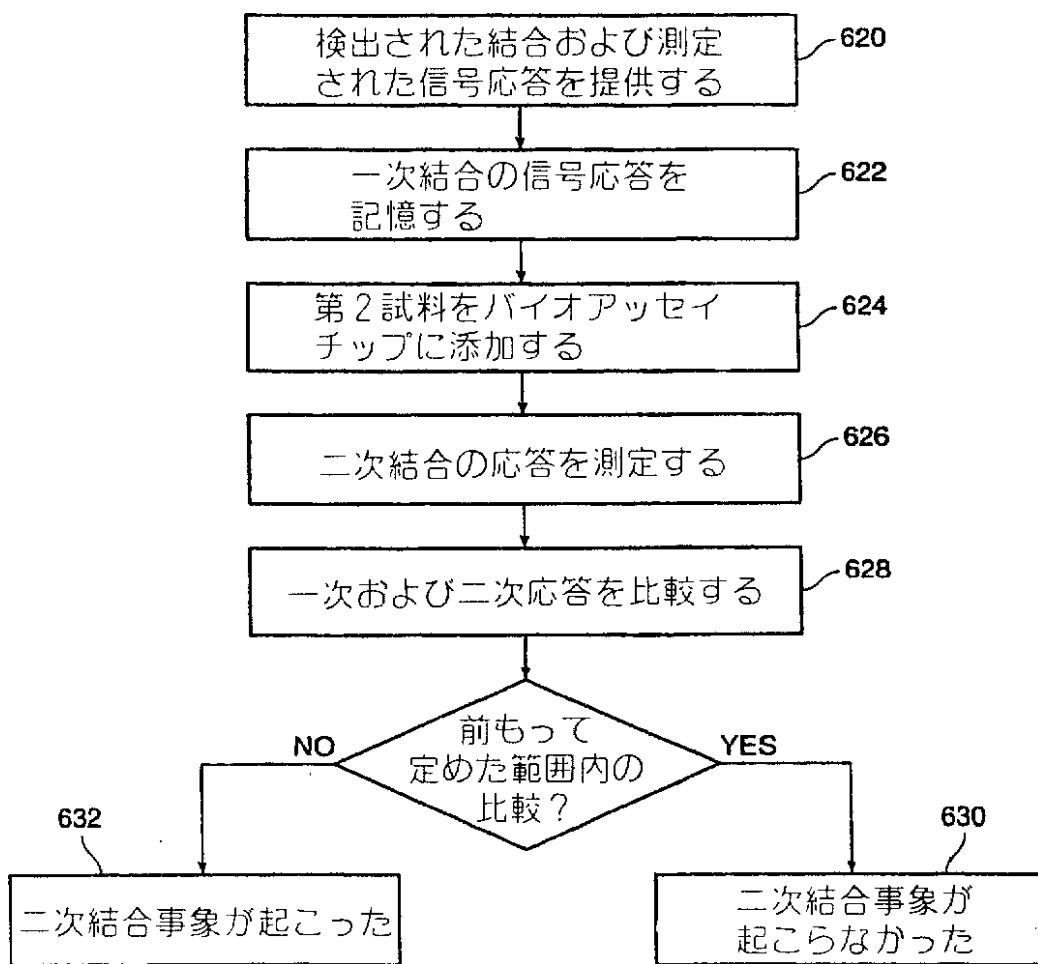


FIG. 4B

【図4C】

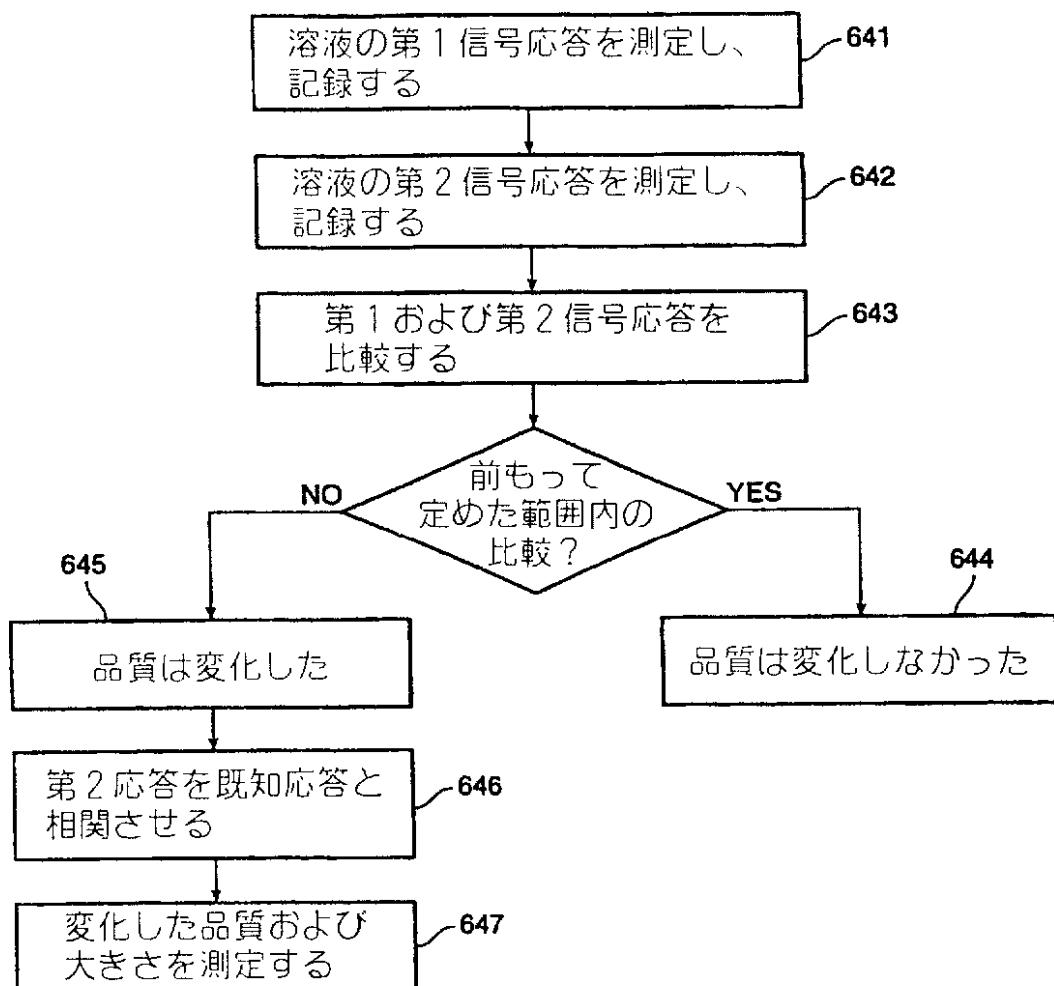


FIG. 4C

【図4D】

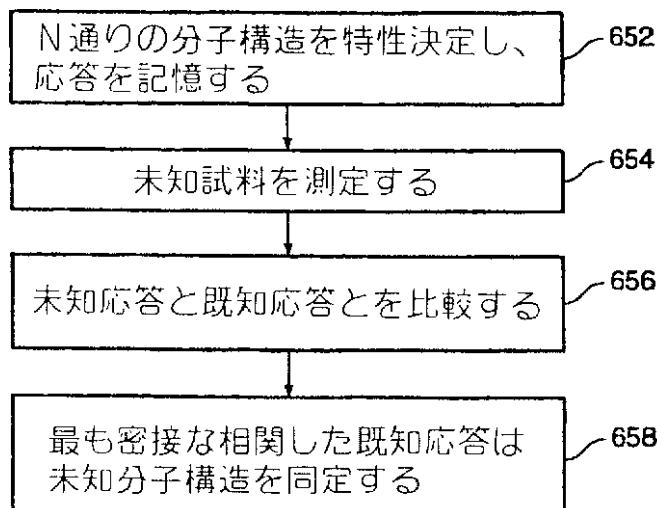


FIG. 4D

【図4E】

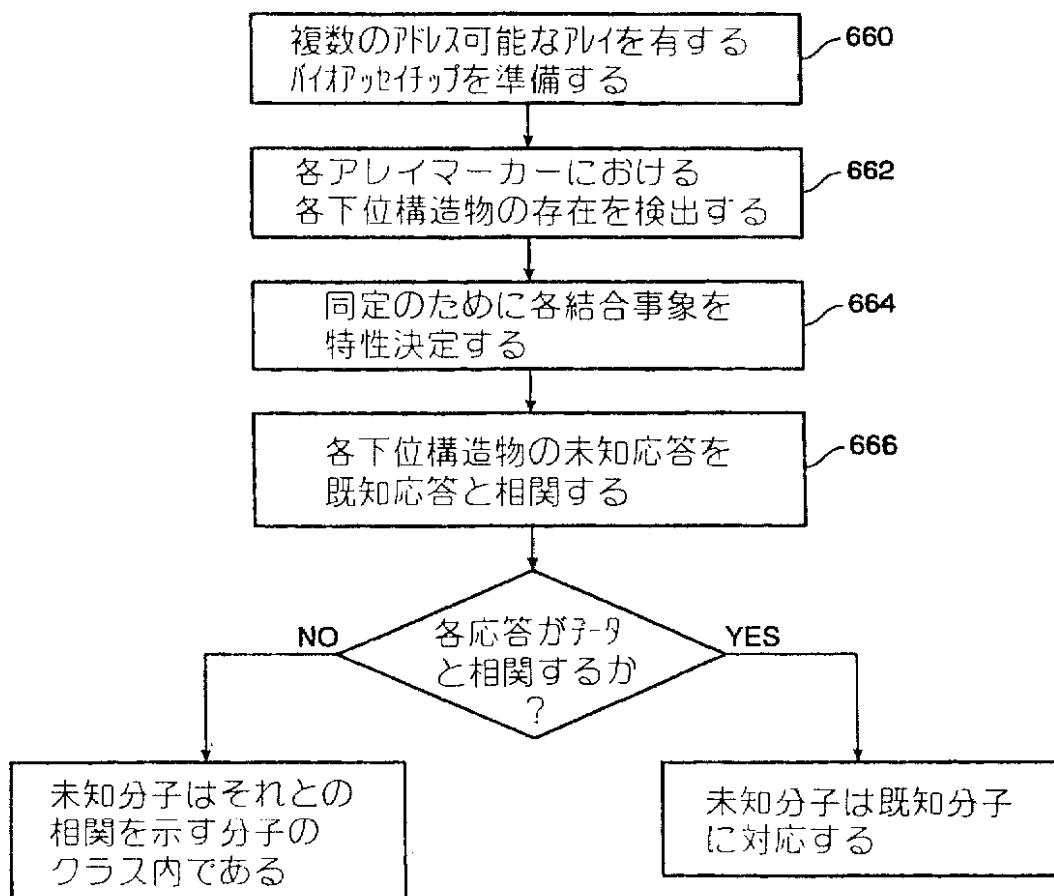


FIG. 4E

【図4F】

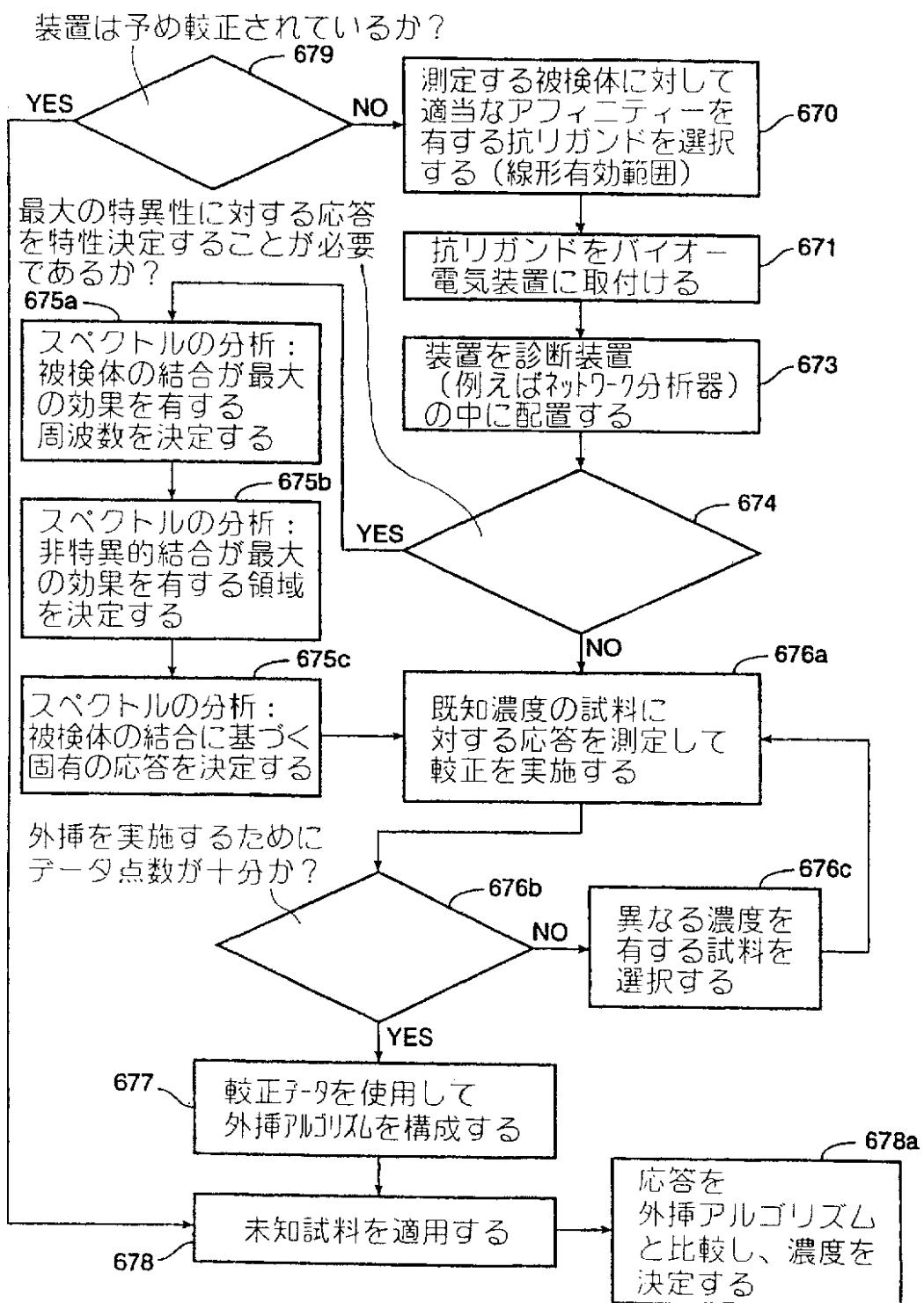


FIG. 4F

【図4G】

抗リガンドの結合の定量的応答
曲線を作製し、滴定「x」
を前もって決定する

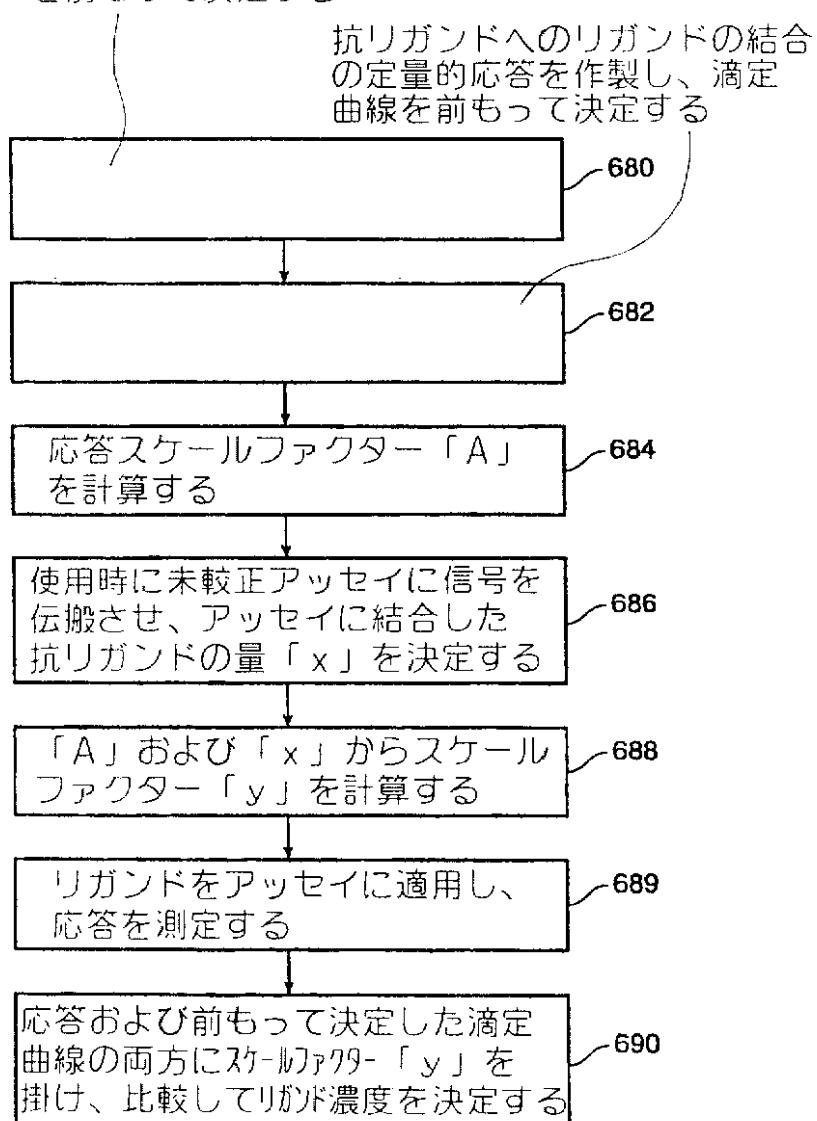


FIG. 4G

【図5A】

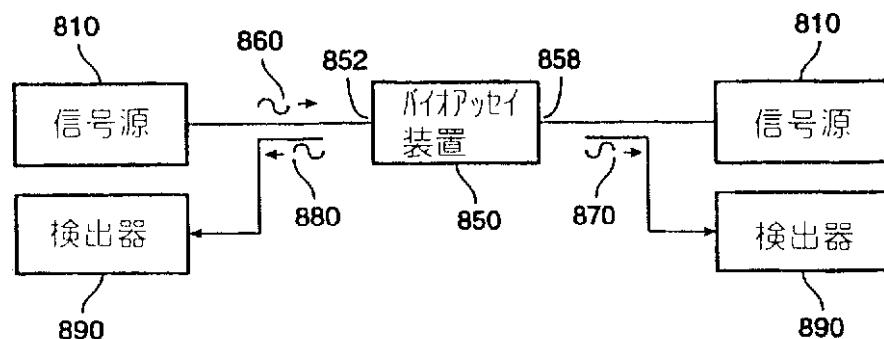


FIG. 5A

【図5B】

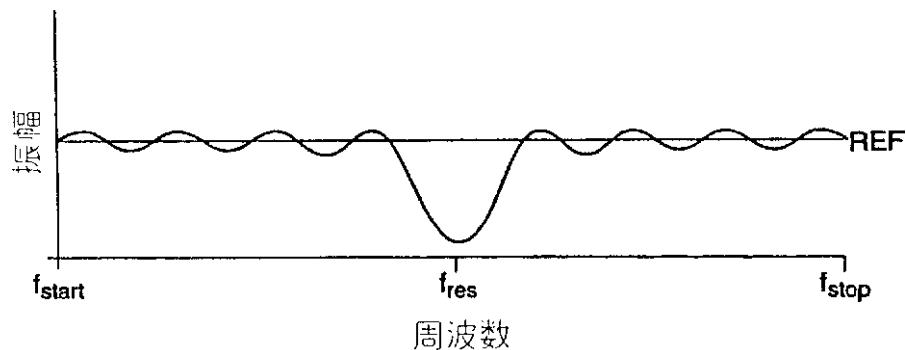


FIG. 5B

【図5C】

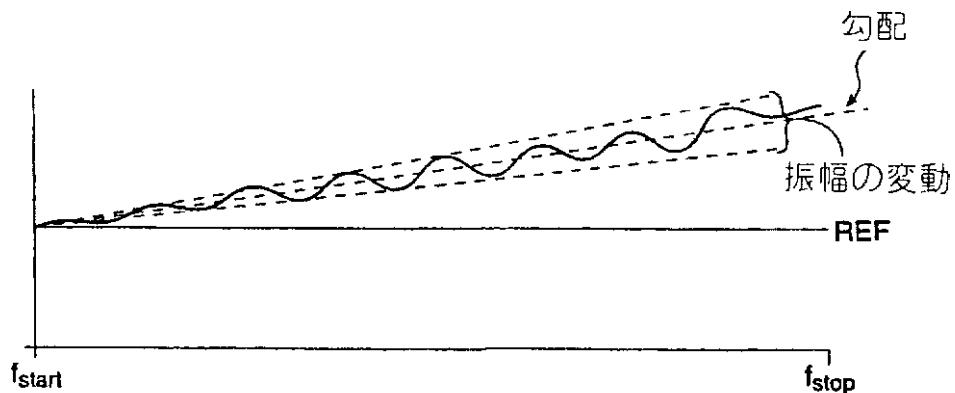


FIG. 5C

【図6】

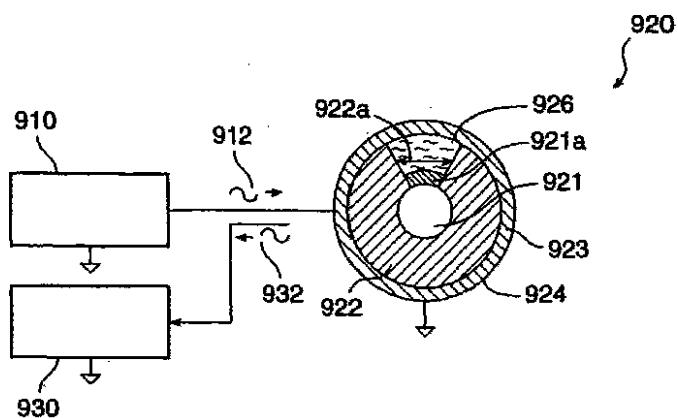


FIG. 6

【図7】

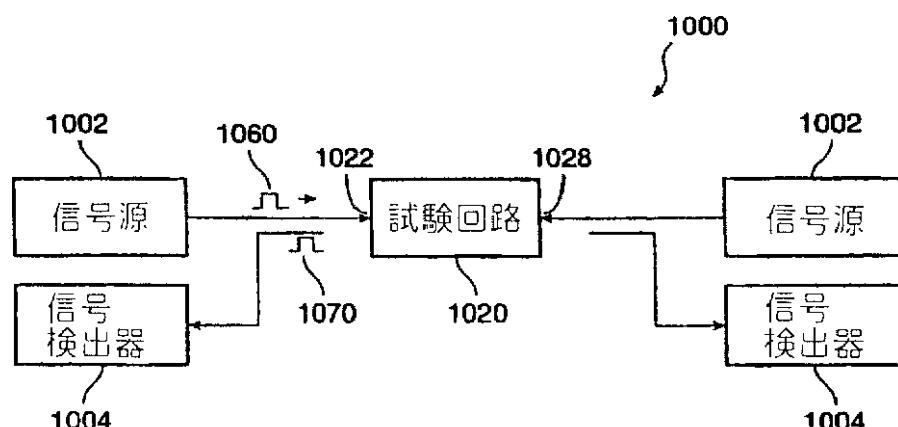
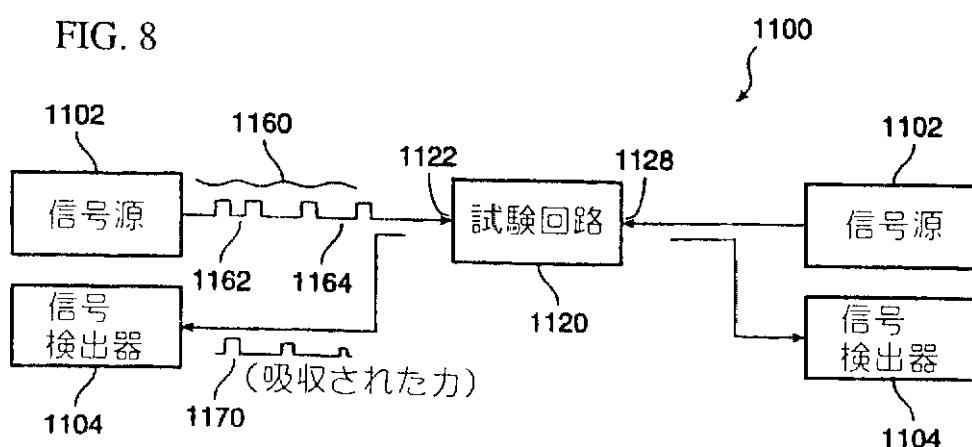


FIG. 7

【図8】

FIG. 8



【図9A】

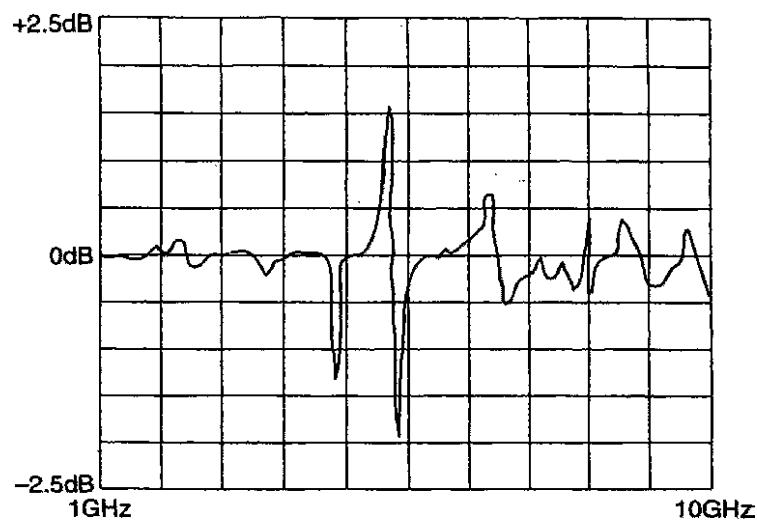


FIG. 9A

【図9B】

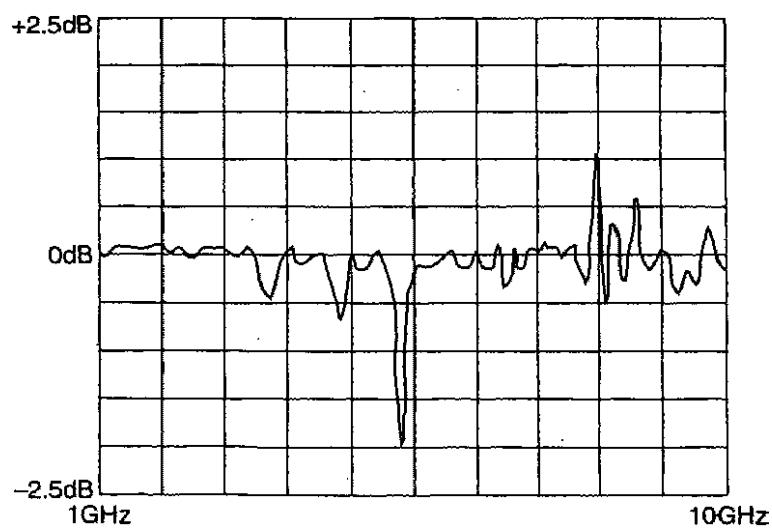


FIG. 9B

【図9C】

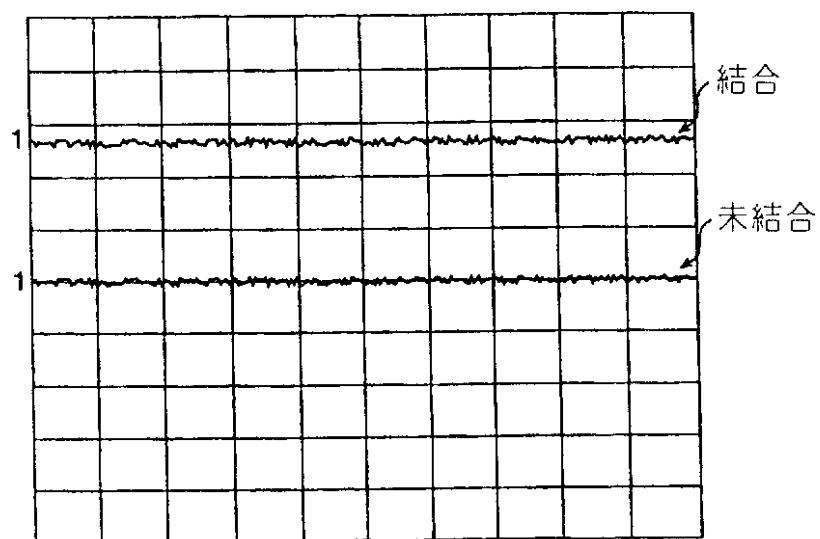


FIG. 9C

【図9D】

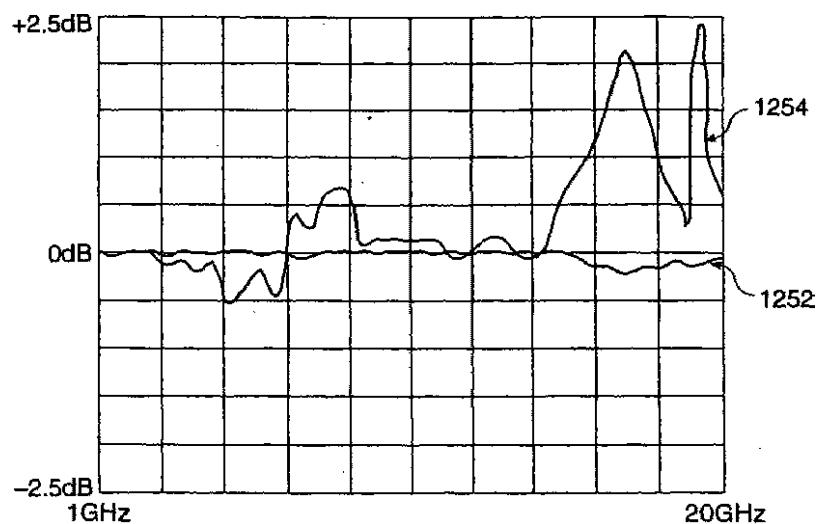
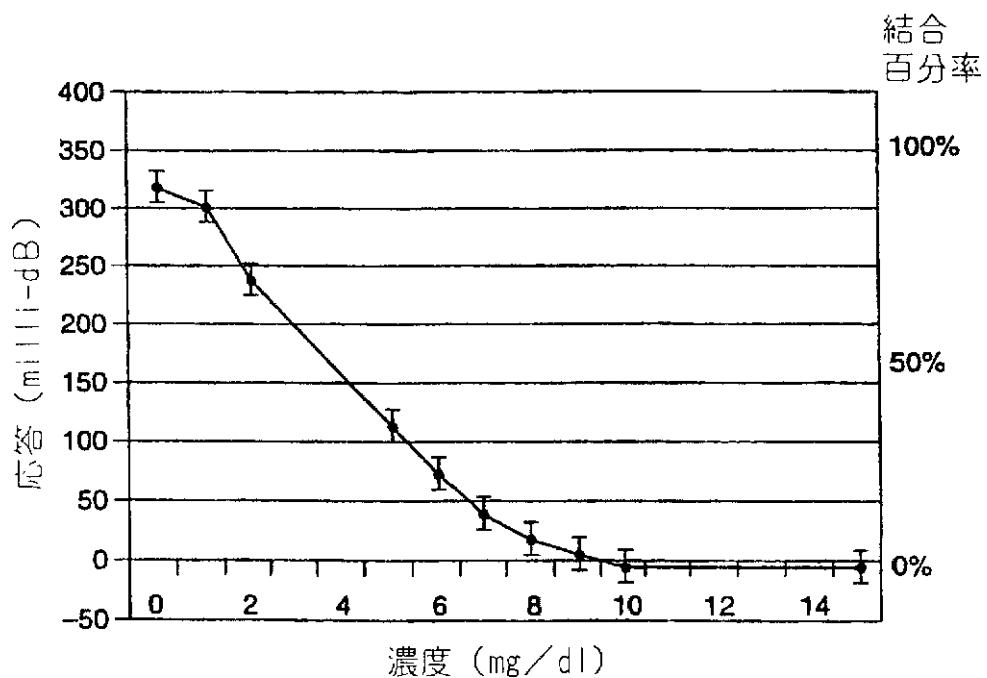


