

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-501860
(P2006-501860A)

(43) 公表日 平成18年1月19日(2006.1.19)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)
C 12M 1/34	(2006.01)	C 12M 1/34 A 2 G O 4 5
C 12M 1/00	(2006.01)	C 12M 1/00 A 4 B O 2 9
C 12Q 1/02	(2006.01)	C 12Q 1/02 4 B O 6 3
C 12Q 1/25	(2006.01)	C 12Q 1/25
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48 M

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 108 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-549903 (P2004-549903)	(71) 出願人	504430503 プラティパス テクノロジーズ エルエル シー
(86) (22) 出願日	平成15年5月22日 (2003.5.22)		アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 マデ ィソン スイート 150 サウス ロー
(85) 翻訳文提出日	平成17年1月24日 (2005.1.24)		ザ ロード 505
(86) 國際出願番号	PCT/US2003/016158	(74) 代理人	100102978
(87) 國際公開番号	W02004/041061		弁理士 清水 初志
(87) 國際公開日	平成16年5月21日 (2004.5.21)	(74) 代理人	100108774
(31) 優先権主張番号	60/382,446		弁理士 橋本 一憲
(32) 優先日	平成14年5月22日 (2002.5.22)	(74) 代理人	100128048
(33) 優先権主張国	米国(US)		弁理士 新見 浩一
(31) 優先権主張番号	10/443,419	(72) 発明者	マーフィー クリストファー アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 マデ ィソン ウッド レーン 1509
(32) 優先日	平成15年5月22日 (2003.5.22)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	米国(US)		

(54) 【発明の名称】細胞をアッセイするための基体、装置および方法

(57) 【要約】

本発明は、分子診断の分野、特に液晶アッセイ形式に基づく診断に関するものである。特に、本発明は、試料中の分析物の量を定量するために液晶アッセイ法を使用する、改善された基体および方法を提供する。また、本発明は、液晶アッセイ形式を使用することによって基体に対する分析物の非特異的な結合を検出するための材料および方法を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

表面を有する基体を含む分析物アッセイ装置であって、該表面が、その上にメソゲンを配向させるように構成された少なくとも1つの非特異的な結合アッセイ領域を有する装置。

【請求項 2】

非特異的な結合アッセイ領域が、実質的に分析物に特異的な認識部分がない、請求項1記載の分析物アッセイ装置。

【請求項 3】

分析物が、細胞、粒状物質、および微生物からなる群より選択される、請求項1記載の分析物アッセイ装置。 10

【請求項 4】

微生物が、細菌、ウイルス、および真菌からなる群より選択される、請求項3記載の分析物アッセイ装置。

【請求項 5】

メソゲンを配向させるように構成された少なくとも1つの非特異的なアッセイ領域が、摩擦されたタンパク質、摩擦された重合体の表面、または整えられた重合体の表面を含む、請求項1記載のアッセイ装置。

【請求項 6】

摩擦された重合体の表面が、組織培養ポリスチレンおよびポリスチレンからなる群より選択される、請求項5記載のアッセイ装置。 20

【請求項 7】

整えられた表面が、微小成形された重合体の表面、フォトリソグラフィーで作製された重合体の表面、および斜めに沈着された金属フィルムからなる群より選択される、請求項1記載のアッセイ装置。

【請求項 8】

メソゲンを配向させるように構成された少なくとも1つの非特異的なアッセイ領域が、表面上に配置された粒子を含む、請求項1記載のアッセイ装置。

【請求項 9】

粒子が、電場、磁場、ずり磁場、流体の流れ、または機械的な移動からなる群より選択される方法によって配置される、請求項8記載のアッセイ装置。 30

【請求項 10】

6、12、24、36、96、384、または1536個のアッセイ領域を含み、該アッセイ領域が、プレートリーダーによって読み取り可能である、請求項1記載のアッセイ装置。

【請求項 11】

6、12、24、36、96、384、または1536個のアッセイ領域が、アレイに配置されている、請求項10記載のアッセイ装置。

【請求項 12】

表面を含むアッセイ装置であって、該表面がその上に粒子を有し、該粒子がメソゲンを配向させるために整えられているアッセイ装置。 40

【請求項 13】

粒子が、電場の適用によって該粒子がメソゲンを配向させるように配置されている、請求項12記載のアッセイ装置。

【請求項 14】

粒子が、磁場の適用によって該粒子がメソゲンを配向させるように配置されている、請求項12記載のアッセイ装置。

【請求項 15】

粒子が、ずり磁場の適用によって該粒子がメソゲンを配向させるように配置されている、請求項12記載のアッセイ装置。

【請求項 16】

50

粒子が、流体の流れの適用によって該粒子がメソゲンを配向させるように配置されている、請求項12記載のアッセイ装置。

【請求項17】

粒子が、表面上に機械的に移動されている、請求項12記載のアッセイ装置。

【請求項18】

粒子が、金属粒子、木炭、チョーク、石鹼石、グラファイト、および軽石からなる群より選択される、請求項12記載の方法。

【請求項19】

アッセイ領域を含むアッセイ装置であって、該アッセイ領域が、メソゲンを配向させるように構成された細胞外マトリックスを含むアッセイ装置。

10

【請求項20】

メソゲンをさらに含む、請求項19記載のアッセイ装置。

【請求項21】

メソゲンが、サーモトロピックおよびリオトロピックな液晶からなる群より選択される、請求項20記載のアッセイ装置。

【請求項22】

アッセイ領域を含むアッセイ装置であって、該アッセイ領域が、その中に包埋されたメソゲンを有するマトリックスを含むアッセイ装置。

【請求項23】

メソゲンをさらに含む、請求項22記載のアッセイ装置。

20

【請求項24】

メソゲンが、サーモトロピックおよびリオトロピックな液晶からなる群より選択される、請求項23記載のアッセイ装置。

【請求項25】

表面を有する基体を含むアッセイ装置であって、該表面が、その上にメソゲンによって接触される少なくとも1つのアッセイ領域を有し、該表面が、該メソゲンを配向させるように構成され、および少なくとも1つの細胞播種領域が、該少なくとも1つのアッセイ領域と結合されているアッセイ装置。

【請求項26】

基体が、その中に試験化合物を含むための少なくとも1つの貯蔵所を有し、かつ少なくとも1つの細胞播種領域がウェルを含む、請求項25記載のアッセイ装置。

30

【請求項27】

1つまたは複数の前記少なくとも1つの細胞播種領域が、少なくとも1つの細胞を含む、請求項25記載のアッセイ装置。

【請求項28】

少なくとも1つの細胞が、原核細胞および真核細胞からなる群より選択される、請求項27記載のアッセイ装置。

【請求項29】

メソゲンを配向させるように構成されている少なくとも1つのアッセイ領域が、摩擦されたタンパク質、摩擦された重合体の表面、または整えられた重合体の表面を含む、請求項25記載のアッセイ装置。

40

【請求項30】

メソゲンを配向させるように構成されている少なくとも1つのアッセイ領域が、微小成形された重合体の表面、フォトリソグラフィーで作製された重合体の表面、および斜めに沈着された金属フィルムからなる群より選択される整えられた表面を含む、請求項25記載のアッセイ装置。

【請求項31】

メソゲンを配向させるように構成されている少なくとも1つのアッセイ領域が、その上に粒子を有する表面を含み、該粒子が、液晶を配向させるように構成されている、請求項25記載のアッセイ装置。

50

【請求項 3 2】

表面が、少なくとも1つの分子認識部分で装飾されている、請求項25記載のアッセイ装置。

【請求項 3 3】

認識部分が、共有結合によって表面に付着されている、請求項32記載のアッセイ装置。

【請求項 3 4】

認識部分が、金属、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、抗体、核酸、脂質、リン脂質、脂肪酸誘導体、ステロイド、転写制御因子、糖、細胞受容体、および受容体認識配列からなる群より選択される、請求項32記載のアッセイ装置。

【請求項 3 5】

ポリペプチドが、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、オステオポンチン、トロンボスponジン、血管細胞接着分子-1、細胞内接着分子-1、細胞内接着分子-2、コンドロイチン硫酸、フォンビルプラント因子、エンタクチン、フィブリノーゲン、テネイシン、粘膜アドレッシン細胞接着分子、C3b、MDCタンパク質、およびピトロネクチンからなる群より選択される、請求項34記載のアッセイ装置。

【請求項 3 6】

受容体認識配列が、カドヘリン、免疫グロブリンスーパーファミリー、セレクチン、ムチン、およびインテグリン結合配列を含む、請求項34記載のアッセイ装置。

【請求項 3 7】

インテグリン結合配列が、RGD、EILDV、LDV、LDVP、IDAP、PHSRN、SLDVP、GRGDAC、およびIDSPからなる群より選択される、請求項36記載のアッセイ装置。

【請求項 3 8】

6、12、24、36、96、384、または1536個のアッセイ領域を含む、請求項25記載のアッセイ装置。

【請求項 3 9】

複数のアッセイ領域がアレイに配置されている、請求項38記載のアッセイ装置。

【請求項 4 0】

アッセイ領域のアレイが、市販のプレートリーディング装置の読み位置と対応するよう構成されている、請求項39記載のアッセイ装置。

【請求項 4 1】

貯蔵所が、少なくとも1つの試験化合物を含む、請求項40記載のアッセイ装置。

【請求項 4 2】

少なくとも1つのミクロな液体のチャネルをさらに含む、請求項25記載のアッセイ装置。

【請求項 4 3】

少なくとも1つのミクロな液体のチャネルが、流体により貯蔵所に接続するように構成されている、請求項42記載のアッセイ装置。

【請求項 4 4】

下記の工程を含む、分析物を解析するための方法：

a) 表面を有する基体、分析物、およびメソゲンを提供する工程であって、該分析物が、該表面に特異的に結合されない工程；および

b) 該分析物が検出されるように、該基体の該表面に対して、該メソゲンを適用する工程。

【請求項 4 5】

メソゲンが、表面の整えられた領域および整えられていない領域が同定されるような条件下で適用される、請求項44記載の方法。

【請求項 4 6】

表面が、メソゲンを配向させるように構成されている、請求項44記載の方法。

【請求項 4 7】

表面が、メソゲンを配向させない、請求項44記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 8】

分析物の存在が、メソゲンの整列を崩壊させる、請求項26記載の方法。

【請求項 4 9】

分析物が、原核細胞、真核細胞、ウイルス、および粒状物質からなる群より選択される、請求項44記載の方法。

【請求項 5 0】

分析物が、原核細胞および真核細胞からなる群より選択される、請求項44記載の方法。

【請求項 5 1】

表面を横切る細胞の遊走が、整えられていない領域を形成する、請求項50記載の方法。

【請求項 5 2】

表面を横切る細胞の遊走が、整えられた領域を形成する、請求項50記載の方法。

【請求項 5 3】

表面上における細胞の存在により、メソゲンが整列されるか、またはメソゲンが整列されず、これによって該細胞の存在を検出することができる、請求項50記載の方法。

【請求項 5 4】

整えられた領域を整えられていない領域と比較することにより、表面上の細胞の数を定量する工程をさらに含む、請求項53記載の方法。

【請求項 5 5】

下記の工程を含む、細胞を解析するための方法：

a) 表面を有する基体を含むメソゲンおよび装置を提供する工程であって、該表面が、その上にメソゲンを配向させるように構成された少なくとも1つのアッセイ領域、および該少なくとも1つのアッセイ領域と結合する少なくとも1つの細胞播種領域を有する工程；

b) 該少なくとも1つの細胞播種領域に細胞を適用する工程；および

c) 該表面に該メソゲンを適用することによって該少なくとも1つのアッセイ領域への該細胞の動作をアッセイする工程。

【請求項 5 6】

装置が、試験化合物を含むための貯蔵所をさらに含む、請求項55記載の方法。

【請求項 5 7】

細胞に対する試験化合物の効果が、少なくとも1つのアッセイ領域への細胞の移動によって解析される、請求項55記載の方法。

【請求項 5 8】

試験化合物が、細胞運動性に影響を与えることが疑われる、請求項56記載の方法。

【請求項 5 9】

試験化合物が、細胞増殖または細胞接着に効果があることが疑われる、請求項56記載の方法。

【請求項 6 0】

下記の工程を含む、細胞運動性に対する試験化合物の効果を検出するための方法：

a) i) 表面を有する基体を含むアッセイ装置であって、該表面が、メソゲンを配向させるように構成された少なくとも1つのアッセイ領域および該少なくとも1つのアッセイ領域と結合する少なくとも1つの細胞播種領域を有し、該少なくとも1つの細胞播種領域が、少なくとも1つの細胞に含まれるアッセイ装置と；

ii) 細胞運動性を阻害するまたは促進することが疑われる試験化合物とを提供する工程；

b) 該少なくとも1つの細胞を該試験化合物と接触させる工程；および

c) 該少なくとも1つの細胞に対する該試験化合物の効果を解析する工程。

【請求項 6 1】

少なくとも1つの細胞が、真核細胞または原核細胞である、請求項60記載の方法。

【請求項 6 2】

真核細胞が哺乳類細胞である、請求項60記載の方法。

【請求項 6 3】

10

20

30

40

50

哺乳類細胞が癌であることが疑われる、請求項61記載の方法。

【請求項 6 4】

哺乳類細胞がヒト細胞である、請求項62記載の方法。

【請求項 6 5】

解析工程が液晶によって行われる、請求項60記載の方法。

【請求項 6 6】

液晶がプレートリーダー上で解析される、請求項65記載の方法。

【請求項 6 7】

下記の工程を含む、細胞分泌性産物の產生に対する試験化合物の効果を検出するための方法：
10

a) 表面を有する基体を含むメソゲンおよびアッセイ装置を提供する工程であって、該表面が、その上に該細胞分泌性産物および少なくとも1つの細胞を認識する認識部分を含む少なくとも1つのアッセイ領域を有する工程；

b) 該少なくとも1つの細胞を該少なくとも1つの第1の試験化合物と接触させる工程；および

c) 該少なくとも1つの細胞分泌性産物の產生を解析するために、該表面に該メソゲンを適用する工程。

【請求項 6 8】

少なくとも1つの細胞分泌性産物が栄養性因子である、請求項67記載の方法。

【請求項 6 9】

栄養性因子が、上皮細胞成長因子、線維芽細胞成長因子、ニューロトロフィン、血小板由来成長因子、肝細胞成長因子、成長ホルモン、プロラクチン、アンジオテンシン、キニン、神経分化因子、インスリン、インスリン様成長因子(IGF)IおよびII、ケラチノサイト成長因子、アンフィレギュリン、ヘレギュリン、TGF- α 、TGF- β 、神経ペプチド、並びに神経伝達物質からなる群より選択される、請求項66記載の方法。
20

【請求項 7 0】

少なくとも1つの細胞分泌性産物が、インターロイキン、エリスロポエチン、腫瘍壞死因子、コロニー刺激因子、インターフェロン、および細胞遊走因子からなる群より選択されるサイトカインまたはケモカインを含む、請求項67記載の方法。

【請求項 7 1】

分泌性産物が電解質である、請求項67記載の方法。
30

【請求項 7 2】

電解質が、カルシウム、マグネシウム、ナトリウム、カリウムからなる群より選択される、請求項71記載の方法。

【請求項 7 3】

少なくとも1つの細胞が真核細胞である、請求項67記載の方法。

【請求項 7 4】

真核細胞が哺乳類細胞である、請求項73記載の方法。

【請求項 7 5】

哺乳類細胞がヒト細胞である、請求項74記載の方法。
40

【請求項 7 6】

解析工程がメソゲンによって行われる、請求項67記載の方法。

【請求項 7 7】

メソゲンがプレートリーダー上で解析される、請求項76記載の方法。

【請求項 7 8】

以下の工程を含む、細胞分泌性産物の產生を検出するための方法：

a) メソゲン、少なくとも1つの細胞、および表面を有する基体を含むアッセイ装置を提供する工程であって、該表面が、その上に該細胞分泌性産物を認識する認識部分を含む少なくとも1つのアッセイ領域を有する工程；および

b) 該少なくとも1つの細胞分泌性産物の產生を解析するために、該表面に該メソゲンを
50

適用する工程。

【請求項 7 9】

細胞分泌性産物が、天然の分泌性の産物である、請求項78記載の方法。

【請求項 8 0】

細胞分泌性産物が、組換え分泌性の産物である、請求項78記載の方法。

【請求項 8 1】

以下の工程を含む、細胞の細胞骨格アラインメントを検出するための方法：

a) i) メソゲンと、

ii) 少なくとも1つの細胞と

を提供する工程；

b) 該メソゲンが該少なくとも1つの細胞の該細胞骨格のアラインメントに応答するような条件下で、該少なくとも1つの細胞を該メソゲンと接触させる工程；および

c) 該メソゲンにおける該反応を解析する工程。

【請求項 8 2】

少なくとも1つの細胞の膜を可溶化剤で可溶化する工程をさらに含む、請求項81記載の方法。

【請求項 8 3】

可溶化剤が界面活性物質を含む、請求項82記載の方法。

【請求項 8 4】

界面活性物質がリオトロピックなメソゲンを含む、請求項83記載の方法。

【請求項 8 5】

少なくとも1つの細胞が真核細胞である、請求項81記載の方法。

【請求項 8 6】

真核細胞が哺乳類細胞である、請求項85記載の方法。

【請求項 8 7】

哺乳類細胞がヒト細胞である、請求項86記載の方法。

【請求項 8 8】

解析工程がメソゲンによって行われる、請求項81記載の方法。

【請求項 8 9】

メソゲンがプレートリーダー上で解析される、請求項88記載の方法。

【請求項 9 0】

表面を有する基体を含む装置であって、該表面が、その上に少なくとも1つのアッセイ領域を有し、該少なくとも1つのアッセイ領域が、メソゲンを配向させる領域およびメソゲンを配向させない領域を含む装置。

【請求項 9 1】

少なくとも1つのアッセイ領域が細胞播種領域をさらに含む、請求項90記載の装置。

【請求項 9 2】

少なくとも1つの貯蔵所をさらに含む、請求項90記載のアッセイ装置。

【請求項 9 3】

少なくとも1つの貯蔵所が試験化合物を含む、請求項90記載のアッセイ装置。

【請求項 9 4】

試験化合物が、少なくとも1つの細胞の動作を阻害するか、または促進することが疑われる、請求項93記載のアッセイ装置。

【請求項 9 5】

基体および少なくとも1つのアッセイ領域を含む装置であって、該少なくとも1つのアッセイ領域が、光学的に不透明な領域および光学的に透明な領域を含む装置。

【請求項 9 6】

アッセイ領域が、比色、蛍光定量的、光学濃度、および光散乱読み出しからなる群より選択される読み出しを構成する、請求項95記載の装置。

【請求項 9 7】

10

20

30

40

50

光学的に不透明な領域が、少なくとも1つの細胞播種領域をさらに含む、請求項95記載のアッセイ装置。

【請求項98】

少なくとも1つの細胞播種領域が、少なくとも1つの細胞を含む、請求項97記載のアッセイ装置。

【請求項99】

少なくとも1つのアッセイ領域が、メソゲンを配向させるように構成される、請求項95記載のアッセイ装置。

【請求項100】

少なくとも1つの貯蔵所をさらに含む、請求項95記載のアッセイ装置。

10

【請求項101】

少なくとも1つの貯蔵所が、第1の試験化合物を含む、請求項100記載のアッセイ装置。

【請求項102】

試験化合物が、少なくとも1つの細胞の動作を促進するか、または阻害することが疑われる、請求項101記載のアッセイ装置。

【請求項103】

少なくとも1つの貯蔵所が、少なくとも1つのミクロな液体のチャネルに対して流体により接続されている、請求項100記載のアッセイ装置。

【請求項104】

少なくとも1つの貯蔵所が、少なくとも1つのアッセイ領域で流体により接触される、請求項100記載のアッセイ装置。

20

【請求項105】

少なくとも1つの細胞が生体染色される、請求項98記載のアッセイ装置。

【請求項106】

6、12、24、36、96、384、または1536個のアッセイ領域を含む、請求項95記載のアッセイ装置。

【請求項107】

24、36、96、384、または1536個のアッセイ領域が、複数の行および列のアレイに配列されている、請求項106記載のアッセイ装置。

30

【請求項108】

アッセイ領域のアレイが、プレートリーダー装置の読み取り位置と対応するように構成されている、請求項106記載のアッセイ装置。

【請求項109】

少なくとも第1および第2の分離したアッセイ領域を含むアッセイ装置であって、該第1および第2の分離されたアッセイ領域のそれぞれが、第1側部、第2側部、メソゲンを配向させる領域、およびメソゲンを配向させない領域を含み、該第1および第2の分離されたアッセイ領域のうちの一方において、メソゲンを配向させる領域が、該第1側部上にあり、メソゲンを配向させない領域が、該第2側部上にあり、該第1および第2の分離されたアッセイ領域の他方において、メソゲンを配向させる領域が、該第2側部上にあり、メソゲンを配向させない領域が、該第1側部上にあるアッセイ装置。

40

【請求項110】

第1および第2の分離されたアッセイ領域のそれぞれが細胞播種領域を含む、請求項109記載のアッセイ装置。

【請求項111】

細胞播種領域が少なくとも1つの細胞を含む、請求項110記載のアッセイ装置。

【請求項112】

少なくとも1つの細胞が真核細胞である、請求項101記載のアッセイ装置。

【請求項113】

真核細胞がヒト細胞である、請求項111記載のアッセイ装置。

【請求項114】

50

少なくとも1つの貯蔵所をさらに含む、請求項109記載のアッセイ装置。

【請求項115】

少なくとも1つの貯蔵所が試験化合物を含む、請求項114記載のアッセイ装置。

【請求項116】

試験化合物が少なくとも1つの細胞の走化性を促進するか、または阻害することが疑われる、請求項115記載のアッセイ装置。

【請求項117】

少なくとも1つの貯蔵所が少なくとも1つのミクロな液体のチャネルに対して流体により接続されている、請求項114記載のアッセイ装置。

【請求項118】

a) 表面を有する基体を含む分析物アッセイ装置であって、該表面が、その上にメソゲンを配向させるように構成された少なくとも1つの非特異的なアッセイ領域を有する分析物アッセイ装置；

b) メソゲン；および

c) 該キットで非特異的な結合相互作用を検出するための説明書を含むキット。

【請求項119】

以下の工程を含む、表面上の細胞を定量化する方法：

a) i) メソゲンと、

ii) 表面上に細胞を有する表面を有する基体とを提供する工程；

b) 整列されたメソゲンおよび整列されていないメソゲンの領域が形成されるような条件下で、該表面に該メソゲンを適用する工程；および

c) 該整列されたメソゲンおよび整列されていないメソゲンの領域を比較することによって、該表面上の細胞数を定量する工程。

【請求項120】

以下の工程を含む、細胞を解析する方法：

a) i) 細胞と、

ii) 上に少なくとも1つのアッセイ領域を有する基体を含む装置であって、該少なくとも1つのアッセイ領域が、光学的に不透明な領域および光学的に透明な領域を含む装置とを提供する工程；および

b) 該アッセイ領域に該細胞を適用する工程；および

c) 該細胞を解析する工程。

【請求項121】

アッセイ領域が少なくとも1つの細胞播種領域をさらに含む、請求項120記載の方法。

【請求項122】

少なくとも1つの細胞播種ウェルが少なくとも1つの細胞を含む、請求項121記載の方法。

。

【請求項123】

基体が、その中に第1の試験化合物を含む少なくとも1つの貯蔵所を有する、請求項121記載の方法。

【請求項124】

試験化合物が、少なくとも1つの細胞の移動を促進するか、または阻害することが疑われる、請求項123記載の方法。

【請求項125】

少なくとも1つの細胞が、生体染色または非生体染色される、請求項123記載の方法。

【請求項126】

少なくとも1つの細胞が蛍光マーカーを含む、請求項123記載の方法。

【請求項127】

10

20

30

40

50

解析工程が、濃度測定、光散乱、比色、または蛍光定量的な方法による解析を含む、請求項120記載の方法。

【請求項128】

以下の工程を含む、マトリックスに対する細胞の効果を検査する方法：

- a) マトリックス、細胞、およびメソゲンを提供する工程；
- b) 該細胞に該マトリックスを曝露する工程；および
- c) 該メソゲンの配向または配向されないことが、該細胞により該マトリックスに対して及ぼされた力の指標となるような条件下で、該マトリックスに対して該メソゲンを適用する工程。

【請求項129】

10

マトリックスが液晶を配向させる、請求項128記載の方法。

【請求項130】

液晶が、リオトロピック液晶およびサーモトロピック液晶からなる群より選択される、請求項128記載の方法。

【請求項131】

細胞が真核細胞である、請求項128記載の方法。

【請求項132】

細胞がマトリックスに侵入する、請求項131記載の方法。

【請求項133】

マトリックスが、コラーゲンマトリックス、細胞外マトリックス、細菌細胞外マトリックス、ゲルマトリックス、および重合体マトリックスからなる群より選択される、請求項128記載の方法。

【請求項134】

以下の工程を含む、マトリックスに対する細胞の効果を検査する方法：

- a) 中に包埋されたメソゲンを有するマトリックスおよび細胞を提供する工程；
- b) 該メソゲンの配向または配向されないことが、該細胞により該マトリックスに対して及ぼされた力の指標となるような条件下で、該細胞に対して、その中に包埋されたメソゲンを有するマトリックスを曝露する工程。

【請求項135】

30

マトリックスが液晶を配向させる、請求項134記載の方法。

【請求項136】

液晶が、リオトロピック液晶およびサーモトロピック液晶からなる群より選択される、請求項134記載の方法。

【請求項137】

細胞が真核細胞である、請求項134記載の方法。

【請求項138】

細胞がマトリックスに侵入する、請求項137記載の方法。

【請求項139】

マトリックスが、コラーゲンマトリックス、細胞外マトリックス、細菌細胞外マトリックス、ゲルマトリックス、および重合体マトリックスからなる群より選択される、請求項134記載の方法。

【請求項140】

以下の工程を含む、細胞を培養する方法：

- a) 液晶基体および細胞を提供する工程；および
- b) 該液晶基体上で該細胞を培養する工程。

【請求項141】

液晶基体がサーモトロピック液晶を含む、請求項140記載の方法。

【請求項142】

液晶基体がリオトロピック液晶を含む、請求項140記載の方法。

【請求項143】

40

50

液晶基体がマトリックスを含む、請求項140記載の方法。

【請求項 144】

マトリックスが、コラーゲンマトリックス、細胞外マトリックス、細菌細胞外マトリックス、ゲルマトリックス、および重合体マトリックスからなる群より選択される、請求項143記載の方法。

【請求項 145】

液晶基体が、リン脂質および生物学的な受容体からなる群より選択される部分を含む、請求項140記載の方法。

【請求項 146】

以下の工程を含む、細胞の代謝状態をアッセイする方法：

- a) 細胞およびメソゲンを提供する工程；および
b) 該メソゲンが整列または整列されていないことが、該細胞の該代謝状態の指標となるような条件下で、該メソゲンに対して該細胞を曝露する工程。

【請求項 147】

メソゲンが、リオトロピックおよびサーモトロピックなメソゲンからなる群より選択される、請求項146記載の方法。

【請求項 148】

細胞が培養される温度またはその近くの温度で、メソゲンが相転移を受ける、請求項146記載の方法。

【請求項 149】

相転移の解析が、細胞によって產生された熱量を示す、請求項146記載の方法。

【請求項 150】

メソゲンを配向させるように構成された少なくとも1つの領域を含む表面、および該表面上でランダムに分配されたナノのサイズからミクロのサイズの粒子を含む装置。

【請求項 151】

表面上を覆う液晶をさらに含み、粒子の置換により該液晶が整列される、請求項150記載の装置。

【請求項 152】

a) i) メソゲンを配向させるように構成された少なくとも1つの領域を含む表面であって、その上にナノのサイズからミクロのサイズの粒子が分配された表面と、

- ii) 細胞と、
iii) メソゲンと

を提供する工程；

b) 該表面に該細胞を適用する工程；および

c) 該表面に対して該メソゲンを適用することによって、該メソゲンを配向させるように構成された領域を横切る該細胞の位置または移動をアッセイする工程を含み、該細胞による該粒子の置換により、配向されたメソゲンの領域の形成が生じる方法。

【請求項 153】

2つの側面と表面を通って電流が生じるように構成された電極とを有する表面、該2つの側面の一方の上の液晶、および該2つの側面の他方の上の分析物を含む装置であって、電流が該電極を通った場合に、該分析物の存在が、液晶の整えられていない状態の存在によって報告される装置。

【請求項 154】

中に流体チャネルを有する基体を含む装置であって、該基体が、試験領域および貯蔵所を含み、該流体チャネルが、該貯蔵所に配置された試験化合物が拡散によって該試験領域に送達されるように、該試験領域と液体により連絡されている基体を含む装置。

【請求項 155】

流体チャネルが、試験領域に隣接した開口部で終わる、請求項154記載の装置。

【請求項 156】

10

20

30

40

50

比色、液晶、蛍光定量的、および濃度測定によるアッセイ系からなる群より選択されるアッセイ系と共に使用するために構成された、請求項154記載の装置。

【請求項 157】

貯蔵所および流体チャネルが、ガラス、ポリプロピレン、ポリスチレン、およびシリコーンからなる群より選択される材料から形成される、請求項154記載の装置。

【請求項 158】

装置が、マルチウェル・プレートと共に使用するための挿入物として構成される、請求項154記載の装置。

【請求項 159】

複数の試験領域、貯蔵所、および複数の試験化合物の平行した試験ができる流体チャネルを含む、請求項154記載の装置。 10

【請求項 160】

以下の工程を含む、細胞を解析する方法：

a) i) 細胞と、
ii) 上に少なくとも1つのアッセイ領域を有する基体を含む装置であって、該少なくとも1つのアッセイ領域が、メソゲンを配向させる領域およびメソゲンを配向させない領域を含む装置と