FIG. 9D

【図9E】

FIG. 9E



【図9F】

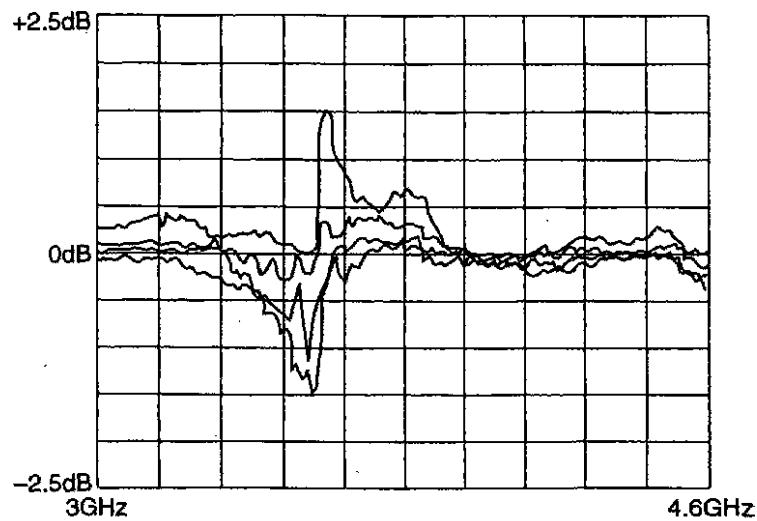


FIG. 9F

【図9G】

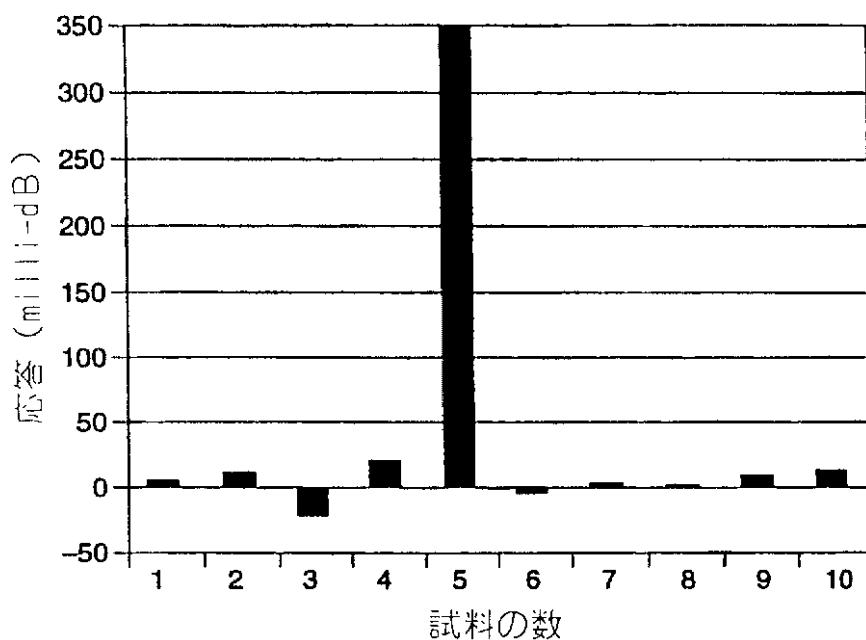


FIG. 9G

【図10A】

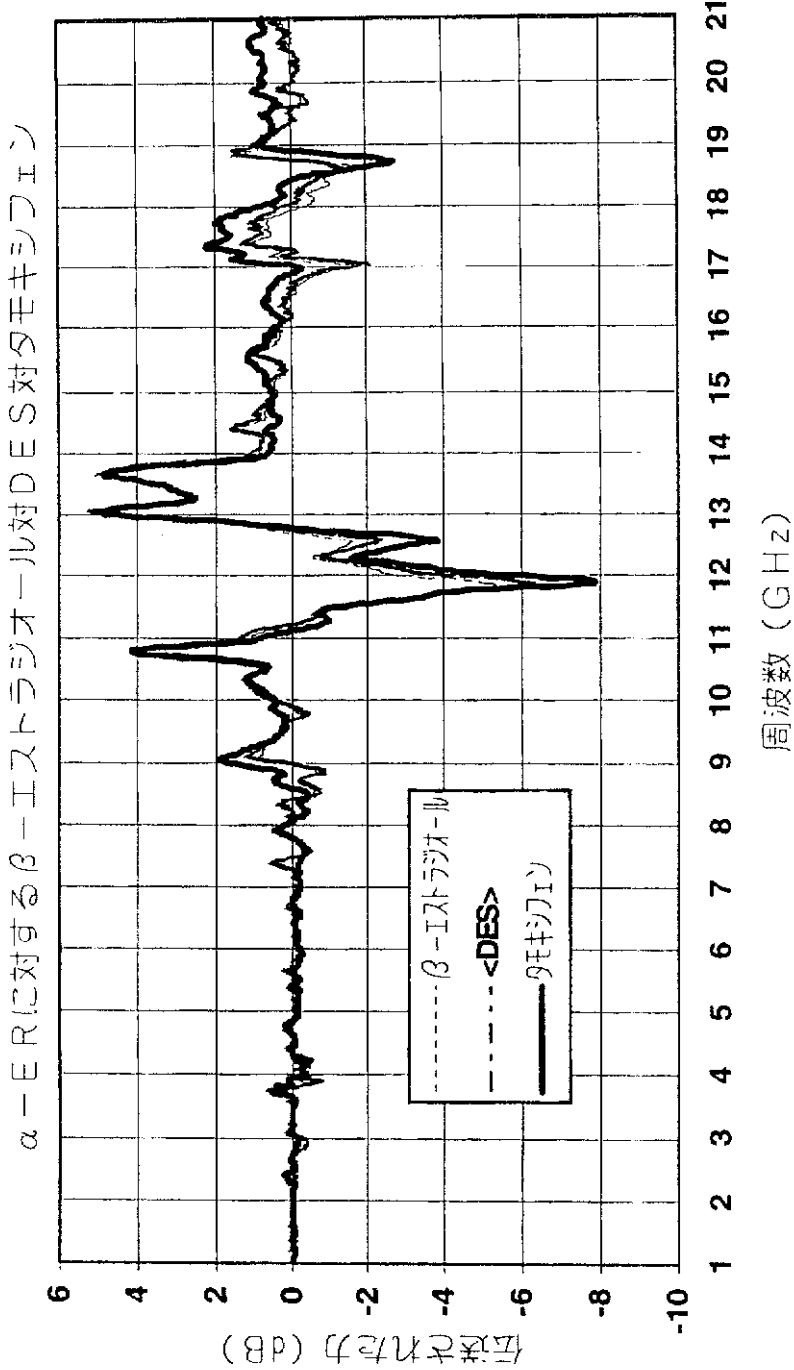


FIG. 10A

【図10B】

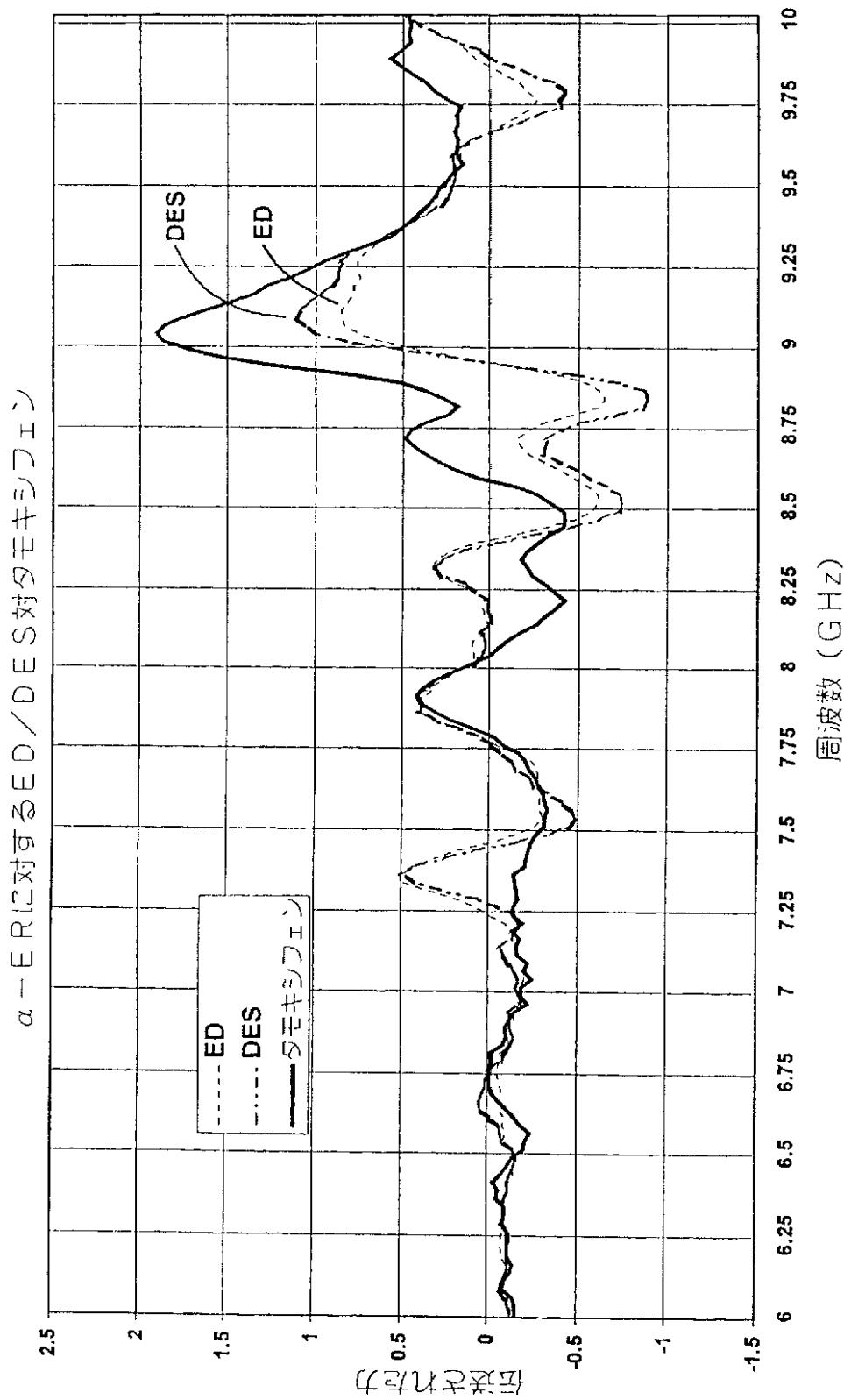


FIG. 10B

【図11】

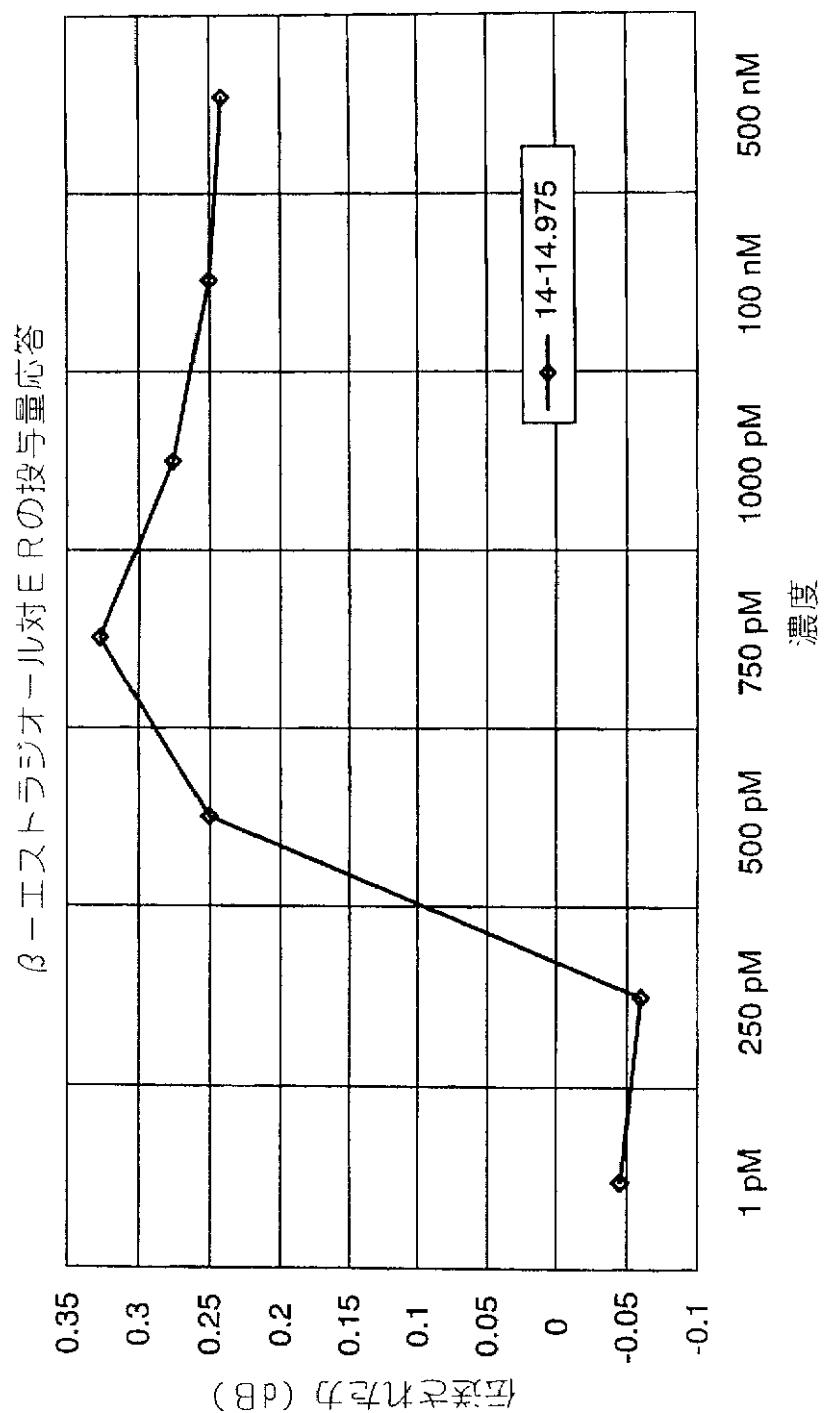


FIG. 11

【図12】

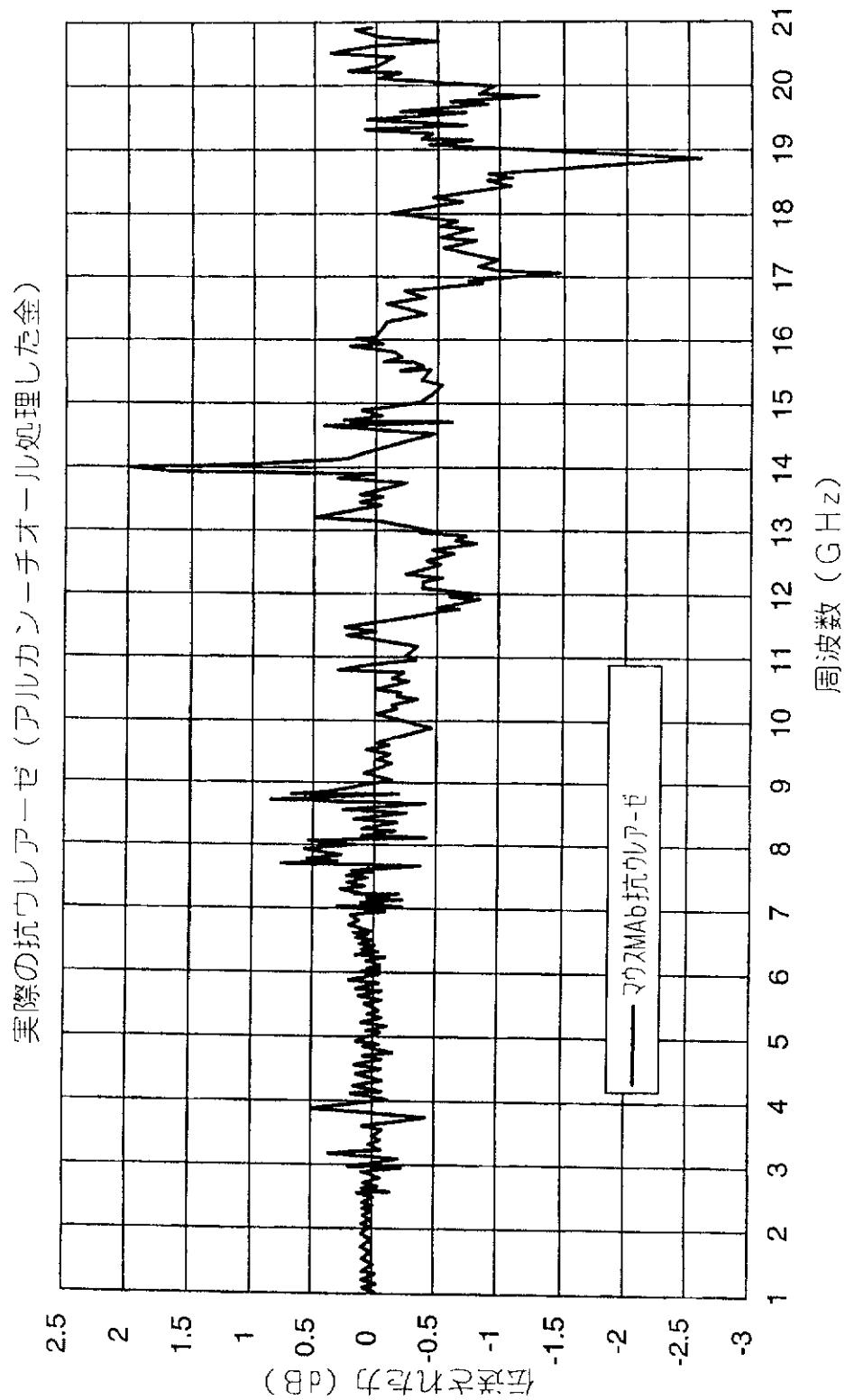
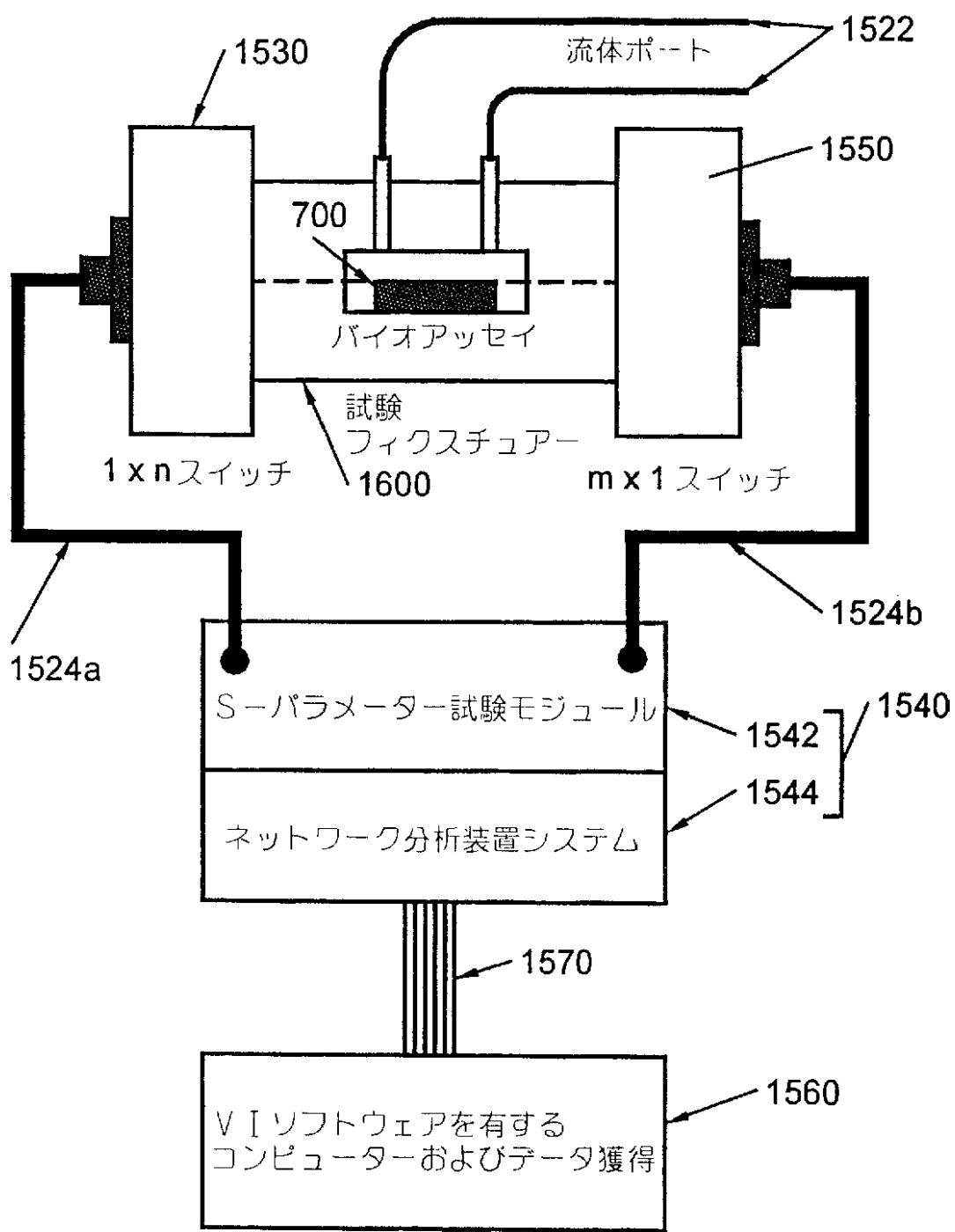


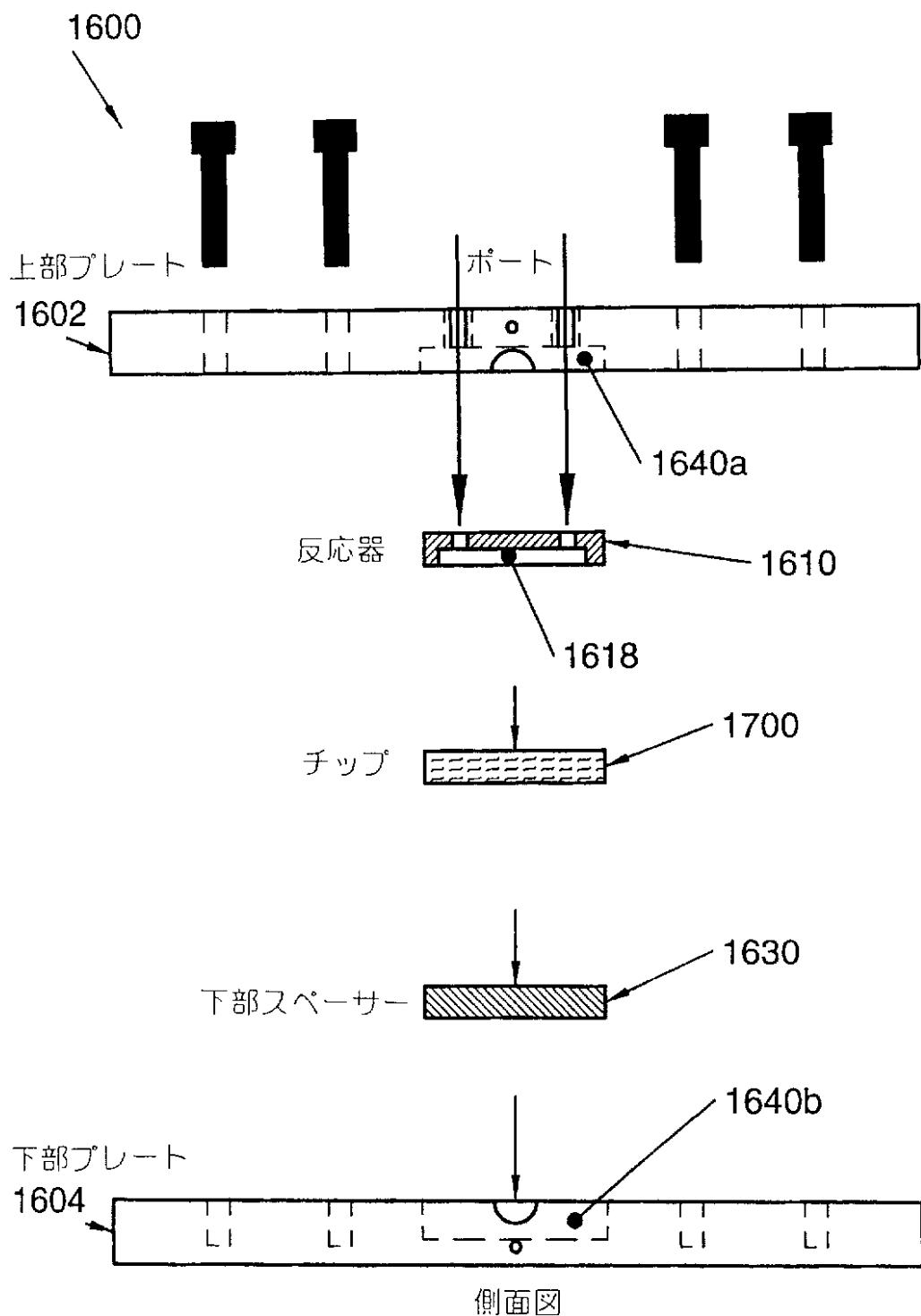
FIG. 12

【図13】

アレイ試験システム

**FIG. 13**

【図14A】



側面図

FIG. 14A

【図14B】

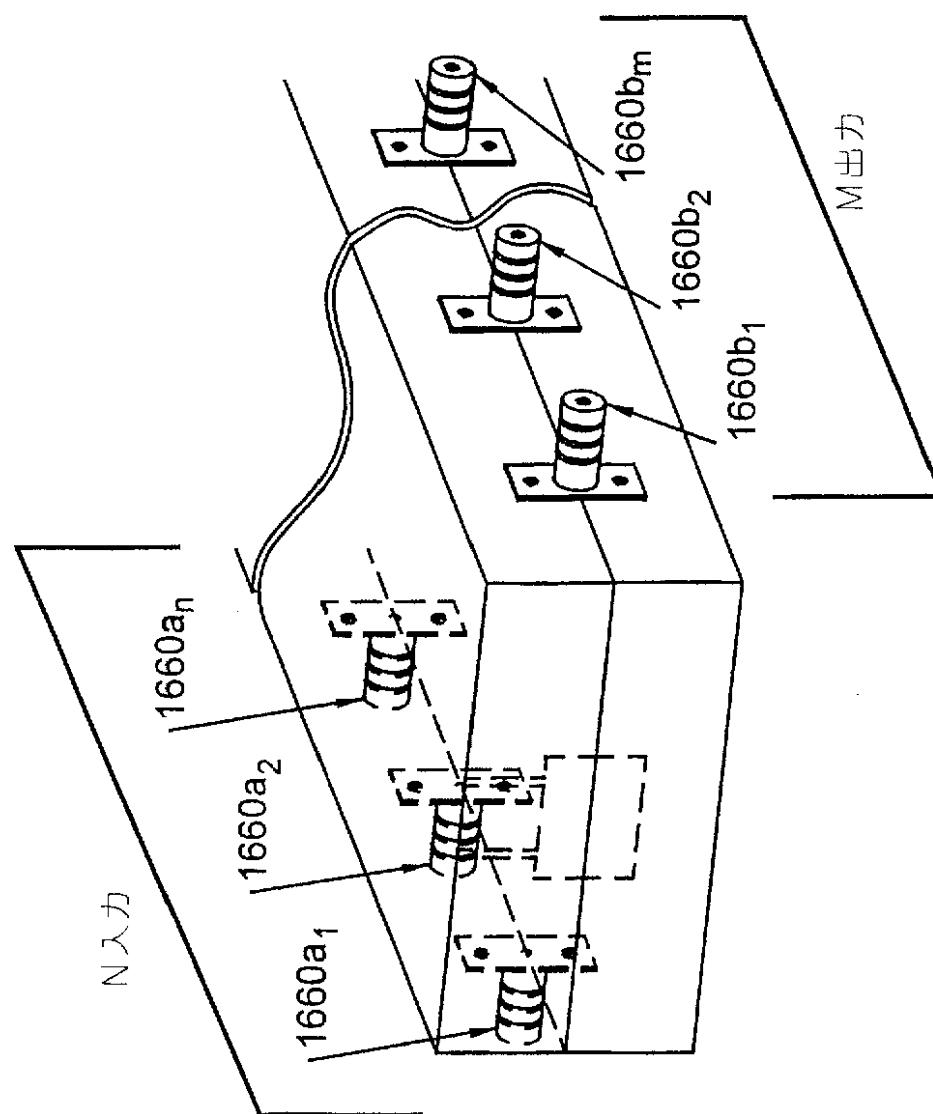


FIG. 14B

【図15A】

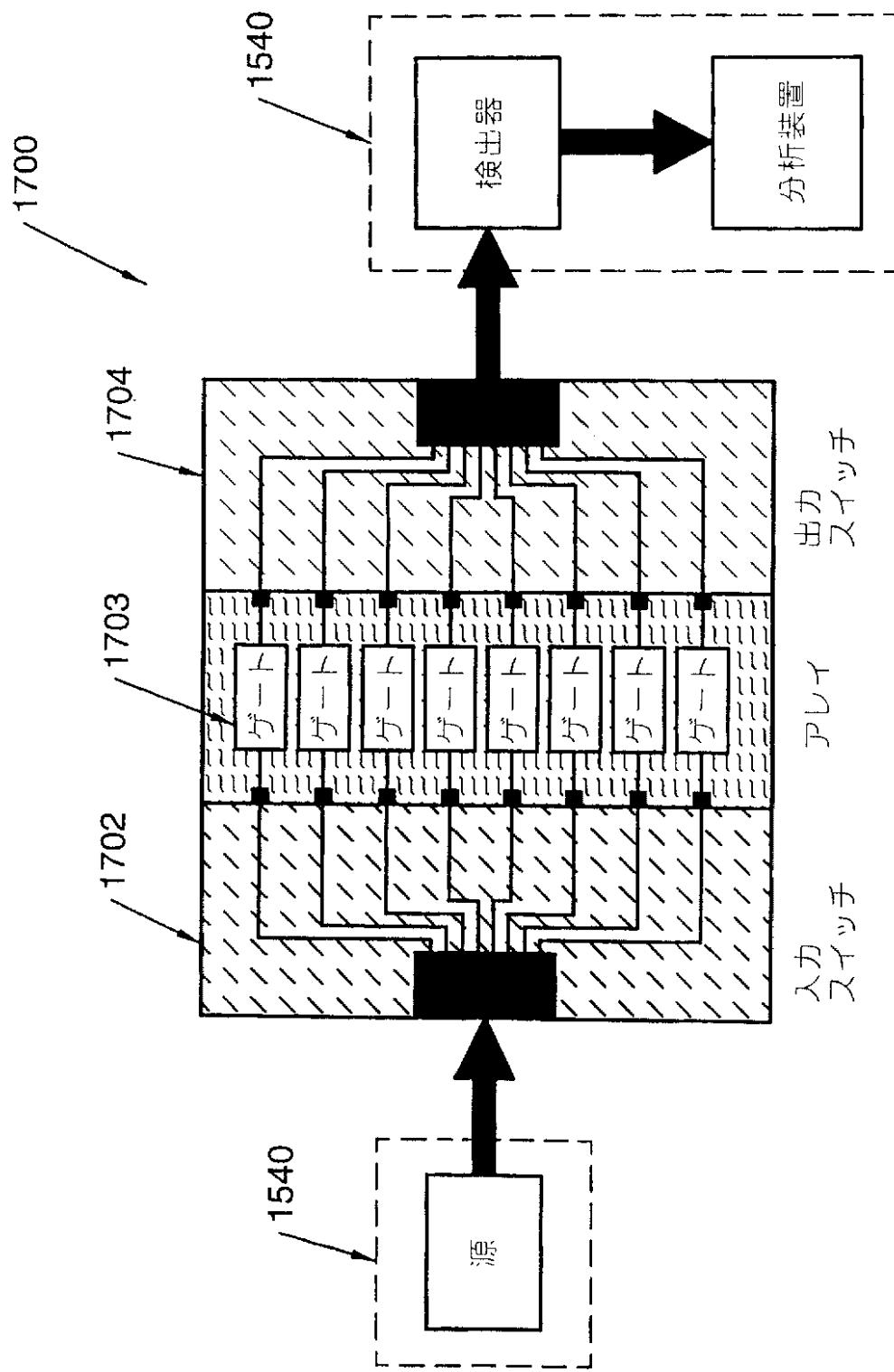


FIG. 15A

【図15B】

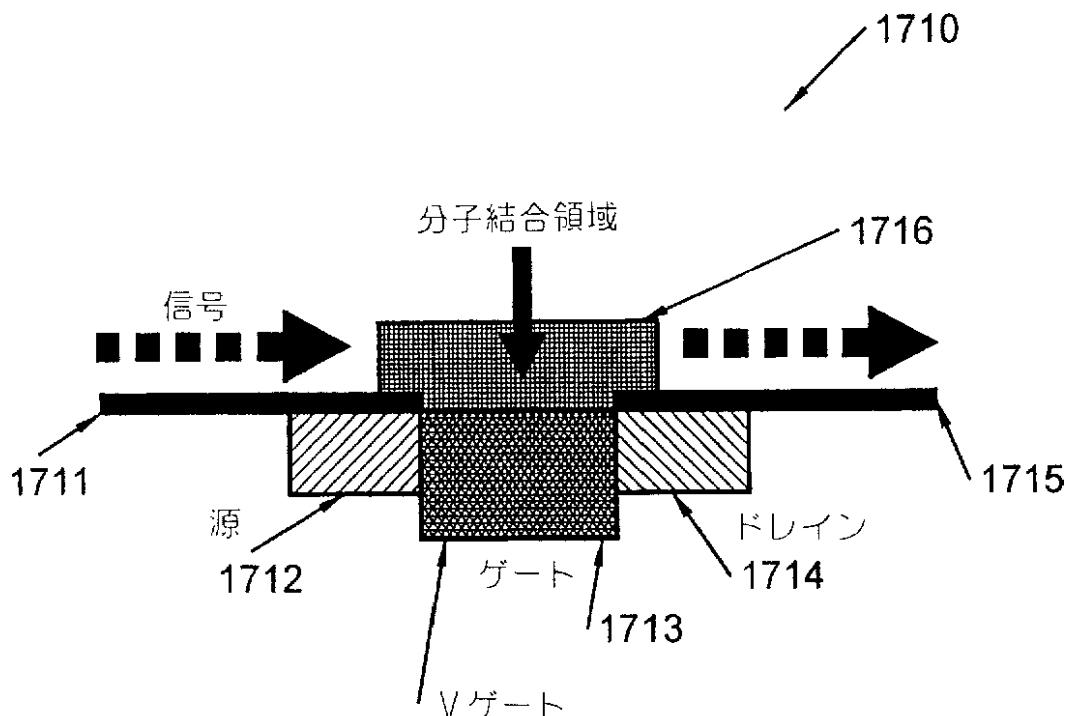


FIG. 15B

【図15C】

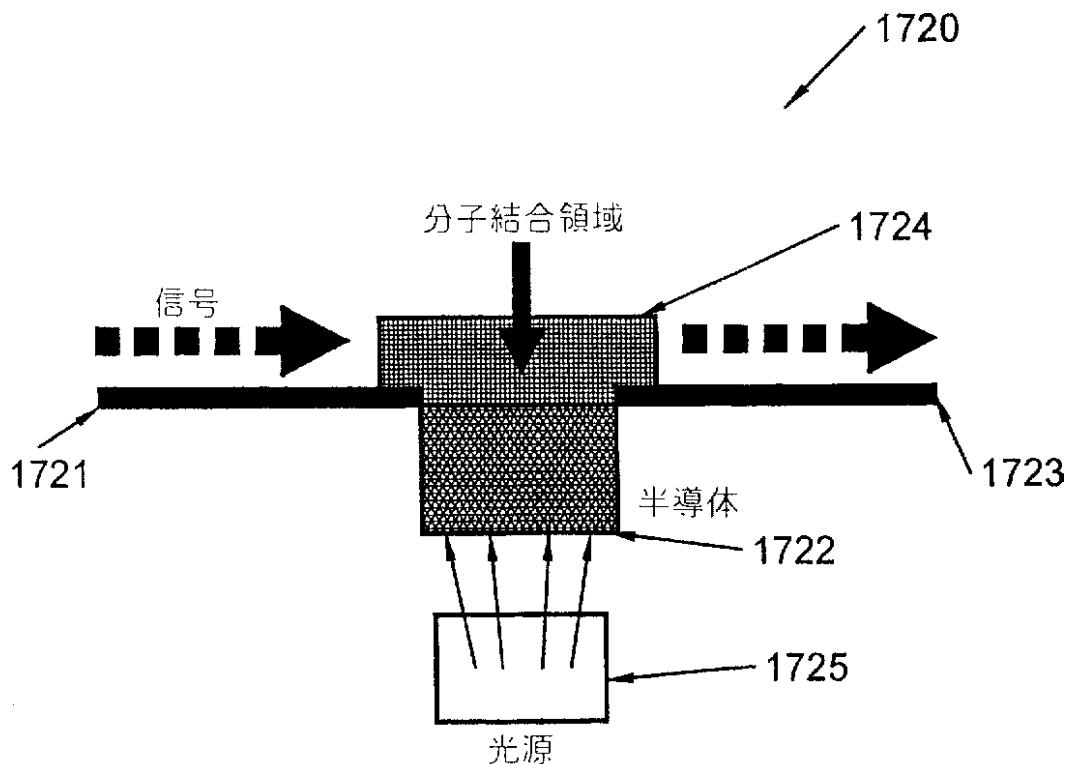
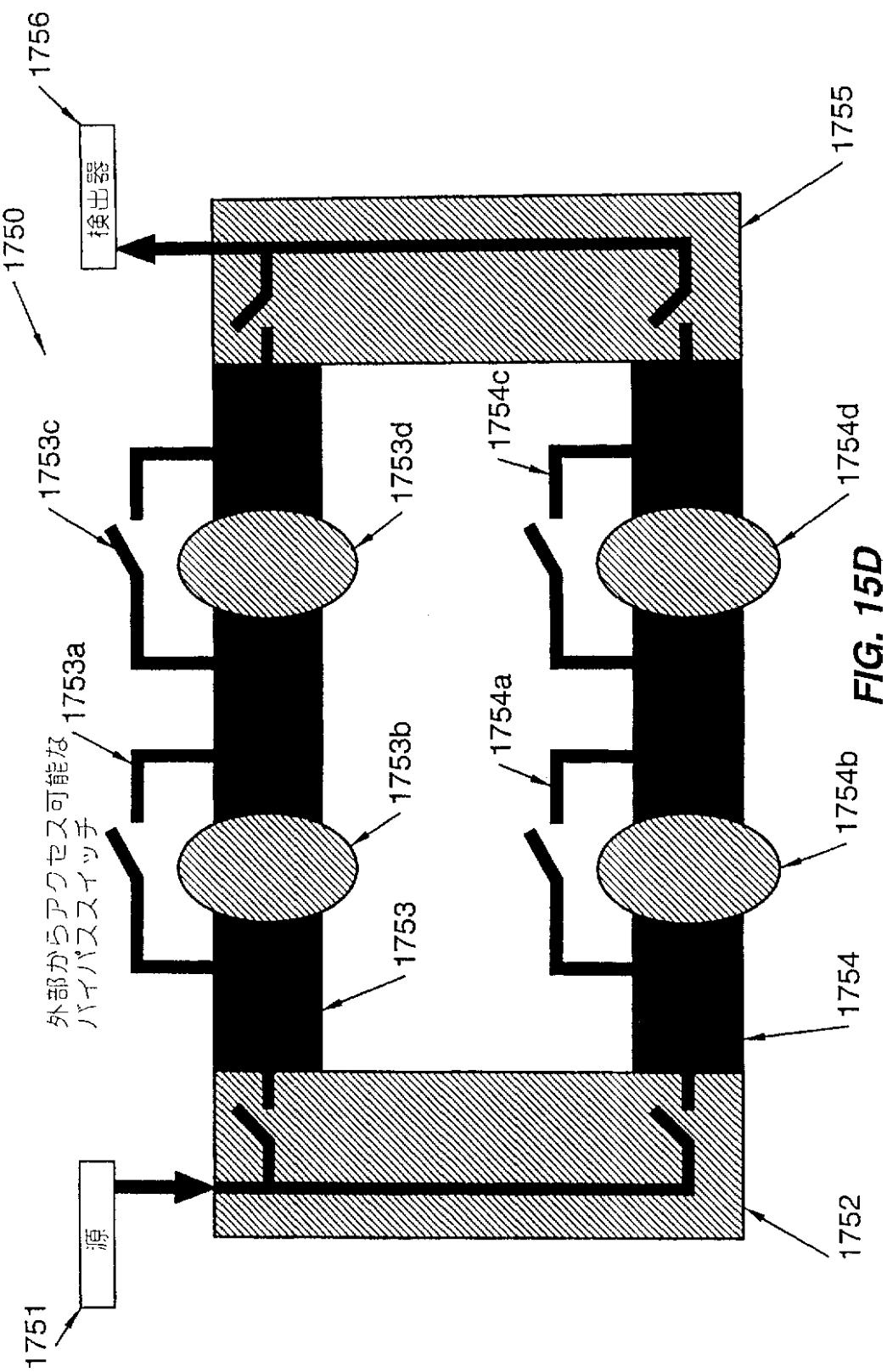


FIG. 15C

【図15D】



【図15E】

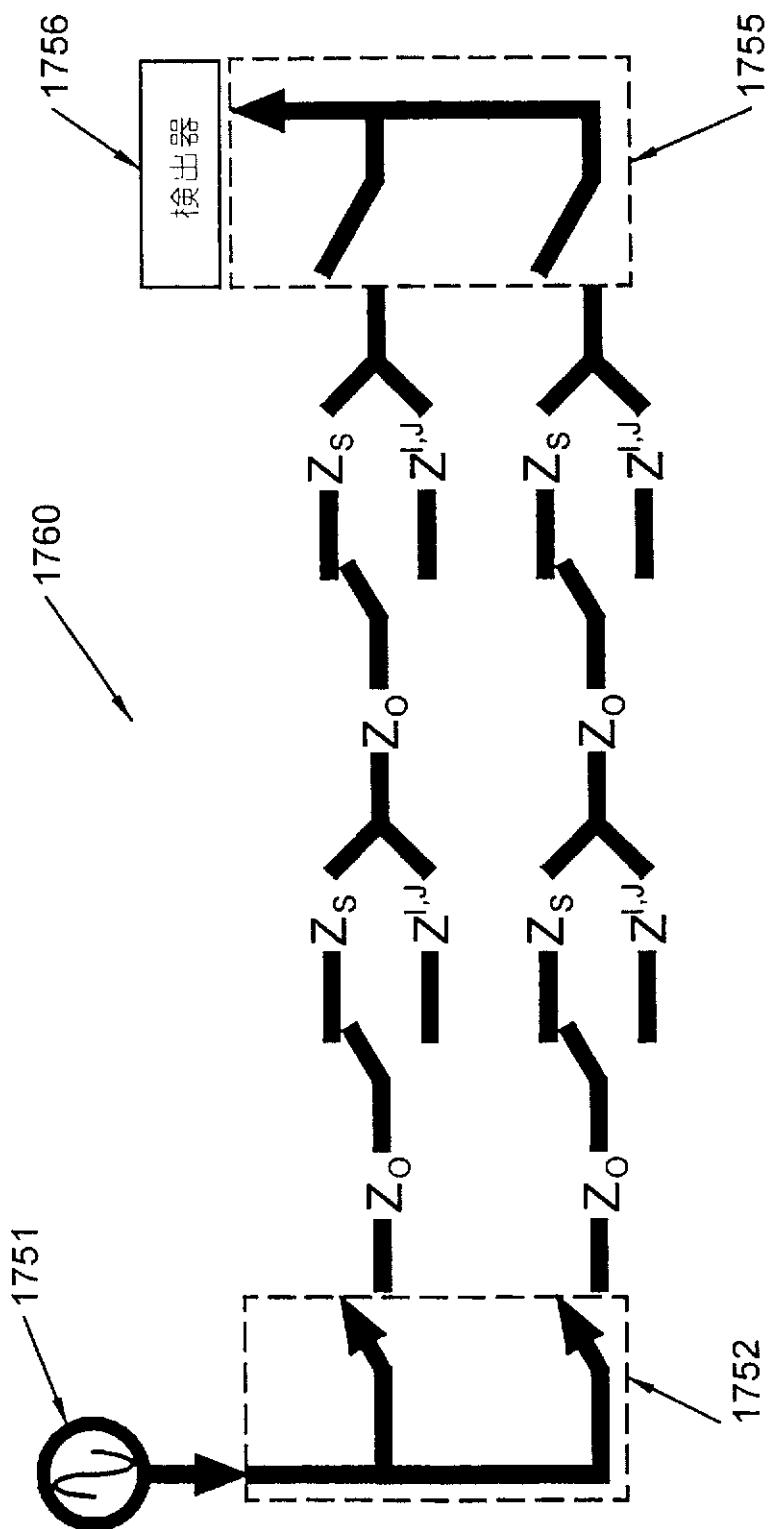


FIG. 15E

【図15F】

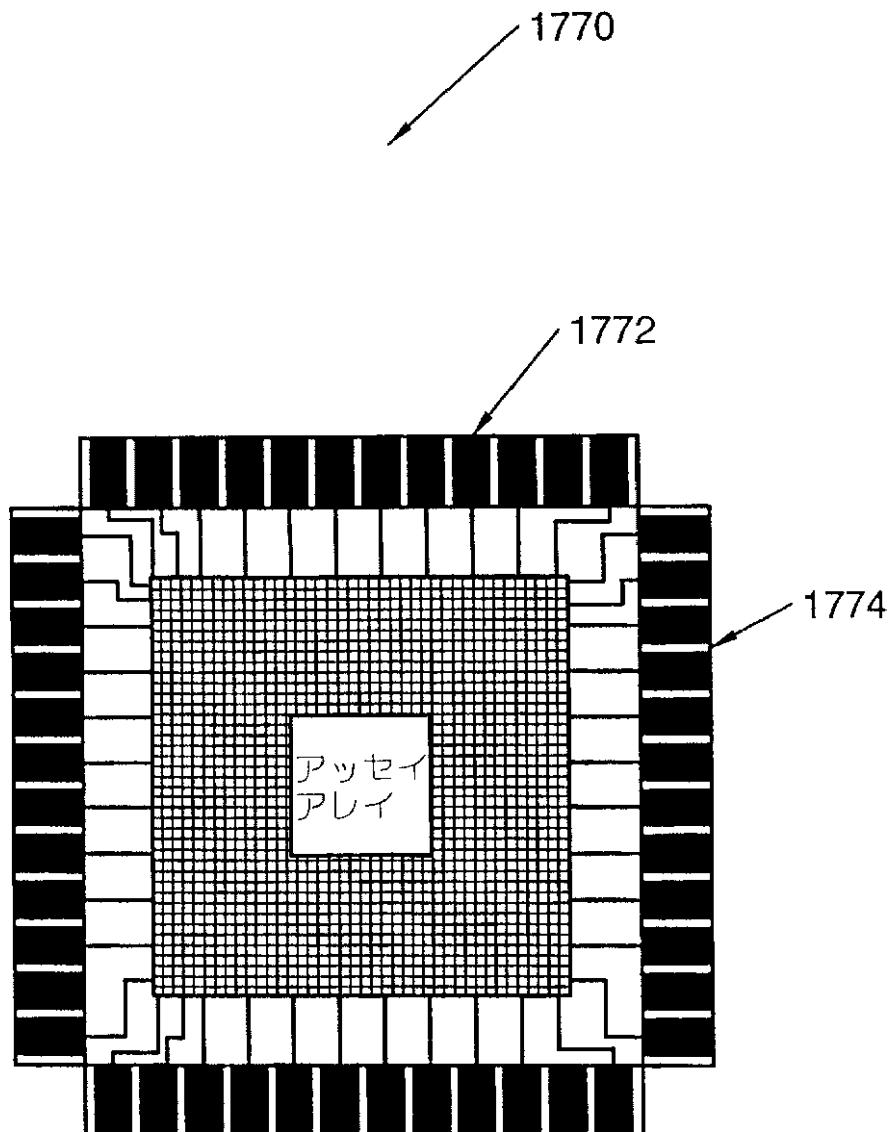


FIG. 15F

【手続補正書】

【提出日】平成14年3月15日(2002.3.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の名称】タンパク質結合事象を分析する方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】工程：

(a) 注目のタンパク質をリガンドと接触させ、ここで前記注目のタンパク質または前記リガンドは信号通路の一部分に電磁的にカップリングされた分子結合領域内に含まれ、ここで前記信号通路は10MHz～1000GHzの範囲の1又は複数の周波数での信号の伝搬を支持するように機能し、且つ伝送ライン、接地素子、当該伝送ラインと接地素子との間に配された誘電層を含んで成り；そして