を提供する工程；および

b) 該アッセイ領域に該細胞を適用する工程；および
c) 該細胞を解析する工程。 20

【請求項 161】

以下の工程を含む、1つまたは複数の細胞の予め定められた性質を解析するための方法：
:

a) 基体、細胞、およびメソゲンを提供する工程；
b) 表面に該細胞を適用する工程；および
c) 該メソゲンと該表面および該細胞の接觸によって該細胞を解析する工程。 30

【請求項 162】

予め定められた性質が、化合物に応答して増殖すること、化合物に応答して分化すること、および化合物に応答して遊走することからなる群より選択される、請求項161記載の方法。

【請求項 163】

解析工程が、細胞に対する物質または化合物の効果を測定する工程をさらに含む、請求項161記載の方法。

【請求項 164】

効果が定量される、請求項163記載の方法。

【請求項 165】

表面が、シリコーン、ガラス、金属、および重合体表面からなる群より選択される、請求項161記載の方法。

【請求項 166】

表面がマトリックスである、請求項161記載の方法。 40

【請求項 167】

マトリックスが、コラーゲンマトリックス、細胞外マトリックス、細菌細胞外マトリックス、ゲルマトリックス、および重合体マトリックスからなる群より選択される、請求項166記載の方法。

【請求項 168】

以下の工程を含む、アッセイ装置を製造するための方法：

a) 少なくとも1つの異方性の領域および被覆材料を含む表面を有する基体を提供する工程；および

b) 該少なくとも1つの異方性の領域を含むアッセイ領域が定義されるような条件下で、表面を有する該基体に該被覆材料を適用する工程。 50

【請求項 169】

第2の基体を提供する工程、および被覆材料を適用した後に第2の基体を第1の基体と接触させる工程とをさらに含む、請求項168記載の方法。

【請求項 170】

第1の基体が、シリカおよび石英からなる群より選択される、請求項169記載の方法。

【請求項 171】

第2の基体が、シリカおよび石英からなる群より選択される、請求項169記載の方法。

【請求項 172】

被覆材料が、ポリウレタン、ポリエチレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエチレンテトラフラート、ポリテトラフルオロエチレン、ポリビニリデンジフルオライド、タンパク質、ラテックス、ポリスチレン、シリコーン、セルロース、およびニトロセルロースからなる群より選択される、請求項169記載の方法。
10

【請求項 173】

被覆材料が圧感接着剤を含む、請求項169記載の方法。

【請求項 174】

被覆材料の適用が、第1の基体上に該被覆材料をプリントする工程を含む、請求項168記載の方法。

【請求項 175】

プリント工程が、シルクスクリーンプリント法、フレキソ印刷プリント法、マイクロコンタクトプリント法、セリアグラフプリント法、インクジェット式プリント法、インタリゴプリント法、オフセットプリント法、ハイデルベルク・プレス・プリント法、および温熱レーザープリント法からなる群より選択される、請求項174記載の方法。
20

【請求項 176】

被覆材料が色素を含む、請求項169記載の方法。

【請求項 177】

被覆材料の適用が複数のアッセイ領域を定義する、請求項168記載の方法。

【請求項 178】

少なくとも1つのアッセイ領域が、ミクロな液体のチャネルである、請求項168記載の方法。

【請求項 179】

被覆材料の適用が、アッセイ領域に物質を送達するための少なくとも1つのミクロな液体のチャネルをさらに定義する、請求項168記載の方法。
30

【請求項 180】

市販のマルチエウェル・プレートと実質的に同様の外寸法を有する支持体表面であって、該支持体の部材がその中に少なくとも1つのカットアウトを有する支持体表面と、該少なくとも1つのカットアウトに嵌入されたアッセイ基体とを含む装置。

【請求項 181】

アッセイ基体が液晶アッセイ基体である、請求項180記載の装置。

【請求項 182】

支持体部材が複数のカットアウトを含み、それぞれが、その中に嵌入されたアッセイ基体を有する、請求項180記載の装置。
40

【請求項 183】

a) 上に液晶を配向させるように構成された少なくとも1つの酵素の基質および該酵素の基質に対して作用する酵素活性を含むことが疑われる試料を有するアッセイ基体を提供する工程；および

b) 液晶の配向の変化が該試料中の該酵素活性に対して作用する酵素活性の存在を表すような条件下で、該試料と該アッセイ基体を接触させる工程
を含む方法。

【請求項 184】

液晶の配向の変化が配向の減少である、請求項183記載の方法。
50

【請求項 185】

液晶の配向の変化が液晶を配向させる能力である、請求項183記載の方法。

【請求項 186】

以下の工程を含む、アッセイ基体を解析する方法：

a) マルチエウェル・プレートリーダーおよび実質的に細胞培養ウェルがない少なくとも1つの分析領域を含むアッセイ基体を提供する工程；および

b) 該基体の該少なくとも1つの分析領域をマルチエウェル・プレートリーダーで読み取る工程。

【請求項 187】

少なくとも1つの分析領域が、市販のマルチエウェル・プレートの細胞培養ウェルの位置と対応する、請求項186記載の方法。

10

【請求項 188】

少なくとも1つの分析領域が、マルチエウェル・プレートの細胞培養ウェルの位置と対応しない、請求項186記載の方法。

【請求項 189】

マルチエウェル・プレートリーダーが走査モードで作動する、請求項186記載の方法。

【請求項 190】

アッセイ基体が液晶アッセイ基体である、請求項186記載の方法。

【請求項 191】

アッセイ基体が異方性の領域を含む、請求項186記載の方法。

20

【請求項 192】

少なくとも1つの分析領域が、マイクロな液体のチャネルの領域と対応する、請求項186記載の方法。

【請求項 193】

プレートリーダーが、少なくとも1つの分析領域の分離した領域を読み取る、請求項186記載の方法。

【請求項 194】

プレートリーダーが、反応が生じた領域を同定するための少なくとも1つの分析領域を走査する、請求項186記載の方法。

【請求項 195】

反応が結晶の配向の破壊である、請求項194記載の方法。

30

【請求項 196】

少なくとも1つの分析領域に対して細胞を適用する工程、および該細胞が該プレートリーダーと共に移動する領域を同定する工程をさらに含む、請求項186記載の方法。

【請求項 197】

マルチエウェル・プレートのウェルと対応するように配列された複数の細長いシリンダを含む装置であって、該細長い部材のそれそれが、遠位端を有しあつその中に開口部を有し、その結果、該装置が底面を有するウェルを含むマルチエウェル・プレート上に配置されたときに、該細長いシリンダが、該開口部が該ウェルの該底面と隣接するように該マルチエウェル・プレートの該ウェルに延長される細長いシリンダを含む、装置。

40

【請求項 198】

a) 分析物を含むことが疑われる試料、メソゲン、および液晶を配向させ、かつ認識部分で装飾されたマイクロチャネルをその中に有する基体を提供する工程；

b) 該試料が該マイクロチャネルに沿って移動するように、該試料を該マイクロチャネルに対して適用する工程；および

c) 該メソゲンと該マイクロチャネルを接触させる工程を含む方法であって、

結合する分析物の量が、液晶の配向が破壊されている該マイクロチャネルに沿った長さによって示される方法。

【請求項 199】

50

メソゲンが、サーモトロピックおよびリオトロピックの液晶からなる群より選択される、請求項198記載の方法。

【請求項 200】

マイクロチャネルが摩擦された表面を含む、請求項198記載の方法。

【請求項 201】

マイクロチャネルが斜めに沈着された金属表面を含む、請求項198記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2002年5月22日に出願された仮特許出願第60/382,446号の恩典を主張するものである。 10

【0002】

技術分野

本発明は、分子生物学、細胞生物学、発生生物学、幹細胞分化、免疫学、腫瘍学、一般的な研究室科学、および微生物学の分野に、並びに特に試験表面上または試験基体内に存在する細胞数、並びに対照条件下での、および走化性のおよびその他の細胞活性を有する（ケモキネシスであるが走化性でない化合物および細胞遊走を阻害する因子を含む）因子に応答する細胞の増殖、死滅、または移動を検出し、かつ定量するための、液晶アッセイ法に基づいた、並びに増殖の範囲内のその他のバイオフォトニカリー・ベース・アッセイ法（biophotonically based assay）に基づいた、方法および組成物に関する。さらに、本発明は、酵素活性の検出および定量のための新規のバイオフォトニックな方法を記述する。 20

【背景技術】

【0003】

発明の背景

癌は、毎年世界的に数十万人もの生命を奪う。重工業化された国の多くの住民は、特に癌が誘導される罹患率および死亡率に影響されやすい。実際に、癌は、先進工業国において主要な死因の2番目である。例えば、前立腺癌は、男性において2番目に最もよくある悪性腫瘍である。2002年には米国において、約180,000人の男性が前立腺癌であると診断されるものと推定される。乳癌は、大部分の先進工業国において最もよくある女性の悪性腫瘍であり、米国において、乳癌は、彼女らが生きている間に約10%の女性に影響するものと推定される。手術可能な乳癌を有する約30~40%の女性は、最終的に原発腫瘍から遠く離れたところに転移を発症する。 30

【0004】

転移は、原発腫瘍の部位から離れた器官および組織における二次腫瘍の形成であり、癌患者の治療不能および死亡の主な原因である。実際に、悪性細胞を区別する特色は、これらが周囲の正常組織に侵入し、遠くの器官に血液およびリンパ系を介して転移する能力である。癌転移は、特定の癌細胞が実質的に遺伝子変異を獲得し、これらが原発腫瘍集団をそのままにさせ、離れた部位で二次腫瘍を確立することができるというシグナル・カスケードを混乱させることによる複雑なプロセスである。転移性の癌細胞は、隣接する細胞との接着を破壊し、細胞外マトリクスを溶解し、周囲組織に遊走および侵入し、循環系を経て移動し、新たな部位に侵入し、生存し、増殖する。残念なことに、癌細胞の転移性の伝播を促進および抑制する分子機構は、明確に同定されていないままである。 40

【0005】

医学の研究者は、走化性の作用物質が転移に関与しているかどうか、およびなぜ特殊の癌が、特定の部位に優先して転移するのかを理解するために、多くの努力を費やしてきた。乳癌は、例えば局部リンパ節、骨髄、並びに肺および肝臓組織に優先的に転移する。前立腺癌は、骨髄に優先的に転移する。特定の癌の優先的な転移を説明するためのいくつかの理論が進歩している。

【0006】

10

20

30

40

50

高転移性の細胞の1つの重要な性質は、これらがパラ分泌性および自己分泌性の運動因子などの走化性の作用物質に応答する能力であることが最近示された。例えば、Mullerらによって最近行われた研究では、転移部への乳癌の走化性のホーミングの証拠を提供する (Mullerら、「Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis」、Nature, 410: 50-56 [2001])。または、M. More、「The role of chemoattraction in cancer metastases」、Bioessays, 23: 674-676 [2001]を参照されたい。Mullerらの知見は、CXCR4およびCCR7ケモカイン受容体が、乳癌細胞において見出されたこと、およびこれらの受容体のリガンドが、優先的に乳癌の転移と関係する部位において高度に発現されていることを示す。

【0007】

10

関心対象の癌細胞およびその他の細胞に対する走化性因子の効果を研究するために、従来のアッセイ方法の多くが適応されてきた(例えば、濃度測定、膜フィルターの解析、可視スペクトルまたは分光光度的なELISAマイクロプレートリーダー、蛍光マイクロプレートリーダー、シンチレーションカウンター、および光ルミネセンスリーダー)。これらの方法のそれぞれは、特定の利点および不利点を有する。これらの方法のそれぞれにおいて見出される1つの不利点は、化学因子に対する細胞の反応を観察するために、関心対象の細胞を色素、蛍光を発する因子、または放射性同位元素で「タグを付ける」必要があることである。外因から細胞を標識する技術は、既存のアッセイ方法の経費および複雑度を増し、非常に熟練した技官の専門知識を必要とすることが多い。

【0008】

20

転移細胞の重要な性質は、これらが、細胞外マトリクスの成分を消化することができるマトリクスマタロプロテイナーゼ(MMP)などのプロテアーゼを産生する能力である。これらのプロテアーゼの生成は、これらが組織を侵襲するのを容易にする。インビトロおよびインビボの系を使用する転移性のプロセスにおけるプロテアーゼの役割、並びに転移能の予後指標として使用するためのこれらの定量は、広く報告されている。存在する所与のプロテアーゼの量は、ELISAを使用して測定することができるが、これは所与の種に由来するプロテアーゼと反応することができる特異抗体を必要とする。ELISAのもう1つの欠点は、これが所与のプロテアーゼの総量を測定し、酵素前駆体、活性化された酵素、または阻害剤複合型の酵素の間を区別しないということである。例えば、細胞環境における活性化状態のMMPは、メタロプロテイナーゼの組織阻害剤によって厳密に調節される。酵素電気泳動法(プロテアーゼの測定)およびリバース酵素電気泳動法(TIMPの測定)は、適切な基質の酵素消化と組み合わせたゲル電気泳動を含む、広く使用されている方法である。プロテアーゼの酵素前駆体および活性型は、分子量に基づいて区別することができる。残念なことに、標準的な酵素電気泳動法では、面倒な多くの調製工程が必要になる(Hawkes SP, Li H, Taniguchi T., Zymography and reverse zymography for detecting MMPs and TIMPs., In Matrix Metalloproteinase Protocols. Volume 151 of Methods in Molecular Biology. Ian Clark ed. Humana Press. Totowa NJ. 2001, pp 399-410)。

30

【0009】

40

その他に使用されるアッセイ法は、放射標識された基質の酵素による切断によって放出される放射標識されたコラーゲン断片を定量する工程、および自己消光されている蛍光基質が消化を受けて、定量可能な蛍光シグナルの増加を引き起こしたときに生じる蛍光を測定する工程を含む、種々のプロテアーゼアッセイ法を含む。しかし、これらの方法では、プロテアーゼ間を識別することができない(Cawston TE, Koshy P, Rowan AD., Assay of matrix metalloproteinases against matrix substrates. In Matrix Metalloproteinases Protocols. Volume 151 of Methods in Molecular Biology. Ian Clark ed. Humana Press. Totowa NJ. 2001, pp389-397)。

【0010】

50

増強された試料の評価ができるように使用するための頑強かつ容易な、細胞数を定量するため、これらの空間における位置を同定するため、並びに外因性の細胞ラベリング技術を必要としないプロテアーゼおよびプロテアーゼ阻害剤を同定し、かつ定量するための、

アッセイ装置およびシステムが必要とされる。

【発明の開示】

【0011】

発明の概要

本発明は、分子生物学、細胞生物学、免疫学、腫瘍学、発生生物学、幹細胞分化、一般的な研究室科学、および微生物学の分野に、並びに基体（細胞接着および細胞増殖の定量ができる）上に存在する細胞数を、並びに対照条件下での、および走化性の、増殖性の、分化性の増強、およびその他の細胞活性を有する（ケモキネシスな因子および細胞遊走を阻害する因子の原因となる）因子の存在に応答して、細胞外マトリクス（細胞侵襲）の表面にまたは通過して、増殖、細胞死、分化、または細胞遊走を検出し、かつ定量するための、液晶アッセイ法、並びに増殖の範囲内のその他のバイオフォトニカリー・ベース・アッセイ法に基づいた方法および組成物に関する。

【0012】

一部の態様において、本発明は、表面を有する基体を含む分析物アッセイ装置であって、表面は、その上にメソゲンを配向させるように構成された少なくとも1つの非特異的な結合アッセイ領域を有する装置を提供する。一部の態様において、メソゲンは、表面上で異方性の特色によって配向される。その他の態様において、アッセイ領域は、分析物の存在によって破壊することができるホメオトロピックな配向を促進する。一部の好ましい態様において、非特異的な結合アッセイ領域は、実質的に分析物に特異的な認識部分ではない。本アッセイは、細胞、粒状物質、および微生物を含む（しかし、これらに限定されない）種々の分析物を検出するため有用である。本発明は、任意の特定の微生物の検出に限定されない。実際に、細菌、ウイルス、および真菌を含む（しかし、これらに限定されない）種々の微生物の検出が想定される。本発明は、メソゲンを配向させるように構成された任意の特定の非特異的アッセイ領域に限定されない。実際に、摩擦された（ラブド）タンパク質（rubbed protein）、摩擦された（ラブド）重合体の表面（rubbed polymeric surface）、および整えられた（オーダード）重合体の表面を（ordered polymeric surface）含む（しかし、これらに限定されない）種々のこのようアッセイ領域が想定される。本発明は、任意の特定の摩擦された重合体の表面に限定されない。実際に、ポリウレタン、ポリイミド、組織培養ポリスチレンおよびポリスチレンを含む（しかし、これらに限定されない）種々の摩擦された重合体の表面が想定される。本発明は、任意の特定の整えられた表面の使用に限定されない。実際に、微小成形された重合体の表面（micromolded polymeric surface）、マイクロ／ナノ研磨された重合体の表面、フォトリソグラフィーで作製された重合体の表面、および斜めに沈着された金属フィルム（obliquely deposited metallic film）を含む（しかし、これらに限定されない）種々の整えられた表面が想定される。さらに他の態様において、メソゲンを配向させるように構成される少なくとも1つの非特異的なアッセイ領域は、表面上に配置された粒子を含む。本発明は、粒子を配向させる任意の特定の方法に限定されない。実際に、電場、磁場、ずり磁場、流体の流れ、および機械的な移動を含む（しかし、これらに限定されない）種々の配向方法が想定される。本発明は、任意の特定のアッセイ領域の数に限定されない。実際に、6、12、24、36、96、384、または1536個のアッセイ領域を含むアッセイを含む種々のアッセイ領域配置であって、アッセイ領域は、プレートリーダーによって読み取り可能なアッセイ領域配置が想定される。特に好ましい一部の態様において、6、12、24、36、96、384、または1536個のアッセイ領域は、アレイに配置される。

【0013】

その他の態様において、本発明は、表面を含むアッセイ装置であって、表面は、その上に粒子を有し、粒子は、メソゲンを配向させるために整えられているアッセイ装置表面を含むアッセイ装置を提供する。本発明は、粒子を任意の特定の配向させる方法に限定されない。実際に、本方法は、電場、磁場、ずり磁場、流体の流れ、および機械的な移動を含む（しかし、これらに限定されない）種々の配向方法が想定される。本発明は、任意の特定の粒子の使用に限定されない。実際に、金属粒子、木炭、チョーク、石鹼石、グラファ

10

20

30

40

50

イト、および軽石を含む（しかし、これらに限定されない）種々の粒子の使用が想定される。

【0014】

なおさらなる態様において、本発明は、アッセイ領域を含むアッセイ装置であって、アッセイ領域は、メソゲンを配向させるように構成された細胞外マトリックスを含むアッセイ装置を提供する。一部の好ましい態様において、アッセイ装置は、メソゲンをさらに含む。本発明は、任意の特定のメソゲンの使用に限定されない。実際に、サーモトロピックおよびリオトロピックな液晶を含む（しかし、これらに限定されない）種々のメソゲンの使用が想定される。

【0015】

その他の態様において、本発明は、アッセイ領域を含むアッセイ装置であって、アッセイ領域は、その中に包埋されたメソゲンを有するマトリックスを含むアッセイ装置を提供する。一部の好ましい態様において、アッセイ装置は、メソゲンをさらに含む。本発明は、任意の特定のメソゲンの使用に限定されない。実際に、サーモトロピックおよびリオトロピックな液晶を含む（しかし、これらに限定されない）種々のメソゲンの使用が想定される。

【0016】

一部の態様において、本発明は、表面を有する基体を含むアッセイ装置であって、この表面は、その上に少なくとも1つのメソゲン (mesogen) によって接触されるアッセイ領域を有し、表面は、メソゲンを配向させるように構成され、および少なくとも1つの細胞播種領域は、少なくとも1つのアッセイ領域と結合されているアッセイ装置を提供する。一部の好ましい態様において、基体は、その中に、試験化合物を含むための少なくとも1つの貯蔵所を有し、かつ少なくとも1つの細胞播種領域がウェルを含む。その他の一部の好ましい態様において、1つまたは複数の細胞播種領域が少なくとも1つの細胞を含む。さらなる態様において、貯蔵所は、試験化合物を含む。本発明は、任意の特定の細胞タイプに限定されない。実際に、原核細胞および真核細胞を含む（しかし、これらに限定されない）種々の細胞の使用が想定される。本発明は、メソゲンを配向させるように構成された任意の特定の非アッセイ領域に限定されない。実際に、摩擦されたタンパク質、摩擦された重合体の表面、および整えられた重合体の表面を含む（しかし、これらに限定されない）種々のこのようなアッセイ領域が想定される。本発明は、任意の特定の摩擦された重合体の表面に限定されない。実際に、ポリイミド、ポリウレタン、組織培養ポリスチレンおよびポリスチレンを含む（しかし、これらに限定されない）種々の摩擦された重合体の表面が想定される。本発明は、任意の特定の整えられた表面の使用に限定されない。実際に、微小成形された (micromolded) 重合体の表面、マイクロ/ナノ研磨された重合体表面、フォトリソグラフィーで作製された重合体の表面、および斜めに沈着された金属フィルムを含む（しかし、これらに限定されない）種々の整えられた表面が想定される。さらに他の態様において、メソゲンを配向させるように構成された少なくとも1つのアッセイ領域は、その上に粒子を有する表面を含み、粒子は、液晶を配向されるように構成される。その他の好ましい態様において、表面は、少なくとも1つの分子認識部分で装飾される。一部の好ましい態様において、認識部分は、共有結合によって表面に付着される。本発明は、任意の特定の認識部分の使用に限定されない。実際に、金属、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、抗体、核酸、脂質、リン脂質、脂肪酸誘導体、ステロイド、転写制御因子、糖、細胞受容体、および受容体認識配列を含む（しかし、これらに限定されない）種々の認識部分の使用が想定される。本発明は、任意の特定のポリペプチドの使用に限定されない。実際に、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、オステオポンチン、トロンボスポンジン、血管細胞接着分子-1、細胞内接着分子-1、細胞内接着分子-2、コンドロイチン硫酸、フォンビルプラント因子、エンタクチン、フィブリノーゲン、テネイシン、粘膜アドレッシン細胞接着分子 (mucosal cell addressin molecule)、C3b、MDCタンパク質、およびビトロネクチンを含む（しかし、これらに限定されない）種々のポリペプチドの使用が想定される。本発明は、任意の特定の受容体認識配列の使用に限定されない。実際に

10

20

30

40

50

、カドヘリン、免疫グロブリンスープラファミリー、セレクチン、ムチン、およびインテグリン結合配列を含む（しかし、これらに限定されない）種々の受容体認識配列の使用が想定される。本発明は、任意の特定のインテグリン結合配列の使用に限定されない。実際に、RGD、EILDV、LDV、LDVP、IDAP、PHSRN、SLDVP、GRGDAC、およびIDSPを含む（しかし、これらに限定されない）種々のインテグリン結合配列の使用が想定される。本発明は、任意の特定のアッセイ領域の配置に限定されない。一部の態様において、本発明のアッセイ装置は、6、12、24、36、96、384、または1536個のアッセイ領域を含む。一部の好ましい態様において、複数のアッセイ領域は、アレイに配置される。その他の態様において、アッセイ領域のアレイは、市販のプレートリーディング装置の読み位置と対応するよう構成されている。一部の態様において、本発明のアッセイ装置は、少なくとも1つのミクロな液体のチャネルを含む。その他の態様において、少なくとも1つのミクロな液体のチャネルは、流体により貯蔵所に接続するよう構成されている。
10

【0017】

本発明の一部の態様において、表面を有する基体、分析物、およびメソゲンを含む分析物を分析する工程（ここで、分析物は、表面に特異的に結合されない）；並びに分析物が検出されるように、基体の表面に対してメソゲンを適用する工程のための方法が提供される。一部の態様において、メソゲンは、表面の整ったおよび整っていない領域が同定されるような条件下で適用される。一部の態様において、表面は、メソゲンを配向させるよう構成されている。その他の態様において、表面は、メソゲンを配向させない。一部の態様において、分析物の存在は、メソゲンの整列を破壊させる。本発明の方法は、任意の特定の分析物の解析に限定されない。実際に、原核細胞、真核細胞、ウイルス、および粒状物質を含む（しかし、これらに限定されない）種々の分析物の解析が想定される。一部の態様において、表面を横切る細胞の遊走が、整えられていない領域を形成する。その他の態様において、表面を横切る細胞の遊走が、整えられた領域を形成する。なおさらなる態様において、表面上における細胞の存在が、メソゲンの整列または乱れを引き起こし、これにより細胞の存在を検出することができる。さらなる態様において、本発明の方法は、整えられた領域を整えられていない領域と比較することにより、表面上の細胞の数を定量する工程を含む。
20

【0018】

本発明のさらに他の態様において、表面を有する基体を含むメソゲンおよび装置を提供する工程であって、ただしこの表面は、その上にメソゲンを配向させるよう構成された少なくとも1つのアッセイ領域、および少なくとも1つのアッセイ領域と関係する少なくとも1つの細胞播種領域を有する工程；少なくとも1つの細胞播種領域に細胞を適用する工程；並びに表面にメソゲンを適用することによって少なくとも1つのアッセイ領域に細胞の動作をアッセイする工程を含む、細胞を解析するための方法が提供される。一部の態様において、装置は、試験化合物を含むための貯蔵所をさらに含む。さらなる態様において、細胞に対する試験化合物の効果は、少なくとも1つのアッセイ領域への細胞の移動によって解析される。一部の態様において、試験化合物は、細胞運動性に影響を与えることが疑われる。その他の態様において、試験化合物は、細胞増殖または細胞接着に効果があることが疑われる。
30

【0019】

また、本発明は、細胞運動性に対する試験化合物の効果を検出するための方法であって：表面を有する基体を含むアッセイ装置であって、ただしこの表面は、その上にメソゲンを配向させるよう構成された少なくとも1つのアッセイ領域および少なくとも1つのアッセイ領域と関係する少なくとも1つの細胞播種領域を有し、少なくとも1つの細胞播種領域は、少なくとも1つの細胞を含むアッセイ装置と、細胞運動性を阻害または促進することが疑われる試験化合物とを提供する工程；少なくとも1つの細胞を試験化合物と接触させる工程；並びに少なくとも1つの細胞に対する試験化合物の効果を解析する工程を含む方法を提供する。本発明の方法は、任意の特定の細胞の解析に限定されない。実際に、真核細胞（例えば哺乳類）および原核細胞を含む（しかし、これらに限定されない）種々の細
40

胞を、解析することができる。その他の態様において、哺乳類細胞はヒト細胞である。一部の態様において、解析は、液晶によって行われる。さらに他の態様において、液晶フィルム内のメソゲンの配向は、プレートリーダー上で解析される。

【0020】

本発明は、細胞分泌性産物の產生に対する試験化合物の効果を検出するための方法であって：表面を有する基体を含むメソゲンおよびアッセイ装置を提供する工程であって、ただしこの表面は、その上に、細胞分泌性産物および少なくとも1つの細胞を認識する認識部分を含む少なくとも1つのアッセイ領域を有する工程；少なくとも1つの細胞を少なくとも1つの第1の試験化合物と接触させる工程；並びに少なくとも1つの細胞分泌性産物の產生を解析するために、表面にメソゲンを適用する工程を含む方法をさらに提供する。本発明は、任意の特定の細胞分泌性産物の解析に限定されない。実際に、栄養性因子、サイトカイン、ケモカイン、および電解質を含む（しかし、これらに限定されない）種々の細胞分泌性産物の解析が想定される。本発明は、任意の特定の栄養性因子の解析に限定されない。実際に、上皮細胞成長因子、線維芽細胞成長因子、ニューロトロフィン、血小板由来成長因子、肝細胞成長因子、成長ホルモン、プロラクチン、アンジオテンシン、キニン、神経分化因子、インスリン、インスリン様成長因子（IGF）IおよびII、ケラチノサイト成長因子、アンフィレギュリン（amphiregulin）、ヘレギュリン（heregulin）、TGF- α 、TGF- β 、神経ペプチド、並びに神経伝達物質を含む（しかし、これらに限定されない）種々の栄養性因子の解析が想定される。本発明は、任意の特定のサイトカインまたはケモカインの解析に限定されない。実際に、インターロイキン、エリスロポエチン、腫瘍壞死因子、コロニー刺激因子、インターフェロン、および細胞遊走因子を含む（しかし、これらに限定されない）種々のサイトカインおよびケモカインの解析が想定される。本発明は、任意の特定の電解質の解析に限定されない。実際に、カルシウム、マグネシウム、ナトリウム、およびカリウムを含む（しかし、これらに限定されない）種々の電解質の解析が想定される。本発明は、任意の特定の細胞タイプの解析に限定されない。実際に、本発明の方法は、真核細胞（例えば、ヒト細胞を含む哺乳類細胞、および癌細胞、並びにその他の脊椎動物および無脊椎の種に由来する細胞）を含む（しかし、これらに限定されない）種々の細胞タイプの解析のために有用である。一部の態様において、解析工程は、メソゲンによって行われる。さらなる態様において、メソゲンは、プレートリーダー上で解析される。

【0021】

また、本発明は、細胞分泌性産物の產生を検出するための方法であって：メソゲン、少なくとも1つの細胞、および表面を有する基体を含むアッセイ装置を提供する工程であって、ただしこの表面は、その上に細胞分泌性産物を認識する認識部分を含む少なくとも1つのアッセイ領域を有する工程；並びに少なくとも1つの細胞分泌性産物の產生を解析するために、表面にメソゲンを適用する工程を含む方法を提供する。一部の態様において、細胞分泌性産物は、天然の分泌性産物であるが、他の態様において、細胞分泌性産物は、組換え分泌性産物である。