(b) 前記注目のタンパク質と前記リガンドとの間で形成された結合性複合体を指標する前記10MHz～1000GHzの範囲での1又は複数の周波数での応答信号を検出し、ここで応答信号の検出は前記分子結合領域から未結合のリガンド又はタンパク質を洗浄する前に行われる；

を含んでなる、注目のタンパク質に結合する能力についてリガンドをスクリーニングする方法。

【請求項2】前記リガンドがペプチド、オリゴ糖、核酸、脂質、抗体またはそのフラグメント、ステロイドおよび細胞から成る群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】前記リガンドが化合物のライブラリーである、請求項1に記載の方法。

【請求項4】前記ライブラリーがランダムペプチドのライブラリー、天然産物のライブラリー、レガシー(legacy)のライブラリー、コンビナトリアルライブラリー、オリゴ糖のライブラリーおよびファージディスプレイのライブラリ

ーから成る群から選択される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記注目のタンパク質がレセプター、抗体またはそのフラグメント、酵素、および核酸結合性タンパク質から成る群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 前記検出工程が、

(a) 前記接触工程前に前記伝送ラインに沿って対照信号を伝搬させて基底信号を獲得し；

(b) 前記接触工程後に前記伝送ラインに沿って試験信号を伝搬させて前記応答信号を獲得し；そして

(c) 前記応答信号を前記基底信号と比較する；
を含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記注目のタンパク質または前記リガンドを前記伝送ラインの前記一部分に直接結合させる、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 前記対照信号および前記試験信号がマイクロ波である、請求項6に記載の方法。

【請求項9】 前記注目のタンパク質および前記リガンドが非標識である、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 工程：

(a) 注目のタンパク質をリガンドと接触させ、ここで前記注目のタンパク質または前記リガンドは信号通路の一部分に電磁的にカップリングされた分子結合領域内に含まれ；

(b) 前記信号通路に沿って試験信号を伝搬させ、ここで前記信号通路は10MHz～1000GHzの範囲の1又は複数の周波数での信号の伝搬を支持するように機能し、且つ伝送ライン、接地素子、当該伝送ラインと接地素子との間に配された誘電層を含んで成り、ここで前記信号通路は前記分子結合領域に対して非直角であり；そして

(c) タンパク質／リガンド複合体の形成を指標する前記10MHz～1000GHzの範囲での1又は複数の周波数での応答信号を検出し、ここで応答信号の検出は前記分子結合領域から未結合のリガンド又はタンパク質を洗浄する前に行われる；

を含んでなる、注目のタンパク質と結合する能力についてリガンドをスクリーニングする方法。

【請求項11】 信号通路に沿って試験信号を伝搬させ、ここで前記信号通路は10MHz～1000GHzの範囲の1又は複数の周波数での信号の伝搬を支持するよう機能し、且つ伝送ライン、接地素子、当該伝送ラインと接地素子との間に配された誘電層を含んで成りそしてタンパク質／リガンド複合体の形成を指標する前記10MHz～1000GHzの範囲での1又は複数の周波数での応答信号を検出することによってタンパク質と試験リガンドとの間で形成されたタンパク質／リガンド複合体のスペクトルを獲得することを含んでなり、ここで前記タンパク質または前記試験リガンドは前記信号通路の一部分に電磁的にカップリングされた分子結合領域内に含まれ、ここで前記伝搬工程は前記試験信号を経時的に変化させることを含んで成り、そしてここで応答信号の検出は前記分子結合領域から未結合のリガンド又はタンパク質を洗浄する前に行われる、タンパク質の結合を分析する方法。

【請求項12】 前記タンパク質が既知タンパク質である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記既知タンパク質と特定リガンドとの間で形成された既知タンパク質／リガンド複合体特有の既知信号の存在について前記スペクトルを検査することをさらに含み、前記スペクトル中の前記既知信号の存在は前記試験リガンドが前記特定リガンドであることを示す、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 前記既知タンパク質上の特定部位における既知リガンドの結合特有の既知信号の存在について前記スペクトルを検査することをさらに含み、前記スペクトル中の前記既知信号の存在は前記特定部位における前記試験リガンドの結合を示す、請求項12に記載の方法。

【請求項15】 前記既知タンパク質が酵素であり、そして前記特定部位が活性部位およびアロステリック部位から成る群から選択される、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記タンパク質がレセプターであり、前記既知リガンドが前記レセプターの天然リガンドであり、そして前記特定部位が前記天然リガンド

の結合部位である、請求項14に記載の方法。

【請求項17】 前記タンパク質が抗体またはそのフラグメントであり、前記既知リガンドが天然抗原であり、そして前記特定部位が前記天然抗原の抗原結合部位である、請求項14に記載の方法。

【請求項18】 前記既知タンパク質に対する特定クラスのリガンドの結合特有の既知信号の存在について前記スペクトルを検査することをさらに含み、前記スペクトル中の前記既知信号の存在は前記試験リガンドが前記特定クラスのメンバーであることを示す、請求項12に記載の方法。

【請求項19】 前記既知タンパク質がレセプターであり、そして前記特定クラスのリガンドがアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 前記既知タンパク質が酵素であり、そして前記特定クラスのリガンドが競合インヒビターまたはアロステリックエフェクターである、請求項18に記載の方法。

【請求項21】 前記試験信号がマイクロ波である、請求項11に記載の方法
。

【請求項22】 前記タンパク質および前記試験リガンドが非標識である、請求項11に記載の方法。

【請求項23】 前記信号通路が伝送ラインであり、そして前記タンパク質または前記試験リガンドが前記伝送ラインに直接結合されている、請求項11に記載の方法。

【請求項24】 前記信号通路が前記分子結合領域に対して非直角である、請求項11に記載の方法。

【請求項25】 工程：

(a) 既知タンパク質と特異的に結合する特定リガンドを潜在的に含有する試料と、既知タンパク質を接触させ、前記既知タンパク質は信号通路の一部分に電磁的にカップリングした分子結合領域内に含まれ、ここで前記信号通路は10MHz～1000GHzの範囲の1又は複数の周波数での信号の伝搬を支持するように機能し、且つ伝送ライン、接地素子、当該伝送ラインと接地素子との間に配された誘電

層を含んで成り；

(b) 十分な時間を経過させて、前記既知タンパク質および、前記試料の中に存在する場合、前記特定リガンドが結合性複合体を形成するようにさせ；そして

(c) 前記結合性複合体の形成を指標する前記10MHz～1000GHzの範囲での1又は複数の周波数での応答信号を検出し、前記応答信号は前記試料中の前記特定リガンドの存在を示し、ここで応答信号の検出は前記分子結合領域から未結合のリガンド又はタンパク質を洗浄する前に行われる；

を含んでなる分析法。

【請求項26】 前記既知タンパク質が抗体またはそのフラグメント、レセプター、酵素、および核酸結合性タンパク質から成る群から選択される、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 前記試料が血液、尿、精液、痰、および組織ホモジネートから成る群から選択される、請求項25に記載の方法。

【請求項28】 前記特定リガンドが腫瘍マーカー、薬剤または薬剤代謝物質、ホルモン、オリゴ糖および脂質から成る群から選択される、請求項25に記載の方法。

【請求項29】 前記既知タンパク質が前記連続伝送ライン直接結合されている、請求項28に記載の方法。

【請求項30】 工程：

(a) 既知リガンドと特異的に結合する特定タンパク質を潜在的に含有する試料と、既知リガンドを接触させ、前記既知リガンドは信号通路の一部分に電磁的にカップリングした分子結合領域内に含まれ、ここで前記信号通路は10MHz～1000GHzの範囲の1又は複数の周波数での信号の伝搬を支持するように機能し、且つ伝送ライン、接地素子、当該伝送ラインと接地素子との間に配された誘電層を含んで成り；

(b) 十分な時間を経過させて、前記既知リガンドおよび、前記試料の中に存在する場合、前記特定タンパク質が結合性複合体を形成するようにさせ；そして

(c) 前記結合性複合体の形成を指標する前記10MHz～1000GHzの範囲での1又は複数の周波数での応答信号を検出し、前記応答信号は前記試料中の前記特定タンパク質の存在を示し、ここで応答信号の検出は前記分子結合領域から未結合のリガンド又はタンパク質を洗浄する前に行われる；
を含んでなる分析法。

【請求項31】 工程：

(a) 既知タンパク質と結合性複合体を形成する特定リガンドを潜在的に含有する試料と、既知タンパク質を接触させ、前記既知タンパク質は信号通路の一部分に電磁的にカップリングした分子結合領域内に含まれ、ここで前記信号通路は10MHz～1000GHzの範囲の1又は複数の周波数での信号の伝搬を支持するように機能し、且つ伝送ライン、接地素子、当該伝送ラインと接地素子との間に配された誘電層を含んで成り；

(b) 前記信号通路に沿って前記10MHz～1000GHzの範囲での1又は複数の周波数での試験信号を伝搬させ、そして前記結合性複合体の形成の指標となる前記10MHz～1000GHzの範囲での1又は複数の周波数での応答信号を検出することによつて試験スペクトルを獲得し、ここで試験信号の伝搬は前記試験信号を経時的に変化させることを含んで成り、そしてここで応答信号の検出は前記分子結合領域から未結合のリガンド又はタンパク質を洗浄する前に行われる；そして

(c) 前記結合性複合体特有の既知信号の存在について前記試験スペクトルを検査し、前記既知信号の存在は前記試料中の前記特定リガンドの存在を示す；
を含んでなる分析法。

【請求項32】 前記既知タンパク質が抗体またはそのフラグメント、レセプター、酵素および核酸結合性タンパク質から成る群から選択される、請求項31に記載の方法。

【請求項33】 前記試料が血液、尿、精液、痰、および組織ホモジネートから成る群から選択される、請求項31に記載の方法。

【請求項34】 前記特定リガンドが腫瘍マーカー、薬剤または薬剤代謝物質、ホルモン、オリゴ糖および脂質から成る群から選択される、請求項31に記載の方法。

【請求項35】 前記既知タンパク質が前記連続伝送ライン直接結合されている、請求項31に記載の方法。

【請求項36】 前記信号通路が前記分子結合領域に対して非直角である、請求項31に記載の方法。

【請求項37】 工程：

(a) 複数の部位を含んでなるアレイとリガンドを含有する試料とを接触させ、各部位は中に配された信号通路の一部分に電磁的にカップリングした分子結合領域内に含まれている複数の既知タンパク質とを含んでなり、前記信号通路は10MHz～1000GHzの範囲の1又は複数の周波数での信号の伝搬を支持するように機能し、且つ伝送ライン、接地素子、当該伝送ラインと接地素子との間に配された誘電層を含んで成り；そして

(b) タンパク質／リガンド複合体が形成されている部位のタンパク質／リガンド複合体の形成を指標する前記10MHz～1000GHzの範囲での1又は複数の周波数での応答信号を検出し、ここで応答信号の検出は前記分子結合領域から未結合のリガンド又はタンパク質を洗浄する前に行われる；
を含んでなる、注目のタンパク質に結合する能力を有するものについてリガンドをスクリーニングする方法。

【請求項38】 前記複数の部位が同一タンパク質を含有する、請求項37に記載の方法。

【請求項39】 前記複数の部位の各々が異なるタンパク質を含有する、請求項37に記載の方法。

【請求項40】 前記試料が複数の試料であり、そして前記接触工程が各部位を前記複数の試料のうちのいずれか1つと接触させることを含んでなる、請求項37に記載の方法。

【請求項41】 前記試料がリガンドのライブラリーを含んでなる、請求項37に記載の方法。

【請求項42】 前記リガンドおよび前記複数のタンパク質が非標識である、請求項37に記載の方法。

【請求項43】 前記複数のタンパク質が前記部位の各々とともに位置する

前記連続的伝送ラインに直接結合されている、請求項37に記載の方法。

【請求項44】 工程：

(a) 複数の部位を含んでなるアレイと既知タンパク質を含有する試料とを接触させ、各部位は中に配された信号通路の一部分に電磁的にカップリングした分子結合領域内に含まれている複数の異なるリガンドとを含んでなり、前記信号通路は10MHz～1000GHzの範囲の1又は複数の周波数での信号の伝搬を支持するよう機能し、且つ伝送ライン、接地素子、当該伝送ラインと接地素子との間に配された誘電層を含んで成り；そして

(b) タンパク質／リガンド複合体が形成されている部位のタンパク質／リガンド複合体の形成を指標する応答信号を検出し、ここで応答信号の検出は前記分子結合領域から未結合のリガンド又はタンパク質を洗浄する前に行われる；を含んでなる、注目のタンパク質に結合する能力を有するものについてリガンドをスクリーニングする方法。

【請求項45】 工程：

(a) 複数の部位を含んでなるアレイとリガンドを含有する試料とを接触させ、各部位は信号通路と、中に配された信号通路の一部分に電磁的にカップリングした複数のタンパク質とを含んでなり、前記信号通路は10MHz～1000GHzの範囲の1又は複数の周波数での信号の伝搬を支持するよう機能し、且つ伝送ライン、接地素子、当該伝送ラインと接地素子との間に配された誘電層を含んで成り；

(b) 信号通路に沿って前記複数の素子の各々に前記10MHz～1000GHzの範囲での1又は複数の周波数での試験信号を伝搬させ、ここで前記信号通路は前記分子結合領域に対して非直角であり；そして

(c) タンパク質／リガンド複合体が形成されている部位のタンパク質／リガンド複合体の形成を指標する前記10MHz～1000GHzの範囲での1又は複数の周波数での応答信号を検出し、ここで応答信号の検出は前記分子結合領域から未結合のリガンド又はタンパク質を洗浄する前に行われる；を含んでなる、注目のタンパク質に結合する能力を有するものについてリガンドをスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】**発明の分野**

本発明は、概括的に言えば、タンパク質と種々のタイプのリガンドとの間の結合相互作用を検出する方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、注目のタンパク質ターゲットに対して特異的アフィニティーを有するものについてリガンドの大コレクションをスクリーニングする方法に関する。それ自体、本発明は、基本的生物医学的および生化学的研究、特に薬剤の発見および医学的診断の分野において有効である。

【0002】**発明の背景**

タンパク質は、生物学的プロセスおよび機能、例えば、触媒、生化学的経路のレギュレーター、レセプター、および免疫応答における重要な素子としての機能において種々の主要な役割を演ずる。タンパク質の多様なかつ重要な役割を考えると、タンパク質に結合するリガンドは薬学的研究者らにより治療剤の候補として見られてきていることは驚くべきことではない。薬剤発見の1つの伝統的アプローチは単に天然レギュレーターを修飾することを含む。構造機能の関係に関してより多くのデータが入手可能となるにつれて、例えば、酵素の活性部位に適合させるように調整した分子の合成を促進するためにコンピューターおよびX線構造を使用して、合理的薬剤を設計することが可能となった。しかしながら、このような進歩した技術を使用してさえ、薬剤のスクリーニングおよび開発はしばしば退屈な時間のかかるプロセスのままであった。

【0003】

より最近の薬剤発見法は異なるアプローチを取り、化合物の極めて大きいライブラリーを注目のタンパク質ターゲットに結合する能力についてスクリーニングすることを含む。このタイプのアプローチは典型的には潜在的タンパク質ターゲット、例えば、レセプターを同定することから開始される。次いでターゲットに結合する能力についてスクリーニングすべきリガンドを含有する、多様なライブラリーを調製する。ライブラリーはランダムペプチドライブラリー、炭水化物ライブラリー、天然産物ライブラリー、およびその他であることができる。しばし

ばライブラリーは最近開発されたコンビナトリアル技術を使用して調製される。引き続いてこれらのライブラリーをハイスループットスクリーニングにかけて、ターゲットに結合するリガンドを同定する。このアプローチの主要な特徴は莫大な数の分子をスクリーニングすることであるので、このアプローチの成功はターゲットに結合するリガンドをすばやくスクリーニングし、同定することにある。ターゲットであると最初に同定されたリガンドを次いで使用して、いっそう収束されたライブラリーを作り、次いでこれを同一スクリーニングプロセスにかける。新しい収束されたライブラリーをスクリーニングし、調製するこのプロセスは、典型的には、先導化合物の比較的小さい集団が同定されるまで、数回反復される。次いでこれらの先導化合物を種々の薬学的分析にかけて、有用な薬剤候補を選択する。

【0004】

現在の方法の主要な制限はスクリーニング試験により結合を単に検出することであるが、特異的結合と非特異的結合とを区別することができないことである。また、いくつかのアプローチはハイスループットのスクリーニング手順と完全には適合性ではない。そのうえ、多数の現在の方法はターゲットまたはリガンドのいずれかの標識化を必要とし、結合性複合体を直接検出することができない。

【0005】

本発明は、タンパク質／リガンド複合体の形成を直接検出することができる、タンパク質結合事象を分析する新規な方法を提供する。このシステムを使用すると、特異的結合相互作用に基づいてライブラリーをスクリーニングすることが可能である。また、本発明のシステムを使用して種々の分析的および診断的分析を実行することが可能である。

【0006】

発明の要約

本発明は、一般に、分子および結合性複合体、例えば、タンパク質／リガンド複合体の誘電性に対して感受性であるシステムを利用して、タンパク質と種々の異なるタイプのリガンドとの間の結合事象を検出する方法を提供する。他の方法は、リガンドのライブラリーをスクリーニングして、注目のタンパク質に結合す

るリガンドを同定することを含み、このような方法は、例えば、薬剤スクリーニングプログラムにおいて特定の実用性を有する。他の方法は診断方法であり、この方法において、既知タンパク質に結合する特定リガンドの存在、または既知リガンドに結合する特定タンパク質の存在を検出するために、このシステムを使用する。スクリーニングおよび診断法は、複数の素子を有するアレイを使用して実行することができる。

【0007】

さらに詳しくは、いくつかの方法はタンパク質／リガンド複合体のスペクトルを得ることを含む。このような方法は、タンパク質と試験リガンドとの間で形成されたタンパク質／リガンド複合体についてのスペクトルを獲得することを含む。試験信号を信号通路に沿って伝搬させ、タンパク質／リガンド複合体についての応答信号を検出することによってスペクトルを獲得し、ここでタンパク質または被験リガンドは信号通路の一部分に電磁的にカップリングされる。信号通路に沿って伝搬した試験信号を経時的に変化させてスペクトルを得る。試験信号は、例えば、経時的に周波数または波長を変更することによって、変化させる。

【0008】

ある種の方法は、ターゲットタンパク質または注目のタンパク質に結合する能力についてリガンドをスクリーニングすることを含む。この方法は注目のタンパク質をリガンドと接触させることを含む。タンパク質／リガンド複合体の形成は、複合体から生ずる応答信号の形成により検出される。典型的には、注目のタンパク質または試験リガンドを連続伝送ラインの一部分に電磁的にカップリングさせる。

【0009】

本発明のいくつかのスクリーニング法はいっそう精巧化されており、既知タンパク質と試験リガンドとの間のタンパク質／リガンド複合体についてのスペクトルを獲得することを含み、ここで既知タンパク質または試験リガンドのいずれかを信号通路の一部分に電磁的にカップリングさせる。信号通路に沿って経時的に変化する試験信号を伝搬させ、既知タンパク質と試験リガンドとの間の複合体についての応答信号を検出することによって、スペクトルを獲得する。次いで、既

既知タンパク質上の特定部位における既知リガンドの結合について特徴的である既知信号の存在について、生ずるスペクトルを検査する。スペクトル中の既知信号の存在は、既知リガンドが結合する特定部位における試験リガンドの結合を示す。既知タンパク質が酵素である試験について、特定部位は、例えば、活性部位またはアロステリック部位であることができる。既知タンパク質がレセプターであるとき、特定部位は天然リガンドが結合する部位であることができる。既知抗体を使用して実施した試験のための特定部位は典型的には既知抗原のための抗原結合部位である。

【0010】

関係するスクリーニング法において、既知タンパク質に対するリガンドの特定クラスの結合特有の既知信号の存在についてスペクトルを検査する。こうして、既知タンパク質が酵素である方法について、既知信号は、例えば、競合インヒビターまたはアロステリックインヒビターとの複合体についての信号である。既知タンパク質がレセプターである場合において、既知信号は、例えば、アゴニストまたはアンタゴニストとの複合体についての信号である。

【0011】

本発明は、また、試料中の特定タンパク質またはリガンドの存在を検出する種々の診断法を提供する。それゆえ、いくつかの方法は、連続伝送ラインの一部分に電磁的にカップリングした既知タンパク質と、既知タンパク質に特異的に結合する特定リガンドを潜在的に含有する試料とを接触させることを含む。十分な時間を経過させて、既知タンパク質および、存在する場合、注目の特定リガンドが結合性複合体を形成するようにさせる。結合性複合体についての応答信号の検出は、試料中の特定リガンドの存在を示す。あるいは、既知リガンドは伝送ラインの一部分に電磁的にカップリングさせ、次いで既知リガンドと結合性複合体を形成する特定タンパク質を潜在的に含有する試料と接触させることができる。

【0012】

いっそう精巧なスクリーニング法を用いるとき、ある種の診断法は試料中の特定タンパク質またはリガンドの存在を検出するために特徴的な信号を使用することを含む。さらに詳しくは、このような方法は、信号通路の一部分にカップリン

グした既知タンパク質と、既知タンパク質と結合性複合体を形成する特定リガンドを潜在的に含有する試料とを接触させることを含む。試験信号を信号通路に沿って伝搬させ、結合性複合体についての応答信号を検出することによって、試験スペクトルを獲得し、ここで伝搬工程は経時的に試験信号を変化させることを含む。次いで試験スペクトルを結合性複合体について特徴的である既知信号の存在について検査する；このような信号の存在は試料中の特定リガンドの存在を示す。あるいは、既知タンパク質よりむしろ既知リガンドを信号通路にカップリングさせる。この場合において、これらの方法は、既知リガンドと特定タンパク質との間で形成された結合性複合体について特徴的である信号の存在について、獲得した試験信号を検査することを含み、このような信号の存在は被験試料中の特定タンパク質の存在を示す。

【0013】

なお他の方法は、複数の部位または素子を含有するアレイの使用を含む。各素子は、連続伝送ラインと、素子内に位置する連続伝送ラインの一部分に電磁的にカップリングした既知タンパク質（または複数のタンパク質）とを含む。リガンドを含有する試料と、これらの素子を接触させる。既知タンパク質とリガンドとの間で形成された結合性複合体についての応答信号を検出し、この応答信号はリガンドがタンパク質に結合することができることを示す。他の方法において、既知タンパク質よりむしろ既知リガンドをアレイの各部位に結合させ、試料の中に含有されるタンパク質と接触させる。

【0014】

本発明の方法は結合事象の直接的検出を含むので、標識化されたタンパク質またはリガンドを使用することは不要であり、こうしてタンパク質／リガンドの結合事象をモニターする他のアプローチに比較して、これらの方法を簡素化し、コストを低下させる。異なるタイプの結合を区別することができるので、また、潜在的に治療的値を有する分子についてのスクリーニングを非常にいっそう迅速にすることができます。

【0015】

特定の態様の説明

I. 用語の定義

用語生物学的「結合相手」または「リガンド／抗リガンド」または「リガンド／抗リガンド複合体」は、他の分子を特異的に認識（例えば、結合）して「結合性複合体」、例えば、抗体 - 抗原、レクチン - 炭水化物、核酸 - 核酸、ビオチン - アビシン、およびその他を形成する分子を意味する。生物学的結合相手は、单一分子の対に限定する必要がない。こうして、例えば、單一リガンドは2またはそれ以上の「抗リガンド」の協同作用により結合されることができる。

【0016】

用語「リガンド」または「被検体」または「マーカー」は、検出される任意の分子を意味する。それは抗リガンドとの相互作用を通して検出されるか、あるいはリガンドの特徴的な誘電性により検出される。ここで抗リガンドはリガンドに特異的または非特異的に結合する。一般に、リガンドは、リガンドのある部分の認識のために、前記リガンドに特異的または非特異的に結合する他の分子（すなわち、抗リガンド）がそれに対して存在する、任意の分子として定義された。抗リガンドは、例えば、抗体であることができ、そしてリガンドは抗体に特異的に結合する抗原のような分子である。抗原が表面に結合し、そして抗体が検出される分子である場合において、この書類の目的のために、抗体はリガンドとなり、そして抗原は抗リガンドである。リガンドは、また、細胞、細胞膜、オルガネラおよびそれらの合成アナローグから成ることができる。

【0017】

本発明を実施するために適当なリガンドは下記のものを包含するが、これらに限定されない：抗体、抗原、核酸（例えば、天然または合成のDNA、RNA、gDNA、cDNA、mRNA、tRNA、およびその他）、レクチン、糖、オリゴ糖、糖タンパク質、レセプター、増殖因子、サイトカイン、小分子、例えば、薬剤候補（例えば、ランダムペプチドライブラリー、天然産物ライブラリー、レガシーライブラリー、コンビナトリアルライブラリー、オリゴ糖ライブラリーおよびファージディスプレイライブラリーからの）、代謝物質、乱用の薬剤およびそれらの代謝副生物、酵素基質、酵素インヒビター、酵素コファクター、例えば、ビタミン、脂質、ステロイド、金属、酸素および生理学的流体、細胞、細胞成分、細胞膜および関連

構造物の中に見出される他の気体、細胞接着分子、植物および動物源の中に見出される天然産物、腫瘍マーカー（すなわち、腫瘍に関連する分子）、他の部分的または完全に合成の産物、およびその他。「天然リガンド」は、天然に存在しかつ特定抗リガンド、例えば、タンパク質上の1またはそれ以上の特定部位に特異的に結合するリガンドである。例示であるかつ非限定的例は次の通りである：レセプターおよびレセプターに対して特異的なリガンド（例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト）、酵素およびインヒビター、基質またはコファクター；および抗体および抗原。

【0018】

「抗リガンド」は、他の分子（すなわち、リガンド）に特異的または非特異的に結合する分子を意味する。抗リガンドは、また、それが特異的に結合するリガンドとの相互作用を通して検出されるか、あるいはそれ自身の特徴的な誘電性により検出される。本明細書において使用するとき、抗リガンドは、通常、単独でまたは表面上に固定化される結合相手の1メンバーとして、表面上に固定化される。ある態様において、抗リガンドは信号通路または導性表面上の分子から成ることができる。あるいは、いったん抗リガンドがリガンドに結合されると、生ずる抗リガンド／リガンド複合体は引き続く結合の目的で抗リガンドと考えることができる。

【0019】

用語「特異的に結合する」は、タンパク質またはポリペプチド、核酸、またはレセプターまたは本明細書に記載する他の結合相手について言及するとき、タンパク質および／または他の生物学的物質の異種集団中の注目の同種リガンドを決定する結合反応を意味する。こうして、指定した条件（例えば、抗体の場合においてイムノアッセイ条件）下に、特定したリガンドまたは抗体は特定の「ターゲット」に結合し（例えば、ホルモンはそのレセプターに特異的に結合する）、そして試料の中に存在する他のタンパク質に、あるいはリガンドまたは抗体が生物または生物に由来する試料において接触するようになる他のタンパク質に、有意な量において結合しない。あるタンパク質に特異的に結合するリガンドは、天然リガンドと同一部位において結合するリガンドである。

【0020】

用語「単離された」、「精製された」または「生物学的に純粋な」は、目的とする種が存在する優勢を占める種（すなわち、モル基準で、それは組成物中の他の個々の種よりも豊富に存在する）、好ましくは目的とする種が存在するすべての高分子種の少なくとも約50%（モル基準で）を構成する、組成物中の実質的精製された画分である。一般に、実質的純粋な組成物は組成物の中に存在するすべての高分子種の約80～90%を構成する。最も好ましくは、目的とする種は本質的に均質に精製され（汚染する種は慣用検出法により組成物において検出されない）、ここで組成物は单一の高分子種から本質的に成る。

【0021】

用語「核酸」は、一本鎖または二本鎖のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドポリマーを意味し、そして特記しない限り、天然に存在するヌクレオチドに類似する方法において機能することができる天然ヌクレオチドの既知アナローグを包含する。

【0022】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、「タンパク質」および「タンパク質ターゲット」は、アミノ酸残基のポリマーを互換的に意味するために使用される。これらの用語は、1またはそれ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工的化学的アナローグであるアミノ酸ポリマーに適用され、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用される。それらに対するリガンドを薬剤発見法においてスクリーニングする、タンパク質またはタンパク質ターゲットは、あるタイプのリガンドに結合することができる本質的に任意のタイプであることができ、下記のものを包含するが、これらに限定されない：酵素、レセプター、抗体およびそれらのフラグメント、ホルモン、および核酸結合性タンパク質。タンパク質またはペプチドは特定部位を含むことができ、この部位はリガンドおよびタンパク質がそこで結合性複合体を形成する部位である。酵素について、特定部位は活性部位またはアロステリック部位であることができる；レセプターの場合において、特定部位は天然リガンドがそこで結合する部位である。

【0023】

用語「抗体」は、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子のフラグメントにより実質的にコードされる1またはそれ以上のポリペプチドから成るタンパク質を意味する。認識される免疫グロブリン遺伝子は、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロンおよびミュー定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を包含する。軽鎖はカッパまたはラムダとして分類される。重鎖はガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンとして分類され、これらは引き続いて免疫グロブリンのクラス、それぞれ、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEを定義する。

【0024】

典型的な免疫グロブリンはテトラマーを含んで成ることで知られる。各テトラマーは2つの同一対のポリペプチド鎖から構成され、各対は1つの「軽鎖」（約25kD）および1つの「重鎖」（約50～70kD）を有する。各鎖のN末端は抗原認識に主として関係する約100～110またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を定義する。可変軽鎖（VL）および可変重鎖（VH）という用語は、それぞれ、軽鎖および重鎖を意味する。

【0025】

抗体は無傷の免疫グロブリンとして、または種々のペプチダーゼを使用する消化により產生される十分に特性決定された多数のフラグメントとして定義される。こうして、ペプシンは抗体をヒンジ領域においてジサルファイド結合の下で消化して、 $F(ab)'$ ₂、すなわち、それ自体ジサルファイド結合によりVH - CH1に結合された軽鎖であるFabの二量体、を产生する。 $F(ab)'$ ₂をヒンジ領域においてジサルファイド結合を破壊する温和な条件下に還元し、これにより($Fab)'$ ₂二量体をFab'モノマーに変換することができる。Fab'モノマーは本質的にヒンジ領域の一部分を有するFabである（他の抗体フラグメントのいっそう詳細な記載については、下記の文献を参照のこと：Fundamental Immunology、W. E. Paul、編、Raven Press、N. Y. (1993)）。種々の抗体フラグメントは無傷抗体の消化により定義されるが、当業者は理解するように、このようなFab'フラグメントは化学的にまたは組換えDNA法を利用することによってde novo合成することができる。こうして、抗体という用語は、本明細書において使用するとき、また、

完全抗体の修飾により產生されるか、あるいは組換えDNA法を使用してde novo合成された、抗体フラグメントを包含する。好ましい抗体は、一本鎖抗体、より好ましくは可変重鎖および可変軽鎖が一緒に結合されて（直接的にまたはペプチドリンカーを介して）連續的ペプチドを形成している、一本鎖Fv（scFv）抗体を包含する。

【0026】

一本鎖Fv（「scFv」または「scFv」）ポリペプチドは共有結合したVH：：VLヘテロダイマーであり、これは直接結合したまたはペプチドコードリンカーにより結合したVHおよびVLコード配列を包含する核酸から発現させることができる。Houston他（1998）Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85：5879 - 5883。自然に凝集されているが、抗体V領域から化学的に分離された軽および重ポリペプチド鎖をscFvに変換するための多数の構造物は、抗原結合部位の構造に実質的に類似する三次元構造に折りたたまれるであろう。例えば、下記の文献を参照のこと：米国特許第5,091,513号および米国特許第5,132,405号および米国特許第4,956,778号。

【0027】

「抗原結合部位」または「結合性部分」は、抗原結合に参加する免疫グロブリン分子の一部分を意味する。抗原結合部位は、重（「H」）および軽（「L」）鎖のN末端の可変（「V」）領域のアミノ酸残基により形成される。重鎖および軽鎖のV領域内の3つの高度に分岐したストレッチは「超可変領域」と呼ばれ、これらの領域は「フレームワーク領域」または「FR」として知られている、いっそう保存されたフランкиングストレッチの間に介在する。こうして、用語「FR」は免疫グロブリンにおける超可変領域の間およびそれらに隣接して自然に見出されるアミノ酸配列を意味する。抗体分子において、軽鎖の3つの超可変領域および重鎖の3つの超可変領域は互いに關して三次元空間で配置されて抗原結合「表面」を形成している。この表面はターゲット抗原の認識および結合を仲介する。重鎖および軽鎖の各々の3つの超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」と呼ばれ、例えば、Kabat他により、特性決定された。Sequence of proteins of immunological interest、第4版、U. S. Dept. of Health and Human Service

es、Public Health Services、マリイランド州ベセスタ(1987)。

【0028】

「エピトープ」は、抗体と相互作用する抗原の部分である。

【0029】

用語「免疫学的結合」または「免疫学的結合性」は、免疫グロブリン分子と、免疫グロブリンがそれに対して特異的である抗原との間で起こるタイプの非共有結合的相互作用を意味する。

【0030】

「試料」は、核酸から得ることができる、本質的に任意の源を意味する。試料は本質的に任意の生物、例えば、動物および植物、ならびに細胞培養物、組換え細胞および細胞成分から獲得することができる。試料は生物学的組織、流体または検体からのものであることができ、そして疾患を有するまたは健康な生物から得ることができます。試料は下記のものを包含するが、これらに限定されない：痰、羊水、血液、血球（例えば、白血球）、尿、精液、腹膜液、胸膜液、組織または細い針のバイオプシー試料、および組織ホモジネート。典型的には、試料はヒトから採取される。しかしながら、試料は他の哺乳動物からも得ることができ、このような哺乳動物は、例えば、下記のものを包含するが、これらに限定されない：イヌ、ネコ、ヒツジ、畜牛、およびブタ。試料は、必要に応じて、適当な緩衝液中の希釀により前処理するか、あるいは、所望ならば、濃縮することができる。種々の緩衝剤の1つ、例えば、リン酸塩、Tris、またはその他を使用する、好ましくは生理的pHにおける多数の標準水性緩衝溶液の任意のものを使用することができる。

【0031】

生物学的試料は、よく知られている技術、例えば、静脈穿刺、腰椎穿刺、流体試料、例えば、唾液、または組織バイオプシーおよびその他を使用して患者から得ることができる。生物学的材料をヒト以外、例えば、商業的に関係する家畜から得るとき、血液および組織は家畜プロセシングプラントから入手することが好都合である。同様に、本発明において使用する植物材料は好都合には農業または園芸源、または他の天然産物源から得ることができる。あるいは、生物学的試料

は組織および / または血液が貯蔵されている細胞または血液バンクから、あるいは *in vitro* 源、例えば、細胞培養物から得ることができる。生物学的材料源として使用するための細胞培養物を確立する技術は、この分野においてよく知られている。Freshney、Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Techniques、第3版、Wiley - Liss、NY (1994) は細胞培養物に対する一般的手引きを提供する。

【0032】

用語「信号通路」は、DC静電場等の任意の有効な周波数の電磁信号を支持することができるバイオ - 電気的インターフェース伝いの伝送媒質を意味する。信号通路の非限定的例は下記のものを包含する：導電性および誘電性導波管、多重導体伝送媒質、例えば、横方向電磁 (TEM) 伝送ライン、TE、TMまたはTEMモード伝搬を支持する3以上の導電性素子を有する伝送ライン、例えば、四重極線および八重極線、結合導波管、結合されているか、あるいはされていないことができる共鳴空洞構造物、他の非モード構造物、例えば、ワイヤ、プリント回路、および他の分布回路および集中インピーダンス伝導構造物、およびその他。信号通路は構造的に、信号平面、接地平面、または両方の構造物の組合せを含んでなる。典型的には、信号通路は分子結合領域 (MBR) の表面に対して非直角である方向に沿って形成される。信号通路が導電性層または領域から成る態様において、導電性領域はその領域にわたって連続的に延びる。信号通路が非金属である、すなわち、誘電性導波管である態様において、信号通路は信号損が最小である通路として、あるいは導電率が $3\text{mhos}/\text{m}$ より大きい通路として定義される。

【0033】

「伝送ライン」は導電性素子であり、典型的には金メッキしたニッケルであり、これはある前もって決定された周波数において電磁信号の伝搬を支持することができます。「信号通路」は使用するより広い意味の用語である（すなわち、伝送ラインは信号通路の1つのタイプである）。

【0034】

「分子結合領域」または「MBR」は、バイオ - 電気的インターフェースに沿つて信号通路にカップリングした少なくとも1つの分子構造物（すなわち、被験体

、抗リガンド、またはリガンド／抗リガンド対、およびその他)を有する層を意味する。分子結合領域は、1またはそれ以上のリガンド、抗リガンド、リガンド／抗リガンド複合体、リンカー、ポリマーおよび他の物質のマトリックス、または本明細書に記載する他の分子構造物から成ることができる。さらに、分子結合領域は極めて多様性であり、1またはそれ以上の連鎖基を有することができる、マトリックス層および／または絶縁層を含む1またはそれ以上の成分を包含することができる。MBRは直接的または間接的物理的接続を介して、あるいはリガンドが信号通路から物理的に分離されるとき、電磁的カップリングを介して、信号通路にカップリングされる。MBRは、すべてはこの分野において実施されている標準に従い、例えば、チオールリンカー、ビオチニル化金属およびその他により、誘導化された表面を有することができる。

【0035】

用語「結合事象」は、最低2つの分子構造物、例えば、リガンドおよび抗リガンド間に相互作用または結合を意味する。2つの分子構造物が直接的または間接的に物理的に接触するとき、あるいは2つの分子構造物が物理的に分離されても、それらの間で電磁的にカップリングされるとき、相互作用は起こることができる。医学的関係における注目の結合事象の例は下記のものを包含するが、これらに限定されない：リガンド／レセプター、抗原／抗体、酵素／基質、DNA／DNA、DNA／RNA、RNA／RNA、核酸ミスマッチ、相補的核酸および核酸／タンパク質。あるいは、用語「結合事象」は、信号通路に結合した、本明細書に記載する単一分子または分子構造物、例えば、リガンド、または抗リガンド／リガンド複合体を意味することができる。この場合において、信号通路は第2分子構造物である。

【0036】

「リガンド／抗リガンド複合体」は、抗リガンドに結合したリガンドを意味する。結合は特異的または非特異的であることができ、そして結合は典型的には共有結合、水素結合、免疫学的結合、ファンデルワールス力、または他のタイプの結合である。

【0037】

「カップリング」は、直接的または間接的物理的接続を通して、あるいは任意の形態の信号カップリング、例えば、静電的または電磁的カップリングを通して、2つの構造物間のエネルギー移動を意味する。こうして、「電磁的カップリング」は、電磁的相互作用によるエネルギー移動を意味する。

【0038】

「試験信号」は、電磁スペクトル内で規定される任意の有効な周波数において伝搬する信号を意味する。例えば、試験信号の周波数は1MHzまたはそれ以上、例えば、5MHz、10MHz、20MHz、45MHz、100MHz、500MHz、1GHz、5GHz、10GHz、30GHz、50GHz、100GHz、500GHz、1000GHzおよびそれらの間の範囲の周波数である。

【0039】

「酵素」は、他の化合物又は「基質」中の化学反応の活性化工エネルギーを減少する触媒として作用するが、反応の最後産物ではないタンパク質を意味する。

【0040】

「溶液」は、リガンドがその中に存在する物質を包含する。溶液の非限定的例は、固体、液体または気体の状態の物質を包含する。固溶体は、炭水化物、タンパク質、オリゴヌクレオチド、あるいは、任意の有機ポリマー物質、例えば、ナイロン、レーヨン、ダクリオン、ポリプロピレン、テフロン、ネオプレン、デルリンまたはその他を包含する、天然に存在する分子または合成分子から構成することができる。液体溶液は、水性、有機または他の主成分、ゲル、気体、およびエマルジョンを含有する溶液を包含する。典型的な溶液は、セルロース、デキストラン誘導体、d-PBSの水溶液、Tris緩衝液、脱イオン水、血液、生理緩衝液、脳脊髄液、尿、唾液、水、有機溶媒を包含する。溶液は、リガンドおよび/または抗リガンドを結合性表面に適用するために使用する物質を意味するために、本明細書において用いられる。溶液は分析すべき試料を含有する。

【0041】

「連鎖基」または「リンカー」は、バイオアッセイ装置上で任意の2成分を結合するために使用する化学的構造物を意味する。こうして連鎖基は1つの成分に結合する第1結合部分、例えば、導電性表面を有し、そして他の成分、例えば、抗リガンドのマトリックスに結合する第2結合部分を有する。

【0042】

用語「バイオアッセイ装置」は、分子結合領域が形成された構造物を意味する。バイオアッセイ装置は、すべてが特定のサイズまたは形状を有する、表面、溝付き区域、または気密シールされた囲いから成ることができる。