【0022】

なおさらなる態様において、本発明は、細胞の細胞骨格アラインメントを検出するための方法であって：メソゲンおよび少なくとも1つの細胞を提供する工程；少なくとも1つの細胞を、メソゲンが少なくとも1つの細胞の細胞骨格のアラインメントに応答する条件下で、メソゲンと接触させる工程；並びにメソゲンにおける反応を解析する工程を含む方法を提供する。一部の態様において、本方法は、少なくとも1つの細胞の膜を可溶化剤で可溶化する工程をさらに含む。一部の態様において、可溶化剤は、界面活性物質を含む。さらなる態様において、界面活性物質は、リオトロピックなメソゲンを含む。本発明は、任意の特定の細胞タイプの解析に限定されない。実際に、本発明の方法は、真核細胞（例えば、ヒト細胞を含む哺乳類細胞、癌細胞、並びにその他の脊椎動物および無脊椎の種に由来する細胞）を含むがこれらに限定されない種々の細胞種の解析のために有用である。一部の態様において、解析工程は、メソゲンによって行われる。さらなる態様において、メ

10

20

30

40

50

ソゲンは、プレートリーダー上で解析される。

【0023】

さらに他の態様において、本発明は、表面を有する基体を含む装置であって、この表面は、その上に少なくとも1つのアッセイ領域を有し、少なくとも1つのアッセイ領域は、メソゲンを配向させる領域およびメソゲンを配向させない領域を含む装置を提供する。一部の態様において、少なくとも1つのアッセイ領域は、細胞播種領域をさらに含む。他の態様において、本装置は、少なくとも1つの貯蔵所をさらに含む。さらなる態様において、少なくとも1つの貯蔵所は、試験化合物を含む。一部の態様において、試験化合物が、少なくとも1つの細胞の動作を阻害するか、または促進することが疑われる。

【0024】

本発明のさらなる態様は、基体および少なくとも1つのアッセイ領域を含む装置であって、少なくとも1つのアッセイ領域は、光学的に不透明な領域および光学的に透明な領域を含む装置を提供する。一部の態様において、アッセイ領域は、蛍光定量的な、比色、光学濃度、および光散乱読み出しからなる群より選択される読み出しを構成する。一部の態様において、光学的に不透明な領域は、少なくとも1つの細胞播種領域をさらに含む。一部の好ましい態様において、少なくとも1つの細胞播種領域は、少なくとも1つの細胞を含む。一部の態様において、少なくとも1つのアッセイ領域は、メソゲンを配向させるように構成される。さらなる態様において、装置は、少なくとも1つの貯蔵所を含む。一部の態様において、少なくとも1つの貯蔵所は、第1の試験化合物を含む。一部の好ましい態様において、試験化合物は、少なくとも1つの細胞の動作を促進するか、または阻害することが疑われる。さらなる態様において、少なくとも1つの貯蔵所は、少なくとも1つのミクロな液体のチャネルに対して流体により接続されている。一部の好ましい態様において、少なくとも1つの貯蔵所は、少なくとも1つのアッセイ領域で流体により接触させる。

【0025】

さらなる態様において、少なくとも1つの細胞は、生体染色されるか、または固定されてその後に染色される。本発明のアッセイ装置は、任意の特定の配置に限定されない。実際に、本発明は、6、12、24、36、96、384、または1536個のアッセイ領域を含むがこれらに限定されない種々の配置を想定する。一部の態様において6、12、24、36、96、384、または1536アッセイの領域は、複数の行および列のアレイに配置される。一部の好ましい態様において、アッセイ領域のアレイは、プレートリーダー装置の読み位置と対応するように構成されている。

【0026】

さらに他の態様において、本発明は、少なくとも第1および第2の分離したアッセイ領域を含むアッセイ装置であって、第1および第2の分離されたアッセイ領域のそれぞれは、第1側部、第2側部、メソゲンを配向させる領域、およびメソゲンを配向させない領域を含み、第1および第2の分離されたアッセイ領域のうちの一方において、メソゲンを配向させる領域は、第1側部上にあり、メソゲンを配向させない領域は、第2側部上にあり、第1および第2の分離されたアッセイ領域の他方において、メソゲンを配向させる領域、第2側部上にあり、メソゲンを配向させない領域は、第1側部上にあるアッセイ装置を提供する。一部の態様において、第1および第2の分離されたアッセイ領域のそれぞれは、細胞播種領域を含む。さらなる態様において、細胞播種領域は、少なくとも1つの細胞を含む。本発明は、任意の特定の細胞タイプの解析に限定されない。実際に、本発明の方法は、真核細胞（例えば、ヒト細胞を含む哺乳類細胞、癌細胞、並びにその他の脊椎動物および無脊椎の種に由来する細胞）を含むがこれらに限定されない種々の細胞種の解析のために有用である。一部の態様において、解析工程は、メソゲンによって行われる。一部の態様において、アッセイ装置は、少なくとも1つの貯蔵所をさらに含む。さらなる態様において、少なくとも1つの貯蔵所は、試験化合物を含む。一部の態様において、試験化合物は、少なくとも1つの細胞の走化性を促進するか、または阻害することが疑われる。さらなる態様において、少なくとも1つの貯蔵所は、少なくとも1つのミクロな液体のチャネルに対して流体により接続されている。

10

20

30

40

50

【0027】

その他の態様において、本発明は、表面を有する基体を含む分析物アッセイ装置であって、ただしこの表面は、その上に、メソゲンを配向させるように構成された少なくとも1つの非特異的なアッセイ領域を有する分析物アッセイ装置；メソゲン；および説明書を含むキットを提供する。

【0028】

さらに他の態様において、本発明は、表面上の細胞を定量化する方法であって：メソゲンおよび表面を有する基体を提供する工程であって、この表面は、その上に細胞を有する工程；整列されたメソゲンおよび整列されていないメソゲンの領域が形成されるような条件下で、表面にメソゲンを適用する工程；並びに整列されたメソゲンおよび整列されていないメソゲンの領域を比較することによって、表面上の細胞数を定量する工程を含む方法を提供する。

【0029】

なおさらなる態様において、本発明は、細胞を解析する方法であって：細胞とその上に少なくとも1つのアッセイ領域を有する基体とを含む装置を提供する工程であって、この少なくとも1つのアッセイ領域は、光学的に不透明な領域および光学的に透明な領域を含む工程；アッセイ領域に細胞を適用する工程；並びに細胞を解析する工程を含む方法を提供する。一部の態様において、アッセイ領域は、少なくとも1つの細胞播種領域をさらに含む。さらなる態様において、少なくとも1つの細胞播種ウェルは、少なくとも1つの細胞を含む。一部の態様において、基体は、その中に、第1の試験化合物を含む少なくとも1つの貯蔵所を有する。一部の態様において、試験化合物は、少なくとも1つの細胞の移動を促進するか、または阻害することが疑われる。さらなる態様において、少なくとも1つの細胞が、生体染色または非生体染色される。一部の態様において、少なくとも1つの細胞は、蛍光マーカーを含む。さらなる態様において、解析工程は、濃度測定、光散乱、比色、または蛍光定量的な方法による解析を含む。

【0030】

さらに他の態様において、本発明は、マトリックスに対する細胞の効果を検査する方法であって：マトリックス、細胞、およびメソゲンを提供する工程；細胞にマトリックスを曝露する工程；並びにメソゲンが配向されることまたは配向されないことが、細胞によりマトリックスに対して及ぼされた力の指標となる条件下で、マトリックスに対してメソゲンを適用する工程を含む方法を提供する。一部の好ましい態様において、マトリックスは、液晶を配向させる。本発明は、任意の特定の液晶タイプの使用に限定されない。実際に、リオトロピック液晶およびサーモトロピック液晶を含むがこれらに限定されない種々の液晶タイプの使用が想定される。一部の態様において、細胞は、真核細胞である。さらなる態様において、細胞は、マトリックスに侵入する。本発明は、任意の特定のマトリックスのタイプに限定されない。実際に、一部の真核生物細胞株（例えばEHS細胞）に由来する再構築された基底膜様の複合体、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、およびゼラチンなどの細胞外マトリックス、細菌細胞外マトリックス、ゲルマトリックス、および重合体マトリックスを含むが、これらに限定されない種々のマトリックスの使用が想定される。

【0031】

さらに他の態様において、本発明は、マトリックスに対する細胞の効果を検査する方法であって：中に包埋されたメソゲンを有するマトリックスと細胞とを提供する工程；メソゲンが配向されること又は配向されないことが、細胞によりマトリックスに対して及ぼされた力の指標となる条件下で、細胞に対して、その中に包埋されたメソゲンを有するマトリックスを曝露する工程を含む方法を提供する。一部の好ましい態様において、マトリックスは、液晶を配向させる。本発明は、任意の特定の液晶タイプの使用に限定されない。実際に、リオトロピック液晶およびサーモトロピック液晶を含むが、これらに限定されない種々の液晶タイプの使用が想定される。一部の態様において、細胞は、真核細胞である。さらなる態様において、細胞は、マトリックスに侵入する。本発明は、任意の特定のマ

10

20

30

40

50

トリックスのタイプに限定されない。実際に、一部の真核生物細胞株（例えばEHS細胞）に由来する再構築された基底膜様の複合体、コラーゲン、フィプロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、およびゼラチンなどの細胞外マトリックス、細菌細胞外マトリックス、ゲルマトリックス、および重合体マトリックスを含むが、これらに限定されない種々のマトリックスの使用が想定される。

【0032】

その他の態様において、本発明は、細胞を培養する方法であって：液晶基体および細胞を提供する工程；並びに液晶基体上で細胞を培養する工程を含む方法を提供する。本発明は、任意の特定の液晶タイプの使用に限定されない。実際に、リオトロピック液晶およびサーモトロピック液晶を含むが、これらに限定されない種々の液晶タイプの使用が想定される。一部の態様において、液晶基体は、マトリックスを含む。本発明は、任意の特定のマトリックスのタイプに限定されない。実際に、一部の真核生物細胞株（例えばEHS細胞）に由来する再構築された基底膜様の複合体、コラーゲン、フィプロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、およびゼラチンなどの細胞外マトリックス、細菌細胞外マトリックス、ゲルマトリックス、および重合体マトリックスを含む、細菌細胞外マトリックス、ゲルマトリックス、および重合体マトリックスを含むが、これらに限定されない種々のマトリックスの使用が想定される。さらに他の態様において、液晶基体は、リン脂質および生物学的な受容体からなる群より選択される部分を含む。

【0033】

さらなる態様において、本発明は、細胞の代謝状態をアッセイする方法であって：細胞およびメソゲンを提供する工程；並びにメソゲンが整列されることまたは整列されないことが、細胞の代謝状態の指標となる条件下で、メソゲンに対して細胞を曝露する工程を含む方法を提供する。本発明は、任意の特定の液晶タイプの使用に限定されない。実際に、リオトロピック液晶およびサーモトロピック液晶を含むが、これらに限定されない種々の液晶タイプの使用が想定される。一部の態様において、細胞が培養される温度で、またはその近くで、メソゲンが相転移を受ける。さらなる態様において、相転移の解析は、細胞によって產生された熱量を示す。

【0034】

なおさらなる態様において、本発明は、メソゲンを配向させるように構成された少なくとも1つの領域を含む表面と、表面上でランダムに分配されたナノのサイズからミクロのサイズの粒子とを含む装置を提供する。一部の態様において、装置は、表面の上に被われた液晶をさらに含み、粒子の置換により液晶が整列される。

【0035】

一部の態様において、本発明は、メソゲンを配向させるように構成された少なくとも1つの領域を含む表面であって、その上にナノのサイズからミクロのサイズの粒子が分配された表面と、細胞と、メソゲンとを提供する工程；表面に細胞を適用する工程；並びに表面に対してメソゲンを適用することによって、メソゲンを配向させるように構成された領域を横切る細胞の位置または移動をアッセイする工程を含み、細胞による粒子の置換により、整列されたメソゲンの領域の形成が生じる方法を提供する。

【0036】

その他の態様において、本発明は、2つの側面と表面を通って電流が生じるように構成された電極とを有する表面と、2つの側面の一方の上に液晶と、2つの側面の他方の上に分析物とを含む装置を提供し、分析物の存在は、電流が電極を通ったときに、液晶の乱れの存在によって報告される。

【0037】

さらに他の態様において、本発明は、上に流体チャネルを有し、試験領域および貯蔵所を含む基体と、貯蔵所に配置された試験化合物が拡散によって試験領域に送達されるように、流体チャネルが試験領域と液体により連絡されている貯蔵所とを提供する。一部の態様において、流体チャネルは、試験領域に隣接した開口で終わる。さらなる態様において、装置は、比色、液晶、蛍光定量的、および濃度測定によるアッセイ系からなる群より選

10

20

30

40

50

択されるアッセイ系と共に使用するために構成される。一部の態様において、貯蔵所および流体チャネルは、ガラス、ポリプロピレン、ポリスチレン、およびシリコーンからなる群より選択される材料から形成される。その他の態様において、装置は、マルチエウェル・プレートと共に使用するための挿入物として構成される。さらなる態様において、装置は、複数の試験領域、貯蔵所、および複数の試験化合物の平行した試験を可能にする流体チャネルを含む。

【0038】

さらなる態様において、本発明は、細胞を解析する方法であって：細胞とその上に少なくとも1つのアッセイ領域を有する基体とを含む装置を提供する工程であって、この少なくとも1つのアッセイ領域は、メソゲンを配向させる領域およびメソゲンを配向させない領域を含む工程；並びにアッセイ領域に細胞を適用する工程；並びに細胞を解析する工程を含む方法を提供する。

【0039】

その他の態様において、本発明は、1つまたは複数の細胞の予め定められた性質を解析するための方法であって：基体、細胞、およびメソゲンを提供する工程；表面に細胞を適用する工程；並びにメソゲンと表面および細胞の接触によって細胞を解析する工程を含む方法を提供する。本発明は、任意の特定の予め定められた性質の解析に限定されない。実際に、化合物に応答して増殖すること、化合物に応答して分化すること、および化合物に応答して遊走することを含む（しかし、これらに限定されない）種々の予め定められた性質の解析が想定される。一部の態様において、解析工程は、細胞に対する物質または化合物の効果を測定することをさらに含む。一部の態様において、効果は、定量化される。

【0040】

さらに他の態様において、本発明は、アッセイ装置を製造するための方法であって：少なくとも1つの異方性の領域および被覆材料を含む表面を有する基体を提供する工程；並びに少なくとも1つの異方性の領域を含むアッセイ領域が定義されるような条件下で、表面を有する基体に被覆材料を適用する工程を含む方法を提供する。一部の態様において、本方法は、第2の基体を提供する工程、および被覆材料を適用した後に第2の基体を第1の基体と接触させる工程をさらに含む。一部の態様において、第1および第2の基体は、シリカおよび石英基体からなる群より選択される。

【0041】

一部の態様において、被覆材料は、ポリウレタン、ポリエチレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエチレンテトラフタラート、ポリテトラフルオロエチレン、ポリビニリデンジフルオライド、タンパク質、ラテックス、ポリスチレン、シリコーン、セルロース、およびニトロセルロースからなる群より選択される。その他の態様において、被覆材料は、圧感接着剤を含む。さらに他の態様において、被覆材料は、色素を含む。