【0043】

「バイオアッセイシステム」は、バイオアッセイ装置を電磁的にプロービングしつつ検出するために必要な成分と組み合わせた、前述のバイオアッセイ装置を意味する。これらの成分は下記のものを包含するが、これらに限定されない：1またはそれ以上の信号通路、1またはそれ以上の基質、電子装置、例えば、信号発生器、オシロスコープ、およびバイオアッセイ装置からの信号をプロービングしつつ検出するために必要なベクター分析装置、電磁信号をプロービングしつつ検出し、そしてデータを解析することができるマイクロチップおよびマイクロプロセッサー。

【0044】

用語「共鳴する」または「共鳴」は、周波数の関数として急速に変化する誘電応答を一般に意味する。

【0045】

用語「バイオ-電気的インターフェース」は、試験信号の伝搬を支持する信号通路と分子結合領域との間のインターフェース構造を意味する。

【0046】

用語「マトリックス」または「結合性マトリックス」は、スペーサーとして使用するか、あるいは結合に有効な表面積を増強するために、あるいは結合を増強するために分子の向きを最適化するために、あるいはバイオアッセイ装置を最適化するために結合の他の性質を増強するために使用するバイオアッセイチップ上の物質の層を意味する。マトリックス層は、炭水化物、例えば、デキストラン、ポリアミノ酸、架橋および非架橋タンパク質、およびその他から構成することができる。

II. 序論**A. 一般論**

本発明は、一般に、種々のタイプのリガンド、例えば、インヒビター、アゴニスト、アンタゴニスト、薬剤、およびその他に対するタンパク質（例えば、レセプター、酵素、抗体、およびその他）の結合を包含する、タンパク質の結合事象を解析する方法を提供する。さらに詳しくは、ある種の方法は、分子の大きいライブラリーをスクリーニングして、注目の特定タンパク質に結合し、こうして注目の生物学的活性を潜在的に有する分子を同定することを含む；このような方法は、例えば、薬剤発見プログラムにおいて特定の実用性を有する。他の方法は、試料中の特定リガンドの存在についてアッセイするためにタンパク質を使用することを含む。なお他の方法は、ある種のタンパク質結合事象を区別し、同定し、または定量するために、あるいはタンパク質またはタンパク質の相互作用に関する構造の情報を提供するために、プロファイルを使用することを含む。

【0047】

ある種のスクリーニング法はタンパク質によるリガンドの結合のために発生した信号を観測することを含み、ここでリガンドまたはタンパク質が信号通路、例えば、伝送ラインに電磁的にカップリングされている。他のいっそう複雑なスクリーニング法は、タンパク質／リガンド複合体についてのスペクトルを獲得し、次いである種の構造的モチーフまたは結合相互作用特有の信号についてスペクトルを検査することを含む。このような方法を使用すると、例えば、リガンドのタイプおよび結合相互作用のタイプに関する情報を得ることができる。

【0048】

これらの方法は複数の素子または部位を含むアレイを使用して実施することができる。各素子または部位は異なるタンパク質またはリガンドを含む。アレイの各素子は、信号通路、例えば、伝送ラインを含む。タンパク質またはリガンド（またはそれらの複数）は、アレイの一部分である信号通路の各々に電磁的にカップリングされる。信号は複数の伝送ラインを通り、各伝送ラインはアレイの異なる素子を走行する。次いで伝送および／または反射された信号は、結合性複合体の存在により変調され、アレイ上の種々の素子における結合の特質を分析するために使用される。

【0049】

B. バイオアッセイシステム

本発明は、大部分の分子が示す独特の誘電性に基づいて、非常に大量の分子を区別することができるという観測を使用する。これらの区別する誘電性は、信号を結合した分子構造物にカップリングすることによって観測することができる。結合した分子構造物の独特的誘電性は信号を変調し、それに独特の信号応答を与える。次いでこの独特的信号応答を使用して、分子結合領域を構成するリガンドおよび他の分子を検出し、同定することができる。システムの下記の説明は、その広い適用可能性のために、リガンドおよび抗リガンドとの関連で往々にして記載されるが、リガンドおよび抗リガンドはタンパク質ターゲットおよびタンパク質ターゲットに結合することができる多数のリガンドの任意のもの特異的に含むことができることを理解すべきである。同様に、広く結合事象について言及するが、このような事象はタンパク質に対するリガンドの結合を含むことができる。

【0050】

第1A図は、本発明によるバイオアッセイシステムの1つの態様を図解する。システム100は、マイクロストリップ、ストリップライン、共平面導波管、スロットラインまたは同軸システムの中に集中素子回路または分布素子回路を含む多数の構成において実現することができる、2つの導体、信号平面接地平面、回路トポロジーにおいて図解されている。そのうえ、エレクトロニクスの当業者は容易に理解するように、このシステムは単一の導体導波管システム、または3またはそれより多い導体システムに容易に変更することができる。

【0051】

図解するように、システム100は、信号源110、伝送ライン120、接地平面130、バイオアッセイ装置150、および信号検出器160を含む。図解する態様はバイオアッセイ装置150にカップリングされた2つの伝送ライン120を示すが、別の態様において、単一の伝送ラインをバイオアッセイ装置にカップリングさせるか、あるいはさらに3またはそれより多い伝送ラインをバイオアッセイ装置150にカップリングすることができる。伝送ライン120は、操作の所望の周波数にわたって信号の伝搬を支持することができる材料から形成される。伝送ライン120は、慣用の光リソグラフィーまたは半導体加工技術を使用して支持体、例えば、アルミナ、

ダイヤモンド、サファイア、ポリイミド、またはガラス上に配置された導電性層、例えば、金として実現することができる。

【0052】

システム100は、伝送ライン120にカップリングしたバイオアッセイ装置150を含む。バイオアッセイ装置150は、インターフェース伝送ライン153がその上に配置されている支持体151を含有する。インターフェース伝送ライン153は、試験信号の伝搬を支持するインターフェースを形成する。支持体151は、任意の絶縁材料、例えば、ガラス、アルミナ、ダイヤモンド、サファイア、シリコン、ヒ化ガリウムまたは半導体のプロセシングにおいて使用される他の絶縁材料から成ることができる。

【0053】

分子結合領域(MBR)156は、インターフェース伝送ライン153の1またはそれ以上の区域にカップリングされている。エレクトロニクスの当業者は容易に理解するように、カップリングは図解するようにインターフェース伝送ライン153とMBR156との間の直接的接続を通して、あるいはさらに後述するように、信号カップリングを通して行うことができる。

【0054】

MBR156は1またはそれ以上のリガンドから主として構成されるが、本明細書において記載するように、他の分子および構造物を含めることもできる。MBR156は、例えば、一次結合の場合において、ただ1つの結合したリガンド列から成ることができるか、あるいは二次またはそれより高次の結合事象が発生する場合、2、3、4、5またはそれ以上のリガンド列であることができる。複数のリガンド列は同一インターフェース伝送ライン153にわたって異なる結合表面153に存在することができる。

【0055】

図解する態様において、誘電性支持体158は溶液157と当該バイオアッセイ装置接地平面159との間に位置する。図解する態様において、誘電性支持体158および当該バイオアッセイ装置接地平面159はバイオアッセイ装置150内に位置するが、別の態様において、一方または両方は外部に位置することができる。さらに、MB

R156および溶液157の配置は、インターフェース伝送ライン153に対するこれらの層の近接の他に、又はそれに加えて、接地平面に向かって入れ替え、移動させることができる。

【0056】

システム100は、試験信号を伝送ライン120上にかつバイオアッセイ装置150に向かって発射させる信号源110を含む。信号検出器160は伝送路に沿って位置して、生ずる信号（反射または伝送されたまたは両方の）を検出する。信号がバイオアッセイ装置150のインターフェース伝送ライン153に沿って伝搬するとき、MBR156の誘電性は試験信号を変調する。次いで変調された信号を取り、バイオアッセイ装置内で起こる分子結合事象を検出し、同定するために使用する。これについてはさらに後述される。

【0057】

本発明の別の態様において、リガンド、抗リガンド／リガンド複合体（例えば、タンパク質ターゲットとリガンドとの間の結合性複合体）または本明細書に記載する他の分子構造物がインターフェース伝送ライン153から物理的に分離されるとき、その検出および同定は可能である。この態様において、リガンドは伝送ライン153に物理的に接続されておらず、インターフェース伝送ライン153に電気的にまたは電磁的にカップリングされている。インターフェース伝送ライン153と懸垂されたリガンドとの間のカップリングはインターフェース伝送ライン153に沿って伝搬する試験信号の応答を変更し、これによりそれは検出および／または同定する手段を提供する。インターフェース伝送ライン153と懸垂されたリガンドとの間の最大距離は、因子、例えば、インターフェース伝送ライン153とリガンドとの間の媒体の有効誘電定数、全カップリング面積、信号検出器の感度、溶液のリガンドの濃度、および所望の検出時間により決定される。分離距離は典型的には 10^{-1} m、 10^{-2} m、 10^{-3} m、 10^{-4} m、 10^{-5} m、 10^{-6} m、 10^{-8} m、 10^{-9} m、 10^{-10} mまたはそれらの間の範囲内の程度である。

【0058】

ある態様、例えば、細胞をベースとするアッセイにおいて、溶液を通して信号通路にMBRを電磁的にカップリングさせることができる。こうして、細胞および

特に細胞膜および膜をベースとする構造物を信号にカップリングさせることができる。

【0059】

第1B図は、共鳴マイクロストリップ回路170のアレイを含んでなるバイオ・アッセイ・システムの第2態様を図解する。各共鳴回路170は解放回路スタブ176において終わる伝送ライン172から成る。回路設計の当業者は理解するように、集中素子または分布回路のトポロジー、またはそれらの組合せにおいて、他の共鳴構造物を使用することができる。

【0060】

第1C図は1つの共鳴回路170の断面図を図解する。解放回路スタブ176は第1A図に示す共鳴回路170のバイオ-電気的インターフェースを形成し、バイオ-電気的インターフェースに密接して並列する。特に、解放回路スタブ176は誘電層176b上に配置されたインターフェース伝送ライン176aから成り、接地平面176cより上に位置する。

【0061】

この態様において、MBR176dは直接的接続を介して伝送ライン176aにカップリングされている。MBR176dは特異的または非特異的方法でインターフェース伝送ラインに沿って結合することができる。前述したように、主題の分子構造物をインターフェース伝送ライン176aから懸垂させるが、インターフェース伝送ライン176aに電気的または電磁的にカップリングさせて、結合事象の検出および同定の情報を得ることができる。

【0062】

インターフェース伝送ライン176aの寸法は、例えば、所望の測定時間（より大きい面積はより速い検出時間を生ずる）、所望の共鳴周波数 f_{res} 、より高い効率を達成するか、あるいは不連続を引き起こして結合事象を際立たせるための一定のインピーダンス整合条件および全アレイが形成されるプロセスを考慮して変えてよい。例えば、慣用のマイクロ波光リソグラフィーを使用する場合、比較的厚い誘電層、例えば、アルミナ、ダイヤモンド、サファイア、デュリオッド(duriod)または他の慣用支持体材料を使用して、結合表面積を $10^{-1}m^2 \sim 10^{-6}m^2$ の範囲

にすることができる。あるいは、半導体加工を使用する場合、シリコンまたはヒ化ガリウムの他の比較的薄い誘電層を使用して、結合表面積を $10^{-6}\text{m}^2 \sim 10^{-12}\text{m}^2$ の範囲にすることができる。

【0063】

慣用マイクロ波またはCADツール、例えば、Microwave SpiceTM、EEsof TouchstoneTMおよびLibraTMを使用して、共鳴構造物が所望の共鳴周波数点 f_{res} において応答信号の応答を示すように、伝送ライン172の長さおよびインピーダンス、インターフェース伝送ライン176aの寸法、および誘電層176bの厚さおよび誘電定数を選択する。典型的には、所望の共鳴周波数 f_{res} 点は注目の分子がそれらの誘電性の劇的变化を示す周波数の範囲であり、それらの測定はそれらの検出を可能とするであろう。あるいは、共鳴周波数点 f_{res} は最も広い範囲の信号検出器を可能とする所望の試験周波数範囲の中心として定義することができる。図解する態様において、共鳴周波数 f_{res} は10MHz、20MHz、45MHz、100MHz、500MHz、1GHz、5GHz、10GHz、30GHz、50GHz、100GHz、500GHz、1000GHzおよびそれらの間の範囲の周波数を包含する。

【0064】

測定の間に、溶液176eは1またはそれ以上の解放回路スタブ172上に適用する。溶液中の1またはそれ以上の分子がインターフェース伝送ライン176aに結合するとき、MBR176dが形成する。この場合において、MBR176dおよび溶液は、さらに後述するように、パラシスチックとして電気的に挙動し、これは共鳴周波数点 f_{res} をその本来の共鳴周波数点より上または下にシフトさせる。この周波数のシフトを検出することができ、そして分子結合事象の発生を示すために使用することができる。また、後述するように、信号応答を広いスペクトルにわたって問合せ、結合した分子構造物の同定を確認することができる。各共鳴回路170は異なる分子構造物に結合するように製作し、そして各共鳴回路170をアドレス可能とし、これにより同一溶液中の多数の分子構造物を同時に検出しつつ同定できるようになる。別の態様において、明確な共鳴周波数を示すように各共鳴回路170を設計することができ、この場合において共鳴回路170のすべてに連続的周波数範囲にわたって問合せして、分子の結合を決定することができる。

【0065】

バイオ - 電気的インターフェース領域は、所望の試験周波数における電磁信号を支持するように設計された信号通路から成る。多数の構成が可能であり、1つの例はDCおよび110GHzの間で操作可能なスパッタード金伝送ラインである。他の態様において、信号通路は誘電媒体、例えば、MBRそれ自体から成る。この態様において、信号通路はDC電圧および電流をブロックするが、そうでなければ、例えば、下記の周波数において発生する所望の試験信号の伝搬を支持する：1MHz、5MHz、10MHz、20MHz、45MHz、80MHz、100MHz、250MHz、500MHz、750MHz、1GHz、2.5GHz、5GHz、7.5GHz、10GHz、12GHz、18GHz、20GHz、22GHz、24GHz、26GHz、30GHz、33GHz、40GHz、44GHz、50GHz、80GHz、96GHz、100GHz、500GHz、1000GHz、またはそれらの間の範囲の周波数。したがって、この分野において知られている高周波数回路設計技術を使用して信号通路を設計する。このような設計技術は、信号通路を相互に接続する構造物に整合させ、信号通路の挿入損失を最小にし、そして信号通路の電圧定常波比（VSWR）を最小にするインピーダンスを含む。本発明の好ましい態様において、信号通路およびMBRは非直角に向いている。

【0066】

本発明は、信号通路に取付けられた予測された大きさおよび構造の分子の検出に限定されない。MBRは、信号通路に取付けられているか、あるいはそれから分離しているが、信号通路にカップリングされた1、2、3、4、5、10、20、30、50、100、1000通り、またはそれ以上の分子長さから成ることができる。さらに、MBRは均質分子の複数層、単一であるが不均質の分子層、または複数の不均質分子層から成ることができる。

【0067】**C. 伝送ラインおよびMBR**

システムの結合相互作用は一般にバイオアッセイ装置内で、特に導電性層（第1A図～第1C図においてインターフェース伝送ライン）に沿って起こる。導電性層は、導電性であって高周波数の試験信号の伝搬を支持する形態を有する材料から製作される。導電性表面は、前述したように、所望の試験周波数範囲にわたって適当な導電性を示しあつすぐれた分子結合性を有する材料から製作される。この

のような材料は下記のを包含するが、これらに限定されない：金、酸化インジウム錫（ITO）、銅、銀、亜鉛、錫、アンチモン、ガリウム、カドミウム、クロム、マグネシウム、コバルト、イリジウム、白金、水銀、チタン、アルミニウム、鉛、鉄、タンクステン、ニッケル、タンタル、レニウム、オスミウム、タリウムまたはそれらの合金。また、導電性層は半導体材料から形成することができる。半導体材料は、結晶質または非晶質であることができ、化学的にドーピングされたまたは純粋な炭素、シリコン、ゲルマニウム、ガリウム-ヒ素、ヒ化インジウム-ガリウム、またはその他を包含する。導電性材料は、また、ポリマー、特に導電性であるポリマー、例えば、ポリアセチレン、ポリチオフェンおよびその他から形成することができる。導電性層は用途に依存して厚いか、あるいはわずかに数分子層深さであることができる。導電性層は、ヒ化ガリウムまたは既知半導体加工技術により導電性される他の半導体材料の蒸着された薄い金属層、またはエピタキシャル層から構成することができる。さらに、導電性層は誘導化することができ、そのプロセスはよく知られており、例えば、下記の文献を参照のこと：Kumar他、Patterned Self-Assembled Monolayer and Mesoscale Phenomena, Accounts of Chemical Research, 28 : 219 - 226 (1995)。

【0068】

さらに、導電性層は、分子の結合に対して導電性である形態を有する材料から製作される。リガンドは直接的に、他の分子構造物を通して間接的に、または両方の立体配置を通して導電性層に結合することができる。導電性層に結合することができる分子の範囲は下記のものを包含するが、これらに限定されない：タンパク質、核酸、小分子、サッカリド、脂質、および注目の任意の他の分子。この化学は、表面に取付けられた分子のわずかに單一種、表面に取付けられた分子の全アレイ、または表面に直接取付けた種と溶液中の注目のリガンドとの間の多数の結合事象を含むことができる。

【0069】

導電性層ヘリガンドを取付けるとき関係する典型的な化学は、一般に、リガンドおよびそれに結合する抗リガンドの特質、およびアッセイにおけるそれらの機能に依存するであろう。表面上で起こることがある相互作用の可能なタイプのリ

ストは下記のものを包含するが、これらに限定されない：タンパク質／タンパク質の相互作用、DNA／タンパク質の相互作用、RNA／タンパク質の相互作用、核酸のハイブリダイゼーション、例えば、塩基対誤対合の分析、RNA／RNAの相互作用、tRNAの相互作用、酵素／基質システム、抗原／抗体の相互作用、小分子／タンパク質の相互作用、薬剤／レセプターの相互作用、固相リガンドのコンフォメーションの変化、タンパク質／サッカリドの相互作用、および脂質／タンパク質の相互作用。

【0070】

一般的用語において、1つの態様である結合事象を一次結合および二次結合として記載することができる。また、分子結合の追加の層があってもよい。一次結合は導電性表面への抗リガンドの取付けを意味し、これはリンカー分子の助けにより実施することができる。二次結合は抗リガンドへのリガンドの結合を意味し、抗リガンドはMBR中の他の分子であるか、あるいは二次結合は導電性表面それ自体へのリガンドの直接的結合を意味する。典型的には、結合は固定化された固相抗リガンドへの液相リガンドの結合を包含する。例えば、一次結合はバイオアッセイ装置の導電性層への特異的抗体の取付けができる、そして二次結合は抗体に対する試料溶液中の特異的抗原の結合を包含するであろう。あるいは、二次結合は導電性表面に対するタンパク質の直接的取付けができる、例えば、タンパク質のアミノ末端は金導電性層に直接的に結合する。

【0071】

前述の結合は、導電性層の1またはそれ以上の区域に沿って分子結合領域（MBR）180を形成し、その態様の1つは第1D図に図解されている。この態様において、MBR180は、必要に応じて第1リンカー181、絶縁体182、第2リンカー183、マトリックス184、第3リンカー185、抗リガンド層186、およびリガンド層187から成る。

【0072】

第1リンカー181は絶縁体182と導電性層（図示せず）との間の取付けを提供する。第1リンカー181は、分子、例えば、チオール、アミン、アミド、または金属、例えば、クロムまたはチタンから成る。絶縁層182は導電性層およびMBR180お

および溶液(図示せず)の間のバリヤーを提供する。絶縁層182は、MBRおよび/または溶液に対する暴露のための導電性層の構造的劣化を防止する気密バリヤーを提供する。選択的に、または追加的に、絶縁層182は非導電性層から成ることができる。この非導電性層は、測定を妨害するであろう、導電性層からMBRおよび/または溶液へのDCまたは低周波数のエネルギーの流れを防止する。絶縁層は、ポリイミド、アルミナ、ダイヤモンド、サファイア、非導電性ポリマー、半導体絶縁材料、例えば、二酸化ケイ素またはヒ化ガリウム、または気密および/または電気的絶縁特性を提供する他の材料を包含することができる。絶縁層は、また、空気、または他の気体物質から成ることができ、この場合においてリンカー181を検出することができる。

【0073】

第2リンカー183は絶縁層182とマトリックス184との間の取付けを提供し、そして第1リンカー181と同一であるか、あるいはそれに類似する分子から成る。マトリックス層184はポリマー層から成るが、また、必要に応じて炭水化物、ポリアミノ酸層またはその他である。第3リンカー185はマトリックス層を抗リガンド186に取付けるために適当な分子から成り、そして第1リンカー181および/または第2リンカー183と同一であるか、あるいはそれに類似する分子から成る。

【0074】

抗リガンド186を使用して、溶液中のリガンド187と特異的または非特異的に結合させおよび/または溶液の物理的性質を測定する。物理的性質のいくつかの例は、温度、pH、イオン強度、およびその他である。抗リガンドは、リガンド187に特異的または非特異的に結合する分子または分子構造物から成る。例えば、リガンドが抗原から成る場合、抗リガンドは抗体から成るであろう。リガンド187は、抗リガンド186に特異的または非特異的に結合する分子または構造物から成る。

【0075】

一般に、MBRは、本明細書に記載するように、結合した信号通路に沿った電磁試験信号と測定可能にほどに相互作用するのに十分である。こうして、変化する誘電性を示す本質的に任意のMBR組成物を分析することができる。大部分の態様

において、MBRは約1～5～1cmの範囲の厚さを有するであろう。簡単な分子結合事象について、この厚さの範囲は通常約10～10,000、典型的には100～5,000、または500～1,000であろう。より大きい相互作用（例えば、細胞）において、MBRは1μm～100μm、好ましくは5μm～50μmの範囲であろう。絶縁体、マトリックスおよびその他では、サイズは有意により高い範囲であろう。

【0076】

第1D図の態様はすべての可能なMBR立体配置を網羅することを意図しない。当業者は理解するように、MBRを構成する非常に多数の組合せは、特定の用途に従い、設計可能である。例えば、他の態様において、第1リンカー181、第2リンカー183、第3リンカー185、絶縁層182、およびマトリックス層184を利用せず、こうしてMBRは抗リガンド186およびリガンド187から成る。さらに選択的に、第1リンカー181および絶縁層182を欠失させることができる。記載した層の1またはそれ以上が欠失されているか、あるいは追加の層が付加されている他の選択的態様は、当業者にとって明らかであろう。

【0077】

さらに、MBRを不均質分子から構成することができる。不均質分子は、特定のアレイフォーマットに依存して空間的にまとめるか、あるいはランダムに層状化または分布させることができる。例えば、第1E図は空間的に分離されている、4つの異なる抗リガンド190、191、192および193を有するMBR180の上面図を図解する。第1F図は、4つの異なる抗リガンド190、191、192および193が全体を通じてランダムに分布している、MBR180を図解する。別の態様において、第1G図は、MBR180が信号通路153にカップリングされた溶液157中に細胞194を含有する、断面図を図解する。別の態様において、膜結合構造（図示せず）を有する細胞膜195はインターフェース伝送ライン153にカップリングされた溶液の中に存在する。層は、例えば、リンカー、マトリックス、抗リガンド、リガンドおよび1またはそれ以上の絶縁層を包含することができる。ある態様において、1またはそれ以上の膜、例えば、イオン移動、サイズまたは電荷の選択をコントロールするか、あるいは抗リガンドまたは他の分子構造物の取付けを支持する膜を使用することができます。

【0078】

電気的に、MBRは独特の誘電性を示す。誘電性は単離された結合した分子、および環境的変化、例えば、結合事象、pH変化、温度、イオン強度およびその他の存在下における結合した分子の両方の一部分構造的およびコンフォメーション的性質に寄与する。結合した分子構造物の誘電性は、溶媒和媒質（溶液）の局所的構造と一緒に、また、一次または他の高次の結合により引き起こされる分子内および分子間の結合の変化、および導電性層付近における溶媒和媒質の変位に寄与することができる。

【0079】

バイオ - 電気的インターフェース領域は、所望の試験周波数における電磁信号の伝搬を支持するように設計された信号通路から成る。多数の構成が可能であり、1つの例はDCおよび110GHzの間で操作可能なスパッタード金伝送ラインである。他の態様において、信号通路は誘電媒体、例えば、MBRそれ自体から成る。この態様において、信号通路はDC電圧および電流をブロックするが、そうでなければ、例えば、下記の周波数において発生する所望の試験信号の伝搬を支持する：1MHz、5MHz、10MHz、20MHz、45MHz、80MHz、100MHz、250MHz、500MHz、750MHz、1GHz、2.5GHz、5GHz、7.5GHz、10GHz、12GHz、18GHz、20GHz、22GHz、24GHz、26GHz、30GHz、33GHz、40GHz、44GHz、50GHz、80GHz、96GHz、100GHz、500GHz、1000GHz、またはそれらの間の範囲の周波数。したがって、この分野において知られている高周波数回路設計技術を使用して信号通路を設計する。このような設計技術は、信号通路を相互に接続する構造物に整合させ、信号通路の挿入損を最小にし、そして信号通路の電圧定常波比（VSWR）を最小にするインピーダンスを含む。本発明の好ましい態様において、信号通路およびMBRは非直角に向いている。

【0080】

本発明は、信号通路に取付けられた予測された大きさおよび構造の分子の検出に限定されない。MBRは、信号通路に取付けられているか、あるいはそれから分離しているが、信号通路にカップリングされた1、2、3、4、5、10、20、30、50、100、1000通り、またはそれ以上の分子長さから成ることができる。さらに、M

BRは均質分子の複数層、単一であるが不均質の分子層、または複数の不均質分子層から成ることができる。

III. バイオアッセイ装置

A. 装置の構造

構造的に、バイオアッセイ装置は信号通路およびバイオ - 電気的インターフェースを含む。信号通路は、単一の入力 / 出力信号ポート、1つの入力信号ポート通路および1つの出力信号ポート通路、または複数の入力および / または出力信号ポート通路から成ることができる。1またはそれ以上の信号通路は、多数の異なる構成、例えば、導電性ワイヤ、伝送ライン、導波管構造物、共鳴空洞、または所望の周波数範囲にわたって試験信号の伝搬を支持する任意の他の伝送媒体において実現することができる。可能態様について、下記の文献を参照のこと : R.

E. Collins, Foundations for Microwave Engineering, MacGraw - Hill Publishing Co., 1966 ; および S. March, Microwave Transmission Lines and Their Physical Realizations, Les Besser and Associates, Inc., 1986。さらに、バイオアッセイ装置はまた種々の異なる立体配置において実現することができる。立体配置の非限定的例は、慣用製造技術、慣用エッチングおよび光リソグラフィー、または半導体加工技術を使用する大型 ~ 小型の構造物を包含する。

【0081】

第2A図は、断面図で示すバイオアッセイ装置の1つの態様を図解する。バイオアッセイ装置230は、上部プレート231、接触端子237、および下部プレート239から成る。上部プレート231は、その上に配置されたインターフェース伝送ライン233を有する下部表面を含む。誘電性支持体240および接地平面250はバイオアッセイ装置に対して外部に位置する。上部プレート231および / または誘電性支持体240は、絶縁材料、例えば、ガラスから形成され、好ましくは慣用光リソグラフィーまたは金スパッタリング、エッチングまたは化学的蒸着 (CVD) 加工法と適合性である。他の材料、例えば、アルミナ、シリコン、ヒ化ガリウムまたは他の絶縁材料を選択的に使用できる。

【0082】

第2A図に図解されているように、インターフェース伝送ライン233の下部表面は分子結合領域（MBR）234と接触している。図解するように、MBRは異なる層またはタイプの結合した分子構造物ならびに溶液中に存在する分子構造物から成ることができる。別の態様において、MBR234はインターフェース伝送ライン233の小さいまたは大きい部分にわたって延び、そして示すように異なる結合した分子構造物から成ることができる。第1D図に示すように、MBRは抗リガンド／リガンド構造物、またはリンカー、マトリックス、および絶縁層の種々の中間体のみから成ることができる。実行するとき、絶縁層182（第1D図）は、他の慣用絶縁材料に加えて、空気、ポリイミド、アルミナ、ダイヤモンド、サファイア、または半導体絶縁材料、例えば、二酸化ケイ素またはヒ化ガリウムまたは非導電性材料から成ることができる。絶縁層の厚さおよび誘電定数は、MBR234およびインターフェース伝送ライン233が信号伝送の間に一緒に緊密にカップリングされるようなものである。絶縁層182の厚さは、必要なカップリングの量、絶縁層の誘電定数、および全カップリング面積に依存して、 10^{-1} m、 10^{-2} m、 10^{-3} m、 10^{-4} m、 10^{-5} m、 10^{-6} m、 10^{-7} m、 10^{-8} m、 10^{-9} m、 10^{-10} mまたはそれより小さい、またはそれらの間の範囲内の値であることができる。カップリングは、多数の異なる立体配置、例えば、多層、共平面、または導波管回路のトポロジーの横形およびオフセットカップルド立体配置により達成することができる。溶液媒質からインターフェース伝送ラインを気密シールするためにおよび／または溶液中で起こる分子結合事象を妨害することがある溶液の中へDCまたは低周波数の電流の流入を防止するために、絶縁層を使用することは好都合である。

【0083】

インターフェース伝送ライン233は、信号伝搬を支持することができかつMBR234に結合することができる材料から成る。材料はMBRの構成に依存して変化するであろうが、いくつかは金、酸化インジウム錫（ITO）、銅、銀、亜鉛、錫、アンチモン、ガリウム、カドミウム、クロム、マンガン、コバルト、イリジウム、白金、水銀、チタン、アルミニウム、鉛、鉄、タングステン、ニッケル、タンタル、レニウム、オスミウム、タリウムまたはそれらの合金を包含する。あるいは、インターフェース伝送ライン233は、1またはそれ以上のターゲット分子（リガント

ド)との結合を形成するために、1またはそれ以上の分子構造物(抗リガンド)(これらはMBR234の一部分を形成する)を包含することができる。インターフェース伝送ラインを構成する材料は、また、リンカーの取付けを促進しつつ信号伝搬を支持するように選択することができる。インターフェース伝送ライン233を形成するために使用できる他の材料は、当業者にとって容易に明らかであろう。

【0084】

溶液260、例えば、種々の緩衝化溶液(例えば、ダルベッコリン酸塩緩衝液(d-PBS))を使用してリガンドをMBR234に移すことができる。種々の技術、例えば、吸上げ作用、ピペッティング、浸漬、滴下、毛管作用による直接的接触、または種々の流体装置を介する技術を使用して、注目のリガンド、例えば、タンパク質を結合表面に適用することができる。

【0085】

特定の態様において、低い信号損失および外部の伝送ライン270に対する密接なインピーダンス整合を提供するように、インターフェース伝送ライン233を設計する。導電性材料、例えば、金、銅、アルミニウム、酸化インジウム錫(ITO)または前述の他の導電性材料からインターフェース伝送ライン233を製作することによって、低い信号損失は達成される。支持体、溶液、およびMBRの相対的誘電性に依存して、インターフェース伝送ライン233の幅をほぼ外部の伝送ライン270の幅に定めることによって、密接なインピーダンス整合は達成される。インターフェース伝送ライン232と外部の伝送ライン270との間の信号連続性は接触端子237を介して提供される。前述したように、MBR234および溶液媒質260は、選択的に、あるいはインターフェース伝送ライン232に近接したこれらの層の位置に加えて、接地平面250に近接させることができる。

【0086】

集中素子の形態、分布した形態、または両方の組合せの追加のアナログおよび/またはデジタル回路をバイオアッセイ装置の入力および/または出力ポートに含めることができる。例えば、インピーダンス整合回路および/または緩衝増幅器回路を入力ポートにおいて使用することができる。あるいは、またはさらに、インピーダンス整合回路および/またはそれ以上の出力増幅器を利用して出

力信号を増強することができる。エレクトロニクスの当業者は理解するように、他の型のコンディショニング回路をその上別の態様において使用することができる。

【0087】

第2B図はバイオアッセイ装置の第2態様を図解する。この態様において、溶液は下部プレート239の上面に形成されたインターフェース伝送ライン233より上の空間を占有する。インターフェース伝送ライン233の上側は、MBR234が付着する結合表面を形成する。誘電層240はインターフェース伝送ライン233と接地平面250との間に配置される。接触端子237は、外部の伝送ライン270への信号通路を提供する。インターフェース伝送ライン、上部プレート、下部プレート、接触端子、および誘電層を前述の材料およびプロセスから形成することができる。また、MBRを第1D図に記載したように、またはその変形体へと構成することができる。さらに、MBR234および溶液媒質260は、選択的に、あるいはインターフェース伝送ライン233に近接したこれらの層の位置に加えて、接地平面250に近接させることができる。

【0088】

第2C図は、本発明の他のバイオアッセイ装置150の垂直断面図を描写する。このバイオアッセイ装置150は、第1A図に示す立体配置に類似する2素子のストリップ線路の立体配置を含んでなる。バイオアッセイ装置150はガラス（ほぼ1mmの厚さ）から作られた支持体151を含み、その上面に金伝送ライン120がスパッタリングされている。LEXAN（DuPont製のポリカーボネート材料）から作られた反応器90（6.0cm×1.5cm×0.5mm）が、伝送ライン120の区画に対してシールされている。支持体151および取付けられた伝送ライン120を、伝送ライン120に取付けられた反応器90と一緒に、それぞれ、誘電材料の上層70および下層72の間に挟む。この特定の態様において、誘電材料70、72は、反応器と同様に、LEXANから構成されている。誘電層またはスペーサー70、72は、システムにおいて所望のレベルのインピーダンスを得るように機能する。こうして、同様な結果を達成することができる他の材料はLEXANの代わりに使用することができる。この特定の態様において、35 の公称広帯域インピーダンスを与えるように設計し、1.5cmの幅、7.5

cmの長さおよびほぼ100オングストロームの厚さを有した。

【0089】

ガラス支持体151、伝送ライン120、反応器90および誘電層70、72を含むサブアセンブリーをバイオアッセイ装置接地面を担うステンレス鋼カバープレート159の中に包んで、伝送ライン120を電磁的に遮蔽し、機械的支持および圧力を提供して、バイオアッセイ装置150をシールして保持する。コネクター（例えば、3.5mmのコネクター）84、86がバイオアッセイ装置150の2つの端の各々に取付けられている。コネクターのセンターピン（図示せず）は、導電性エポキシ（図示せず）により伝送ライン120および50μlのゴムカスケットを有する支持体151に取付けられている。入ポート80および出ポート82はカバープレート159、誘電材料70の上層を通して延び、反応器90に別々に接続されている（典型的には反応器90の対向する端において）。これらの2つのポート80、82は溶液を反応器90に流入および流出させる。

【0090】

次いで45MHz～40GHzのS-パラメーターを測定できる分析装置または検出器（図示せず）に、一方のコネクター84を介して、バイオアッセイ装置150を接続することができる。他方のコネクター86は信号源（図示せず）に接続されている。

追加の構造的態様は、多素子伝送ライン、導波管、および共鳴空洞を有するバイオアッセイ装置を包含し、ここで検出特異性および感受性を増強する方法で、MBRを1またはそれ以上のラインまたは空洞に取付けることができる。このような構造は、並列に配置された信号コンバイナー、共鳴空洞、または導波管を包含し、導波管に沿って1つの素子上の結合MBRは結合構造を含まない他の並列素子に比較して信号伝搬性質を変更し、こうして組合わされた信号のモード性質を変化させる働きをし、容易に検出可能な出力信号の性質を生ずる。これらの後者の効果により、よく知られている技術を使用して、周波数、周波数安定性、および周波数の非常に小さい変化を超高精度で測定できる。

【0091】

B. 結合表面

第3図は、バイオ-電気的インターフェースの導電性層に沿って起こる結合表

面の化学の1つの態様を図解する。バイオ - 電気的インターフェースは、支持体320、導電性層330、MBR340、および溶液350を包含する。支持体320は本明細書に記載する任意の誘電層または支持体材料、例えば、アルミナ、ダイヤモンド、サファイア、プラスチック、ガラスおよびその他であることができ、そして導電性層320に対して構造的支持を提供する。別の態様において、支持体320を除去し、絶縁層342により構造的支持を提供する。

【0092】

導電性層330は、前述したように、所望の周波数にわたって信号伝搬を促進しつつMBR340の結合を促進する形態を有する材料から成る。2導体回路のトポロジーにおいて、導電性層330は信号平面または接地平面を含んでなることができる。しかしながら、いずれの場合においても、第2導電性層（信号平面または接地平面、示されていない）は支持体320より下に位置する（第2B図の配置）か、あるいは溶液350から除去された少なくとも1つの支持体層に位置する（第2A図の倒立配置）。あるいは、導電性層はこれらの両方のレベルに位置決定することができる。

【0093】

溶液350をMBR340にカップリングさせて、リガンドをMBR340に流れさせる。溶液350からMBR340へのリガンドの流れは指向性または非指向性であることができる。溶液は任意の輸送媒質、例えば、気相、液相、または固相の物質から成り、いくつかの例は水性d-PBS、Tris緩衝液、リン酸塩緩衝液、およびその他である。

【0094】

バイオ - 電気的インターフェースに沿って、MBRは溶液と信号通路との間の少なくとも一部分に位置し、MBRはその部分において溶液よりも信号通路に対していっそう近接させる。第3図の態様において、MBR340は溶液350と導電性層330との間に、後者により密接に近接して、配置されている。他の態様（第2A図に示す）において、溶液は信号平面と接地平面との間に配置されている。第2態様（第2B図）において、溶液は信号 - 接地平面領域の外側に配置されている。

【0095】

MBRは、リガンド、リガンド／抗リガンド複合体、または本明細書に記載する他の分子構造物から成ってよい。この態様では、MBRは任意的に第一リンカー342、絶縁体343、第二リンカー344、マトリックス345、第三リンカー346、抗リガンド層347及びリガンド層348から成り、その機能及び構造は図1Dに示している通りである。典型的には、リガンドは機能的に無傷であり、できるだけ表面に密接し、そして抗リガンドの表面密度は最大の誘電効果を提供するために十分であるが、例えば、立体障害性または付近の分子による固定化抗リガンドの活性結合部位の物理的ブロッキングにより、結合機能を損傷するほど高くない。

【0096】

リガンドは、第3図に示すように、導電性層320または中間構造物に特異的または非特異的に直接的に結合することができる。特異的に結合したリガンドを望む場合、リンカーを必要に応じて使用して結合、例えば、すべてのタンパク質の結合を促進し、こうして導電性層320が溶液に暴露されるようにする。結合性層を密に詰めることを確実にするために、チオール基、Fab、またはタンパク質、例えば、プロテインAを使用して、導電性層320に沿った抗体または他の抗リガンドの結合を促進することができる。多数の方法、例えば、光リソグラフィー、半導体加工、または任意の他の変換適用技術により、物質を導電性層320に適用することができる。

【0097】

さらに、いくつかのリガンドおよび抗リガンドを多数の方法で結合させることができる。典型的には、これらのリガンドは統計学的優勢を占める結合モードを有するか、あるいは部位特異性方法で結合するように操作することができる。いくつかの抗リガンドは必要に応じて部位特異性方法で表面に結合する。例えば、オリゴヌクレオチドを1つの末端に結合させることができる。一般に、抗リガンドの機能を損なわない方法で、例えば、好ましくは表面変性を最小とする濃度で、抗リガンドを取付ける。

【0098】

結合表面上の抗リガンドの濃度は、特定の被検体に依存して、変化するであろう。例えば、タンパク質について典型的な濃度は、 $10^7 / \text{cm}^2$ 、 $10^8 / \text{cm}^2$ 、 $10^9 / \text{cm}^2$

m^2 、 $10^{10}/\text{cm}^2$ 、 $10^{11}/\text{cm}^2$ 、 $10^{12}/\text{cm}^2$ 、 $10^{13}/\text{cm}^2$ 、 $10^{14}/\text{cm}^2$ 、 $10^{15}/\text{cm}^2$ 、またはそれらの間の範囲内の濃度である。核酸について典型的な濃度は、 $10^7/\text{cm}^2$ 、 $10^8/\text{cm}^2$ 、 $10^9/\text{cm}^2$ 、 $10^{10}/\text{cm}^2$ 、 $10^{11}/\text{cm}^2$ 、 $10^{12}/\text{cm}^2$ 、 $10^{13}/\text{cm}^2$ 、 $10^{14}/\text{cm}^2$ 、 $10^{15}/\text{cm}^2$ 、 $10^{16}/\text{cm}^2$ 、 $10^{17}/\text{cm}^2$ 、 $10^{18}/\text{cm}^2$ 、 $10^{19}/\text{cm}^2$ 、 $10^{20}/\text{cm}^2$ 、またはそれらの間の範囲内の濃度である。全血中の被検体について典型的な濃度は、 55M 、 25M 、 10M 、 1M 、 0.5M 、 10^{-1}M 、 10^{-2}M 、 10^{-3}M 、 10^{-4}M 、 10^{-5}M 、 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 、 10^{-12}M 、 10^{-13}M 、 10^{-14}M 、 10^{-15}M 、 10^{-16}M 、 10^{-17}M 、 10^{-18}M 、またはそれらの間の範囲内の濃度である。

【0099】

バイオ - 電気的インターフェースを通る信号の伝送を変更するために十分なりガンドがMBR内で付着すべきである。結合表面に付着するリガンドの量は、 1 、 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、またはそれより多いリガンド、ならびに導電性層の表面積に依存してそれらの間の任意の数から成ることができる。リガンドは導電性層に沿って前もって定めた範囲に適用する必要がない。なぜなら、バイオアッセイ装置またはチップ上の配置とは異なりMBRの固有の誘電性により信号の応答は決定されるからである。MBRは一般に $10^{10}\text{cm}^2 \sim 10^{24}\text{cm}^2$ 、典型的には $10^{15}\text{cm}^2 \sim 10^{20}\text{cm}^2$ の範囲の小分子のための表面密度を有するであろう。リガンド層は1層程度に薄くあることができるが、 2 、 3 、 4 、 5 または 10 またはそれより多い層を必要に応じて使用する。

【0100】

いったんリガンドが導電性層に結合されると、システムの化学および / または構造的生物学は働くようになる。リガンドの誘電性は1またはそれ以上の結合した構造物の特徴を示す信号応答を生じ、これにより結合事象の検出、ならびに構造物中の注目の他の性質の検出が可能となる。結合事象により提供される独特の応答は、固定化された抗リガンド、そのターゲットリガンド、および近くの溶液分子（例えば、水および遊離イオン）の転移に依存するであろう。表面に結合する分子の範囲は下記のものを包含するが、これらに限定されない：タンパク質、核酸、小分子、サッカリド、脂質、および注目の任意の他の分子。

【0101】

典型的には、MBRの分子は溶液の中に配置される。溶液は、水、d-PBS、Tris、血液、生理緩衝液、脳脊髄液、尿、汗、唾液、他の体分泌物、有機溶媒、およびその他の水溶液から成ることができる。他の溶液は、気体、乳濁液、ゲル、および有機および無機の化合物を包含することができる。

【0102】

バイオアッセイ装置のMBRにおいて、二次結合反応が起こる。溶液中のリガンドはバイオアッセイ装置を横断し、こうしてリガンドは結合層の抗リガンドと接触する。溶液中のリガンドの濃度は様々であってよく、 $10^{-1}M$ 、 $10^{-2}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $10^{-13}M$ 、 $10^{-14}M$ 、 $10^{-15}M$ 、 $10^{-16}M$ 、 $10^{-17}M$ 、 $10^{-18}M$ 、 $10^{-19}M$ 、 $10^{-20}M$ から成ることができる。相互作用、例えば、結合がリガンドと抗リガンドとの間で起こるとき、リガンドは、結合事象の化学的平衡特性により支配されるように、次いで必要に応じて結合層の一部分となる。

【0103】

MBRは結合したリガンドを含み、また、溶液分子を含むことができる。結合したリガンドは、タンパク質、炭水化物、脂肪、核酸、および本明細書に記載するすべての他の分子を包含する任意の分子であることができる。さらに、MBRは結合性表面層への抗リガンドの結合を促進するリンカーを含むことができる。

【0104】

さらに、抗リガンドとリガンドとに相互作用は、結合した抗リガンドのみを有する結合層の特徴的な誘電応答を変化させる。例えば、抗リガンドAが結合層を形成する抗リガンドである場合、伝送ラインに沿って伝搬する試験信号の誘電応答は抗リガンドAの構造の特性を反映する。リガンドBが抗リガンドAに結合するとき、BへのAの結合のために結合層の構造および/または誘電性は変化するであろう。BがAに結合するとき、Aの構造は変化し、異なる信号応答を提供することがある。結合相互作用による信号の変化はBへのAの結合の特徴を示すであろう。したがって、結合相互作用の存在は信号の変化から決定することができる。

【0105】

そのうえ、結合または構造のタイプおよび/または結合時のコンフォメーショ

ンの変化についての情報は、相互作用のために信号応答のどの部分が変化したを注目することによって得られる。リガンドBが抗リガンドAに結合するときの信号の変化により、リガンドBを必要に応じて検出し、同定する。抗リガンドAへのリガンドBの結合は、抗リガンドAおよびその環境における、コンフォメーションの変化、または分子構造または取り囲む溶液の変化を誘導する。これらの変化はMBRの誘電性を変更し、これにより信号通路に沿って伝搬する試験信号の信号応答を変更する。試験信号の変化を使用してリガンドBの結合事象を検出することができ、そして変化の詳細を使用してリガンドBを同定することができる。分子の構造と機能との間の関係が、例えば、酵素、抗体、レセプターおよびその他の場合において、既知であるかぎり、結合したリガンドの機能をその構造の同定から推定することができる。

【0106】

1つの態様において、1つのタイプの抗リガンドを結合表面に適用してMBRを形成し、MBRにわたってリガンドを適用して、2つの分子間の結合事象を検出する。例えば、抗リガンドはターゲットタンパク質であり、そしてリガンドは種々の分子の任意のもの、例えば、ライブラリーからの分子、ホルモン、核酸、およびその他であることができる。他の態様において、抗リガンドは混合物であることができ、そして結合層にわたって適用するリガンドは既知被検体である。信号応答の特異的变化を検出することによって、リガンドまたは抗リガンドにおいて誘導されたコンフォメーションおよび他の変化、およびそれらから生ずるスペクトル応答のために、抗リガンドが相互作用した特定リガンドを決定することができる。このような態様は特定の抗リガンドの各々の空間的単離を必要とせず、むしろスペクトル応答から所望レベルの特異性を誘導するので、アッセイのどの部分に結合事象が起こるかを注目するよりむしろ電磁的応答を見ることによって、所定の結合相互作用が決定される。

【0107】

他の態様において、抗リガンドは結合層上の既知分子であることができ、そしてリガンドは未知分子の混合物としてバイオアッセイ装置にわたって適用することができる。これに関して、信号をバイオアッセイ装置に通過させることから生

するスペクトル中の特定のピークおよび信号の存在または非存在により、特定リガンドの存在は検出される。あるいは、リガンドが結合するときの抗リガンドまたはリガンドのスペクトルの変化により、リガンドを検出することができる。信号は結合事象の特質についての情報を含有するので、このような態様は結合化学単独のそれよりも検出の特異性を増加させる。こうして、特異的結合は非特異的結合と区別することができ、そして化学単独の特異性を超えて検出の全体の特異性を大きく改良することができる。

【0108】

バイオアッセイ装置を使用して形成される検出システムは、検出を必要に応じて実時間で実施しつつ多数の試料をすばやく分析することができる、ハイスクループット検出システムを提供する。応答期間は必要に応じてナノセカンドの時間目盛りでモニターされる。分子が互いに結合するとすぐに、検出を行う。低い濃度を測定するか、あるいは低い結合アフィニティーを有する分子間の結合事象を測定するために、より多くの時間を必要とすることがある。実際の時間は拡散速度により制限されることがある。これらの潜在的制限以外に、数千の分子を必要に応じて非常に迅速に、例えば、1時間でシステムを通して走行させる。例えば、チップ製作技術を使用して、10,000チャンネルのデバイス（出現するミクロ流体技術のいくつかを使用する）が可能であり、小さい体積、それ故短い拡散時間、および反応の初期のみを測定する反応速度論的測定を使用して、 1×10^7 試料/時を必要に応じて測定する。既知濃度を使用して、結合アフィニティーを必要に応じて反応速度論から計算し、こうしてデバイスを非常に速い時間目盛りでプロービングすることができ、そして反応速度論的曲線の勾配からアフィニティーを計算しあり／または推定することができる。反応速度論およびアフィニティーについての論及は標準的生化学および化学のテキスト、例えば、下記の文献において見出すことができる：Mathewsおよびvan Holde、Biochemistry、Benjamin Cummings、New York、1990。

【0109】

C. バイオ - 電気的インターフェース

バイオ - 電気的インターフェースは、MBRおよび信号通路がそれに沿って形成

されている構造物である。前述したように、信号通路はこの分野において知られている導電性または誘電性導波管構造物、2導体構造物、例えば、慣用信号 / 接地平面構造物、または3またはそれより多い導体構造物から成ることができる。

一般に、信号通路の導電性領域の厚さは最小信号損失を提供するように設計される。例えば、金伝送ラインの典型的な厚さは $0.1 \sim 1000 \mu\text{m}$ 程度、好ましくは約 $1 \sim 10 \mu\text{m}$ である。

【0110】

信号通路はMBRに対して非直角である方向に沿って形成される。1つの態様において、試験信号はMBRが形成された表面上の接線に対して並列に伝搬する。他の態様において、試験信号はMBR結合表面に関して $\pm 1^\circ$ 、 $\pm 2^\circ$ 、 $\pm 3^\circ$ 、 $\pm 4^\circ$ 、 $\pm 5^\circ$ 、 $\pm 10^\circ$ 、 $\pm 15^\circ$ 、 $\pm 20^\circ$ 、 $\pm 30^\circ$ 、 $\pm 40^\circ$ 、 $\pm 45^\circ$ 、 $\pm 50^\circ$ 、 $\pm 60^\circ$ 、 $\pm 70^\circ$ 、 $\pm 80^\circ$ 、または $\pm 85^\circ$ 、またはそれらの間の範囲の任意の角度で伝搬する。第1態様において、信号通路は2導体構造物中の伝送ラインから成り、そして信号通路の方向は電磁の分野において知られているポインティング (Poynting) ベクターにより定められる。第2態様において、伝送ラインはバイオ - 電気的インターフェース領域に沿って連続的に延びる導電性領域または層から成ることができる。第3態様において、信号通路は所望の操作周波数範囲にわたってバイオ - 電気的インターフェースに沿って最小の信号損失を有する通路として定義することができる。第4態様において、信号通路は 3mhos/m より大きい交流導電率を有する、すなわち、塩類溶液のそれより大きい、例えば、 5mhos/m より大きいが、理想的には $100 \sim 1000\text{mhos/m}$ およびそれより大きい範囲の導電率を有するとして定義することができる。

【0111】

こうして、本発明のある種の方法は、リガンドまたは抗リガンド、例えば、タンパク質が信号通路にカップリングされるように、それを配置することを含む。このような方法において、信号通路に沿って伝送される信号は、例えば、1つの電気的接触から他の電気的接触に、溶液を通過する必要はない。これは重要である。なぜなら、いっそ詳しく述べるように、水溶液は水を通過する電磁信号を有意に減衰し、これによりこのような方法の感度を大きく減少させるからであ

る。

【0112】

バイオ - 電気的インターフェース領域は、所望の試験周波数における電磁信号の伝搬を支持するように設計された信号通路から成る。多数の構成が可能であり、1つの例はDCおよび110GHzの間で操作可能なスパッタード金伝送ラインである。他の態様において、信号通路は誘電媒体、例えば、MBRそれ自体から成る。この態様において、信号通路はDC電圧および電流をブロックするが、そうでなければ、例えば、下記の周波数において発生する所望の試験信号の伝搬を支持する：1MHz、5MHz、10MHz、20MHz、45MHz、80MHz、100MHz、250MHz、500MHz、750MHz、1GHz、2.5GHz、5GHz、7.5GHz、10GHz、12GHz、18GHz、20GHz、22GHz、24GHz、26GHz、30GHz、33GHz、40GHz、44GHz、50GHz、80GHz、96GHz、100GHz、500GHz、1000GHz、またはそれらの間の範囲の周波数。したがって、この分野において知られている高周波数回路設計技術を使用して信号通路を設計する。このような設計技術は、信号通路を相互に接続する構造物に整合させ、信号通路の挿入損失を最小にし、そして信号通路の電圧定常波比（VSWR）を最小にするインピーダンスを含む。本発明の好ましい態様において、信号通路およびMBRは非直角に向いている。

【0113】

本発明は、信号通路に取付けられた予測された大きさおよび構造の分子の検出に限定されない。MBRは、信号通路に取付けられているか、あるいはそれから分離しているが、信号通路にカップリングされた1、2、3、4、5、10、20、30、50、100、1000通り、またはそれ以上の分子長さから成ることができる。さらに、MBRは均質分子の複数層、単一であるが不均質の分子層、または複数の不均質分子層から成ることができる。

【0114】

バイオ - 電気的インターフェースの操作に関する追加の詳細は、同時継続中の、普通に所有された米国特許出願第09/243,194号、1999年2月1日提出（前に引用することによって本明細書の一部とされた）に記載されている。

IV. 測定法

A. 一般的外観

本発明の測定法において、非常に大きい数の分子は分散効果、共鳴効果、および分子を取り囲む溶液に対する効果を包含する、それらの独特の誘電性に基づいて互いに区別可能であるという観察を使用する。本発明において、試験信号がMBRにカップリングするとき、MBRは試験信号のエネルギーと相互作用し、独特の信号応答を生ずる。次いで独特の信号応答を使用して、MBRを構成する分子を検出し、同定することができる。

【0115】

当業者は理解するように、大部分の分子は異なる周波数にわたって誘電性の変動を示す。例えば、分子は電磁スペクトルの1またはそれ以上の領域において周波数の関数としてその誘電性を劇的に変化させることができる。分子が劇的な誘電性変化を示す周波数バンドは、しばしば分子分散レジームと呼ばれる。これらのレジームにわたって、分子の誘電定数、誘電率、双極子および/または多重極モーメント、および感受率は周波数の関数として劇的に変化する。これらの数値はしばしば複雑であり、信号応答において起こる大きさおよび相の変化の両方を説明するために現実および想像の両方の部分を有する。分散レジームは、RF、マイクロ波、ミリメートル波、遠赤外、および赤外周波数を包含する、種々の周波数にわたる範囲である。

【0116】

分子の誘電性は、試験信号を分子にカップリングさせ、生ずる信号を観測することによって観測することができる。試験信号は分子分散レジーム内の周波数、特に共鳴周波数において分子を励起するとき、分子は信号と強く相互作用し、生ずる信号は測定した振幅および相の劇的変動を示し、これにより独特の信号応答を発生する。この応答を使用して、結合した分子構造物を検出し、同定することができる。さらに、大部分の分子は同一または異なる周波数帯域にわたって異なる分散性を示すので、各分子は独特の信号応答を示し、これを用いて分子構造物を同定することができる。

【0117】

分子結合事象の検出および同定は、分子レベルにおいて誘電性を検出し、測定

することによって達成することができる。分子レベルにおける誘電性は分子の多重極モーメントにより定義することができ、この分野において知られているように、そのポテンシャルエネルギーは無限級数として表すことができる：

【0118】

【数1】

$$\Phi(\mathbf{x}) = \frac{q}{r} + \frac{\mathbf{p} \cdot \mathbf{x}}{r^3} + \frac{1}{2} \sum_{i,j} Q_{ij} \frac{x_i x_j}{r^5} + \dots$$

【0119】

無限級数は多項から成り、各項は電場、磁場または電磁場の存在下に分子の誘電性を変化する程度で記載する。第1項は単極子モーメントと呼ばれ、分子上の全電荷から発生する静電ポテンシャルエネルギーのスカラー量を表す。第2項または「双極子モーメント」はベクトル量であり、3自由度から成る。第3項または「四重極モーメント」は順位 - 2テンソルであり、9自由度にわたる分子の応答を記載する。一般に、N番目の項は 3^{N-1} 自由度を有する順位N - 1のテンソルであるが、対称性は自由度の総数を減少することがある。理解できるように、より高い次数のモーメントは分子の誘電性についてより大きい詳細を提供し、こうしてより多い分子の独特的な誘電サインを明らかにする。ポテンシャルの勾配は電場を生ずるので：

$$\mathbf{E} = - \nabla \Phi (\mathbf{x})$$

より高い次数のモーメントは距離の関数として急速に減じ、こうしてそれらの寄与は測定が困難となる。例えば、双極子モーメントによる場は r^{-3} として減じ、そして四重極モーメントによる場は r^{-4} として減じる。こうして、このアプローチは結合性分子と試験信号通路との間の密接な近接性およびそれらの間の低い信号損失を必要とする。分子結合事象の検出が信号吸収性の強い溶液、例えば、全血試料またはイオン溶液中で起こることがしばしばあるので、結合事象と信号通路との間の信号損失は非常に高くなり、より高い次数のモーメントの検出は非常に困難となる。

【0120】

さらに、各多重極の項は異なる様で電場にカップリングする。これは所定の静電システムのエネルギーを最初に調べることによって証明される：

【0121】

【数2】

$$W = \int \rho(\mathbf{x}) \Phi(\mathbf{x}) d^3x$$

【0122】

テイラー級数において静電ポテンシャルを展開すると、下記が得られる：

【0123】

【数3】

$$\Phi(\mathbf{x}) = \Phi(\mathbf{0}) + \mathbf{x} \cdot \nabla \Phi(\mathbf{0}) + \frac{1}{2} \sum_i \sum_j x_i x_j \frac{\partial^3 \Phi(0)}{\partial x_i \partial x_j}$$

【0124】

$E = -$ (x) であるので、

【0125】

【数4】

$$\Phi(\mathbf{x}) = \Phi(\mathbf{0}) - \mathbf{x} \cdot \mathbf{E}(0) - \frac{1}{2} \sum_i \sum_j x_i x_j \frac{\partial E_j}{\partial x_i}$$

【0126】

さらに、外部場について、 $\cdot E = 0$ であるので、下記が得られる：

【0127】

【数5】

$$\Phi(\mathbf{x}) = \Phi(0) - \mathbf{x} \cdot \mathbf{E}(0) - \frac{1}{6} \sum_i \sum_j (3x_i x_j - r^2 \delta_{ij}) \frac{\partial E_j}{\partial x_i}$$

【0128】

これを上で得られたエネルギーの方程式の中に挿入し戻すと、下記の方程式が生ずる：

【0129】

【数6】

$$W = q\Phi(0) - \mathbf{p} \cdot \mathbf{E}(0) - \frac{1}{6} \sum_i \sum_j Q_{ij} \frac{\partial E_j}{\partial x_i}$$

【0130】

これは各多重極項が問合せ場と相互作用する方法を示す：全電荷qはポテンシャルと、双極子pは電場と、四重極Q_{ij}は電場の勾配と相互作用する、およびその他。これはより高次の多重極モーメントの検出の第2の困難性を例示する：大量の試料において、より高い次数のモーメントにカップリングさせるために十分な場の勾配を達成することは困難である。

【0131】

本発明は、記載したバイオ-電気的インターフェースを供給することによって、前述の障害を克服する。このインターフェースは、信号通路に沿ってカップリングされたMBRを包含する。MBRは非常に薄い、高度に不均質な層（誘電的観点から）から成り、こうして電磁的にプロビングする構造物に対する必要な近接性ならびにより高い次数のモーメントにカップリングさせるために十分な場の勾配を提供する。これらの量は、分子の誘電性の大きく増強された見解を提供する、より高い次数のモーメントの検出を可能とする。信号平面および/または接地平面に対してMBRを近接させて配置すると、その上を伝搬される信号が溶液中に吸収されるのを防止するように隔離し、これにより信号損失は減少し、より高い試

験周波数の使用が可能となり、結合事象を精確に検出し、同定することができる。このようにして、本発明は、分子の双極子および他のより高度の多重極モーメントに由来する因子を包含する信号応答の回収をより大きい程度に可能とする。

【0135】

溶液中の分子の双極子、四重極、およびより高次の多重極モーメントを検出し、測定する能力は、多数の理由でこの分野における有意な進歩を表す。第1に、注目の生物医学の多数の分子、例えば、タンパク質は非常に独特な構造を有し、したがって独特的多重極モーメントを有する。こうして所定の分子についての多重極モーメントの同定は独特である前記分子の性質を明らかにし、こうして前記分子の同定を可能とする。第2に、生物医学的関連性を有する多数の分子、例えば、タンパク質において、構造および因子は緊密に関係する。こうして、所定の分子の機能に直接関係する前記分子の性質を検出する能力は、活性の全範囲について機能性をモニターできることを意味する。第3に、局所的生理学的環境は所定の分子の構造および機能において重要な役割を演ずるので、前述の物理的性質を検出する能力は、所定のシステムにおける変化を測定する目的のモニターまたはプローブとして分子を使用できることを意味する。こうして、分子および細胞のシステムについての複雑な、情報を与える性質を検出可能な電子的データのフォーマットに翻訳する能力を使用すると、非常に多数の新しい可能性が本明細書に論ずる領域において発生する。

【0136】

B. 結合した分子構造物の検出

本明細書に記載するバイオアッセイ装置は、信号通路に沿って起こる分子結合事象の検出を可能とする。検出可能な結合事象は、一次、二次、およびより高い次数の結合事象を包含する。例えば、既存するMBRをもたない2導体バイオ-電気的インターフェースにおいて、導電性層の分子はリガンドに結合させる抗リガンドを形成し、リガンドはMBRを形成する。他の態様において、抗リガンドおよびリガンドの両方をMBRの中に含める。この態様において、第1D図に示すように、リンカー、マトリックス分子、絶縁層または各々の組合わせを介してMBRを信号通路の表面に取付ける。

【0137】

第4A図はこのプロセスの1つの態様を図解する。最初に工程602において、操作の所望の周波数にわたって信号の伝搬を支持することができる材料から、MBRを形成する。信号通路は、本明細書に記載するバイオアッセイ装置の1つ内の、単一ポートの通路、2つのポートの通路、または複数のポートの通路から成ることができる。さらに、信号通路は伝送ライン、共鳴空洞、または導波管構造物として実現することができる。

【0138】

次に工程604において、主題の分子または分子構造物を含有する溶液を準備する。工程606において、リガンドから成るMBRを溶液から形成し、信号通路の少なくとも一部分と溶液との間にカップリングさせる。次に608において、信号通路に沿って試験信号を伝搬させる。あるいは、結合事象の結果として起こる信号応答を実時間で観測するために、溶液を適用する間に試験信号を発射することができる。工程610において、試験信号はMBRにわたって伝搬し、MBRにカップリングし、リガンドの存在を示す信号応答を発生する。次に工程612および614において、試験信号を回収し、その存在はリガンドの検出を示す。

【0139】

MBRの誘電性はある数の信号応答を誘導することに寄与し、信号応答の各々は分子結合を示すことができる。例えば、MBRの分散特性は周波数を著しく変えうる。この場合、分子結合事象が結合表面に沿って起こるとき、試験信号応答は周波数にわたって振幅および/または相の応答の大きい変化を示し、これにより結合表面に沿って分子結合事象を検出する手段を提供する。

【0140】

他の態様において、MBRの誘電緩和性は入力信号のパルス期間の関数として変化するであろう。この場合において、試験信号応答は、特定のパルス期間またはその付近での、吸収された力の値の変化、または試験信号のいくつかの他のパラメーター、例えば、相または振幅の変化を示すであろう。吸収された力または他のパラメーターの変化を観測することによって、結合表面伝いの結合事象を検出することができる。他の量、例えば、特性インピーダンス、伝搬速度、振幅、相

、分散、損失、誘電率、感受率、周波数、および誘電定数はまた分子結合事象の可能なインジケーターである。

【0141】

前述の方法を使用して、信号通路に沿って直接的または間接的に抗リガンドまたはリガンドの一次結合を検出することができる。同様に、第4A図のプロセスをまた使用して、抗リガンドに対するリガンドの二次結合を検出することができる。第4A図の方法は、信号通路に沿って起こる一次または二次結合事象の検出に限定されない。事実、信号通路に沿ってまたは溶液中に懸濁させて起こる三次、およびより高い次数の結合事象をまたこの方法により検出することができる。

【0142】

第4B図は、信号通路に沿って起こる二次およびより高い次数の結合事象を検出する第2プロセスを図解する。最初に工程620において、一次結合事象を検出し、信号応答を測定し、その1つの態様を工程602～612に示す。引き続いて工程622において、一次結合事象の信号応答を記憶し、基底応答として使用する。次に工程624において、第2分子溶液をバイオアッセイ装置に添加し、結合表面にわたって循環させる。次に工程626において、第4A図の工程608～612を反復して第2信号応答を得る。次に工程628において、第2信号応答および基底応答を比較する。変化がほとんど、あるいはまったくないことは、2つの信号応答が非常に近くMBRの構造的または誘電的性質が新たな溶液中への分子の添加によって変化されなかったことを示す。この場合において、二次結合は有意な程度に起らなかった（工程630）。比較が前もって決定された範囲外の変化をもたらすなら、MBRの構造および/または誘電性は変更されており、これにより二次結合事象を示す（工程632）。二次結合事象を示すために使用できる量は、前述の量、例えば、振幅、相、周波数、分散、損失、誘電率、感受率、インピーダンス、伝搬速度、誘電定数ならびに他の因子に匹敵することを示す。三次またはより高い次数の結合事象をこのアプローチにより検出することができる。

【0143】

二次またはより高い次数の結合事象を検出する別法は、特定の一次結合事象の事前知識を必要としない。この態様において、アッセイ開発段階において既知パ

ラメーターが取り扱われるようにバイオアッセイ装置を設計し、こうしてこれらのパラメーターのいずれかにおける前もって定めた変化が例えば使用時点において検出されたなら、1またはそれ以上の結合事象が起こったことがわかるようになる。この態様において、一次特性決定が製作時または設計時に既に実施されているので、一次結合事象を前もって測定すること不必要である。

【0144】

また、一次結合分子の構造の変化を検出することによって、二次結合事象を達成することができる。分子が結合すると、分子はその非結合状態と比べコンフォメーションの変化および分子構造の他の変化を伴う。これらの変化は一次結合性分子の誘電性に影響を与え、そして取り囲む溶液の中に変化を誘導し、これらの変動は前述の第4B図の工程620～628により検出することができる。一次結合した分子の誘電性の変化を示すためにモニターできる量は、前述の量、例えば、振幅、相、周波数、分散、損失、誘電率、感受率、インピーダンス、伝搬速度、誘電定数ならびに他の因子を包含する。

【0145】

C. 分子結合層の誘電性の変化の検出

また、本明細書に記載するバイオアッセイ装置を使用して、温度、pH、イオン強度およびその他の生ずる変化として、MBRの誘電性の変化を測定することができる。

【0146】

第4C図はこのプロセスの典型的な態様を図解する。このプロセスは結合事象を同定する開示した方法に密接に匹敵し、例外はこの方法はMBRの誘電性の変化を検出し、定量できることである。

【0147】

このプロセスは工程641において開始し、初期誘電性を有する溶液をバイオアッセイ装置に添加するとき、信号応答を測定し、記録する。1つの態様において、この工程は工程602～612に従い実行される。前もって決定された時間または操作後、再び工程602～612に従う他の態様において、第2測定を実施し、第2信号応答を記録する（工程642）。工程643後、比較を第1信号と第2信号との間で実施し

て、前もって定めた範囲内で2つの信号が相関するかどうかを決定する。そのような場合において、溶液の性質は誘電性を変化させなかったと見なす（工程644）。

【0148】

信号応答が前もって定めた範囲内で相関しない場合、溶液の1またはそれ以上の誘電性は変化しなかったものと見なす（工程645）。必要に応じて、誘電性の変化は下記の方法で定量することができる。工程646において、第2信号を記憶し、既知信号応答に相関させる。最も密接に相関した応答は溶液の誘電性を特定し、第1信号応答を誘電性の初期値に相関させることができ、それらの差を使用して、特定された誘電性の変更された量を決定することができる（工程647）。

【0149】

D. 結合した分子構造物の同定

記載したバイオアッセイ装置を使用して、既知リガンドを特性決定し、引き続き未知のリガンド組成を有する溶液中でそれを同定することができる。第4D図はこのプロセスの1つの態様を図解する。最初に工程652において、下記の通りにして、1またはそれ以上の測定システムを使用して、多数の分子構造物を測定し、それらの応答を記憶する。1つの態様において、この工程を工程602～612に従い実行する。各記憶した応答は、溶液の中に存在する単一リガンドまたは同一溶液の中に存在する複数のリガンドに対応することがある。引き続いて工程654において、未知溶液について測定を行う。1つの態様において、この工程を工程602～612に従い実行する。次に工程656において、溶液の信号応答を記憶された信号応答と比較して、それとの相関の程度を決定する。工程658において、未知応答に対して最も密接な相関を示す記憶された応答を選択することによって、未知分子構造物を同定する。1またはそれ以上のデータ点を使用する比較を実行して、1またはそれ以上の記憶された応答間の相関を決定する。この比較はパターン認識ソフトウェアまたは同様な手段を使用して相関を決定することを含む。このプロセスを使用して、一次、二次またはより高い次数の結合した分子構造物を同定することができる。

【0150】

E. 結合した分子構造物のクラスの同定

また、既知分子の下位構造、例えば、タンパク質の同様なクラスまたは核酸中の配列相同性に対して共通するドメインまたは他の構造的相同性を特性決定することが可能である。1つの態様において、このプロセスは第4D図に示すように進行するが、ただし工程652において、N数の分子下位構造を測定し、それらの応答を記憶させる。各記憶した信号応答を1またはそれ以上の下位構造に対応させることができる。十分な数の構造が検出されかつ特性決定されて未知化合物が同定されるまで、このプロセスは工程654、656および658において記載するように連続する。十分な数の相関ができたなら、未知分子構造物を分類することが可能である。

【0151】

第4E図は、未知リガンドを分類できる他のプロセスを図解する。このプロセスは、未知化合物上の構造モチーフに対する結合を検出することによって、未知リガンドを同定する。最初に、工程660において、複数のアドレス可能なアレイを有するバイオアッセイ装置を準備し、アレイの各々は特定のリガンド下位構造物に対する抗リガンドを有する。次に工程662において、特定構造物の各々がそれぞれの抗リガンドに結合すること、および引き続く特性決定により、特定構造物の存在は検出される。1つの態様において、この工程は工程602～612に従い実行される。引き続いて工程664において、量、例えば、アフィニティー、反応速度論、およびスペクトルの応答を同定することによって、結合事象の各々を特性決定する。工程666において、既知応答と未知応答との間で相関を行う。未知応答の各々が既知応答に対して相関するとき、リガンドは既知応答に対応するリガンドとして同定される。下位構造物が相関された応答および非相関応答の両方を示す場合、相関された応答を使用して、未知リガンドのいっそう一般的な分類を構築することができる。このプロセスを使用して、同一クラス内の存在するか、あるいは再生構造的相同性を有する、任意の分子構造物、例えば、タンパク質を同定することができる。

【0152】

また、既知構造物と比較するとき、所定の未知化合物の集中的スペクトル解析

は構造および機能に対する洞察に導くことができ、そして外挿はあるレベルの分類に導くであろう。

【0153】

F. 特異的vs非特異的結合

結合事象のスペクトルの「サイン」または「プロファイル」により、特異的リガンド結合は非特異的リガンド結合と区別される。注目のリガンドとMBR上の前記リガンドに対して特異的な抗リガンドだけを含有する精製された溶液中で、注目の所定の結合事象、例えば、抗原に対する抗体の結合を最初に特性決定することができる。次いで広いスペクトル研究を実施して、スペクトルの中に最も強い応答が見出されるときを見る。次いで複雑な用途において典型的には見出される溶液、例えば、全血中で、このアッセイを反復して、応答に対する非特異的結合の効果が何であるかを決定する。次いで特異的結合を決定する種々の点が見出され、非特異的結合を決定する別の組の点が見出され、そしてこれらの周波数点のサブセットを実際のアッセイ用途のために選択する。特異的結合に基づく応答を非特異的結合に基づく応答と比較することによって、特異的結合の程度を決定することができる。

【0154】

G. 所定のリガンドの特性決定

ある量の所定の分子を決定することはしばしば望ましい。例はタンパク質が属するクラスを決定することを包含する。これは多数の方法で実施することができる。

【0155】

所定の分子の誘電性が前記分子の電荷分布のジオメトリーにより完全に決定され、さらに大部分のタンパク質が独特の構造またはジオメトリーを有するとすると、各タンパク質の誘電性を測定することによって各タンパク質をユニークに決定することができる。こうして簡単な誘電性サイン、例えば、本発明により発生されたものは所定のタンパク質をユニークに同定する働きをし、さらに、タンパク質のいくつかの以前に知られているクラスへのタンパク質の分類を可能とする。

【0156】

所定のタンパク質の特定下位構造物に対して特異的である、バイオアッセイ装置上の抗リガンドのグループを使用することによって、分類法をさらに改良することができる。例えば、特定下位構造物、例えば、ドメインに対して特異的である抗体のグループを利用して、前記下位構造物の存在または非存在を決定することができる。こうして、ある種の下位構造物の存在および非存在ならびにタンパク質それ自体の誘電性の両方を決定することによって、任意の所定のタンパク質を特性決定することができる。この分類法に対するそれ以上の改良は、温度、pH、イオン強度、ならびに前述の性質に対する他の環境の作用の検査を包含することができる。

【0157】

同様な方法において、薬剤 - レセプターの相互作用を特性決定して、所定の結合事象の特質、例えば、所定の相互作用がオン・オフされるレセプターをもたらすか（すなわち、薬剤がアゴニストまたはアンタゴニストとして作用するか）、いくつかの部分的アゴニストおよび／またはアンタゴニストの作用をもたらすか、またはいくつかの他の形態のアロステリック作用または非特異的結合をもたらすかどうかを決定することができる。例えば、所定のレセプターを抗リガンドとして使用し、そして既知アゴニストを第1リガンドとして使用することができる。次いで誘電応答に従い相互作用を特性決定し、そしてこの応答を保存しておく。引き続いて、次いで薬剤候補についてスクリーニングされる化合物を前記レセプターとの結合特性に関して観測する。かくして、結合しつつ同様な誘電応答を生ずる分子は、既知アゴニストと同様な作用をレセプターに対し有することがわかり、したがってアゴニストである非常に高い確率を有するであろう。このパラダイムは注目のターゲット - レセプターの結合事象の任意のタイプを事実上特性決定するために使用ことができ、そして結合事象が起こるか否かのみを決定する現在の検出方法を越えた、有意な改良を表す。

【0158】

所定の薬剤レセプター（例えば、オーファンレセプター）について有効な既知アフィニティーリガンドが存在しない場合、同様な構造的相同性を有するシステ

ムにおいて、前記レセプターに対する未知リガンドの応答を薬剤 - レセプターの結合事象と比較することができる。例えば、Gタンパク質のカップリングされたレセプターは同様な構造的特徴および応答を有するレセプターの大きいクラスを包含するので、このようなクラスのオーファンレセプターをよりよく理解されたGタンパク質のカップリングされたレセプターシステムと比較して、所定の結合事象の特質に関して決定することができる。当業者は容易に理解するように、本発明を適用できる多数の他の結合事象のクラスが存在する。

【0159】

タンパク質の同一または類似するクラスにおいて見出される構造的相同性、または特定の下位構造の数およびタイプにより、タンパク質はしばしば分類される。例えば、細胞膜の中に普通に見出されかつ細胞外環境と細胞内環境との間の信号トランスダクション経路を仲介するGタンパク質は、細胞膜を数回横切る構造を常に有する。このような構造はGタンパク質の事実上の決定因子である。タンパク質の他のクラスは同様な構造的相同性を有し、これらの相同性に基づいてタンパク質の1つのクラスを他のクラスと区別することができる方法は、それ自体、多数の生物医学的研究分野において極めて多くの用途を有する。

【0160】

前述の方法において使用できる下位構造の例は下記のものを包含する：タンパク質の二次および三元構造、例えば、ヘリックス、シート、三重ヘリックス、ドメイン、バレル構造、ターン、および第四級構造の中に見出される種々の対称基、例えば、 C_2 対称性、 C_3 対称性、 C_4 対称性、 D_2 対称性、立方体対称性、および二十面体対称性。（G. Rose (1979)、Heirarchic Organization of Domains in Globular Proteins、J. Mol. Biol. 134 : 447 - 470）。

【0161】

H. 濃度の定量

また、本明細書に記載するバイオアッセイ装置は、リガンド濃度を定量するために使用することができる。第4F図はこのプロセスの1つの態様を図解する。装置が前もって較正されていない（工程679）場合において、最初に工程670において、測定した被検体について適当な結合性質、例えば、結合アフィニティーまた

は反応速度を有する抗リガンドを選択する。抗リガンドの平衡化定数がその線形作用範囲の中心付近にあるように、これらの性質を選択する。単一抗リガンドを使用するために濃度範囲が広過ぎる用途のために、異なるアフィニティーおよび／または線形作用範囲を有するいくつかの抗リガンドを使用し、これにより非常に広い範囲にわたる濃度値を生ずることができる。

【0162】

次に工程672において、抗リガンドをバイオアッセイ装置またはチップに取付け、そして工程673において、装置を測定システムに接続する。工程674において、応答が最大特異性についての特性決定を必要とするかどうかに関して決定を行う。そうである場合、スペクトル解析を実行し、ここで被験体結合が最大結合を有する周波数を測定し（工程675a）、非特異的結合が最大作用を有する範囲を測定し（工程675b）、そして被験物結合に基づく固有の応答を測定する（工程675c）。特性決定が不要である場合、または必要である場合、その完結後、装置を較正する。この工程は、1つの態様において、既知濃度のリガンドをバイオアッセイ装置に適用し、生ずる応答を測定することによって実行される（工程676a）。あるいは、較正工程のためのより多くのデータ点を必要とする場合（工程676b）、異なる濃度のサンプルを選び（工程676c）、そしてこの濃度に対する応答を測定することができる（工程676a）。1つの態様において、測定は工程602～612に従い実施する。引き続いて工程677において、前の応答からの較正点を記録することによって、外挿アルゴリズムを発生させる。次に工程678において、未知リガンド濃度の試料を測定する。この方法は、1つの態様において、未知試料をバイオアッセイ装置に供給し（工程678）、そして滴定アルゴリズムに対して応答を相關させ、それからリガンド濃度を決定すること（工程678a）によって達成される。

【0163】

所定のバイオアッセイ装置が前もって較正されているか、あるいは設計により較正されている場合、必要な唯一の工程はリガンドまたは被験体を表面に適用し、応答を測定することである。このようなバイオアッセイ装置は多数の異なる方法で実現することができる。例えば、結合事象が起こるとき、前もって決定した

態様で変化するようにいくつかの回路パラメーター、例えば、共鳴回路のインピーダンスまたは特性周波数をデザインすることができ、そしてこれらのパラメーターによる変化量は用量 - 応答を有するようにさらに設計することができる。こうして、前記回路パラメーターの測定は、適当なアルゴリズムを介して解析するとき、所定の被験体またはリガンドの濃度の定量値を生ずるであろう。

【0164】

I. バイオアッセイ装置の自己較正

記載したバイオアッセイ装置は自己診断能力を有し、こうして使用時点の品質コントロールおよび保証を有する。所定の手の込んだ用途のために、特定の抗リガンド（一次結合種）は溶液中のいくつかの注目のリガンド（二次結合種）の抗リガンドとして作用するであろう。一次結合種は製作時点において取付けができる、そして二次結合種は使用時点において取付けることができる。こうして、製作の変動 - 特に一次種の取付け - は装置のその特異的リガンドに結合する能力を変動させるであろう。しかしながら、結合したリガンドの量は結合した抗リガンドの量に正比例し、こうして2つの比率測定的測定が可能である。

【0165】

第4G図はこのプロセスの1つの態様を図解する。最初に工程680において、適当な抗体を種々の濃度で結合させることによってシグナル通路伝いに分子結合表面を形成し、これらの濃度の各々に対して発生した応答を特性決定し、各濃度についていくつかの値「 x 」を得る。次に、工程682において、リガンドのいくつかの異なる濃度に対する抗体 / リガンド結合の応答を測定することによって同様な滴定曲線をリガンドについてつくり、そしてリガンド滴定曲線を前もって決定する。次に、工程684において、リガンド結合に対する抗体結合の応答の比を取ることによってスケールファクターAを得る。使用時において、非較正アッセイはまずプローピングして（工程686）結合した抗体「 x 」の量を測定し、それからスケールファクター「 y 」を得る。次いでリガンドをアッセイに適用し、応答を測定し（工程689）、応答および前もって決定した滴定曲線をスケールファクター「 y 」により作製して（工程690）未知濃度を測定する。

【0166】

また、溶液中のリガンドを定量できるように第4F図のプロセスを変更することができる。変更において、バイオアッセイ装置の結合表面は前もって定めたアフィニティーおよびリガンド特異性を有する抗リガンドを含む。引き続いて溶液を装置に適用し、応答を測定する。信号応答は結合したリガンドの量に比例するであろう。こうして、適当な線形作用範囲（平衡化定数が検出すべき所望濃度範囲のいくつかの対数単位内である範囲）を有する抗リガンドを選択することによって、任意の所定のリガンドの滴定を実施することができる。前述したのと同一の比率測定的分析を適用して、信頼性を保証するために必要な内部のコントロールおよび較正を有する、耐久力の大きい、正確な定量的アッセイを発生させることができる。