【0042】

一部の態様において、被覆材料の適用が、第1の基体上に被覆材料をプリントすること含む。一部の好ましい態様において、プリント方法は、シルクスクリーンプリント法、フレキソ印刷プリント法、マイクロコンタクト（microcontact）プリント法、セリアグラフ（seriagraphic）プリント法、インクジェット式プリント法、インタリゴ（intaligo）プリント法、オフセットプリント法、ハイデルベルク・プレス・プリント法、および温熱レーザープリント法からなる群より選択される。一部の態様において、被覆材料の適用は、複数のアッセイ領域を定義する。さらに他の態様において、少なくとも1つのアッセイ領域は、ミクロな液体のチャネルである。さらなる態様において、被覆材料の適用は、アッセイ領域に物質を送達するための少なくとも1つのミクロな液体のチャネルをさらに定義する。

【0043】

その他の態様において、本発明は、実質的に市販のマルチエウェル・プレートと同様の外寸法を有する支持体表面であって、該支持体部材が中に少なくとも1つのカットアウトを有する支持体部材、およびアッセイ基体を収容する少なくとも1つのカットアウトに嵌

10

20

30

40

50

入されたアッセイ基体とを含む装置を提供する。一部の好ましい態様において、アッセイ基体は、液晶アッセイ基体である。その他の態様において、支持体表面は、複数のカットアウトを含み、それぞれが、中に嵌入されたアッセイ基体を有する。

【0044】

さらに他の態様において、本発明はa)液晶を配向させるように構成された少なくとも1つの酵素基質を上に有するアッセイ基体、および酵素基質に対して作用する酵素活性を含むことが疑われる試料を提供する工程；並びにb)液晶の配向の変化が試料中の酵素活性に対して作用する酵素活性の存在を示すような条件下で、試料とアッセイ基体を接触させる工程を含む方法を提供する。一部の態様において、液晶の配向の変化は、配向の減少である。その他の態様において、液晶の配向の変化は、異方性に整えられた表面上を覆う基質の消化により液晶を配向させる能力である。酵素の基質の消化により、上を覆うメソゲンが、基礎をなす整列にアクセスして、異方性に整えられた表面に影響を及ぼすことができる。

【0045】

さらなる態様において、本発明は、アッセイ基体を解析する方法であって：a)マルチエウェル・プレートリーダーおよび実質的に細胞培養ウェルでない少なくとも1つの分析領域を含むアッセイ基体を提供する工程；並びにb)基体の少なくとも1つの分析領域をマルチエウェル・プレートリーダーで読み込む工程を含む方法を提供する。一部の態様において、少なくとも1つの分析領域は、市販のマルチエウェル・プレートの中の細胞培養ウェルの位置と対応する。その他の態様において、少なくとも1つの分析領域は、マルチエウェル・プレートの中の細胞培養ウェルの位置と対応しない。一部の好ましい態様において、マルチエウェル・プレートリーダーは、走査モードで作動する。さらに他の好ましい態様において、アッセイ基体は、液晶アッセイ基体である。さらなる好ましい態様において、アッセイ基体は、異方性の領域を含む。一部の態様において、少なくとも1つの分析領域は、マイクロな液体のチャネルの領域と対応する。一部の態様において、プレートリーダーは、少なくとも1つの分析領域の分離した領域を読み込む。その他の態様において、プレートリーダーは、反応が生じた領域を同定するための少なくとも1つの分析領域を走査する。一部の好ましい態様において、反応は、液晶の配向の破壊である。さらに他の態様において、本方法は、該少なくとも1つの分析領域に対して細胞を適用する工程、および該細胞が該プレートリーダーと共に移動する領域を同定する工程をさらに含む。

【0046】

その他の態様において、本発明は、マルチエウェル・プレートのウェルと対応するよう配列された複数の細長いシリンドラを含む装置を提供し、ここで、該細長い部材のそれぞれは、遠位端を有し、かつその中に開口部を有し、その結果、装置が底面を有するウェルを含むマルチエウェル・プレート上に配置されたときに、細長いシリンドラは、開口部がウェルの底面と隣接するように該マルチエウェル・プレートのウェルに延長される。

【0047】

さらなる態様において、本発明は、a)分析物を含むことが疑われる試料、メソゲン、および液晶を配向させ、かつ認識部分で装飾されたマイクロチャネルをその中に有する基体を提供する工程；b)試料を、試料が該マイクロチャネルに沿って移動するように、マイクロチャネルに対して適用する工程；並びにc)メソゲンとマイクロチャネルを接触させる工程を含む方法であって、結合する分析物の量は、液晶の配向が乱されているマイクロチャネルに沿った長さによって示される方法を提供する。一部の態様において、メソゲンは、サーモトロピックおよびリオトロピックの液晶からなる群より選択される。一部の態様において、マイクロチャネルは、摩擦された表面を含む。その他の態様において、マイクロチャネルは、斜めに沈着された金属表面を含む。

【0048】

定義

本明細書において使用されるものとして、「基体(substrate)」の用語は、関連したアッセイ成分(例えば、アッセイ領域、液晶の機能単位を構成するメソゲン、細胞、試験

10

20

30

40

50

化合物など)を支持することができる材料をいう。例えば、一部の態様において、基体は、平面(すなわち、2次元)、ガラス、金属、複合体、プラスチック、シリカ、またはその他の生体適合性のもしくは生物学的に非反応性の(または、生物学的に反応性の)組成物を含む。その他の一部の態様において、基体は、多孔性の(例えば、微孔質)または構築された(すなわち、3次元)組成物(例えば、ゾル-ゲル・マトリックス)を含む。

【0049】

本明細書において使用されるものとして、「メソゲン(mesogen)」の用語は、液晶を形成する化合物、および特に堅い、液晶材料の成分である棒様または円盤様の分子をいう。

【0050】

本明細書において使用されるものとして、「アッセイ領域」は、データの収集のために構成された基体上の位置をいう。一部の態様において、アッセイ領域は、メソゲンを整列させるように構成される。その他の態様において、アッセイ領域は、特にメソゲンを整列させないように構成される。なおさらなる態様において、アッセイ領域は、2つまたはそれ以上の区別可能な領域を提供するように構成される(例えば、光学的に不透明な領域および光学的に透明な領域、液晶(メソゲン)のメソゲンを整列させることができる領域およびこれらの表面上に配置されたメソゲンを配列させる能力を特に欠いている領域、並びにこれらの組み合わせ)。

【0051】

本明細書において使用されるものとして、「アレイ」は、複数の分子を有する基体(例えば、メソゲン、認識部分)および/またはその表面に結合した規則的な配置(例えば、複数の行および列)の構造(例えば、ウェル、貯蔵所、チャネルなど)をいう。もう一つの意味において、「アレイ」の用語は、基体上の2以上のアッセイ領域の規則的な配置(例えば、行および列)をいう。

【0052】

「細胞播種領域」の用語は、本明細書に使用されるものとして、関心対象の1つまたは複数の細胞のための最初の付着点を提供するように構成された一部のアッセイ領域または基体をいう。特定の好ましい態様において、細胞播種領域は、基体のアッセイ領域のくぼみを含む。

【0053】

本明細書において使用されるものとして、「走性(taxis)」は、動作の方向が環境のきっかけによって影響される反応をいう。キネシスとは明確に区別される。

【0054】

本明細書において使用されるものとして、「キネシス(kinesis)」は、いずれの方向にも偏ることなく、細胞の動作が変化することをいう。したがって、速度は増減してもよく(オルトキネシス)または回転拳動(クリノキネシス)の変化があってもよい。

【0055】

本明細書において使用されるものとして、「オルトキネシス(orthokinesis)」は、動作の速度もしくは頻度が増大される(ポジティブなオルトキネシス)または減少される(ネガティブなオルトキネシス)キネシスをいう。

【0056】

本明細書において使用されるものとして、「ケモキネシス(chemokinesis)」の用語は、移動の速度(ポジティブなまたはネガティブなオルトキネシス)もしくは頻度の増大または減少、または回転拳動(クリノキネシス)の頻度もしくは規模の変化を含む、可溶性化学物質に対する運動細胞による反応をいう。

【0057】

本明細書において使用されるものとして、「走化性(chemotaxis)」の用語は、移動方向が拡散性の物質の勾配による影響をうける運動性の細胞または生物体の反応をいう。勾配により、ランダムな運動の速度または頻度ではなく、一方向のみの運動可能性を変化させるという点で、ケモキネシスとは異なる。

10

20

30

40

50

【0058】

本明細書において使用されるものとして、「異常増殖 (neoplasia)」の用語は、異常な新成長をいい、したがって良性または悪性かもしれない腫瘍と同じ意味である。これは、ここでは、細胞の抑制されない、異常な増殖によって特徴付けられる100以上の疾患に対して、癌の用語と交換可能に使用される一般的な用語である。新生物のまたは癌性の細胞は、局所的に、または体のその他の部分に血流およびリンパ系を介して広がり得る。

【0059】

本明細書において使用されるものとして、「遊走 (migration)」の用語は、1つの位置から別の位置へ通過することをいう。細胞、微生物、粒子、または分子の位置の変化を記述するために使用される。

10

【0060】

本明細書において使用されるものとして、「細胞運動 (cell movement)」は、転移および細胞質流動などを含む（しかし、これらに限定されない）細胞の形状の任意の動作または変化をいう。本明細書において使用されるものとして、「増殖」の用語は、同様の形態の、特に細胞の再生産または増加をいう。

【0061】

本明細書において使用されるものとして、「収縮」は、細胞の大きさの短化または減少をいう。典型的には、細胞が結合する基体の上または中に力を伝達することに付随する。

【0062】

本明細書において使用されるものとして、「侵襲」の用語は、異なる組成物の領域内への細胞の移動をいう。特に、細胞が1つの基体上に播種され、その後にこれらが3次元マトリックス内に移動するというインビトロ・アッセイ系の使用をいう。3次元マトリックスに「侵入する」能力は、時に悪性の潜在性の指標として使用される。

20

【0063】

本明細書において使用されるものとして、「走光性 (phototaxis)」の用語は、光の供与源の方に（ポジティブな走光性）もしくは光の供与源から離れる（ネガティブな走光性）細胞または生物体の移動をいう。

【0064】

本明細書において使用されるものとして、「走気性 (aerotaxis)」の用語は、酸素の方へまたは酸素から離れて、その存在に対する反応としての生物体の移動をいう。本用語は、好気性菌（酸素を使用する）対嫌気性菌（酸素を使用しない）を論議するときに、使用されることが多い。

30

【0065】

本明細書において使用されるものとして、「走濃性 (osmotaxis)」の用語は、増大された溶質の浸透圧濃度の供与源の方に（ポジティブな走濃性）もしくは供与源から離れる（ネガティブな走濃性）細胞または生物体の移動をいう。

【0066】

本明細書において使用されるものとして、「固定化」の用語は、材料の移動を制限する方法で、もう一つの実体（例えば、固体担体）に対して材料を、化学的にまたはそれ以外により、付着または捕らえることをいう。

40

【0067】

本明細書において使用されるものとして、「メソゲンを配向させるように構成された表面」の用語は、本質的にメソゲンを配向させる（例えば、斜めに沈着された金または摩擦されたタンパク質などの異方性の表面特徴による）表面および粒子、電場、磁場、もしくはこれらの組み合わせを含む（しかし、これらに限定されない）外因性の構造または力の適用によって、液晶を配向させるように修飾された表面をいう。

【0068】

本明細書において使用されるものとして、「マトリックス」の用語は、細胞外マトリックス、合成もしくは生物学的な多糖体マトリックス、コラーゲンマトリックス、マトリゲル (matrigel)、重合体ネットワーク、軟らかい微細製造された構造（例えば、PDMSから

50

)、リオトロピック液晶のゲル、および細菌細胞分泌から調製されるマトリックスを含む(しかし、これらに限定されない)任意の材料の3次元ネットワークをいう。マトリックスの材料は、化学的に架橋されても、または物理的に架橋されてもよい。

【0069】

本明細書において使用されるものとして、「材料」および「材料群」の用語は、これらの最も広い意味において、任意の合成物をいう。

【0070】

本明細書において使用されるものとして、「ポリペプチド」の用語は、これらの最も広い意味において、2つまたはそれ以上のアミノ酸を含む全ての分子または分子集合体をいう。こののような分子は、タンパク質、ペプチド、酵素、抗体、受容体、リボタンパク質、および糖タンパク質を含むが、これらに限定されない。

【0071】

本明細書において使用されるものとして、「抗原結合タンパク質」の用語は、免疫原(抗原)によって動物において誘起される反応、またはファージディスプレイ系において選択されるタンパク質、およびこののようなタンパク質もしくは糖タンパク質に由来するタンパク質(例えば、単鎖抗体、およびF(ab')2、Fab'、およびFab断片)をいう。抗体は、免疫原に、またはより詳細には、免疫原に含まれる1つまたは複数のエピトープに結合することが実証されている。天然の抗体は、少なくとも2つのポリペプチド軽鎖および少なくとも2つのポリペプチド重鎖を含む。ポリペプチド重鎖およびポリペプチド軽鎖のそれぞれは、ポリペプチド鎖のアミノ末端部分に、抗原と相互作用する結合ドメインを含む可変領域(すなわち、それぞれVHおよびVL)を含む。また、ポリペプチド重鎖およびポリペプチド軽鎖のそれぞれは、宿主組織に対する免疫グロブリンの結合または免疫系の種々の細胞に影響を及ぼす因子、食作用性の一部の細胞、および古典的な補体系の第1成分(C1q)を媒介するであろう、ポリペプチド鎖の定常領域(一般にカルボキシ末端部)を含む。軽鎖の定常領域は、「CL領域」といわれ、重鎖の定常領域は、「CH領域」といわれる。重鎖の定常領域は、CH1領域、CH2領域、およびCH3領域を含む。CH1とCH2領域の間の一部の重鎖は、ヒンジ領域(すなわち、「H領域」)と称する。細胞表面形態の抗体の重鎖の定常領域は、膜カルボキシ末端のスペーサー膜貫通領域(M1)および細胞質領域(M2)をさらに含む。抗体の分泌された形態は、一般にM1およびM2領域を欠いている。認識配列は、動物の循環血漿に由来しても、または特異的なインビトロ培養システムに由来してもよい(例えば、モノクローナル抗体、組換え抗体、並びに真核生物および原核生物の培養系もしくはファージディスプレイ系から収集したFab)。

【0072】

本明細書において使用されるものとして、「非特異的な結合」の用語は、表面上での関心対象の分析物(標的分子、細胞、寄生生物、ウイルス、細菌、粒子その他)であって、認識部分によって結合されない分析物を配置すること(固定化)をいう。

【0073】

本明細書において使用されるものとして、「分析物」の用語は、解析される任意の物質をいう。このような物質は、イオン、分子、アミノ酸、ポリペプチド、核酸、抗原、細菌、真菌、化合物、ウイルス、細胞、原核生物および真核生物、多細胞生物、抗体、細胞部分、並びに懸濁液中の粒状物質を含むことができるが、これらに限定されない。

【0074】

本明細書において使用されるものとして、「選択的結合」の用語は、特定の分子構造の存在に依存した様式で、1つの物質が別のものに対して結合することをいう(すなわち、特異的な結合)。例えば、受容体は、選択的にリガンド結合部位に相補的な化学構造を含むリガンドに結合する。これは、相互作用が任意であり、分子の構造上の適合性に基づかないことによる「非選択的な結合」とは対照的である。