V. 測定システム

前述の方法を実行するために、種々の測定システムを使用することができる。第5図～第8図は可能な測定システムの3つの例を図解する：周波数ドメイン試験システム、時間ドメイン試験システムおよび誘電緩和測定システム。

【0167】

A. 周波数測定システム

第5A図は、本発明による周波数測定システムの1つの態様を図解する。システム800は、バイオアッセイ装置850の入力ポート852にカップリングされた信号源810およびバイオアッセイ装置850の出力ポート858にカップリングされた信号検出器890を包含する。必要に応じて、追加の信号源をバイオアッセイ装置の出力858にカップリングさせ、そして追加の信号検出器をバイオアッセイ装置入力ポート852にカップリングさせて、完全な2ポート測定能力を提供することができる。信号検出器が反射した信号を受取る信号通路にカップリングされている1ポート試験システムに、このシステムを変更することができる。特定の態様において、前述の周波数測定システムはネットワーク分析装置、例えば、ヒューレット・パッカード・カンパニー (Hewlett - Packard Company) からのモデルNo.8510Cから成る。伝送され、反射された信号に基づく信号情報を提供する、他の高周波数測定システム、例えば、スカラーネットワーク分析装置を選択的に使用することができる。

【0168】

測定は前述の方法に従いなされる。最初に、入射信号860を試験回路に向けて発射し、伝送された信号870並びに / または反射された信号870および880それを引き続いて回収する。生ずる信号応答は独特の周波数応答または「スペクトルサイン」の形態を取り、それらの2つの例は第5B図および第5C図に示されている。第5B図は、共鳴が周波数 f_{res} において起こる、周波数応答の1つのタイプを図解する。ここで、応答870は急低下または急上昇し、信号エネルギーがこの周波数において出力ポートにほとんど、あるいはまったく到達しないことを示す。周波数 f_{start} から周波数 f_{stop} にわたって変化するMBRの誘電性およびインピーダンスにより、共鳴が発生する。異なるリガンドは異なる周波数点において共鳴するであろう。さらに、いくつかのリガンドは測定した帯域 $f_{start} \sim f_{stop}$ にわたって複数の共鳴周波数点を示すことがある。いったんリガンドが1またはそれ以上の独特に発生する共鳴点を有するとして特性決定されると、このデータを使用して未知溶液中のリガンドの存在を同定することができる。この特性決定は実験的データから、あるいは多重極モーメントおよび共鳴周波数の理論的計算から確認することができる。さらに、二次結合事象の存在を検出するとき、このデータは1またはそれ以上の独特の共鳴点の変化により被験体がリガンドに結合するときを示すことができる。

【0169】

第5C図は、分子構造物の検出または同定に使用できる、周波数応答の他のタイプを図解する。この場合において、周波数応答はある程度の振幅変動とともに一般的に単調に増加または減少する傾向を示す。応答の勾配および / または振幅変動を使用して、結合した分子を検出しあり / または独特に特性決定することができる。こうして記載した方法において、試験信号の相の共鳴周波数点、勾配、傾向、および変動を使用して分子結合事象を独特に同定することができる。周波数応答を入力ポート852、出力ポート858または両方のポートにおいて測定して、結合した分子構造物を独特に同定することができる。

【0170】

第6図は、本発明による周波数測定システムの第2の典型的な態様を図解する。

試験下のバイオアッセイ装置920は、中央導体921、空洞922aを有する第1絶縁体922、第2絶縁体923、および外側導体924を有する同軸トポロジー（第5G図に示す）から成る。溶液926は空洞922aを占有する。もちろん、他の回路トポロジーの装置をその上試験することができる。

【0171】

いったん溶液926が空洞922aに添加されると、溶液926中の分子は中央導体921に近接してMBR921aを形成する。測定の間に、信号源910は中央導体921に対して入射試験信号912を発射する。MBR922aは入射試験信号912を変調し、そして反射した試験信号932は独特的の信号応答を提供し、この信号を使用してリガンドを同定することができる。1ポート同軸立体配置は、例えば、皮下注射用針の構造として実現することができる。

【0172】

B. 時間ドメイン測定システム

第7図は、本発明による時間ドメイン測定システム1000の1つの態様を図解する。このシステムは、信号源1002と試験回路（本明細書記載の任意のバイオアッセイ装置から成る）入力ポート1022にカップリングされた検出器1004とを含む。別の態様において、追加の信号源および検出器を出力ポート1028にカップリングして完全な2ポート測定能力を供することができる。さらに選択的に、システムは信号検出器が反射された信号を受取る信号通路にカップリングされた1ポート試験システムを含んでなることができる。特定の態様において、時間ドメイン測定システムは時間ドメイン反射計、例えば、テクトロニックス・コーポレーション（Tektronix Corporation）製のモデルNo.11801から成る。他の高周波数測定システム、例えば、伝送された信号パルスおよび反射された信号パルスに基づく信号情報を提供する時間ドメイン測定モードを有するネットワーク分析装置を選択的に使用することができる。

【0173】

時間ドメイン測定システムにおいて、入力試験信号1060は時間ドメインパルスから成り、その反射部は経時的に表示することができる。この態様において、アッセイ表面に緊密にカップリングされた伝送部分に向かって入射パルス1060を発

射する。MBRの誘電性のために、入射パルス1060の一部分は検出器1004に向かって反射される。反射されたパルス1070は、MBRの誘電性固有の独特な形状および／または時間遅延を示し、これらは引き続いてリガンド、抗リガンド、および取り囲む溶液の誘電性により主として定められる。こうして、反射されたパルス1070のパルスの形状および遅延を使用してリガンドを特性決定し、同定することができる。時間ドメイン試験システムは別々に使用するか、あるいは高周波数試験システムと組み合わせて使用して1またはそれ以上の未知リガンドを同定することができる。

【0174】

C. 誘電緩和測定システム

この分野において知られているように、リガンドの誘電緩和周波数は、電場が分子に加えられるとき、分子レベルの誘電性が変化する速度である。リガンドの誘電性を使用するとき、誘電緩和周波数は各分子独特の構造および結合ジオメトリーにより主として定められる。こうしていったん測定されると、リガンドの誘電緩和周波数を使用するそれを同定することができる。

【0175】

リガンドが周波数にわたって電力を吸収する速度を測定することによって、誘電緩和周波数を定量できる。第8図は、この測定を行うシステム1100の1つの態様を図解する。測定システム1100は第7図に図解する時間ドメイン測定システム100に類似し、信号源1102と、試験回路（本明細書記載の任意のバイオアッセイ装置から成る）の入力ポート1122にカップリングされた検出器1104とを含む。追加の信号源および検出器を出力ポート1128にカップリングさせて、完全な2ポート測定能力を提供することができる。特定の態様において、時間ドメイン測定システムは時間ドメイン反射計、例えば、テクトロニックス・コーポレーション（Tektronix Corporation）製のモデルNo.11801から成る。他の高周波数測定システム、例えば、伝送された信号パルスおよび反射された信号パルスに基づく信号情報を提供する時間ドメイン測定モードを有するネットワーク分析装置を選択的に使用することができる。

【0176】

入力試験信号1160は別々のパルスグループから成り、各グループは2またはそれ以上の入射パルスおよび異なるパルス間隔を有する。パルスグループ1162および1164は結合表面に緊密にカップリングされた伝送ラインの部分に向かって発射される。パルスグループ1162が誘電緩和期間（緩和周波数の逆数）に実質的に等しい間隔を有するなら、MBRは連続するパルスにおける徐々に弱まるエネルギーを吸収するであろう。信号吸収の減少は、入力ポート1122または出力ポート1128における反射された応答1170において測定することができる。別の測定量として、残留信号電力を入力ポート1122または出力ポート1128において測定することができる。

【0177】

変化が起こる信号吸収およびパルス間隔の変化速度を次いでプロットし、1またはそれ以上の未知の結合した分子を特性決定し、同定するために使用することができる。これはシステム特性決定を独立に使用するか、あるいは前述の時間および/または周波数ドメイン試験システムと組み合わせて使用することができる。

【0178】

前述のシステムのすべてにおいて、当業者は容易に理解するように、このようなシステムはマイクロ波モノリシック集積回路（MMIC）およびその他のような技術に従いチップレベルに縮小することができる。このような最小化されたシステムは、数百、数千、または数万の化合物を同時に検出し、測定することができる、高度に並列のシステムに容易に拡張することができる。これらのシステムは「論理ゲート」を生ずるように構成することができる。論理ゲートを結合事象それ自体により、例えば、特性インピーダンス、こうして伝送および/または反射係数を変化させるか、あるいはこのような回路のバンドパス性を変化させることによってスイッチし、そしてこれをオン/オフゲートとして使用する。

VII. チップ技術を使用して検出システムの統合

A. 一般論

前述のバイオアッセイ装置を安価な、使い捨てチップ上に含めることができる。小型化が容易であるために、数千または数万のアドレス可能なバイオアッセイ

装置をその中に有する、非常に小さいチップを製造することができる。以後詳細に記載するように、アッセイを含有するチップを使用して、試料中の種々の注目の被験体の存在を検出し、分子のライプラリーをスクリーニングする。

【0179】

チップは種々の安価な材料、例えば、プラスチックまたはガラス支持体から製作することができる。第1D図～第1F図に関して前述したように、チップは種々の形状および大きさを有し、そして結合層の構造を変化させることができる。典型的には、チップそれ自体は複数の素子または部位を含有するアレイを含む。アレイの各アレイは、素子をアドレスするための信号通路、例えば、伝送ラインおよび適当な回路を含む。各素子において、タンパク質またはリガンド（しばしば複数のタンパク質またはリガンド）を素子内に位置する信号通路にカップリングさせる。

【0180】

タンパク質の結合事象に分析にチップを使用する現在の方法において、試料の中に含有されるリガンドは典型的には標識化される。本発明は、伝送された信号の変調により結合事象を直接検出できるので、リガンドおよびターゲットタンパク質を標識化することおよびこのような標識化に関連する問題を排除する。

【0181】

B. アレイ素子のアドレス

一般に、種々の素子に走行する信号通路の各々に信号を伝搬させ、特定素子におけるタンパク質／リガンド複合体の形成から生ずる信号を検出することによって、アレイの各素子を問合せることが可能である。ある場合において、ターゲットのみを信号通路にカップリングさせ、基底信号を測定するとき、信号検出は信号通路に信号を伝送させることを含む。ターゲットを試料および必要に応じてリンクしたアレイと接触させた後、他の信号を伝送ラインに伝搬させ、測定した信号を基底信号と比較して信号間の差を得る。また、複数の信号通路に信号を同時に伝送させることができある - - 1つの信号通路は試験素子に延び、そして他の信号通路はプローブおよび／またはターゲットを欠如する対照素子に走行する。種々の信号通路に伝搬させる信号は、同時にまたは連続的に、すなわち、異なる

る時間に発射することができる。

【0182】

アレイは、各結合事象のアフィニティー、反応速度、および独特の誘電プロファイルを同時に測定し、そしてアレイ上の複数のアドレス可能な部位においてこれらの測定を行う方法の独特の能力を使用する。アドレスの正確な特質は用途に依存するが、一般的方法の例は次の通りである。ベクトル空間は変数 K_{eq} 、 k_A 、および $= (1, 2, 3, \dots)$ により定義され、ここでこれらの変数は平衡定数、反応速度定数、および誘電性がプロビングされるときのN周波数の基本的組を表す。こうして、N+2次元空間が定義され、その中ですべての結合事象がマッピングすることができる。引き続いて、注目の結合事象のスペクトルを表す対照分子（例えば、タンパク質）のグループ、例えば、異なる結合特異性を有する抗体のグループを選択する。次いで、これらの対照分子をチップ上のアドレス可能な点に取付ける。分子の特定種または種のグループ（例えば、対照分子として働くタンパク質に結合する被験体）をチップに導入し、次いで各アドレスを上に定義したベクトル空間中の点の各々（またはそれらの適当なサブセット）の値についてプロビングする。次いでベクトル空間中のアドレスにより、各種を表すことができる。システムの複雑さはベクトル空間の大きさ、および表面上の異なる固定化されたリガンドの総数に依存するであろう。

【0183】

上記の例として、4つの異なる周波数において分析される2つの異なるタンパク質から構成された簡単なシステムを考慮する；そしてさらに、これらの周波数の各々を10の異なる振幅に解剖する。このようなシステムは 10^8 の可能なアドレスを有するであろう。システムの中に配置された未知のものは形式 $[(1, 5, 3, 7) (4, 8, 6, 7)]$ の独特的アドレスにより表すことができ、ここで最初の4つの数は4つの選択された周波数におけるタンパク質の1つのスペクトル応答を表し、そして後者の4つの数は4つの選択された周波数における他のタンパク質のスペクトル応答を表す。こうしてちょうど2つのプローブおよび4つの周波数を使用して、 10^8 の独特的アドレスを発生させることができる。

【0184】

C. 検出

試験信号を信号通路または伝送ラインに発射し、次いで試験信号と結合性複合体との相互作用から生ずる応答信号を検出することによって、信号を検出する。いくつかの方法において、検出はまず対照信号を伝搬させ、結合性複合体の1またはそれ以上の成分が存在しないときの基底信号を測定することを含む。例えば、緩衝化溶液だけを使用して基底信号を獲得することができる；他の場合において、信号通路にカップリングされたタンパク質またはリガンドを使用するが、両方を使用しないで、基底信号を得る。ある態様において、伝送された信号はマイクロ波である。

【0185】

種々の部位においてタンパク質／リガンド複合体が形成した結果発生した信号をコンピューターにより追跡して、種々の素子からの信号をモニターし、記憶する。このようにして、どの素子がタンパク質／リガンド複合体を含むかを同定することが可能である。リガンドがアレイに取付けられる場合において、各素子は個々にアドレスされ、モニターされるので、ターゲットタンパク質に結合するリガンドを同定することが可能である。

【0186】

しばしば信号測定はある範囲の周波数または波長を走査することを含む。上に示したように、信号は一般にMHzから数百GHzのレベルの範囲である。ある態様において、信号はマイクロ波である。ある場合において、例えば、信号を1～21GHzで走査する。

【0187】

変調された信号の検出器は「論理ゲート」のバージョンを包含することができる。この論理ゲートにおいて、所定の用途に適当であるように、特定リガンドまたは被験体の存在がゲートをオンまたはオフにする作用を有する。このようなゲートは任意の数の方法で実現することができる。このような方法において、結合事象を電磁信号に翻訳し、この信号をオフおよびオン、1または0、およびその他に対応する2つの可能な状態の1つに割り当てることができる。2つの状態は結合および非結合に対応する共鳴空洞または導波管の異なる周波数、または結合およ

び非結合に対応する伝送ラインまたは導波管における振幅の変化、または特定回路のバンドパスの変化、またはその他であることができる。

【0188】

D. 特定のアレイの態様

1. 試験システム

第13図は、本発明による $N \times M$ アレイ試験システム1500の1つの態様を図解する。試験システムは、さらに後述される試験フィクスチュア-1600、 $1 \times N$ 入力スイッチ1530、測定システム1540、 $M \times 1$ 出力スイッチ1550、およびコンピューター-1560を含む。測定システム1540は、入力試験ケーブル1524aおよび $1 \times N$ 入力スイッチ1530を介して試験フィクスチュア-1600に試験信号を送る。引き続いて試験フィクスチュアから $M \times 1$ 出力スイッチ1550および出力試験ケーブル1524bを介して、試験信号は受取られる。コンピューター-1560は、制御バス1570を介して $1 \times N$ 入力スイッチ1530、測定システム1540、および $M \times 1$ 出力スイッチ1550をコントロールする。

【0189】

1つの態様において、測定システム1540は、S - パラメーター試験モジュールモデルNo.8516A(1542)、周波数シンセサイザー(図示せず)モデルNo.8341B、およびベクトルネットワーク分析装置モデルNo.8510B(1544)(それらのすべてはHewlett Packard Company、カリフォルニア州パロアルト製である)(www.hp.com)を含む。この態様において、測定システム1540は周波数45MHzと40GHzとの間の測定能力を有する。別の態様において、測定システム1540は5Hzと500MHzとの間の測定能力を有するモデルNo.HP8751Aネットワーク分析装置から成ることができる。それ以上の態様において、測定システムは33GHzと110GHzとの間の測定能力を有するモデルNo.HP85106Dネットワーク分析装置(両方はHewlett Packard Company製である)から成ることができる。また、他の測定システム、例えば、スカラーネットワーク分析装置、時間ドメイン反射計、他の同様な測定システムを使用して試験信号の変化検出することができ、この信号はMBRの誘電性に寄与する。

【0190】

試験ケーブル1524は、所望の周波数における試験信号の伝搬を支持する。1つの態様において、試験ケーブルはモデルNo.6Z PhaseFlexTM Microwave試験ケーブル (W. L. Gore and Associates, Inc. of Newark Delaware製 (www.gore.com)) から成る。制御バス1570は試験システムとコンピューター1560との間の通信を提供し、図解する態様において、汎用計装バス (GPIB) から成る。別の態様において、測定システム1540およびコンピューター1560は単一の自動化測定ユニット内に統合することができる。

【0191】

コンピューター1560は、測定システム1540をコントロールして、1またはそれ以上の周波数、出力電力レベル、信号形状、相オフセットまたは他の測定設定において試験信号を発生させる。好ましい態様において、コンピューター1560はa + 450MHzのマイクロプロセッサー、例えば、インテル・コーポレーション (Intel Corporation of Santa Clara、カリフォルニア州 (www.intel.com)) 製のマイクロプロセッサーを含む。試験システムのコントロール、データ獲得、および解析は、グラフィカル・プログラミング・ソフトウェア・ツール、例えば、LabVIEW[®] (National Instruments Corporation of Austin、テキサス州、製 (www.natinst.com)) を使用して実行することができる。

【0192】

選択的にまたはさらに、測定システム1540は、時間ドメイン反射計 (TDR) システム、例えば、必要に応じて前述のネットワーク分析装置を使用して入手可能であるか、あるいは引用することによって本明細書の一部とされた出願第09/243,194号、発明の名称「分子結合事象を検出する方法および装置」、に記載されているTDRシステムを含む。本質的に、TDRシステムは信号パルスを試験下のユニットに向けて伝送する。戻り信号（試験下のユニットから反射したまたは試験下のユニットを通して伝送された）を解析して、試験下のユニットについての情報を確認することができる。詳しくは、この態様において、MBRの誘電性は信号パルスを変調し、これによりその中の分子結合事象を検出し、同定することができる。

【0193】

前述のシステムを使用してフィクスチュアレベルで、あるいはマイクロ波モノリシック回路（MMIC）技術の標準技術の1またはそれ以上を利用してバイオアッセイ装置レベルで、TDR測定を行うことができる。TDR測定を装置レベルで実施するとき、時間ドメイン試験信号をバイオアッセイ装置に密接に近接させて発生させる。次いでMMIC技術において使用する標準導電性ジオメトリーを介して信号通路に沿って、この信号をバイオアッセイ素子に伝搬させる。分子結合領域は時間ドメイン試験信号を変調し、次いで変調された信号を回収して解析する。

【0194】

1×N入力スイッチ1530は、試験信号を入力試験ケーブル1524aからN試験フィクスチュア信号入力の1つに送る。M×1出力スイッチ1550は、試験信号をM試験フィクスチュア出力の1つから出力試験ケーブルに送る。入力スイッチ1530および出力スイッチ1550は、所望の試験信号の伝搬を支持する任意のスイッチまたはマルチブレクシング手段から成ることができる。例えば、入力スイッチ1530および出力スイッチ1550は低周波数スイッチ（DC～2GHz）、例えば、アンプリフォニックス・インコーポレーテッド（Amplifonix, Inc. of Philadelphia、ペンシルバニア州（www.amplifonix.com））製のスイッチから成ることができる。より高い周波数（2～18GHz）において使用するためのスイッチ、例えば、ジェネラル・マイクロウェイブ・コーポレーション（General Microwave Corporation of Amityville、New York（www.generalmicrowave.com））製のスイッチを選択的に使用することができる。絶縁ケーブル、ワイヤ結合、または操作の試験周波数に適当な他の慣用相互接続手段を使用して、バイオアッセイ装置および入力スイッチ1530および出力スイッチ1550の間の接続を行うことができる。

【0195】

別の態様において、入力スイッチ1530および出力スイッチ1550およびバイオアッセイアレイはモノリシック集積回路を形成する。例えば、GaAs半導体加工技術を使用してバイオアッセイアレイを製作するとき、入力スイッチ1530および出力スイッチ1550は、バイオアッセイアレイにカップリングされる、一体的に形成されたPINダイオードから成ることができる。さらに選択的に、入力スイッチ1530および出力スイッチ1550は統合されたアセンブリーを形成することができ、ここ

で入力スイッチ1530および出力スイッチ1550は、バイオアッセイアレイに接続された（ワイヤまたはリボン結合を介して）離散成分である。両方の選択的態様は、相互に接続する構造物が小型化または排除され、これによりそれらに関連する信号損が減少または排除されるという利点を提供する。

【0196】

説明したように、バイオアッセイアレイは半導体加工技術を使用してウェーハの形で製作することができる。この態様において、アレイ試験システム1500はウェーハプローブ試験ステーション、例えば、カスケード・マイクロテク・インコ一ポレーテッド（Cascade Microtech, Inc. of Beaverton、オレゴン州（www.cascademicotech.com））製のものから成ることができ、これは前述の入力スイッチ1530および出力スイッチ1550、およびコンピューター1560を含むか、あるいはそれにカップリングされる。ウェーハプローブステーションは1またはそれ以上のプローブカードを利用し、それらの各々は多数の低損失、低VSWR信号をバイオアッセイアレイに相互接続させる。

【0197】

1またはそれ以上のプローブカードを使用して、遠隔に位置する、それぞれ、入力スイッチ1530および/または出力スイッチ1550に対するNおよび/またはM信号の相互接続を提供する。選択的に、入力スイッチ1530および/または出力スイッチ1550をバイオアッセイアレイとモノリシックに製作することができ、この場合において、1またはそれ以上のプローブカードは入力および/または出力信号を測定システム1540に転移させる。この後者の態様において、1またはそれ以上のプローブカードはスイッチ制御電圧をモノリシックに形成されたスイッチに印加する。

【0198】

選択的にまたはさらに、測定システム1540は時間ドメイン反射計（TDR）システム、例えば、必要に応じて前述のネットワーク分析装置を使用して入手可能であるか、あるいは引用することによって本明細書の一部とされた出願第09/243, 194号、発明の名称「分子結合事象を検出する方法および装置」、に記載されているTDRシステムを含むことができる。

【0199】

2. アレイ試験フィクスチュア

第14A図は、本発明によるN×M試験アレイフィクスチュア1600の1つの可能な態様の断面図を図解する。試験フィクスチュア1600は、上部プレート1602、下部プレート1604、および前述の反応器1610、バイオアッセイアレイ1700（下の第15A図においてさらに記載する）並びに下部スペーサー1630の素子を保持する上部及び下部くぼみ1640a及び1640bのそれぞれから成る試料空洞1640を含む。N×Mアレイ試験フィクスチュアの態様において、試料空洞1640および相応して反応器1610および下部スペーサー1630の寸法は、バイオアッセイ装置より大きいか、あるいは小さいことができるバイオアッセイ装置1700を収容するように設計される。各アレイ素子は、各アレイ素子の信号通路との電磁通信において試料の一部分を保持するために、信号通路にわたってくぼみが形成された区域を形成する、小さい、モノリシックに配置された構造物を含む。

【0200】

第14B図はN×M試験アレイフィクスチュア1600の端面図を図解する。試験フィクスチュア1600はN入力コネクター1660_{a1}～1660_{an}およびM出力コネクター1660_{b1}～1660_{bm}を含む。また、試験フィクスチュア1600は、フィクスチュアのNコネクター1660_{a1}～1660_{an}とバイオアッセイのN入力との間の信号転移を提供するN入力伝送ライン（図示せず）を含む。さらに、試験フィクスチュア1600は、バイオアッセイのM出力とフィクスチュアのM出力コネクター1660_{b1}～1660_{bm}との間の信号転移を提供するM出力伝送ライン（図示せず）を含む。入力および出力伝送ラインは、絶縁された導電性ワイヤ、マイクロストリップ、ストリップ線路、誘電性支持体上に配置された共平面導波管伝送ライン、または他の普通に知られている信号通路構築物として実現することができる。伝送ラインの構築物の選択は、試験周波数およびバイオアッセイ装置の入力および出力のポート密度により影響を受けるであろう。

【0201】

3. バイオアッセイアレイ

第15A図は、本発明による統合されたバイオアッセイアレイ1700の1つの態様を

図解する。統合されたアレイ1700に、測定システム1540の信号源を介して試験信号を供給する。アレイ1700は、半導体製作プロセスの間にモノリシックに形成される、統合された $1 \times N$ 入力スイッチおよび $M \times 1$ 出力スイッチを含む。入力の数は出力の数と同一であることができ、この場合において $M=N$ であり、入力および出力の数は異なることができる。

【0202】

1 × N入力スイッチ1702は、入来する試験信号をアレイ内の所望のアレイ素子1703に送る。アレイ素子中のMBRは、MBRを構成する分子結合事象の誘電性に従い試験信号を変調する。M × 1出力スイッチ1704は試験信号を測定システム1540の検出器に送る。測定システム1540の分析装置は入力および変調された試験信号を比較して、測定された信号応答を決定する。各アレイ素子は2ポート装置として図解されているが、当業者は理解するように、1ポートまたは複数のポートのアレイ素子を選択的に使用することができる。

【0203】

上に説明したように、アレイ1703および入力および出力スイッチ1702および1704は離散成分としてまたはウェーハ形で製作し、用途に依存して変化する程度に統合することができる。図解する態様において、アレイ1703および入力および出力スイッチ1702および1704は半導体ウェーハ上にモノリシック的に形成される。他の態様において、入力および出力スイッチ1702および1704は検出アレイ1703から別々にモノリシック的に形成され、ワイヤまたはリボン結合を介して接続される。それ以上の態様において、入力スイッチ1702および出力スイッチ1704およびアレイ1703の各々は離散ユニットである。また、当業者は理解するように、他の配置が可能である。

【0204】

第15B図は、直列に接続された、電子的にスイッチされる電界効果トランジスタ(FET)1710として示す、アレイ素子の1つの態様を図解する。FET1710は、GaAsを使用する製作された金属半導体の電界効果トランジスタ(MESFET)であることができる。また、他のトランジスタの構成が可能であり、これらは、例えば、高電子移動度トランジスタ(HEMT)、ヘテロ構造FET、均質またはヘテロ接合双

極トランジスタ、またはPN接合デバイス、例えば、PINダイオードであるが、それらに限定されない。他の能動または受動アレイ素子を選択的にまたはこれらに加えてその上使用することができる。

【0205】

第15B図の態様において、FET1710の源端子1712およびドレイン端子1714を、それぞれ、入力ポート1711および出力ポート1715として用い、そしてFET1710のオン／オフ状態はゲート端子に適用される電圧を介して制御される。MBR1716が源端子1712とドレイン端子1714との間に並列通路を提供するように、試料をFET1710の上に適用する。オフにしたとき、MBR1716を通る抵抗よりも非常に高い源抵抗(R_{ds})をドレインにFET1710が与えるように、FET1710を設計する。この場合において、信号通路はMBR1716を通して伝搬する。MBR1716は試験信号を変調する。変調された試験信号を回収し(DC阻止コンデンサを通してDCバイアスを除去する)、入力試験信号に対して比較して、MBR1716内で起こる分子結合事象を検出および／または同定する。FET1710が活性化されるとき、それはMBR1716の抵抗に比較して非常に低い R_{ds} を提供する。この場合において、MBR1716は信号通路から効果的にスイッチアウトし、信号はそれにより大きく影響されないで伝搬する。こうして単にスイッチ開閉することによって、アレイ素子をアドレスすることができる。

【0206】

第15C図は、光学的にスイッチされるアレイ素子として使用するFETのそれ以上の態様を図解する。FET1720は第15B図に記載するFET1710と同様に接続され、そして感光性トランジスタ、ダイオードまたは他の感光性デバイスから成ることができる。ゲート接合1722を、例えば、正常の光、レーザー、発光ダイオード(LED)1725、またはFET1720が高い感受性を有する波長を有する他の源で照明することができる。入射光はFET1720を活性化して、MBR1724をスイッチアウトする。FET1720が失活されるとき、試験信号はMBR1724を通してFET入力1721からFET出力1723へと伝搬し、それにより変調される。変調された試験信号を回収し(DC阻止コンデンサを通してDCバイアスを除去する)、解析して、MBR1724内の分子結合事象の存在を検出しおよび／またはそれを同定する。

【0207】

第15D図は、2またはそれ以上のFETが直列に接続されている、第15B図および第15C図のエクステンションを図解する。アレイ1750は第1試験通路1753を含み、それに沿ってアドレス可能なスイッチ1753aおよび1753cがカップリングされている。1つの態様において、前述したように、アドレス可能なスイッチは電子的または光学的に制御されるMESFETである。さらに、アレイ通路1753は試料領域1753bおよび1753dを含み、それらの各々は対応するアドレス可能なスイッチ1753aおよび1753cに対して並列信号通路を提供する。

【0208】

前述したように、アドレス可能なスイッチ1753aおよび1753cは、入力スイッチ1752及び出力スイッチ1755を介して信号源1751と信号検出器1756との間の試料領域1753bおよび1753dをスイッチインおよびアウトするように作動する。こうして、单一のアッセイ部位がインピーダンス誤対合として現れる伝送通路の中に特定の列が作られる。必要に応じて、各アッセイ部位は回路の中にスイッチされるか、あるいは回路の外にスイッチされることができる。インピーダンス誤対合の特質は、MBRにおける結合および他の変化の関数である。追加の信号通路、例えば、信号通路1754（サンプル領域1754bと1754dと平行に接続されたアドレス可能なスイッチ1754a及び1754cを有する）はアレイの中に含めることができ、そして他の低損失スイッチ（図示せず）を使用して他方の通路に対して交差ストラップして、試験信号が信号通路1753および1754の間で伝搬するようになることができる。入力スイッチ1752および出力スイッチ1755を使用して、試験信号をアレイ1750の中に注入し／それから回収する。当業者は理解するように、記載したアレイを任意の数のN×M素子に拡張して、二次元のアレイ装置を構成することができる。

【0209】

第15E図は、第15D図に示すアレイの回路等価モデルを図解する。入力源1751、入力スイッチ1752、出力スイッチ1755及び信号検出器1756を図15Dに示す。スイッチインピーダンスZsは信号通路の対照インピーダンスZ0と密接整合するように設計され、そしてアッセイインピーダンスZ'、'はスイッチインピーダンスまたは参照インピーダンスと非常に異なるように設計される。こうして、アッセイイ

インピーダンスの小さい変化は任意の所定の列の電気的性質を支配し、したがって容易に検出可能である。インピーダンスの正確な値は特定アレイについての設計基準に依存するであろうが、工学的適用のある種の一般原理、例えば、負荷（検出器）への電力供給に関して最大の効率は整合したインピーダンス設計を使用して得られ、そして参照インピーダンスはしばしば50 である。

【0210】

別の態様において、各アレイ素子は、ゲーティングの条件に依存して、2つの可能な状態の1つを占有することができる論理ゲートから成ることができる。1例として、ゲーティング条件は特定の結合事象が起こったか否かであることができる。このような条件は装置の表面上の特異的捕捉プローブに対する核酸物質のハイブリダイゼーション、または特定の薬剤 - レセプターの相互作用であることができる。いずれの場合においても、MBRにおける結合事象または構造の変化がゲーティングを引き起こすように、装置を操作する。本質的に任意の回路のパラメーターの変調はゲーティングを引き起こすことができる；必要なすべては、回路パラメーターが変調されたか否かに関して決定する代わりに、必要なハードウェアおよびソフトウェアを有することである。

【0211】

1例として、所定のシステム、例えば、共鳴構造物の特性周波数をモニターすることができる。特定結合事象の結果としてのこの周波数のシフトは、論理状態を信号する変調として働くことができる。結合の関数として変化する任意のパラメーターを使用して、論理ゲートをトリガーすることができる。このようなパラメーターは下記のを包含するが、これらに限定されない：周波数、電圧、電流、電力、相、遅延、インピーダンス、リアクタンス、アドミタンス、コンダクタンス、抵抗、キャパシタンス、インダクタンス、または他のパラメーター。

【0212】

第15F図は、二次元バイオアッセイアレイ1770の1つの態様を図解する。示されたように、アレイ1770は試験信号を入力 / 出力するための第1入力 / 出力(1 / 0)軸1772および第21 / 0軸1774を含む。

【0213】

アレイは慣用の外部の診断用ハードウェアでインターフェースされている。このハードウェアは1またはそれ以上の適当な周波数を発生し、検出し、次いで、上に例示したように、マルチプレクサを介してアッセイアレイにそれを通信し、アッセイアレイから通信することができる。このような外部的に支持されるシステムは任意の数の電磁源、例えば、ベクトルおよびスカラーネットワーク分析装置、時間ドメインデバイス、例えば、TDR分析装置および他のパルス技術から構成することができる；本明細書に記載する任意の検出スキーム、例えば、ベクトルおよびスカラーネットワーク分析装置を利用することができる；そして任意の数のよく知られている技術を使用して、標準および非標準のマルチプレクシング技術を介して信号をアッセイアレイに送り、アッセイアレイから送ることができる。

【0214】

一般に、このようなチップは標準半導体チップアプローチを使用する製作することができる。当業者は容易に理解するように、このような構成は1ポートフォーマット、2ポートフォーマットにおいて使用することができるか、あるいは2より多いポートを利用することができる。

【0215】

バイオ-電気的インターフェース領域は、所望の試験周波数における電磁信号の伝搬を支持するように設計された信号通路から成る。多数の構成が可能であり、1つの例は110GHzまで操作可能なスパッタード金伝送ラインである。他の態様において、信号通路は誘電媒体、例えば、MBRそれ自体から成る。この態様において、信号通路はDC電圧および電流を遮断するが、そうでなければ、例えば、下記の周波数で発生する、所望の試験信号の伝搬を支持する：1MHz、5MHz、10MHz、20MHz、45MHz、80MHz、100MHz、250MHz、500MHz、750MHz、1GHz、2.5GHz、5GHz、7.5GHz、10GHz、12GHz、18GHz、20GHz、22GHz、24GHz、26GHz、30GHz、33GHz、40GHz、44GHz、50GHz、80GHz、96GHz、100GHz、500GHz、1000GHz、またはそれらの間の範囲の周波数。したがって、信号通路はこの分野において知られている高周波数回路設計技術を使用する設計される。このような設計技術は、信号通路を相互接続構造物に整合させ、信号通路の挿入損を最小にし、そして信号通路の

電圧定常波比 (VSWR) を最小にするインピーダンスを包含する。本発明の好ましい態様において、信号通路およびMBRは非直交の向きに向いている。

【0216】

本発明は、信号通路に取付けられた予測される大きさまたは構造の分子の検出に限定されない。MBRは、信号通路に取付けられているか、あるいはそれから分離しているが、信号通路にカップリングされた1、2、3、4、5、10、20、30、50、100、1000、またはそれ以上の分子長さから成ることができる。さらに、MBRは均質分子の複数層、単一であるが不均質の分子層、または複数の不均質分子層から成ることができる。

【0217】

本発明のアレイに関する追加の情報は、下記の出願に記載されている：代理人の処理番号019501 - 000500USを有する発明の名称「分子結合事象を検出する試験システムおよびセンサー」の同時継続の、普通に所有された米国特許出願、これはこの出願と同時に提出され、そしてこれは以前にすべての目的のために引用することによって本明細書の一部とされた。

VII. 伝送ラインへのタンパク質の取付け

伝送ラインは、一般に、所望の試験周波数範囲にわたって適當な導電性を示しつつ前述したようにすぐれた分子結合性を有する材料から構築される。このような物質下記のものを包含するが、これらに限定されない：金、酸化インジウム錫(ITO)、銅、銀、亜鉛、錫、アンチモン、ガリウム、カドミウム、クロム、マグネシウム、コバルト、イリジウム、白金、水銀、チタン、アルミニウム、鉛、鉄、タングステン、ニッケル、タンタル、レニウム、オスミウム、タリウムまたはそれらの合金。また、導電性層は半導体材料から形成することができる。半導体材料は、結晶質または非晶質であることができ、化学的にドーピングされたまたは純粋な炭素、シリコン、ゲルマニウム、ガリウム-ヒ素、ヒ化インジウム-ガリウム、ガラス、石英、セラミック、またはその他を包含する。導電性材料は、また、ポリマーから製作することができる。ポリマーは、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアセチレン、ポリチオフェンを包含するが、これらに限定されない。

【0218】

1つの態様において、伝送ラインは金である。金伝送ラインを製作する1つの方法は次の通りである。支持材料、例えば、ガラスまたは他の安価な、比較的平滑な材料を下に横たわる物理的構造物として使用する。この材料の上部の上に、チタンの薄層（10～100オングストローム）を熱的蒸発、スパッタリング、化学的蒸着または他の手段により載せる。チタンは金と支持体との間の接着層として作用する。チタンの析出に引き続いて、金（10～10000オングストローム）を熱的蒸発、スパッタリング、化学的蒸着または他の方法により載せる。

【0219】

ある態様において、ターゲットは伝送ラインに直接的にまたは種々のリンカーを介して取付けることができる。取付けは、例えば、静電相互作用、共有結合、および疎水性相互作用を包含することができる。多数の生物学的分子は結合を形成できる官能基を含有するので、しばしばターゲットは直接取付けることができる；特定の手順は表面に取付ける特定分子（例えば、タンパク質、抗体、糖タンパク質、核酸、レクチン、糖、炭水化物、およびその他）の化学構造に従い変化する。例えば、ポリペプチドは典型的には種々の官能基、例えば、カルボン酸（COOH）または遊離アミン（-NH₂）基を含有し、これらの基は伝送ラインの表面上の適当な官能基との反応にまたは適当なリンカーに対して有効である。同様に、他の生物学的分子、例えば、核酸、糖および炭水化物は取付けに適当な点である他の官能基（例えば、-OH、-NH₂、-COOH、-SH、およびその他）を含有する。

【0220】

選択的に、ターゲットを誘導化して、追加の反応性官能基に対して暴露するか、あるいはそれと結合させることができる。誘導化はターゲットまたは伝送ラインの化学的処理を包含することができる。例えば、シリカまたはガラス支持体をシラン化して、その上に官能基を形成することができる。同様に、例えば、タンパク質抗体に取付けられた糖部分を過ヨウ素酸塩でグリコール切断して遊離アルデヒド基を発生させることによって、糖タンパク質を誘導化することができる。糖タンパク質上の遊離アルデヒド基を表面において遊離アミンまたはヒドラジン

と反応させて、それに対する結合相手に結合させる（参照：米国特許第4,671,958号）。ポリペプチド、例えば、抗体または抗体フラグメント上に遊離スルフヒドリル基を発生させる手順もまた知られている（参照：米国特許第4,659,839号）。

【0221】

直接的に結合する代わりに、第1D図～第1F図に示すように、ターゲットを1またはそれ以上のリンカーを介して取付けることができる。リンカーは、生物学的結合相手（例えば、リガンドまたは抗リガンド）を下に横たわる（例えば、装置またはデバイスの）表面に結合させるために使用できる分子である。リンカーは核酸または伝送ラインと共有結合を形成することができる。伝送ラインの表面上の基と反応することができる1つの官能基、および核酸と反応性の他の基を有する二官能リンカーを使用して、所望の複合体を形成することができる。種々の金属、ガラス、およびプラスチックの支持体に種々の生物学的分子を取付ける多数の手順およびリンカーはこの分野において知られている。例えば、下記の文献を参照のこと：欧州特許出願第188,256号；米国特許第4,671,958号；米国特許第4,659,839号；米国特許第4,414,148号；米国特許第4,699,784号；米国特許第4,680,338号；米国特許第4,569,789号；米国特許第4,589,071号および米国特許第5,670,381号；およびBorlinghaus他、Cancer Res. 47 : 4071 - 4075 (1987)、これらの各々は引用することによって本明細書の一部とされる。

【0222】

タンパク質は、種々の異なるプロトコルを使用して、伝送ラインに取付けることができる。ある場合において、タンパク質はタンパク質または伝送ラインを修飾しないで取付けることができる。例えば、タンパク質溶液を標準的緩衝液中で調製し、この溶液を裸の金と接触させ、次いで洗浄する。他のアプローチは、疎水性化合物、例えば、アルカンチオールを金表面に適用する（例えば、Bain他、Angew. Chem. 10 : 522 - 528、(1989)）。タンパク質は、また、種々のホモ機能またはバイオ機能のリンカーを使用して取付けることができる（例えば、下記の文献を参照のこと：Pierce Catalog and Handbook, Life Science and Analytical Research Products, 1994）。