【0075】

本明細書において使用されるものとして、「高次構造上の変化」の用語は、物質の分子構造の変化をいう。本用語は、单一の分子または分子集合体の構造の変化を含むことが企

10

20

30

40

40

50

図される（例えば、リガンドを結合することによる受容体の構造の変化）。

【0076】

本明細書において使用されるものとして、「病原体」の用語は、ウイルス、細菌、寄生生物（門原生動物、扁形動物、袋形動物、鉤頭虫類、および節足動物の範囲内の生物体を含むが、これらに限定されない）、真菌、およびブリオンを含む（しかし、これらに限定されない）疾患を引き起こす生物体、微生物、または因子をいう。

【0077】

本明細書において使用されるものとして、「細菌類」および「細菌」の用語は、原核生物界の全ての門の範囲内のものを含む全ての原核生物をいう。本用語は、マイコプラズマ、クラミジア、放線菌 (Actinomycetes)、ストレプトマイセス、およびリケッチャを含む細菌であるとみなされる全ての微生物を含むことが企図される。球菌、桿菌、スピロヘータ、スフェロプラスト、プロトプラストなどを含む全ての形態の細菌が、この定義の範囲内に含まれる。「グラム陰性」および「グラム陽性」は、当該技術分野において周知のグラム染色プロセスによって獲得される染色パターンをいう（例えば、FinegoldおよびMartin, Diagnostic Microbiology, 6th Ed. (1982), CV Mosby St. Louis, pp 13-15を参照されたい）。

【0078】

本明細書において使用されるものとして、「重合」の用語は、小さな分子の単量体の、反覆された単位からなるより大きな分子への変換を生じる任意のプロセスを含む。典型的には、重合は、互いに単量体の化学的架橋を含む。

【0079】

本明細書において使用されるものとして、「膜受容体」の用語は、その他の分子または物質と相互作用することができる膜成分をいう。このような成分は、タンパク質、脂質、炭水化物、およびこれらの組み合わせを含むことができるが、これらに限定されない。

【0080】

本明細書において使用されるものとして、「揮発性の有機化合物」または「VOC」の用語は、反応性（すなわち、迅速に蒸発し、爆発性、腐蝕性など）であり、典型的には、特定の濃度以上でヒトの健康または環境にとって危険である有機化合物をいう。VOCの例には、アルコール、ベンゼン、トルエン、クロロホルム、およびシクロヘキサンを含むが、これらに限定されない。

【0081】

本明細書において使用されるものとして、「酵素」の用語は、化学的および生物学的な反応を触媒する役割を担う分子または分子凝集体をいう。このような分子は、典型的にはタンパク質であるが、短いペプチド、RNA、DNA、リボザイム、抗体、並びにその他の分子、金属およびイオンも含むことができる。

【0082】

本明細書において使用されるものとして、「薬物」の用語は、疾患もしくは症状を診断する、治療する、または防止するために使用される物質をいう。薬物は、これらが曝露される生体、組織、細胞、またはインビトロ系の生理学を変化させることによって作用する。本用語は、抗菌薬、抗真菌薬、および抗ウイルス性の化合物を含む（しかし、これらに限定されない）抗微生物性を含むことが企図される。また、本用語は、天然に存在する化合物、合成物、および組換えDNA技術によって產生される化合物を含む抗生物質を含むことが企図される。

【0083】

本明細書において使用されるものとして、「炭水化物」の用語は、糖、デンプン、セルロース、キチン、グリコーゲン、および同様の構造のものを含む（しかし、これらに限定されない）分子の分類をいう。また、炭水化物は、糖脂質および糖タンパク質の成分として存在することができる。

【0084】

本明細書において使用されるものとして、「抗原」の用語は、少なくとも1つの抗体に

10

20

30

40

50

よって認識される任意の分子または分子群をいう。定義によれば、抗原は、少なくとも1つのエピトープ（すなわち、抗体によって認識することができる特異的な生化学単位）を含まなければならない。「免疫原」の用語は、抗体の産生を誘導する任意の分子、化合物、または凝集体をいう。定義によれば、免疫原は、少なくとも1つのエピトープ（すなわち、免疫応答を引き起こすことができる特異的な生化学単位）を含まなければならない。

【0085】

本明細書において使用されるものとして、「キレート化化合物」の用語は、閉じた環構造を完全なものにする配位結合から構成され、または含む、任意の化合物をいう。本化合物は、非金属イオンのうちの少なくとも2つに対する配位結合により付着された金属イオンと結合することができる。

10

【0086】

本明細書において使用されるものとして、「認識部分」の用語は、分子を認識することができる（すなわち、特異的に相互作用する）任意の分子、分子群、または分子複合体をいう。例えば、受容体のリガンド結合部位は、分子認識複合体であると考えられる。また、「認識部分」の用語は、特異的な標的分子および金属に結合する分子と結合することが知られている結合配列を含む（例えば、Raf1の結合配列は、Rasに特異的に結合する）。

【0087】

本明細書において使用されるものとして、「細胞の結合部分」の用語は、細胞に結合する任意の分子、分子群、または分子複合体をいう。細胞の結合部分の例は、RGDなどのインテグリン結合配列および細胞外マトリックスタンパク質において見出されるその他の結合配列を含むが、これらに限定されない。

20

【0088】

本明細書において使用されるものとして、「家庭での試験」および「看護時点での試験」の用語は、研究室環境外で行う試験をいう。このような試験は、屋内でまたは屋外で、例えば、個人の住宅、ビジネスの場、公共または個人の土地、乗り物の中、並びに患者のベッドサイドで行うことができる。

20

【0089】

本明細書において使用されるものとして、「ウイルス」の用語は、いくつかの例外もあるが、光学顕微鏡によって観察できず、独立した代謝がなく、および生きている宿主細胞内でのみ複製することが可能である微小な感染因子をいう。個々の粒子（すなわちウイルス粒子）は、核酸およびタンパク質のシェルまたは被覆からなり；また一部のビリオンは、膜を含む脂質を有する。「ウイルス」の用語は、動物、植物、ファージ、およびその他のウイルスが存在しないと複製ができないものを含むその他のウイルスを含む、全てのタイプのウイルスを含む。

30

【0090】

本明細書において使用されるものとして、「ナノ構造」の用語は、顕微鏡学的な構造、典型的にはナノメートルのスケールで測定されるものをいう。このような構造は、リポソーム、フィルム状、多層、網状、層状、らせん状、管状、柱様、および纖維様の形状、並びにこれらの組み合わせを含む（しかし、これらに限定されない）種々の3次元アセンブリを含む。このような構造は、一部の態様において、ロッドおよびコイルなどの凝集した形態の溶媒和した重合体として存在することができる。このような構造は、また、固体の表面上への金フィルムの物理的な沈着によって調製した無機材料、機械的に摩擦した表面上に固定されたタンパク質、機械的に摩擦した重合物質、マイクロおよびナノ研磨材料（ナノ噴射）、高圧水エッティングの使用によってその表面上に導入された重合体または金属の表面、および電子ビームもしくはその他のリソグラフィー・プロセスによって調製されたシリコーン鋳型を用いてトポグラフィーで成形されまたはプリントされた重合物質から形成することができる。また、外部から構造された異方性の表面は、サブミクロン～10mの大きさの粒子（使用される方法に応じて等尺性および/または非等尺性）を配置し、外部場（電場、磁場、ずり磁場、および/または流体の流れを含むが、これらに限定されない）の使用により粒子を整列させ、または部分的に整列させる。また、組織化された粒子

40

50

または整列された粒子の機械的な移動を使用して整列された表面を作製することも可能である（例えば、所望の形態を含む疎水性のスタンプで製作）。粒子は、表面上に沈着されたときに、上に横たわっている液晶内に含まれるメソゲンが整列されるように構成され、または整列される。これらの粒子は、細胞が表面上で増殖するときに、移動され、または再配向される。または、スタンプは、基体と接触させることにより基体へ移動される碎けやすい材料から作製することができる。このような伝達性材料の例は、木炭、チヨーク、石鹼石、グラファイト、軽石などの容易に断片化され、および移動される材料、並びに破壊層が材料内にデザインされるように調製された合成積層物を含むが、これらに限定されない。また、ナノ構造基体は、原子力顕微鏡観察、および走査トンネル効果顕微鏡観察を含む操作プローブ法、並びにX線リソグラフィー、マイクロ／ナノ研磨法、干渉光学リソグラフィー方法、並びに刷り込みおよびエンボシング（温・冷エンボシングを含む）を使用して製造することができる。同様に、整列は、初めに粒子が表面全体にランダムに配置され、粒子の選択的な除去によって整列パターンが導入されることにより、粒子で覆われた表面に導入することができる。

10

【0091】

「多層」の用語は、本明細書において使用されるものとして、2層以上の単相から構成される構造をいう。個々の単層は、化学的に互いに相互作用して（例えば、共有結合、イオン相互作用、ファンデルワールス相互作用、双極子結合、水素結合、疎水性または親水性のアセンブリ、および立体障害により）新たな性質（すなわち、単層単独のものとは異なる性質）を有するフィルムを作製してもよい。

20

【0092】

本明細書において使用されるものとして、「自己集合単量体」および「脂質単量体」の用語は、自発的に結合して分子集合体を形成する分子をいう。ある意味では、これは、結合して界面活性物質の分子集合体を形成する界面活性物質分子をいうことができる。「自己集合単量体」の用語は、単一の分子（例えば、単一脂質分子）および小さな分子集合体（例えば、重合脂質）を含み、これにより、個々の小さな分子集合体は、より大きな分子集合体へとさらに凝集することができる（例えば集合し、および重合する）。

20

【0093】

本明細書において使用されるものとして、「リガンド」の用語は、任意のイオン、分子、分子群、またはもう一つの実体に結合してより大きな複合体を形成するその他の物質をいう。リガンドの例は、ペプチド、炭水化物、核酸、抗体、または受容体に結合する任意の分子を含むが、これらに限定されない。

30

【0094】

本明細書において使用されるものとして、「有機マトリックス」および「生体マトリックス」の用語は、より大きなマルチ分子構造に構築される有機分子の収集をいう。このような構造は、フィルム、単層、および二重層を含むことができるが、これらに限定されない。本明細書において使用されるものとして、「有機単層」の用語は、炭素に基づいた分子の単層に含まれる薄いフィルムをいう。1つの態様において、このような単層は、極性分子に含まれることによって、疎水性の末端を全て単層の一方に整列させることができる。「単層集合体」の用語は、単層に含まれる構造をいう。「有機ポリマーマトリックス」の用語は、マトリックスの分子成分の一部または全てが重合されることによる有機マトリックスをいう。

40

【0095】

本明細書において使用されるものとして、「リンカー」または「スペーサー分子」の用語は、1つの実体をもう一つに結合する物質をいう。ある意味では、分子または分子群は、2つまたはそれ以上のその他の分子に共有結合で付着されるリンカーができる（例えば、リガンドを自己集合単量体に結合する）。

【0096】

本明細書において使用されるものとして、「結合」の用語は、結晶中における、分子中の原子間およびイオンと分子の間の結合をいう。「単結合」の用語は、2つの電子が結合

50

軌道を占めている結合をいう。分子記号中の原子間の単結合は、2つの原子の間に引かれた一本の線によって表される（例えば、C-C）。「二重結合」の用語は、2つの電子対を共有する結合をいう。二重結合は、単結合よりも強く、より反応性である。「三重結合」の用語は、3つの電子対を共有することをいう。本明細書において使用されるものとして、「エン-イン」の用語は、交互に二重結合および三重結合をいう。本明細書に使用されるものとして、「アミン結合」、「チオール結合」、および「アルデヒド結合」の用語は、それぞれ、アミン基（すなわち、炭化水素基によってその水素原子の1つまたは複数が置換されることにより、アンモニアに由来する化学基）、チオール基（すなわち、アルコールの硫黄類似体）、およびアルデヒド基（すなわち、もう一つの炭素原子に直接接続された化学基-CHO）と、もう一つの原子または分子との間で形成される任意の結合をいう。

10

【0097】

本明細書において使用されるものとして、「共有結合」の用語は、2つの電子を共有することにより、1つがそれぞれ原子によって共有される、2つの原子の結合をいう。

【0098】

本明細書において使用されるものとして、「スペクトル」の用語は、波長の順に配置される光エネルギーの分布をいう。

【0099】

本明細書において使用されるものとして、「可視スペクトル」の用語は、約360nm～約800nmまでの波長を含む光照射をいう。

20

【0100】

本明細書において使用されるものとして、「紫外線照射」の用語は、可視光のものよりも短い（すなわち、約360nm未満）が、X-線のものよりも長い（すなわち、約0.1nm以上）波長を有する放射に対する照射をいう。紫外線は、可視光よりも大きなエネルギーを備え、したがって、光化学反応を誘導する際により有効である。

【0101】

本明細書において使用されるものとして、「バッジ」の用語は、携帯型であり、分析物を検出する環境において個々に研究することによって運搬または携帯することができる、任意の装置をいう。

【0102】

本明細書において使用されるものとして、「生物学的な生物体」の用語は、任意の炭素に基づいた生命の形態をいう。

30

【0103】

本明細書において使用されるものとして、「インサイチュー」の用語は、天然の環境の状況内に存在し、または生じるプロセス、イベント、物体、もしくは情報をいう。

【0104】

本明細書において使用されるものとして、「試料」の用語は、最も広義に使用される。ある意味において、これは、生体高分子材料をいうことができる。もう一つの意味において、これは、任意の供与源から得られた検体または培養、並びに生体試料および環境試料を含むことが意味される。生体試料は、動物（ヒトを含む）から得られてもよく、液体（流涙のおよび唾液の分泌並びに尿中試料を含む）、固体、組織、細胞、および気体を含んでもよい。生体試料は、血漿、血清などの血液製剤を含む。また、生体試料は、研究室研究の仮定において得られた検体を含み、また培地中の細胞、細菌、真菌、寄生生物、および/または培地中のウイルス、並びに懸濁液中の粒状物質を含む。環境試料は、表面物質、土壤、水、結晶、および産業試料などの環境物質を含む。これらの例は、本発明に適用できる試料のタイプを限定するものとして解釈されない。

40

【0105】

本明細書において使用されるものとして、「液晶」の用語は、3次元結晶格子が存在しない性質の異方性によって特徴づけられ、一般に固体と等方性の液相の間に温度領域にある熱力学的に安定な相をいう。

【0106】

50

本明細書において使用されるものとして、「サーモトロピック液晶」は、温度の上昇により、メソゲンの固体物の融解から生じる液晶をいう。純物質および混合物は両方とも、サーモトロピック液晶を形成する。

【0107】

「リオトロピック」は、本明細書に使用されるものとして、溶媒中で配向性のおよび/または位置的に整列している相を形成する分子をいう。リオトロピック液晶は、両親媒性の分子（例えば、ナトリウム・ラウリン酸エステル、ホスファチジルエタノールアミン、レシチン）を使用して形成させることができる。溶媒は、水であることができる。

【0108】

本明細書において使用されるものとして、「不均一な表面」の用語は、勾配を横切るなどの、少なくとも2つの分離した面または方向に液晶を配向させる表面をいう。

【0109】

本明細書において使用されるものとして、「ネマチック（nematic）」は、分子の長軸が実質的に平行して残っているが、質量中心の位置は、ランダムに分配されている液晶をいう。ネマチック液晶は、表面の近くまで実質的に配向させることができる。

【0110】

「キラル・ネマチック」は、本明細書に使用されるものとして、メソゲンが光学活性である液晶をいう。ネマチックの場合のように、働く子が局所的に一定の状態に保持されている代わりに、働く子は、試料の全体にわたってらせん状の様式で回転する。キラルなネマチック結晶は、個々のメソゲンの旋光能に基づいて説明することができるものよりも高く強い光学活性を示す。光が、液晶に衝突する働く子のピッチと同等の波長であるときは、働く子は、回折格子の様に作用し、これに対するほとんどおよび時に全ての入射光を反射する。白色光が、このような材料に対して入射される場合、1色の光のみが反射され、これは円形に分極する。この現象は、選択反射として既知であり、キラルなネマチック結晶によって生じる虹色の原因となる。

【0111】

「スメクチック（smectic）」は、本明細書に使用されるものとして、配向性の整列に加えて、より優れた程度の位置的な整列の存在により、「ネマチック」とは区別される液晶をいい；分子は、これらがこれらの面および層の間で行うよりも多くの面および層においてより長期間を費やす。「極性のスメクチック」層は、メソゲンが永久双極子モーメントを有するときに生じる。スメクチック状態のA2相において、例えば、連続層は、抗強誘電体の整列を示し、層の間で交互に現れる永久双極子の方向を有する。分子が、長い分子軸に対して横の永久双極子モーメントを含む場合、キラルなスメクチック相は、強誘電性である。この相を利用する装置では、本質的に双安定であることができる。

【0112】

「減衰相（frustrated phase）」は、本明細書に使用されるものとして、キラル分子によって形成される相のもう一つのクラスをいう。これらの相は、キラルでないが、粒界のアレイによって相にねじれが導入される。立方格子の欠損（働く子が定義されない場合）は、複雑な、配向的に整列されたねじれた構造中に存在する。これらの欠損の間の距離は、数百ナノメートルであり、そしてこれらの相は、まさにX線を反射する結晶のように光を反射する。

【0113】

「ディスク様相（discotic phase）」は、細長い形状ではなく、ディスク形状である分子から形成される。通常、これらの分子は、芳香性のコアおよび6つの側方の置換基を有する。分子がキラルであるか、またはキラルなドーパントが、ディスク様液晶に添加されると、キラルなネマチックなディスク様相を形成することができる。

【0114】

本発明の一般的な記述

本発明は、分子生物学、細胞生物学、免疫学、腫瘍学、発生生物学、幹細胞の増殖および分化、一般的な研究室科学、および微生物学の分野に、並びに特に基体上の細胞、ポリ

10

20

30

40

50

ペプチドおよび酵素を含む細胞分泌源産物、微生物（ウイルス細菌、真菌、および寄生生物を含むが、これらに限定されない）、および粒状物質の存在を検出し、かつ定量するための、液晶アッセイ法およびその他のバイオフォトニックアッセイ法に基づいた方法および組成物に関する。アウトプットシグナルを細胞数と相關させる能力により、本発明の装置は、細胞接着、並びに細胞増殖、細胞死、および細胞分化のアッセイのために広く有用となる。さらに、細胞活性を有する因子（cytoactive agent）に応答して、並びに制御された条件下において、細胞の移動を定量することができる方法が記述される。細胞遊走を促進する化合物は、走化性（例えば、勾配に応答した定方向細胞遊走を刺激する化合物）またはケモキネシス（例えば、勾配ではないか、もしくは配向性に依存した細胞遊走を刺激する化合物）因子である。さらに、細胞遊走の阻害は、定量してもよい。接着は、細胞の機能性の変化の指標となることが想定される。実際に、接着は、細胞遊走の第1の必須の工程を表す。また、接着は、線維芽細胞および上皮細胞などの固着依存的な細胞種の生存およびその後の増殖に必要とされる。例えば、接着は、その後に血管外遊出に関する白血球の必須の変化であること、および創傷治癒の必須成分であることを実証する。

10

20

30

40

50

【0115】

増殖は、恒常性の維持において、正常な増殖および／または活力を失った細胞の置換の指標となることが想定される。増殖は、また、異常増殖の基本的な側面、並びに創傷治癒、個体発生、炎症、および免疫応答の必須成分である。接着、遊走、分化、および増殖は、可溶性因子（例えば、サイトカイン、ケモカイン、神経ペプチド、ニューロトロphins、ポリペプチド成長因子）によって、並びに細胞外マトリックス成分（例えば、コラーゲン、ラミニン、ビトロネクチン、フィブロネクチン）によって調整される基本的な細胞行動であり、環境中でその他の細胞およびこれらの生成物による影響を受ける。これらのプロセスがインビトロでどのように調整されるかを検査することにより、正常な生理的プロセスについての洞察がもたらされ、単離の際の因子の影響を解明する際に、および互いに組み合わせて、異常増殖などの疾患プロセスの精査が可能となる。

【0116】

本発明は、細胞増殖および細胞接着のアッセイ法と組み合わせて、細胞数を決定するための装置および方法を提供する。したがって、本発明は、接着、遊走、増殖、侵襲、死亡、分化、および収縮アッセイ法を含む（しかし、これらに限定されない）多くの細胞アッセイ法に対して単一のプラットフォームを提供する。したがって、本発明の装置および方法は、顕微鏡観察および血球計数器を使用する直接の細胞計数または自動化された細胞計数装置（例えば、コールターカウンタ）；細胞内酵素による基質の変換を利用する比色アッセイ法（例えば、MTTアッセイ法）；細胞の初期の生体染色後における色素（およびその後の定量）の抽出に基づく直接の比色アッセイ法；酵素変換に基づいた蛍光定量的なアッセイ法（例えば、細胞内エステラーゼのための蛍光定量的に変換された基質を提供するカルセインAM-分子プローブ）；DNA結合に基づく蛍光定量的なアッセイ法（例えば、ヘキスト色素）；増殖細胞の核抗原（Proliferating Cell Nuclear Antigen: PCNA）の検出などの細胞増殖の細胞内の相關指示薬の同定に基づく比色または蛍光定量的なアッセイ法；DNAのBRDU標識および顕微鏡観察による検査；トリチウムチミジンの組み込みに基づく放射測定のアッセイ法；並びにヨウ化プロピジウム標識を伴うフローサイトメトリーを含む方法を超えて、および補足する、異なる利点を提供する。

【0117】

したがって、一部の態様において、本発明は、任意の分析物の配置を想定すること（粒子、ウイルス、細菌、真菌、寄生生物、細胞、酵素を含むタンパク質）、整列された表面上へ、上部で配置されるこのような液晶は、下側基体の配向の影響にアクセスすることから防止される。したがって、分析物の存在は、非特異的な方法で明らかにされる。他の態様において、分析物の存在は、電場および／または磁場を整える影響によって妨害される（破壊される）と考えられる。本発明のさらに他の態様において、分析物の存在により表面の構造が変化して、液晶に対する表面の配向の影響が変更される。他の態様において、結合した分析物の空間的および配向的な整列は、分析物の存在によって液晶に整

列を導入するようなタイプのものである。

【0118】

本発明は、下側の基体の整列の変化を報告し、増幅するための液晶フィルムの使用をさらに想定する。任意の特定の機構に限定されないが、この現象は、乱れた基体上に沈着されたメソゲン層への整列の導入か、または逆に、整えられた基体上に沈着されたメソゲン層への乱れの導入の結果であると考えられる。基体の整列（または乱れ）は、基体上のナノ構造、微細構造、または分子の規則的な（または不規則な）発生によって作製されることが想定される。

【0119】

整列された（整えられた）表面は、金の斜方沈着を含む多種多様な技術を使用して作製することができる、重合体の表面の簡単な摩擦、または種々の表面に共有結合したタンパク質の摩擦による、重合体の微小成形（micromolding）、表面のマイクロ／ナノ研磨プロセシング、リソグラフィー法での製作（光学リソグラフィー、電子ビームリソグラフィー、およびX線リソグラフィーを含む）。さらに、LCは、異方性の様式で配向され、または組織化された粒子を支持する等方性の表面上で整えることができる。乱れた表面に対する整列または整えられた表面（異方性の様式で配向され、または組織化された粒子を支持する等方性の表面を含む）に対する乱れを知らせる任意の生物学的なイベントは、液晶の使用によって容易に検出される。特定の態様において、ナノ構造は、ポリペプチドおよびタンパク質、核酸、脂質、リン脂質、炭水化物、イオン、有機分子および無機分子などを含む（しかし、これらに限定されない）化学的部分である。特定のその他の態様において、ナノ構造は、フォトリソグラフィー、電子ビームリソグラフィー、微小成形、原子力顕微鏡観察および走査トンネル顕微鏡を含む走査プローブ法、フォトエッチング、化学的エッチング、マイクロコンタクト・プリンティング（microcontact printing）、化学的位置決定、機械的研磨、高圧水エッチングなどによって產生される基体表面の物理的な特徴である。

【0120】

好みの態様において、表面の整列は、重合体の表面または1つもしくは複数のタンパク質および／またはこれに共有結合で結合されたその他の生物学的部分（例えば、糖、特異的な受容体、または細胞受容体認識配列[例えば、RGD]）を有した表面を摩擦することによって作製される。その他の態様において、表面は、サブミクロン～10mにサイズ変更した粒子（粒子は、使用される方法に応じて異方性および／または等方性であることができる）の不純物を添加して、外部場（電場、磁場、すり磁場、および／または流体の流れを含むが、これらに限定されない）の使用によりこれらを整列され、または部分的に整列される。また、粒子は、トポグラフィーにより織られたスタンプから粒子をマイクロコンタクト・プリンティングによって、表面にデリバリーすることができる。スタンプのトポグラフィーは、表面にこれらが移動する前に粒子を整列させ、整えることができる。

【0121】

したがって、本発明は、磁気マイクロ・ナノ粒子の配向を、磁場または電流の制御された適用によって操作する（例えば整える）ことができることを想定する。一部の態様において、基体表面上のナノ構造は、物理的な方法の組み合わせによって作製される。

【0122】

本発明は、メソゲン層の局部的な整列（または、乱れ）の変化により、物理的に層の乱れを生じることを想定する。表面の整列の変化は、液晶の薄層の設置、並びに偏光子または特定の波長の光および光ダイオードまたは電荷結合素子（charge coupled device: CCD）の使用によって、容易に観察される。表面の整列の変化は、局在化させかつ事実上目立たなくするか、または一般化することができる。

【0123】

一部の態様において、乱れは、表面全体の細胞の遊走によって引き起こされる。その他の態様において、乱れは、表面上の細胞の接着、増殖、形態学的な変化、減少、および／または収縮によって引き起こされる。いくつかのこれらの態様において、細胞膜は、無処

10

20

20

30

40

50

理であるが、その他の態様において、細胞膜は可溶化される。一部の態様において、細胞機能（例えば、細胞の運動性、接着、増殖、アポトーシス）をアッセイする場合、表面を変化させる（例えば、付着する）細胞因子の分泌は、局部的な表面の整列を変化してもよい。一部の態様において、液晶膜は、細胞の接着、遊走、および収縮に関連した生体運動の伝達を非特異的に報告するために使用される。これらのアッセイ法は、結晶膜自体の整列の変化によって機能を果たすことが想定される。例えば、このような想定されるアッセイ材料は、その表面でリン脂質を自発的に吸着する液晶フィルムである。もう一つの態様において、エラストマーの液晶材料が使用される。さらにもう一つの態様において、重合体安定化液晶または重合体分散液晶が使用される。

【0124】

10

本発明の好ましい態様は、細胞（例えば、癌細胞）に対する走化性因子およびケモキネシス因子、並びに細胞遊走の阻害剤の効果を定量するためのアッセイ法に向けられる。本発明は、細胞の機能および運動性に対する癌形成および転移に関与することが疑われる薬剤の効果を定量するためのアッセイ法を提供することであるが、これらに限定されない。

【0125】

多くの癌細胞および非悪性細胞のための運動性因子は、成長因子であることを最初に記述した。運動性因子により、静止した接着細胞を、膜ラフリング、ラメラ、糸状仮足、および仮足の出現によって特徴付けられる運動性の遷移状態に変える。以下のものを含むいくつかの運動性因子が癌細胞について記述されている：（1）自己分泌性の様式で転移性の黒色腫細胞のケモキネシスおよび走化性を刺激する自己分泌性の運動性因子（autocrine motility factor: AMF）；（2）オートタキシン（autotaxin）；（3）散乱因子（scatter factor）/肝細胞成長因子（例えば、c-met発癌遺伝子産物のチロシンキナーゼ受容体ファミリーのメンバーのリガンド）；（4）TGF- α およびEGF；（5）インスリン様成長因子；並びに（6）フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスの成分；（7）PDGF；（8）LPA；（9）アンフィレギュリン（amphiregulin）；並びに（10）ケモカイン。これらの因子は、ケモキネシスおよび走化性を刺激する。本発明は、癌細胞（および非癌細胞）の運動性に対するこれらの運動性因子の1つまたは複数の効果を検出し、かつ定量するためのアッセイ法を特に想定する。

20

【0126】

30

転移性の癌細胞は、細胞の接着、変形能、運動性、および転移を生じるための受容体認識のプロセスに依存すると考えられるが、これらのプロセスはいずれも、転移性の癌細胞に独特のものではない。これらのプロセスは、多くの非悪性の細胞タイプおよび細胞プロセスにおいても観察された（例えば、栄養膜移植、乳腺退行、胚形態形成、造血幹細胞、および組織再造形）。

【0127】

40

したがって、本発明の特定の態様は、受胎能および受胎、幹細胞分化および増殖、遺伝子治療および細胞ターゲティング、免疫学、並びに異常な細胞運動性または遊走によって特徴付けられる疾患に関する細胞タイプに対する、潜在的に細胞活性を有する因子（例えば、分裂促進性の、増殖抑制性の、走化性の、およびケモキネシスの因子、細胞遊走の阻害剤、並びに細胞の接着、死滅、または分化を促進または阻害する因子）の効果を定量するためのアッセイ法に向けられる。特定のその他の態様では、細菌、古細菌、および真核生物（eukarya）に対する細胞活性な因子の効果を定量するためのアッセイ法を提供する。特定の態様において、アッセイされる細胞活性な因子は、1つまたは複数の細胞タイプ（例えば、ポジティブな走化性因子）の誘引剤である。特定のその他の態様において、因子は、細胞遊走に対する刺激剤であるが、その効果に方向性はない（例えばケモキネシス因子）。特定のその他の態様において、細胞活性な因子は、1つまたは複数の細胞種の阻害剤または忌避剤である。一部の態様において、および特に細菌および古細菌細胞を使用するアッセイに向けた態様において、潜在的な走性薬剤は、走光性、走気性、または走濃性の因子などを含むが、これらに限定されない。

【0128】

50

また、本発明は、細胞の代謝状態を決定するために、細胞分泌性産物を検出するために、細胞の細胞骨格の構造を解析するために、およびマトリックスへの細