【0223】

選択的に、伝送ラインへの取付けを促進する連鎖部位を含むように、タンパク質を操作することができる。好ましくは、連鎖部位がタンパク質結合機能を妨害しないように、連鎖部位を操作する。いったんタンパク質が伝送ラインに取付けられたときタンパク質が向く方向をコントロールするように、連鎖部位を操作することができる。この一般的アプローチの例は、取付けを促進するために比較的高い濃度のシステイン（およびこうして高いチオール濃度）またはアミノ基を含むように連鎖部位を操作することを包含する。また、第2タンパク質が連鎖部位に取付けられるように部位を操作することが可能であり、そして伝送ラインと実際に結合するのが第2タンパク質である。種々の他のこのようなアプローチはこの分野において知られている。

【0224】

抗体、タンパク質、および糖タンパク質を接合する方法はイムノトキシン文献に豊富に記載されており、例えば、下記の文献から見出すことができる： Mono clonal Antibody - Toxin Conjugates : Aiming the Magic Bullet , Thorpe他、Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine、Academic Press、pp . 168 - 190 (1982) ; Chapter4 in Monoclonal Antibodies : Principles and Applications、BirchおよびLennox、編、John Wiley & Sons , Inc.、NY (1995)) ; Waldmann、Sequence 252 : 1657 (1991) 、米国特許第4,545,985号および米国特許第4,894,443号。

VIII. 無標識検出

本発明の方法は、標識を利用しないでタンパク質 / リガンド複合体の情報を検出することができる。分析する結合事象に関するリガンドのタイプに無関係に、これは真実である。大部分の現存する方法は、対照的に、結合性複合体の形成を検出するために標識の使用を必要とする。現存する方法において使用する標識のタイプは変化するが、しばしば放射性標識または蛍光標識を包含する。

【0225】

本発明の方法は直接的検出を含むので、標識化された化合物を使用することは不需要である。それゆえ、タンパク質 / リガンド複合体を分析する方法の特定の

場合において、実験を実施するために標識化されたタンパク質またはリガンドを調製することは必要である。また、標識をまったく使用しないので、タンパク質／リガンド複合体の形成を妨害することがある、標識の存在により引き起こされる立体障害性の非存在が保証される。さらに、他の方法と異なり、本明細書に記載する方法は非結合標識化分子から生ずるバックグラウンドの信号に対して不感受性である（例えば、非結合リガンドから生ずるバックグラウンドの蛍光）。これが意味するように、本発明の方法は実時間でタンパク質／リガンド複合体の形成をモニターすることができ、これにより反応速度論の研究を実行することができる。本発明において標識は必要であるので、検出システムの特質は標識化の使用を排除しない。

IX. タンパク質／リガンドのプロファイルを使用する分析

A. プロファイルまたはサインの獲得

本発明の検出システムを使用すると、ある種のリガンド／抗リガンド複合体またはある種のタイプの結合相互作用固有の信号を包含する、スペクトル走査を得ることが可能である。このような走査はここにおいてプロファイル、サインまたはフィンガープリントと称する。プロファイルは本質的に任意のタイプのリガンド／抗リガンド複合体について得ることができる。このようなプロファイルは、タンパク質／リガンド複合体を研究するとき特に有効である。いっそ詳細に後述するように、特定複合体の形成を同定し、結合相互作用のタイプに従いリガンドを分類し、そして異なるタイプの結合相互作用を区別するとき、プロファイルを使用することができる。

【0226】

それゆえ、本発明のある種の方法は、種々のタイプのリガンド／抗リガンド複合体、特に種々のタイプのタンパク質／リガンド複合体についてプロファイルまたはサインを決定することを包含する。タンパク質の結合の研究において、このような方法は典型的にはリガンドに結合したタンパク質ターゲットをカップリングさせる信号通路を通して伝送された電磁信号をモニターすることを包含する。周波数または波長を所望の範囲にわたって走査して、周波数または波長の関数として測定した信号を描写するスペクトルを得ることで、信号（伝送および／また

は反射された)の変調は測定される。各タンパク質/リガンド複合体は異なるスペクトルを与えるので、スペクトルはその特定複合体のサインまたはプロファイルとして働くことができる。

【0227】

例えば、特定タンパク質/リガンド複合体に対して固有である、ある種のピークまたは信号を、スペクトル中で特定周波数において同定することが可能である。同様に、ある種の信号を特定下位構造物、例えば、ドメイン、結合部位、活性部位、アロステリック部位、およびその他と相關させることができる。こうして、このような特性ピークを検出し、モニターすることによって、種々の分析、例えば、試料中のある種の被検体の存在の明瞭な同定、結合相互作用のタイプの区別、定量的研究の実施および反応速度論的研究の実行を達成することができる。

【0228】

多数の異なる異なるタンパク質/リガンド複合体を使用してこの手順および分析を反復することによって、サインまたはプロファイルのデータベースを蓄積することができる。例えば、電子的記憶媒体の中にこれらのプロファイルを記憶することによって、プロファイルを実験の間に急速にアクセスし、実験スペクトルに対して比較して、ちょうど列挙した分析のタイプを促進することができる。

X. 定量分析

標識を使用しないで本検出方法は実行でき(前述したように信号を実時間で追跡することを可能にする)かつある種の信号を特定タンパク質/リガンド複合体と相關させること(すなわち、タンパク質/リガンド複合体のスペクトルのプロファイルまたはサイン中の特性信号を同定すること)が可能であるので、ある種の定量分析を実行することが可能である。例えば、特定タンパク質/リガンド複合体から発生することが知られているスペクトル中のある種の信号の変化から、特定複合体の濃度を経時的に測定することができる。測定できる変化は、例えば、ピーク振幅の変化またはピーク周波数の変化を包含するが、他の変化をその上モニターすることができる。

【0229】

特定タンパク質 / リガンド複合体の特徴を示す信号をモニターすることによって、結合反応速度論を実行することができる。このような研究において、例えば、信号強度の変化を時間の関数としてプロットして結合曲線を得る。異なるリガンド濃度レベルにおいて得られた複数の結合曲線から、アフィニティー定数を決定することができる。アフィニティー定数および他の反応速度論のデータをこの分野において知られている方法に従い計算することができる。反応速度論およびアフィニティーについての解説は、任意の標準的生化学または化学のテキスト、例えば、下記の文献に記載されている : Mathewsおよびvan Holde, Biochemistry, Benjamin Cummings, New York, 1990。

XI. ライブラリーの合成

種々の異なるタイプのライブラリーを本発明の方法とともに使用することができる。ライブラリーは、有機合成法を使用してまたは生化学的に調製される、意図的につくられたコレクションである。後者の場合において、分子は *in vitro* または *in vivo* でつくることができる。このような非限定的リストは、ランダムペプチドライブラリー、コンビナトリアル合成ライブラリー、ファージディスプレイライブラリー、天然産物ライブラリー、オリゴ糖ライブラリーおよびレガシーライブラリー（例えば、特定研究設備のグループにより、経時的に合成され、収集された分子の集合物）を包含する。

【0230】

また、細菌またはバクテリオファージ粒子内で分子生物学的技術により構築された、生物学的に合成されたライブラリーを使用して、本発明において使用するライブラリーを調製することができる。例えば、米国特許第5,270,170号および米国特許第5,338,665号（それらの両方は引用することによって本明細書の一部とされる）には、プラスミドのクローニング部位の中に挿入されたランダムオリゴヌクレオチドを使用してつくられた融合タンパク質をコードする組換えプラスミドの構築が記載されている。このクローニングはDNA結合性タンパク質をコードする遺伝子のコーディング領域、例えば、*lac*リプレッサー内に配置され、こうしてDNA結合性タンパク質の特異的結合機能は遺伝子の発現時に破壊されない。また、プラスミドはDNA結合性タンパク質により結合部位として認識される又

クレオチド配列を含有する。こうして、適当な細菌細胞の形質転換および融合タンパク質の発現時に、タンパク質はそれを産生するプラスミドに結合する。次いで細菌細胞を溶解し、融合タンパク質を所定の生物学的活性についてアッセイする。そのうえ、各融合タンパク質はそれをコードする核酸と結合したままである；こうして核酸を增幅し、それ以上の特性決定のための選択されるタンパク質／プラスミド複合体の核酸部分をスクリーニングすることによって、候補化合物の正確な構造を決定することができる。

【0231】

しばしばディスプレイライブラリーと呼ばれる他のライブラリーを使用することもできる。これらのライブラリーは、一体的タンパク質のトランスマンプラン部分をコードする遺伝子の部分にランダムオリゴヌクレオチドが融合されている、核酸ベクターを使用して調製される。例えば、米国特許第5,223,408号（これは引用することによって本明細書の一部とされる）参照。融合タンパク質が発現されると、タンパク質のランダムポリペプチド部分を外方に向け、外側細胞膜の中に融合タンパク質を埋め込む。こうして、この種類のライブラリーにおいて、試験すべき化合物を細胞それ自体に結合させる。また、細胞は融合タンパク質のランダム部分をコードする組換えベクターを含有するので、予備的スクリーンにおいて有望であると思われるランダムポリペプチドを支持する細胞を溶解し、そして核酸配列決定、融合タンパク質のランダム部分のアミノ酸配列の検出、およびそれ以上の研究のためにそれらのベクターを抽出する。

【0232】

同様に、ファージディスプレイ技術を使用してランダムペプチドライブラリーを発生させることができる。一般に、このアプローチは、ファージコートタンパク質の1つをコードする遺伝子の融合物として、数百万のタンパク質の変異型またはそれらの官能基をファージゲノムの中にバッヂクローニングすることを含む。いったん発現されると、コートタンパク質の融合産物として宿主細菌中で組立てられる新しいファージ粒子の中に組込まれる。引き続いて融合タンパク質を成熟ファージコートタンパク質の中に組込むと、リガンド（例えば、ペプチドまたはペプチドフラグメント）はファージ表面上に提示されるが、対応する遺伝物質

はファージ粒子内にとどまる。ディスプレイされたリガンドとリガンド遺伝子型との間のこの接続は、注目のターゲットに結合するリガンドをディスプレイするファージの濃縮を可能とする。このアプローチの概観について、例えば、下記の文献を参照のこと：PhizickyおよびFields、Microbiological Reviews、59：91 - 123（1995）およびHoogenboom他、Immunotechnology 4：1 - 20（1998）、それらの両方は引用することによって本明細書の一部とされる。また、下記の文献を参照のこと：Devlin他、Science 249：404 - 406（1990）；ScottおよびSmith、249：386 - 390（1990）；Cwirla他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87：6387 - 6382（1990）；Fong他、Drug Development Research、33：64 - 70（1994）；ScottおよびSmith、Methods of Enzymol. 217：228 - 257（1993）；Smith、Science 228：1315 - 1317（1985）；Sawyer他、4 Protein Engineering 947 - 53（199）；Takamatsu他、151 J. Immunol. 4651 - 59（1993）、およびDower他、米国特許第5,427,908号、それらの各々はその全体において引用することによって本明細書の一部とされる。

【0233】

コンビナトリアル化学は、ライブラリーの化学的メンバーを系統的方法に従い化学的サブユニットの組立てによりつくる合成法である。こうしてライブラリー中の各分子は、1またはそれ以上のこれらのサブユニットから構成される。化学的サブユニットは、天然に存在するまたは修飾されたアミノ酸、天然に存在するまたは修飾されたヌクレオチド、天然に存在するまたは修飾されたサッカリドまたは有機または無機であるかどうかにかかわらず、他の分子を包含する。典型的には、各サブユニットは少なくとも2つの反応性基を有し、各サブユニットの最初に1つ、次いで他の基を反応させて、連続的にいっそう複雑な、潜在的に多様の分子を構築することによって、段階的構築またはより大きい分子を可能とする。固定された数の個々の構築ブロック、例えば、20の天然に存在するアミノ酸を合成の各工程において等しく利用可能とする方法を使用することによって、化合物の非常に大きいアレイまたはライブラリーを合成反応の数工程後にさえ組立てることができる。

【0234】

1つの一般的コンビナトリアルアプローチは、各ライブラリーの配置がその化合物の合成構造に関する情報を与えるように、組織的な前もって決定した方式で固体支持体上でコンビナトリアルライブラリーを化学的に合成することを包含する。例えば、下記の文献を参照のこと：米国特許第4,833,092号；WO 94 / 05394；およびGeysen他、J. Imm. Meth. 102 : 259 - 274 (1987)、それらの各々はその全体において引用することによって本明細書の一部とされる。他のアプローチは、標準的固相タンパク質化学および感光性保護基を使用する光リソグラフィーの組合せを包含する。例えば、下記の文献を参照のこと：Pirrungに対する米国特許第5,143,854号；WO 90 / 15070；WO 92 / 10092；およびFodor他、Science 251 : 767 - 773 (1991)、それらの各々はその全体において引用することによって本明細書の一部とされる。

XII. スクリーニング / 薬剤の発見

A. 一般論

現在の薬剤発見のプログラムは典型的には相互作用的プロセスを包含し、このプロセスにおいて、大きいライブラリーをスクリーニングして注目のターゲットに結合するターゲットを同定し、次いでターゲットを使用していっそ収束されたライブラリーを調製し、そしてこれらのライブラリーをさらにスクリーニングする。このようなアプローチを適切に働くために、急速なスクリーニングプロトコルが必要である。多数のスクリーニング法の制限は、ターゲット / リガンド複合体を直接的に検出できることである。その代わりに、典型的には結合性複合体を同定するために標識を使用することが必要である。さらに、特異的結合と非特異的結合とを区別することは通常不可能である。こうして、収束されたライブラリーは、複数のラウンドのスクリーニング後でさえ、ターゲットに非特異的結合するリガンドをしばしば含む。それ以上の制限は、多数のスクリーニング法が、分離工程が不要である均質アッセイよりむしろ結合したリガンドを遊離リガンドから物理的に分離する洗浄工程を含む、分離に基づくアプローチであることである。

【0235】

B. 結合するリガンドを同定するためのスクリーニング

タンパク質に結合するリガンドについてスクリーニングする大部分の現存する方法は、注目のタンパク質に結合するリガンドを検出することを単に含む。スクリーニングの初期のラウンドの間に同定されたリガンドをスクリーニングの引き続ラウンドに付して、いっそ収束されたライブラリーを作り、このライブラリーから潜在的能力を有する主要な化合物を選択することができる。

【0236】

また、本発明の方法は、スクリーニングが単に注目のタンパク質とリガンドとの間に結合を検出することを含むようなスクリーニングプロトコルにおいて使用することができる。一般に、このような方法は、タンパク質ターゲットを信号通路にカップリングさせ、次いでリガンドを含有する試料とタンパク質ターゲットを接触させることを含む。信号を信号通路に沿って伝搬させ、次いでタンパク質／リガンド複合体により試験信号の変調から生ずる応答信号を検出する。ある方法において、タンパク質ターゲットを連続伝送ラインに直接取付ける。他の方法において、1またはそれ以上のリガンドを信号通路にカップリングさせ、タンパク質ターゲットをリガンドと接触させる。前述したように、このアッセイにおいて使用するリガンドは、例えば、下記のものを包含するタンパク質に結合することができる、事実上任意の化合物であることができる：抗体、ペプチド、核酸、全細胞、細胞表面レセプター、小胞、脂質、およびその他。

【0237】

C. 生物学的機能をベースとするスクリーニング

本発明の検出システムを使用して種々のスクリーニングアッセイ実施して、あるタイプの生物学的活性または機能に影響を与える分子を同定することができる。例えば、タンパク質ターゲットと他の化合物との間の結合、例えば、タンパク質ターゲットと他のタンパク質、核酸、または細胞との間の結合に影響を与えるリガンドについてスクリーニングすることが可能である。1つのアプローチにおいて、種々の異なる被験リガンド（典型的にはライブラリーからの）の各々をターゲットタンパク質に結合することが知られているリガンドと個々に混合する。次いで、この混合物をバイオアッセイ装置の信号通路にカップリングされたターゲットタンパク質と接触させる。ターゲットタンパク質／既知リガンドについて

の応答信号の検出は、試験リガンドが結合に有意に影響を与えないことを示す；応答信号の非存在は、他方において、試験リガンドがターゲットタンパク質と既知リガンドとの間の結合を阻害できることを示す。

【0238】

こうして、特定ターゲットとターゲットタンパク質に結合する既知核酸との間の結合を妨害するリガンドを同定するためにスクリーニングを実施する場合において、既知核酸を含有する試料を試験リガンドと混合する。次いで生ずる混合物を信号通路にカップリングされたターゲットタンパク質と接触させる。信号を信号通路に沿って伝送して、ターゲットタンパク質と核酸との間で形成された複合体と相互作用させる。応答信号の検出は、試験リガンドがターゲットタンパク質が核酸に結合するのを妨害しないことを示す；期待する信号の非存在は、試験リガンドが結合を妨害し、こうして潜在的に有用な生物学的活性を有しうることを示す。別のアプローチにおいて、ターゲットタンパク質および既知リガンドを最初に一緒に混合して、結合性複合体を形成し、引き続いて試験リガンドを添加する。応答信号の喪失は、試験リガンドがターゲットタンパク質および既知リガンドを含む結合性複合体を不安定にすることを示す。

【0239】

生物学的活性と相關する結合の検出を包含するスクリーニングアッセイの他の例は、生物学的レセプターを通して信号を実際に伝達する試験リガンドの能力をスクリーニングする例である（例えば、WO 98/25146、これはその全体において引用することによって本明細書の一部とされる、参照）。このタイプのアッセイにおいて、試験リガンドが細胞中のレセプターに結合し、リポーター分子の発現を誘発することができ、次いでリポーター分子が結合して検出可能な結合性複合体を形成する場合においてのみ、検出可能な結合性複合体が形成される。

【0240】

また、当業者は理解するように、生物学的活性を有する結合性複合体の形成についてアッセイすることを包含する、広範な種類の他のこのようなスクリーニングメカニズムを開発することができる。

【0241】

D. プロファイルまたはサインを使用するスクリーニング

1. 特異的結合vs非特異的結合

多数の現在のスクリーニングアプローチは、試験リガンドがターゲットタンパク質に結合するかどうかしか示さないという制限を有する。このような情報は、現実の生物学的関係を有する試験リガンドについてのスクリーニングにおいて、多少制限された価値を有する。なぜなら、特異的結合と非特異的結合とを区別することが不可能であるからである。ある種の方法、例えば、細胞レセプターに結合し、発現を誘発する能力について試験リガンドをアッセイすることについてちょうど記載した方法が開発されたが、これらのアッセイは非常に複雑でありかつ時間を消費する傾向がある。

【0242】

本発明のいくつかの方法は、対照的に、一般的に前述したように、特異的結合と非特異的結合とを区別することができる。このような区別を行う能力は、ターゲットタンパク質上の生物学的に関係する部位に結合する試験リガンドをいっそく急速に同定することにおいて、大きい価値を有する。区別を行うことができる方法は、前述のプロファイルまたはサインに基づく方法を利用する。タンパク質およびそれに結合することができるリガンドを含むスクリーニング方法において、ターゲットタンパク質および特異的結合性複合体を形成することが知られている天然リガンドについてプロファイルを得る。このようなプロファイルから、前述したように特異的結合の特徴を示す信号を同定することが可能である。こうして、スクリーニング実験の間に、本発明のある種の方法はターゲットタンパク質に結合する試験リガンドを単に同定するばかりでなく、かつまた天然リガンドが結合する部位に結合するものに結合するリガンドのグループを同定することができる。このような区別を行う能力により、最も価値を有すると思われる試験リガンドにいっそく急速に集中することができる。

【0243】

2. 相互作用の特質による分類

本発明のある種の方法を使用すると、特異的結合と非特異的結合とを区別するよりもいっそく進歩した生物学的に関係するレベルでスクリーニングすることが

可能である。ここでも、プロファイルまたはサインを得ることについて前述したアプローチを使用して、本発明の方法を使用して、ターゲットタンパク質と結合したリガンドとの間に存在する相互作用の特異的タイプの特徴を示す信号を同定することが可能である。こうして、ある種の方法を使用すると、天然リガンドが結合する部位にリガンドが特異的に結合するかどうかを同定することが可能であるばかりでなく、かつまた相互作用の特質を区別することが可能である。こうして、いくつかの方法は特異的に結合するばかりでなく、かつまた特異的方法でターゲットタンパク質と結合するリガンドについてスクリーニングすることを含む。

【0244】

例えば、ある種の方法において、ターゲットタンパク質に対する種々のアゴニストの結合固有の信号または信号の組を同定することが可能である。信号のこの組または信号の組は、ターゲットタンパク質に対する種々のアゴニストの結合固有の信号または信号の組の存在について、ターゲットタンパク質と試験リガンドとの間の実験スペクトルを検査するとき有効である。このような信号または信号の組の存在は、試験リガンドがアゴニストであることを示す。特定ターゲットタンパク質に結合するインヒビターの特徴を示す信号を使用して、同様なタイプの分析を実施することができる。このような信号は試験リガンドのライブラリーを特定のターゲットタンパク質の阻害複合体固有の信号についてスクリーニングするのに使用でき、このような試験リガンドがターゲットタンパク質を阻害する強い候補であることを示す。

【0245】

ある種の方法を使用して関連するタイプのリガンドを区別する、例えば、アゴニストとアンタゴニストとを区別する、更には競合インヒビターとアロステリックインヒビターとを区別することさえ可能である。例えば、アゴニストとアンタゴニストは結合時にターゲットタンパク質において異なるコンフォメーションの構造を誘導するので、アゴニストと特定ターゲットタンパク質との結合固有の信号または信号の組、およびアンタゴニストの結合固有の他の信号または信号の組を同定することが可能である。こうして、実験的スペクトルをアゴニストまたは

アンタゴニストの信号の存在について検査して、結合する試験リガンドがアゴニストまたはアンタゴニストであるかどうかを決定することができる。同様なタイプの研究を使用して、競合インヒビターとアロステリックインヒビターとを区別し、それらについてスクリーニングすることができる。種々の他のタイプの区別を利用して同様なタイプの高度に精巧なスクリーニング分析を実施して、大部分の生物学的に関係するように見えるリガンドのみを同定することができる。

【0246】

3. 多重部位タンパク質

いくつかのタンパク質ターゲットはリガンドが結合する複数の活性部位または多重部位を有し、こうしてタンパク質のコンフォメーションを変更し、生理学的作用を誘導する。生理学的作用は各結合部位について固有であることができる。慣用技術、例えば、蛍光は結合事象しか同定できない；慣用アプローチを使用して、種々の部位における結合を区別することは困難である。しかしながら、本発明の方法を使用すると、異なる部位における結合を区別することが可能である。なぜなら、本発明の方法は結合性複合体の誘電性を変更する、構造的特徴および変化に対して感受性であるからである。特に、前述の方法を使用して、種々の部位における結合の特徴を示す、ある種の信号を同定することが可能である。このような信号の知識を使用して、種々の部位における結合事象を区別することが可能である。

【0247】

E. オーファンレセプターのスクリーニング

「オーファンレセプター」は、既知リガンドが同定されてきていないレセプターを意味するためにこの分野において使用する用語である。このようなレセプターについての研究は多数の現存する方法では複雑化している。なぜなら、このような方法は注目のタンパク質ターゲットに結合できる試験リガンドを同定する競合的結合の研究をしばしば含むからである。競合的結合アッセイにおいて、ターゲットタンパク質に結合できる標識化リガンドは、ターゲットタンパク質に対する結合について試験リガンドと競合する。標識化リガンドの存在量および結合量についての知識から、ターゲットタンパク質に結合する試験リガンドの能力を評

価するために使用できる標準的曲線を作ることが可能である。

【0248】

しかしながら、このような競合的研究はオーファンレセプターでは不可能である。なぜなら、定義によれば、タンパク質標的に結合できるリガンドは知られていないからである。本発明の方法を使用すると、対照的に、オーファンレセプターに結合できるリガンドを同定することができる。なぜなら、本発明の方法によれば、標識を使用しないで、ターゲットタンパク質とリガンドとの間の結合を直接的にモニターすることが可能であるからである。

XIII. アレイを使用するスクリーニング

A. 方法

本発明のある種の方法において、スクリーニングプロセスを実施するためにアレイを利用する。アレイの使用により、試料の処理量を大きく増加させることができる。構造的に、アレイは典型的には複数の素子または部位を含む固体支持体上に形成される。本発明のスクリーニング法において、アレイの各素子は、タンパク質ターゲットまたはリガンドが電磁的にカップリングされるか、あるいは直接的に取付けられる信号通路、例えば、伝送ラインを含む。多数のスクリーニング試験において、目標は1つのタンパク質ターゲットに対して多数の化合物をスクリーニングすることである。こうして、このような方法において、任意の素子内に位置するすべてのタンパク質ターゲット、ならびに異なる素子におけるすべてのターゲットは同一である。各素子を異なる試料と接触させ、各試料は異なる化合物を含有する。このようにして、ライブラリー中の異なる化合物を共通のターゲットでスクリーニングすることができる。

【0249】

しかしながら、他の方法において、任意の特定の素子中のすべてのタンパク質ターゲットは同一であるが、異なる素子中のタンパク質ターゲットは互いと異なることが望ましいことがある。これにより、スクリーニングすべきリガンドまたはリガンドのグループをいくつかの異なるタンパク質ターゲットに対して試験することができる。それゆえ、例えば、10の異なるプロテアーゼインヒビターをターゲットとして使用することを仮定すると、アレイは10列または行の素子を含み

、各素子は異なるプロテアーゼを有することが好ましい。

【0250】

種々のアレイ素子におけるターゲットの種類とは無関係に、各素子に走行する信号通路に信号を発射して、種々の素子の各々における結合をモニターする。発射した信号の変調を使用して、ターゲットおよび試料中のリガンドとの間の結合を検出する。アレイをミクロ流体装置と組み合わせて使用して、異なるアレイに微量の異なる試料をコントロール可能に添加することができる。すべてのターゲットが同一である場合、典型的には流体装置を使用して種々のアレイに異なる試料を小出しする；これに対して、種々の素子におけるタンパク質ターゲットが異なるとき、流体装置はアレイの異なる素子に同一の試料を小出しする。

【0251】

いくつかの方法において、前述したように固体支持体上で合成されたアレイを利用する。ある種の方法において、注目のタンパク質ターゲットに結合することが知られているリガンドの配列（「先導配列」）を利用して、アレイ上で合成されたスクリーニングの引き続くラウンドにおいて使用すべき配列の選択を知らせることによって、所望の生物学的活性を有する可能性が高いリガンドに向かってスクリーニングプロセスを集中させることができると可能である。例えば、米国特許第5,770,456号（これはその全体において引用することによって本明細書の一部とされる）参照。こうして、先導配列の1またはそれ以上の位置において系統的バリエーションをつくることによって、先導配列に関係する1系列のリガンドを合成する。この理論は、ターゲットタンパク質に結合することが知られている配列（例えば、ペプチド）の小さい変更がより高い生物学的活性を有する配列を生ずることができるということである。

【0252】

B. アレイの設計

アレイ中の素子の数は、主としてアレイを使用するスクリーニング用途の種類に基づいて、広く変化する。ライブラリーのスクリーニングの初期段階において、多数の化合物が急速にスクリーニングできるように、多数の素子が好ましい。このような用途のためのアッセイは 10^6 までの素子を有することができる。他の

場合において、アレイの中に 10^3 までの素子が存在する。なお他の方法において、例えば、初期ラウンドのスクリーニングから潜在的に療法上の価値を有する先導化合物のすぐれた候補であると思われる化合物を使用して、より高い分解能の研究を実施しようとするとき、単一の素子のみが存在することができる。それゆえ、一般に、アレイ中の素子の数は1、10、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、または 10^6 、またはそれらの間の任意の数または範囲であることができる。

【0253】

また、アレイを構成するタンパク質ターゲットまたはリガンドの密度は有意に異なってよい。必要な密度は種々の因子、例えば、信号感度の程度、溶液中のリガンドの数、および研究下の特定複合体についての特性ピークが十分に規定されかつ他の複合体からの信号から解明されるかどうかに基づいて異なる。最適な状況において、本発明のシステムの感度およびある種の複合体と相關することが知られている信号を使用して分析を実施する能力は、素子が単一のターゲットまたはリガンドを含有できることを意味する。しかしながら、他の状況において、タンパク質ターゲットまたはリガンドの密度は100ターゲット/ cm^2 までであることができる。なお他の方法において、密度は 10^8 ターゲット/ cm^2 まで、 10^{12} ターゲット/ cm^2 までおよび 10^{18} ターゲット/ cm^2 までであることができる。それゆえ、一般に、ターゲットの数は1ターゲット/素子、または 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{16} 、 10^{17} 、または 10^{18} ターゲット/素子まで、またはそれらの間の任意の数を含むことができる。

【0254】

C. アレイおよびミクロ流体装置のカップリング

アレイまたはミクロ流体技術に従い、本明細書に記載する方法をハイスループットのスクリーニングプロセス(HTS)において使用することができる。このようなアプローチにおいて、数十万の導電性材料を特定ターゲットに結合する能力についてスクリーニングするか、あるいは前述のより高いレベルの分析に従いスクリーニングする。例えば、高度に並列のスクリーニングプラットフォームを実現できるように、本明細書に記載する本発明を小型化することができる；何百も

何千もの化合物を同時にスクリーニングすると同時に、結合効果（例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト）、アフィニティー、反応速度、およびその他を測定できるプラットフォーム。さらに、このような小型システムは非常に少量の化合物を必要とし、こうしてコンビナトリアルライブラリーから前記化合物を購入するコストを大きく節約する。

【0255】

バイオアッセイ装置を使用して形成された検出システムは、検出が必要に応じて実時間で行われかつ多数の試料を急速に分析することができるので、ハイスループット検出システムである。応答期間をナノセカントの時間目盛りで必要に応じてモニターする。分子が互いに結合するとすぐに、検出できる。低い濃度の測定または低い結合アフィニティーを有する分子間の測定に、必要に応じてより多くの時間を必要とする。実際の時間は必要に応じて拡散時間により制限される。潜在的制限以外において、数千の化合物を必要に応じてシステムを通して非常に急速に、例えば、1時間で走行させる。チップ製作技術を使用して、拡散時間最小にするために小さい体積を使用しつつ結合反応の開始においてのみ反応速度の測定を行って、 10^7 の試料／時を必要に応じて測定する。濃度が知られているとき、結合アフィニティーを必要に応じて反応速度から計算し、こうして装置を非常に速い時間でプロービングし、そしてアフィニティーを反応速度曲線の勾配から計算および／または推定することができる。

XIV. 収束されたスクリーニング

最も簡単なアプローチにおいて、スクリーニングの初期ラウンドはライブラリー中のどのリガンドが注目のタンパク質に結合するかを同定することを単に含む。ある場合において、次いでこの初期グループのリガンドを2回目に試験して第1ラウンドのスクリーニングからの結果を確認する。次いで再現性結合を証明する生ずるリガンドのサブグループを典型的には投与量応答試験に付す。投与量応答試験において、異なる濃度のリガンドを一定数のタンパク質ターゲットと接触させ、結合性複合体について生ずる信号を測定する。信号パラメーター（例えば、1またはそれ以上の特定ピークの強度）vs濃度のプロットを調製する。すぐれた投与量応答はシグモイド曲線を生じ、ここで典型的にはリガンドの非常に低い濃

度において信号応答はほとんど存在せず、より高い濃度において急速な信号変化、次いで最後にタンパク質ターゲットが飽和するにつれて信号のプラトーが存在する。

【0256】

ある種の濃度において比較的小さい濃度変化で有意な信号変化が存在するよう、投与量応答はすぐれたダイナミックレンジをもつべきである。そうでなければ、所望の生理学的応答を達成するために大量のリガンドを与えることが必要である。より高い濃度において、望ましくない副作用および毒性の危険が増加する。アレイを使用して、投与量応答の研究を実施できる。このような場合において、例えば、異なる濃度のリガンドを有する溶液をアレイ中で異なる素子に対して暴露することができ、各アレイは同一数のペプチドターゲットを有する。タンパク質ターゲットの数が素子毎に変化する場合、異なる素子についての結果を正規化することが必要である。

【0257】

次いで、すぐれた投与量応答を示すリガンドを典型的には種々のアナローグ合成の基準として使用する。次いでアナローグを追加のラウンドのスクリーニングに付して、強い結合性リガンドを同定し、潜在的に療法上の価値を有するリガンドのいっそう収束された集合物を形成する。

【0258】

サインまたはプロファイルを使用するスクリーニングアプローチは試験を有意に合理化し、過度のスクリーニングラウンドを減少する。このような方法において、初期のスクリーニングラウンドは、例えば、特異的または非特異的にターゲットタンパク質に結合するとしてリガンドを分類するか、あるいは構造的特徴に従いリガンドを分類することを含む。こうして、初期のスクリーニングプロセスにおいて、所望のクラス内のリガンドのみを選抜する。こうして、スクリーニングプロセスがアゴニストを同定することである場合、スペクトルをアゴニスト固有の信号について検査する。アゴニスト結合固有の信号を表示できないすべてのリガンドを排除することによって、ライブラリー中のリガンドの非常に高い割合を無視することができる。プロファイルを使用することによって、単に結合し

ない化合物を排除することができるばかりでなく、かつまた結合性複合体を形成するが、誤ったタイプであるある種のリガンドを排除することができる。次いでリガンドのこのいっそう収束されたグループを投与量応答、合成および前述の追加のスクリーニング試験に付して、療法上の有望性を示すリガンドを同定することができる。スクリーニングプロセスにおいていっそう選択的な基準を使用することによって、治療剤として潜在的価値を有するリガンドを非常にいっそう急速に同定することが可能である。

XV. 抗体

A. 一般論

本発明は、種々の分析的および診断的用途において使用できる抗体またはそれらのフラグメントを使用する種々の方法を提供する。これらの方は、完全な抗体またはそれらの任意の種々のフラグメント、例えば、 $F(ab)'$ 、Fab、またはscFvフラグメントを利用することができる。本明細書において使用するとき、抗体という用語はこのようなフラグメントを包含する。

【0259】

抗体を使用して伝統的研究は、競合結合の研究、ELISA（酵素結合イムノアッセイ）、およびサンドイッチ型アッセイは、例えば、抗原または抗原／抗体複合体の存在を検出する複雑な手順をしばしば含み、ほとんど常に標識の使用を含む。上に示したように、本発明の方法はリガンド／抗リガンド複合体の直接的検出を含み、それゆえ大きく簡素化し、分析を実行できる速度を増加する。

【0260】

B. 伝送ラインへの取付け

一般に、伝送ラインに抗体を取付ける化学は、伝送ラインに一般的にタンパク質を結合することについて前述した化学と同一である。しかしながら、抗体よりもむしろ抗原を伝送ラインに取付ける場合において、特に抗原が小分子であるとき、抗体が結合できるように伝送ラインから抗原を取出すために、リンカーを介して伝送ラインに抗原を取付けることが望ましい。他の場合において、抗原を高分子、例えば、タンパク質（例えば、BSA）に結合し、次いでこれは伝送ラインに取付けることができる。

【0261】

C. 診断の用途

1. 一般論

本発明は、医学的に関係する特定抗原または抗体の存在を同定する診断試験を実施する方法を提供する。一般に、これらの方法は、信号通路の一部分にカップリングされた既知抗体を、既知抗体に特異的に結合する抗原を潜在的に含有する試料と接触させることを含む。応答信号の発生により、結合性複合体の形成を検出する。応答信号の検出は試料中の抗原の存在を示し、そして応答信号を検出できないことは抗原が試料中に存在しないことを示す。また、既知抗原を信号通路にカップリングさせ、抗原と特異的複合体を形成する抗体の存在について試料を検査することによって、分析を変更することができる。

【0262】

2. 潜在的抗原

潜在的に医学的意味を有しつつ本明細書に広く記載する方法を使用してアッセイできる潜在的抗原は、例えば、ペプチド、オリゴ糖、ステロイド、核酸および細胞または細胞成分を包含する。これらの方法は、病原体、例えば、ウイルスまたは細菌、代謝物質および異化物質、例えば、グルコース、脂質、肝臓酵素、電解質、凝固因子をモニターするとき重要であることがある。検出できる分子の1つの重要なクラスには腫瘍マーカーが含まれる。このような腫瘍マーカーは、マーカー、例えば、CEA（絨毛膜胚抗原）またはPSA（前立腺特異的抗原）、ならびに広範な種類の他のマーカーを包含することができる。

【0263】

検出できる潜在的リガンドの他のグループは、乱用薬剤およびそれらの代謝副産物、例えば、コチニン、コカイン、ベンゾイルエクゴニン、ベンゾジアゼピン、テトラヒドロカンナビノール、ニコチン、エタノールを包含する。同様に、療法上の薬剤、例えば、テオフィリン、フェニトイン、アセトアミノフェン、リチウム、ジアゼパム、ノルトリピチリン、セコバルビタール、およびその他の存在を検出することができる。

【0264】

ホルモンは、検出できるリガンドの他の広いカテゴリーを構築し、非限定的例は下記のものを包含する：増殖因子、例えば、テステステロン、エストラジオール、17-ヒドロキシプロゲステロン、プロゲステロン、チロキシン、甲状腺刺激ホルモン、卵胞刺激ホルモン、黄体化ホルモン、形質転換因子アルファ、表皮成長因子、インスリン様成長因子IおよびII、成長ホルモン放出阻害因子、および性ホルモン結合性グロブリン。アッセイできる他の可能な分子は、グルコース、コレステロール、カフェイン、コルチコステロイド結合性グロブリン、DHEA結合性糖タンパク質およびその他を包含する。

【0265】

小分子に加えて、種々の大きい分子、さらには細胞および細胞成分を検出することができる。例えば、感染性病原体、例えば、ウイルス、細菌、真菌およびその他の存在を検出し、定量することができる。結合は抗体と相互作用することができる特徴的な表面マーカー（例えば、膜レセプターまたはレクチン）を通してしばしば形成される。病原体の例は、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、肝炎（例えば、A、BおよびC型肝炎）、麻疹、流行性耳下腺炎、および風疹を包含する。また、患者の血液中のHIVタンパク質の存在を検出することができる。同様に、特徴的なマーカー（例えば、IL-13レセプターを過剰に発現する腫瘍細胞（例えば、米国特許第5,614,191号参照））を有する細胞型（例えば、特定組織の特徴を示す細胞）を検出することができる。こうして、特定病原性、分化の特定状態（またはその欠如）または特定組織のタイプを示す細胞を検出および/または定量することができる。ある種の方法を使用すると、本発明は細胞をベースとするアッセイに拡張することができる。なぜなら、検出は試料の精製および增幅を必要とすることができるからである。これらのクラスの用途において、外部の発現を検出することによって、あるいは細胞を溶解して細胞質ゾル成分を解説し、1またはそれ以上の注目の被検体の存在を検出することによって、細胞システムを種々の変化についてモニターすることができる。

【0266】

抗原を信号通路にカップリングさせると、種々の抗体を検出することができる。例えば、HIVに対して特異的な抗原、特異的抗原、例えば、ANA（リウマチ学

的疾患において使用される)およびアレルギー応答性抗体。

【0267】

3. アレイの使用

アレイを診断用途において使用して、いくつかの抗原の存在について試験するか、あるいは複数の試料を急速に試験することができる。しかしながら、一般に、比較的わずかの数の抗原または抗体が典型的なアッセイにおいてスクリーニングされるという事実により、診断用途における素子の数は比較的わずかの数である傾向がある。多数の方法は単一の抗原または抗体の検出を含む。このような場合において、種々の異なる試料の各々を特定の抗原または抗体についてスクリーニングすべき場合を除いて、単一の素子が十分であることがあり、この場合においてアレイは複数の素子を含み、各々は同一の抗体または抗原を含有する。あるいは、単一の試料中のいくつかの異なる抗原または抗体をアッセイすべき場合、複数の素子が望ましいことがある。最後に、対照として働く重複素子を含めるために、複数の素子が望ましいことがある。典型的には、素子の数は50より小さく、1~10であることができる。しかしながら、診断法における素子の数についての制限は分析の特質の反映であり、薬剤スクリーニングの節において前述したように、非常により多くの素子を有するアレイを調製する能力と無関係である。

【0268】

任意の所定の素子内の抗体または抗原の数は、薬剤発見法において前述したのを同一の考察および因子に依存する。

【0269】

D. 非臨床的用途

関係する方法は、非臨床的用途において種々のリガンドの存在を検出するために抗体を使用することを包含する。このような場合において、これらの方法は注目の特定リガンドの存在を検出するために使用される。例えば、この方法は排水処理分析において使用することができる。この場合において、検出するリガンドはトキシン、微生物または微生物が発生した産物であることができる。

【0270】

E. エピトープの決定

抗体またはそのフラグメントのエピトープは、本発明のある種の方法に従い決定することができる。1つのアプローチは系統的方法においてリガンドを合成して、変化する配列を有するリガンドの多様な組を得ることを含む。これらのリガンドをアッセイフォーマット、例えば、前述のフォーマットで合成し、次いで注目の抗体でスクリーニングすることができる。1またはそれ以上のリガンドのどれに抗体が結合するかを検出することによって、抗体が認識する配列を決定することが可能である。第2アプローチはプロファイルの使用を含む。この場合において、既知抗体 / 抗原複合体についてのプロファイルのデータベースを調製する。次いで、このデータベースを解析して、特定複合体に関連する明確な信号を同定する。エピトープ配列は既知複合体について知られているので、ある種のエピトープをある種の信号と相關させることが可能である。こうして、未知エピトープに結合する試験抗体の場合において、既知エピトープの特徴を示す信号についての実験的スペクトルを検査することによって、試験抗体が認識するエピトープを同定することが可能である。

【0271】

下記の実施例は本発明のある種の面を例示するが、本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではない。

【0272】

実施例1

(コラゲナーゼおよびリゾチームについてのサインプロファイル)

第2A図に示すバイオアッセイ装置を使用して、試験を実施した。バイオアッセイ装置の結合表面は、化学蒸着法 (CVD) により載せたITOで処理したカバーガラスから構成された。ITO伝送ラインを注意して検査して、それが微小割れまたは破壊をその中に含有しないこと保証した。TDRモジュールを有するTektronix 11801信号解析器で伝送ラインを測定し、伝送ラインは32 の広帯域対照インピーダンスを有することが見出された。ライン長さは約2.6nsec長さであり、結合表面は34 のインピーダンスおよび約200psecの長さを有することが見出された。上部プレートと下部プレートとの間の距離は0.10インチ (10ミル) であり、そしてチャンバーは0.5インチの長さであった。側壁を使用しなかった；その代わり

に、上部プレートおよび下部プレートの毛管作用は溶液を所定位置に保持した。

【0273】

次いでバイオアッセイ装置にd-PBSの溶液を充填した。充填したバイオアッセイ装置を使用して、基底伝送損失($S_{2,1}$)およびリターン損失($S_{1,1}$)S-パラメーターの測定を45MHz～1GHzの試験周波数範囲にわたって実施した。ネットワーク分析装置(Hewlett Packard Company製、HP8510B分析装置、HP8516A Sパラメーター試験セットを有する)を使用して、信号を発射し、測定し、記憶した。

【0274】

引き続いて、1～10GHzの周波数範囲にわたって異なるタンパク質の異なる応答を検査する1系列の実験を実行した。同一装置を各実験に使用した(装置間の製作におけるわずかな差を排除するために)が、タンパク質の各々を適用する間にSDSで十分に洗浄した。

【0275】

第9A図および第9B図は、1GHz～10GHzの試験周波数範囲にわたって、それぞれ、コラゲナーゼおよびリゾチーム試料の一次結合の効果の伝送損失の測定を図解する。両方の場合において、信号応答は山および谷のパターンを示し、このパターンを使用してリガンドを固有に検出し、同定する。特に、コラゲナーゼ試料の周波数応答は5GHz付近において強い陽性ピークを示した。リゾチーム試料の応答は、5GHz付近において比較的平らな応答および8GHz付近において強い(コラゲナーゼ応答と比べ)陽性ピーク¹²⁰⁴を示した。検査した他の多数のタンパク質の各々について、試験信号は各タンパク質について固有であり、グループ内の未知タンパク質の同定を容易に可能とした。

【0276】

この実施例において、特定のスペクトル信号を使用して、種々の物質、例えば、タンパク質を区別できる方法を例示する。種々の複合体についての応答を記憶させ、後に検索して未知試料を同定することができる。さらに、顕著に劣るピークを集合的に検査して特定リガンドについてのパターンを決定する。

【0277】

(二次結合：コンカナバリンA対デキストランの検出)

この実施例において、タンパク質に対するリガンドの結合を検出する本発明の方法の能力を証明する。バイオアッセイ装置は実施例1に前述した装置に類似し、同様な方法において調製し、特性決定した。また、伝送ラインは実施例1に記載したものと同一であり、公称32 の対照インピーダンスを有し、そして80 のDC抵抗および34 の公称TDRインピーダンスをもつITOカバーガラスを有した。

【0278】

コンカナバリンA (con - A) 、すなわち、タチナタマメの中に見出すことができるグルコース結合性タンパク質を一次結合性抗リガンドとして使用した。ここで使用したcon - Aは、シグマ・ケミカル・カンパニー (Sigma Chemical Co.) から入手した。デキストラン、すなわち、グルコース多糖をcon - Aに結合するリガンドとして使用した。デキストランの結合を逆転さ、特異性を証明するために、グルコースを競合因子として使用した。(デキストランおよびグルコースもまたシグマ・ケミカル・カンパニーから入手した。)

con - Aのほぼ $15\text{ }\mu\text{M}$ の濃度の溶液をバイオアッセイ装置の中に直接入れ、平衡に到達させた。視的検査により確立されるように、蒸発損失はチャンバーを乾燥しなかった。システムをフラッシュし、安定化した後、デキストランを添加してcon - Aに結合させた。信号変化が検出された後、チャンバーを $10\text{mg}/\text{ml}$ のd - PBSでフラッシュし、2回目の信号応答の測定を実施した。この効果を第9C図に1GHzで示す。非結合応答を基底応答として使用した。示すように、結合した応答は非結合応答よりもノイズが 0.25dB だけ低いように見える。結合したデキストランをグルコースと競合させ、次いでd - PBSでフラッシュしてグルコースを除去することによって、結合特異性を確認した。後者の工程はデキストランが装置に添加されてしまう前に得られた基底値に信号を戻し、こうして結合事象の特異性を証明した。

【0279】

実施例3

(タンパク質小分子の結合)

実施例1に前述した装置に類似し、同様な方法において調製し、特性決定した

バイオアッセイ装置を使用し、バイオアッセイ試験フィクスチュアおよびネットワーク分析装置の構成を使用して、大きい分子、例えば、タンパク質に結合する小分子がまた本発明により検出できることを証明した。より高い周波数でバイオアッセイ装置をプローピングするために、装置は再現性がよく、ファラデーボックスの中に注意して入れて、外部の影響から装置を遮断した。これにより、装置は20GHzまでの周波数においてプローピングすることができた。最初に、con-Aをバイオアッセイ装置の中に添加し、バイオ・電気的インターフェースに結合させた。伝送損失を測定し、記憶させ、第9D図に示すように基底応答として使用した。

【0280】

次に、10mg / mlの濃度のグルコースをバイオアッセイ装置に添加し、con-A抗リガンドに結合させた。伝送損失を測定し、基底応答1252に対してプロットして、小分子の結合に基づく信号応答の変化を測定した。

【0281】

第9D図から理解できるように、con-Aへのグルコースの結合に対応する結合応答1254は基底の測定1252と区別される。特に、結合応答1254は16 ~ 20GHz間に2つの大きいピークを示し、これらのピークは基底応答1252において観測されない。測定した信号応答1252および1254における差は、グルコースがcon-A抗リガンドに結合したとき、検出のための基準を提供する。次いで、d-PBS緩衝液のみでフラッシュし、con-Aから解離した結合グルコースとして応答を逆転させた。裸のチップ(すなわち、抗リガンドとしてcon-Aの非存在)に対するグルコースの効果を検査する別の実験において、前述の周波数スペクトルにおける電磁的問合せの応答に対するグルコースの効果は存在したとしても、ほんのわずかであることが示され、こうして示された結果は完全にcon-Aに結合するグルコースの効果のためであることが示される。

【0282】

実施例4

(定量的滴定)

これらの実験において、リガンドが抗リガンドに結合するときの信号変化の大

きさは占有される部位数の関数であることを証明する。実施例1に前述した装置に類似し、同様な方法において調製し、特性決定したバイオアッセイ装置を使用する試験システムを使用し、con-Aに結合するデキストランを使用し、グルコースを競合インヒビターとして使用した。con-Aの結合定数付近に中心をなす、1系列の希釀物を調製した。100%の結合が起こるように、抗リガンドとしてデキストランをcon-Aに結合させた。分子結合表面上のデキストラン濃度が比例的に減少するように、1系列の競合グルコース濃度を使用してデキストランと競合させた。

【0283】

前述した標準伝送ラインの構成を使用した。con-Aを分子結合領域に結合させ、システムを安定化させた。次いでバイオアッセイ装置をd-PBSでフラッシュし、データを1GHzにおいて得た。この競合滴定の結果を第9E図に示す。グルコース濃度として信号変化が0mg / dIから15mg / dIに増加する方法をこれらの結果は示す。デキストランが解放され、グルコースが結合するとき、con-Aの信号は変化する（これは実際にはデキストランの結合活性を測定する）。また、グルコースのデキストラン結合効果の逆転により、特異性はまた証明された。

【0284】

いくつかの選択した濃度についてのグルコース濃度の関数として、伝送損失の変化の大きさを表2に示す。

【0285】

【表1】

表2

完全に結合したデキストラン	+320milli-dB
1mg/mlのグルコース	+280milli-dB
1.33mg/mlのグルコース	+275milli-dB
2mg/mlのグルコース	+240milli-dB
5mg/mlのグルコース	+115milli-dB
10mg/mlのグルコース	-5milli-dB

【0286】

また、簡単なグルコース滴定を表2に示す濃度レベルにおいてcon-Aのスペクトル中の共鳴点において実施した。共鳴点1260はデキストラノン完全結合状態を示し、トレース1262は1mg/mlのグルコース濃度を示し、トレース1264は2mg/mlのグルコース濃度を示し、トレース1266は5mg/mlのグルコース濃度を示し、そしてトレース1268は10mg/mlのグルコース濃度を示す。2つの効果を証明する、この共鳴点におけるグルコース濃度の関数として、リターン損失の変化を第9F図に示す：第1に、グルコースはリガンドとして投与量 - 応答効果を有し、これは抗リガンド（この場合において、これはcon-Aである）に対するその効果に基づく。第2に、スペクトルにおいて、リガンド / 抗リガンドの結合事象に対して他の領域よりも非常に高い感受性応答を示す領域が存在する。

【0287】

1ピコモル (10^{-12} モル)まで低下する濃度を取ったデキストラノン溶液の1系列の連続希釈は、これらの低い濃度においてさえ、結合を示す有意な信号応答が起こったことを証明した。信号の蓄積に必要な時間は数分から10分までの範囲であったが、応答はより高い濃度においてデキストラノンの検出の特徴を示した。

【0288】

実施例5

(全血の検出)

トロポニン - 1 (TN - 1) の検出を全未処理ヒト血液中で実施し、複雑な環境中の検出能力を確認した。未処理ヒト血液をクエン酸ナトリウムで抗凝固処理した。TN - 1のエピトープに対応する抗TN - 1抗体を較正目的で使用した。バイオアッセイ装置のインターフェース伝送ラインを抗TN - 1Ab (抗リガンド) でコーティングした。血液試料を10ng / mlの濃度のTN - 1に対するスパイキングし、そして血液の第2の同一試料を対照としてスパイキングしないで放置した。

【0289】

実験は抗TN - 1Ab抗リガンドを装置に取付けることから成っていた；次いでまず非スパイキング試料を装置を横切って走行させた；試料チャンバーを数回フラッシュして、交換ノイズを見た；次いでスパイキングした試料をまた数回置換してノイズフロアーを確立した。各場合において、伝送損失の変化を測定した。チェックとして、抗TN - 1Ab抗リガンドを装置から除去した。引き続いて実験を対照として反復して、2つの血液試料の他の性質 (TN - 1スパイクを除外して同一であると仮定する) が変化に関係するかどうかを決定した。1GHzにおけるプローブ信号についてのこの実験の結果を下記表に示す。

【0290】

【表2】

	非スパイキング試料	スパイキングした試料
対照	<20millidB	<20millidB
抗TN-1	<20millidB	+275millidB

【0291】

第2系列の実験において、10種の血液試料を臨床実験室から入手し、ヘパリンで抗凝固に関するした以外未処理であった。試料の1つのを2つの部分に分割し、その部分の1つを前節に記載したようにTN - 1抗原でスパイキングした。次いで表

面上で抗TN-1抗体を使用してバイオアッセイ装置を調製した。次いで各特異性をバイオアッセイ装置に系統的に通過させ、スパイキングした試料を最後のために取っておいた。これらの試料の各々についての応答を前の実験におけるように1GHzにおいてプローピングし、第90図に示す。スパイキングした試料は（非スパイキング）試料の残部と明瞭に区別することができた。

【0292】

実施例6

（エストロゲンレセプターに結合するアゴニストおよびアンタゴニスト）

より大きい分子において構造的变化を誘導する小分子の効果を検出するために、エストロゲンレセプター（ER）および種々のエストロゲンアナローグをモデルシステムとして使用した。バイオアッセイ装置は第20図に記載されている通りであり、そして伝送および検出は実施例1に記載されている通りであった。50mMのTris-HCl（pH8.0）緩衝液中のアルファーエストロゲンレセプター（ α -ER）（Pan Vera、ウイスコンシン州マディソン）（329pmol/mg）を37°において20分間加熱することによって金に結合させた。

【0293】

使用したステロイドエストロゲンアナローグは α -エストラジオールおよびヒドロキシタモキシフェン（HDT）（両方は異なる生理学的機能を有するステロイドエストロゲンアナローグである）、および非ステロイドエストロゲンアナローグ、ジエチルスチベストロール（DES）を誘導した。これらのアナローグは α -ERにおいて構造的变化を引き起こすことが知られている（例えば、下記の文献を参照のこと：Bourguet他、Nature 375: 377 - 382 (1995)）。異なるアナローグの各々により誘導されるものに対する変動を制限するために、実験を单一装置で継続的に実施した。これにより、金伝送ラインおよびアセンブリーの小さい差により誘導される変動の非存在下に、各アナローグが α -ERの誘電性に対して有する異なる効果をモニターすることができる。DESおよび α -エストラジオールは同一の構造的および生物学的機能を有する既知アゴニストである：HDTは α -エストラジオールおよびDESと同様であるが、同一でない、多数の構造的变化を誘導する既知アンタゴニストである（例えば、下記の文献を参照のこと：Siau他

、Cell 95: 927 - 937 (1998)）。DESおよび - エストラジオールは、同様な機能を有するアナローグとして、実験の再現性の測度を提供するので、それらをこの実験のために選択した。また、それらはS - パラメーターを既知の構造的変化との相関を可能とする。HDTを使用して、S - パラメーターに対する結合複合体の異なる検出器の効果を決定した。

【0294】

引き続いて導入されるアナローグが前に結合したアナローグと競合するように（すなわち、アフィニティーが増加する順序で）、濃度（各化合物について10pM）および配列を選択した。さらに、各アナローグを緩衝液（Tris / HCl）でフラッシュして反応器をきれいにし、解離プロセスを開始した。実験全体を37 °Cにおいて実施した。

【0295】

第10A図は、各化合物についての1~21GHzにおける全走査である。第10B図は、すべての3つの化合物についての信号を示す6~10GHzにおける拡大した走査である。プローピングしたスペクトルウィンドウ全体にわたり、2つのアゴニスト（DESおよび - エストラジオール）の応答は非常に類似する。しかしながら、拡大した走査（第10B図）において最も明瞭に示すように、アンタゴニスト、HDT、は非常に異なるスペクトルを生ずる（9~9.25GHzにおいて、より大きい振幅を有する実線はDESである；より小さい振幅を有する実線はエストラジオールについてのものである）。対照実験において、 - ERに結合しないことが知られているビオチンを同様な条件下に - ERと接触させ、ビオチンはバックグラウンドに類似する信号を与えることが見出された（結果は示していない）。

【0296】

次いでこの実験において、本発明の方法がアゴニストおよびアンタゴニストの結合を区別できることが証明される。

【0297】

実施例7

（ - エストラジオールを使用する滴定を含むエストロゲンレセプター投与量応答実験）

より大きい分子において構造的変化を誘導することが知られている小分子の濃度を増加する効果を決定するために、試験システムとして - エストロゲンレセプターおよび - エストラジオールのモデルを使用して滴定を実施した。試験装置は実施例6に記載されている通りであり、信号伝送および検出は実施例1に記載されている通りであった。50mMのTris - HCl (pH8.0) 緩衝液中の - ER (Pan V era、ウイスコンシン州マディソン) (329pmol / mg) を37 °Cにおいて60分間金に結合させた。異なる濃度の - エストラジオールを含有する異なる溶液 (Tris - HCl緩衝液中の1picomolar ; 250picomolar ; 500picomolar ; 750picomolar ; 1000picomolar ; 100nanomolar ; および500nanomolar) を单一装置で継続的に試験した。各 - エストラジオール濃度を試験した後、システムをTris - HCl緩衝液で洗浄した；次いで10分の特定の時間間隔でS - パラメーターを測定した。

【0298】

最も有効な投与量 - 応答効果は14~15GHzにおいて発生した（すなわち、このスペクトル範囲は滴定の間に最大の変動を示した）。第11図に示すように、信号測定値（伝送された力）を - エストラジオール濃度に対してプロットしたとき、1~250picomolarの濃度において効果はほとんど、あるいはまったく見られなかつた。 - ERに対する - エストラジオールの応答は750picomolar ~ 500nanomolarにおいて平らになった。曲線の全体の形状は、レセプターとそれに対して特異的であるリガンドとの結合について期待されるように、S字形である。

【0299】

実施例8

(ウレアーゼに対する抗ウレアーゼ抗体の結合)

ウレアーゼ (Sigma Chemical Co.、ミズリー州セントルイス) を安価なモデルのタンパク質として使用して、抗原に対する抗体の結合を検出するシステムの能力を証明した。バイオアッセイ装置は実施例6に記載されている通りであった。アルカンジオールを介してウレアーゼを金伝送ラインに取付けた。取付けはまずガラスチップをコーティングする金表面を熱ピラナ (piranha) 溶液 (3.0%H₂O₂ / 濃H₂SO₄ の1.3混合物) で洗浄し、次いで蒸留水でリヌスし、次いでチップを乾燥させることを含んだ。次いでチップをクロロホルム中の16 - メルカプトヘキ

サデカン酸 (Gateway Chemical Technology、ミズリー州セントルイス) の5mM 溶液の中に少なくとも12時間浸漬させ、クロロホルム中で短時間洗浄し、次いで空気乾燥した。PBS中の1.1mg / mlのスルホ - NHS (Pierce、イリノイ州ロックフォード) を試験フィクスチュアの中に入れる。金表面に60分間結合させた。次いでチップをPBSで洗浄し、1×PBS pH7.4中のウレアーゼ (0.1mg / ml) をフィクスチュアの中に入れる。金表面に10分間結合させた。

【0300】

マウスモノクローナル抗ウレアーゼクローニUR - 25 (IgG1) (Sigma) をPBS中の1 : 10,000の使用希釈物に希釈し、前述のウレアーゼコーティングしたチップに適用した。S - パラメーターを1~21GHzの範囲にわたって測定し、60分間インキュベートした後、貯蔵した。差スペクトルを第12図に示す。抗原に対する抗体の結合を検出する能力が示される。

【0301】

本発明の可能な態様を上に完全に記載したが、種々の別の態様、変更、および同等の態様を使用することができる。例えば、当業者は理解するように、前述のバイオアッセイ装置の信号通路は伝送ラインに限定されない。他の伝送媒体、例えば、導電性または誘電性導波管を選択的に使用することができる。さらに、タンパク質を信号通路、例えば、伝送ラインにカップリングさせる、いくつかの方法を記載したが、また、多数の方法を使用して、最初に伝送ラインにカップリングさせるメンバーはリガンドであることができる。

【0302】

さらに、この出願に記載したすべての刊行物および特許文献は、各個々の刊行物および特許文献がそのように個々に意味するのと同一程度に、すべての目的に対してそれらの全体において引用することによって本明細書の一部とされる。前述の説明は本発明の典型的な態様としてのみ見るべきであり、本発明の境界は下記の特許請求の範囲により規定される。

【図面の簡単な説明】

【図1A】

本発明によるバイオアッセイシステムの1つの態様を図解する。

【図1B】

本発明によるバイオアッセイシステムの第2の態様を図解する。

【図1C】

第1B図に示すバイオアッセイシステムの断面を図解する。

【図1D】

本発明による分子結合領域の1つの態様を図解する。

【図1E】

本発明に従い空間的に分離した複数の抗リガンドを有する分子結合領域の1つの態様を図解する。

【図1F】

本発明による抗リガンドの複数のクラスを有する分子結合領域の1つの態様を図解する。

【図1G】

本発明による1またはそれ以上の細胞を含有する分子結合領域を図解する。

【図1H】

本発明による細胞膜と膜関連構造とを含んでなる分子結合領域を図解する。

【図2A】

本発明によるバイオアッセイ装置の1つの態様を図解する。

【図2B】

本発明によるバイオアッセイ装置の第2の態様を図解する。

【図2C】

本発明によるバイオアッセイ装置の断面図である。

【図3】

バイオ・電気的インターフェースの導電性層に沿って起こる結合表面の化学の1つの態様を図解する。

【図4A】

本発明による分子結合事象を検出する方法の1つの態様を図解する。

【図4B】

本発明による二次およびより高次の結合事象を検出する方法の1つの態様を図

解する。

【図4C】

本発明による分子結合領域の誘電変化を測定する方法の1つの態様を図解する。

。

【図4D】

本発明による未知溶液中のリガンドを同定する方法の1つの態様を図解する。

【図4E】

本発明によるリガンドのクラスを同定する方法の1つの態様を図解する。

【図4F】

本発明による溶液のリガンド濃度を定量する方法の1つの態様を図解する。

【図4G】

本発明によるバイオアッセイ装置の自己診断能力を提供する方法の1つの態様を図解する。

【図5A】

本発明による周波数測定システムの1つの態様を図解する。

【図5B】

本発明による分子構造物を検出または同定するために使用することができる、測定した第1周波数応答を図解する。

【図5C】

本発明による分子構造物を検出または同定するために使用することができる第2周波数応答を図解する。

【図6】

本発明による周波数測定システムの第2態様を図解する。

【図7】

本発明による時間ドメイン測定システムの1つの態様を図解する。

【図8】

第8図は、本発明による誘電緩和測定システムの1つの態様を図解する。

【図9A】

コラゲナーゼの一次結合作用の伝送損失測定を図解する。

【図9B】

リゾチームの一次結合作用の伝送損失測定を図解する。

【図9C】

結合および非結合のデキストランの伝送損失応答を図解する。

【図9D】

グルコースに対して結合しないおよび結合したコンカナバリン - Aの応答を図解する。

【図9E】

デキストランとグルコースとの間の競合滴定の結果を図解する。

【図9F】

共鳴におけるグルコース濃度の関数としてコンカナバリン - Aの反射減衰量を図解する。

【図9G】

複雑な環境中の検出能力を示す1GHzにおいてプローピングした全血の10試料についての伝送損失応答を図解する。

【図10A】

1~21GHzの走査であり、ジエチルスチベストロール (DES)、- エストラジオールおよびヒドロキシタモキシフェン (HDT) (破線) と - エストロゲンレセプターとの間で形成された複合体についての信号を示す。

【図10B】

第10A図に示す走査の拡大走査 (6~10GHz) である。

【図11】

- エストラジオールを使用する - エストロゲンレセプターの滴定についての投与量応答のプロットである。

【図12】

抗ウレアーゼとウレアーゼとの間で形成された結合性複合体についての信号を示す異なるスペクトルである。

【図13】

本発明によるN×Mアレイ試験システムの1つの可能な態様を図解する。

【図14A】

本発明によるN×Mアレイ試験フィクスチュア（fixture）の側面展開図である。

【図14B】

本発明によるN×Mアレイ試験フィクスチュア（fixture）の透視図である。

【図15A】

本発明によるバイオアッセイアレイの1つの態様を図解する。

【図15B】

直列に接続された、電子的にスイッチされる電界効果トランジスタを含んでなる、本発明によるアレイ素子の1つの態様を図解する。

【図15C】

直列に接続された、光学的にスイッチされる電界効果トランジスタを含んでなる、本発明によるアレイ素子の1つの態様を図解する。

【図15D】

2つの直列に接続されたFET装置の2つの部分を含んでなる、本発明によるアレイの1つの態様を図解する。

【図15E】

本発明による第7D図に示すアレイの回路同等モデルを図解する。

【図15F】

本発明による二次元バイオアッセイアレイの1つの態様を図解する。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図9A

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図9A】

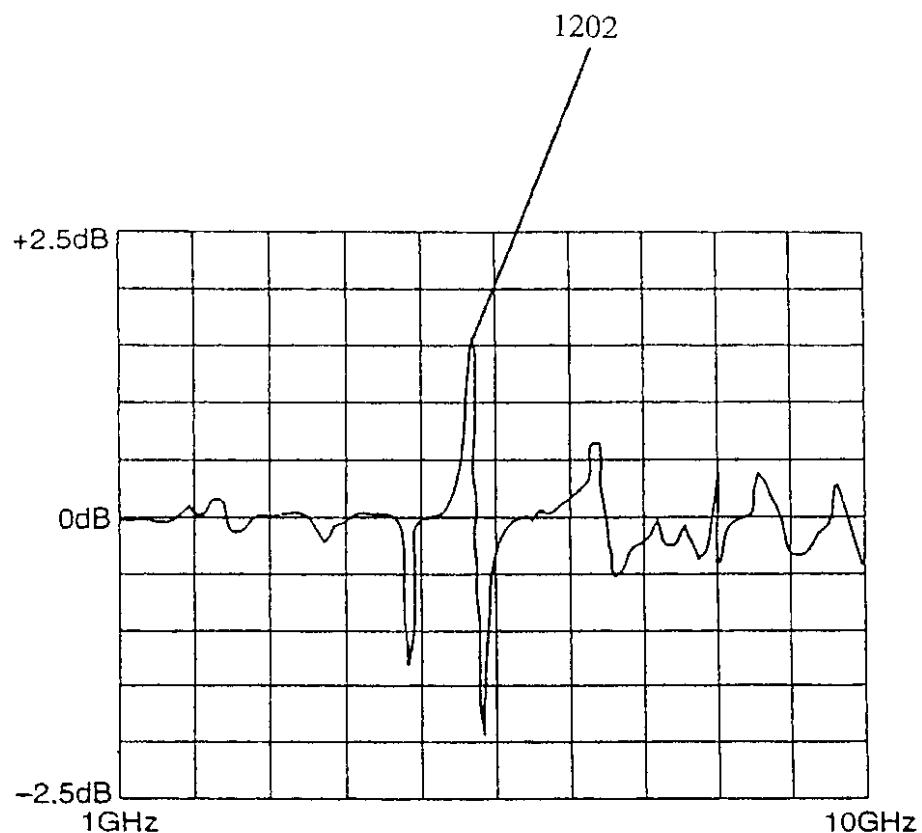


FIG. 9A

【手続補正3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図9B

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図9B】

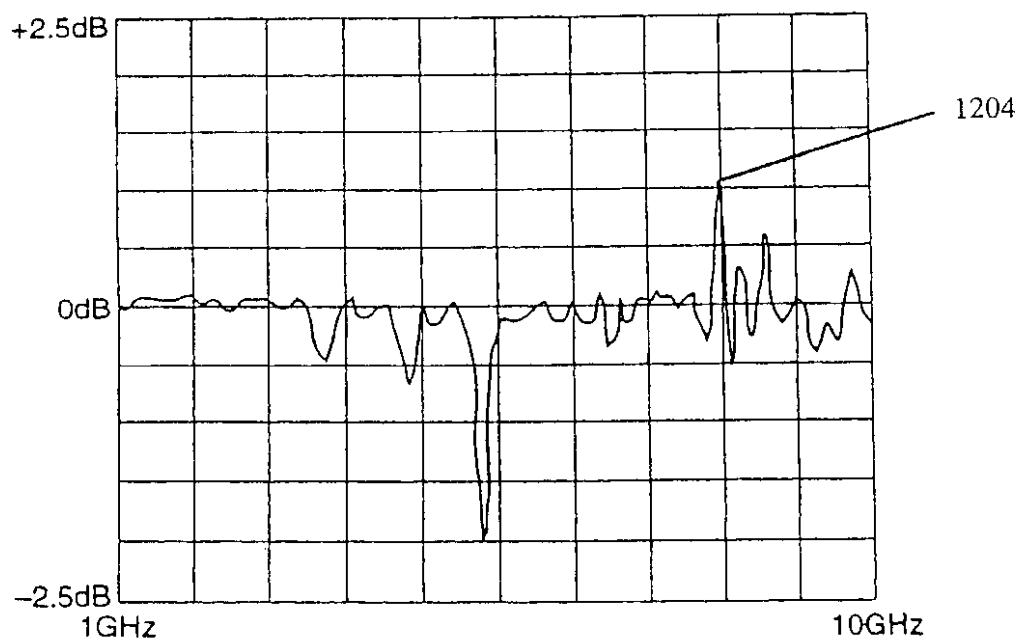


FIG. 9B

【手続補正4】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図9C

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図9C】

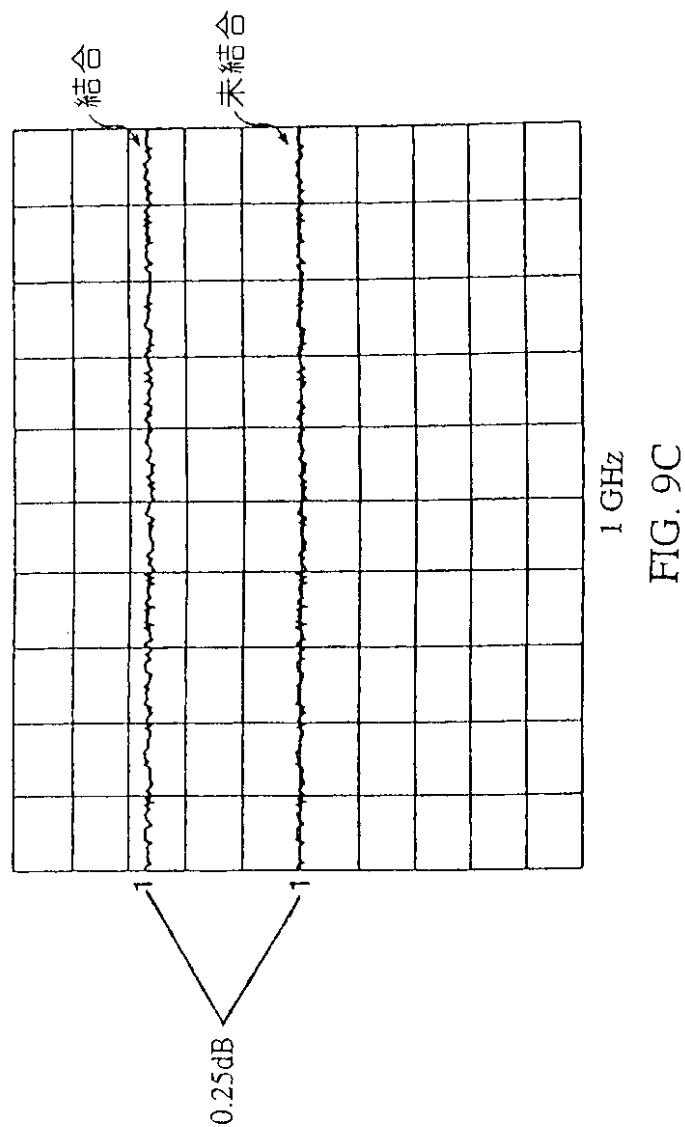


FIG. 9C

【手続補正5】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図9D

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図9D】

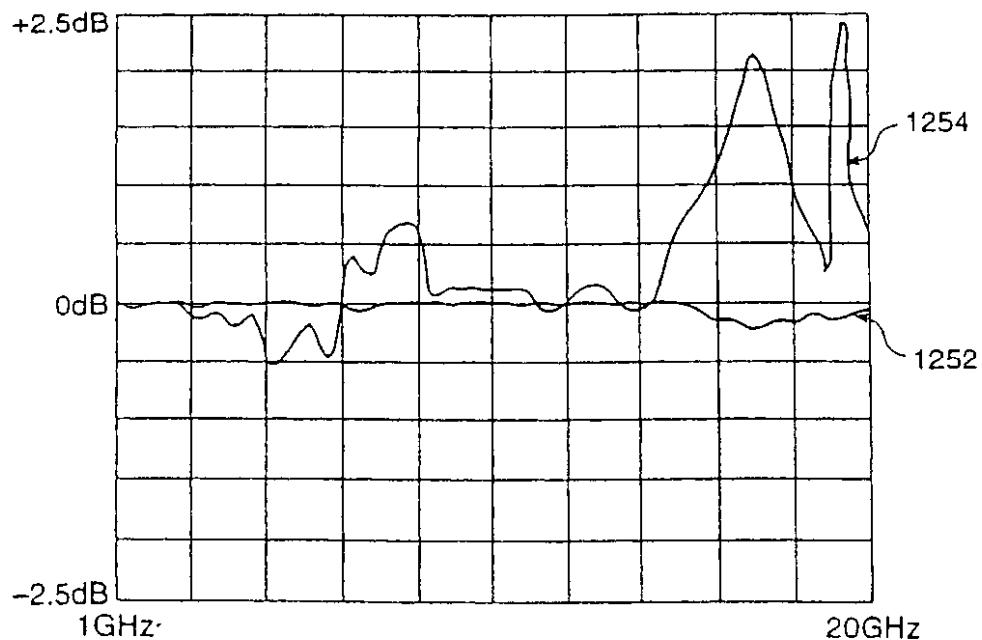


FIG. 9D

【手続補正6】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図9F

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図9F】

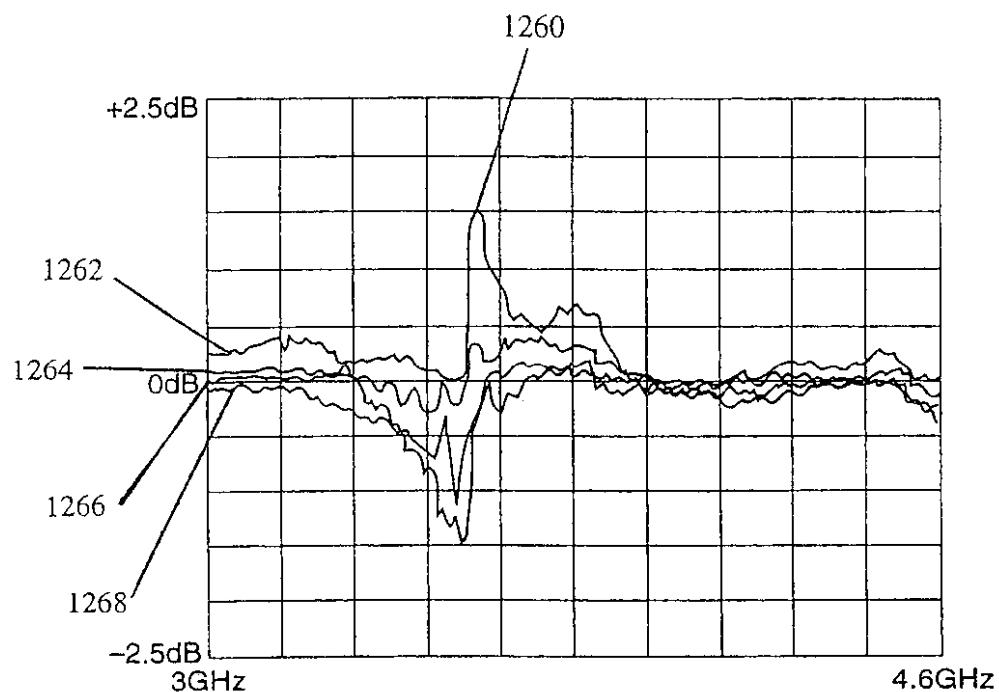


FIG. 9F

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 00/20420
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 GO1N33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 GO1N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, INSPEC, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 99 39190 A (HEFTI JOHN ;SIGNATURE BIOSCIENCE INC (US)) 5 August 1999 (1999-08-05) cited in the application the whole document	1-45
E	WO 00 45170 A (HEFTI JOHN ;SIGNATURE BIOSCIENCE INC (US)) 3 August 2000 (2000-08-03) the whole document	1-45
X	WO 98 31839 A (HARVARD COLLEGE) 23 July 1998 (1998-07-23) page 28, line 26 -page 31, line 18; figures 14,15	1-45 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
E earlier document but published on or after the international filing date		
L document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 13 December 2000		Date of mailing of the international search report 27/12/2000
Name and mailing address of the ISA, European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hart-Davis, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internal Application No PCT/US 00/20420
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 656 428 A (MCALLISTER DOUGLAS J ET AL) 12 August 1997 (1997-08-12) column 8, line 66 -column 12, line 22; figures 1,2 _____ AMO YUKO ET AL: "Dielectric measurements of lysozyme and tri-N-acetyl-D-glucosamine association at radio and microwave frequencies." BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, vol. 12, no. 9-10, 1997, pages 953-958, XP000972664 ISSN: 0956-5663 the whole document _____ HIANIK, T.: "Biosensors based on solid supported lipid bilayers and their physical properties" NATO ASI SER., SER. 2 (1997), 38(BIOSENSORS FOR DIRECT MONITORING OF ENVIRONMENTAL POLLUTANTS IN FIELD), 317-333, XP000974403 page 323 -page 325 _____ WO 98 09168 A (BIOTECHNOLOGY RES & DEV ;PENN STATE RES FOUND (US)) 5 March 1998 (1998-03-05) the whole document _____ WO 93 08464 A (HOLM KENNEDY JAMES W) 29 April 1993 (1993-04-29) figures 3B,5 _____ SMITH GEOFF ET AL: "Dielectric Relaxation Spectroscopy and Some Applications in the Pharmaceutical Sciences." JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 84, no. 9, 1995, pages 1029-1044, XP000971371 ISSN: 0022-3549 the whole document _____	1-45 1-45 1-45 1-45 1-45 1-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members				Internal Application No PCT/US 00/20420
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9939190 A	05-08-1999	AU 2490699 A EP 0991938 A GB 2342176 A NO 20003911 A	16-08-1999 12-04-2000 05-04-2000 29-09-2000	
WO 0045170 A	03-08-2000	AU 3855700 A	18-08-2000	
WO 9831839 A	23-07-1998	AU 5926598 A EP 0981643 A	07-08-1998 01-03-2000	
US 5656428 A	12-08-1997	NONE		
WO 9809168 A	05-03-1998	US 5858666 A AU 3908497 A	12-01-1998 19-03-1998	
WO 9308464 A	29-04-1993	AU 2907092 A CA 2121797 A GB 2278235 A,B GB 2294808 A,B US 5466348 A	21-05-1993 29-04-1993 23-11-1994 08-05-1996 14-11-1995	

フロントページの続き

(51) Int.CI. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ド [®] (参考)
G 0 1 N	33/53	G 0 1 N	33/53
		D	
		Z	
33/566		33/566	
37/00	1 0 2	37/00	1 0 2
(81) 指定国 E P(A T , B E , C H , C Y ,			
D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I			
T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A(B F , B J			
, C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L ,			
M R , N E , S N , T D , T G) , A P(G H , G M , K			
E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G			
, Z W) , E A(A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D ,			
R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T ,			
A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C			
A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M			
, D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H ,			
G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K			
E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S			
, L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N ,			
M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R			
U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M			
, T R , T T , T Z , U A , U G , U Z , V N , Y U ,			
Z A , Z W			

专利名称(译)	分析蛋白质结合事件的方法		
公开(公告)号	JP2003506683A	公开(公告)日	2003-02-18
申请号	JP2001514566	申请日	2000-07-27
申请(专利权)人(译)	签名生物科学，Incorporated的雷开球德		
[标]发明人	ヘフティジョン		
发明人	ヘフティジョン		
IPC分类号	G01N33/483 C12Q1/00 C12Q1/02 C12Q1/25 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566 G01N37/00 H01J49/04		
CPC分类号	B82Y10/00 B82Y30/00 C12Q1/001 G01N33/54373 G01N33/5438 G01N2333/42 G01N2333/4712 G01N2333/723 G01N2333/924 G01N2333/96486 G01N2333/98 H01J49/04		
FI分类号	G01N33/483.E C12Q1/02 C12Q1/25 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.Z G01N33 /566 G01N37/00.102		
F-TERM分类号	2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB14 2G045/CB30 2G045/FB03 2G045 /GC16 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ21 4B063/QR82 4B063/QS36 4B063/QX04		
优先权	09/365580 1999-08-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了使用可以基于蛋白质/配体复合物的介电性质直接检测蛋白质/配体复合物的系统来分析蛋白质结合事件的各种方法。该系统可用于涉及蛋白质结合事件的多种测定，例如筛选配体库，蛋白质结合相互作用和配体鉴定。该系统还可用于各种分析和诊断应用。

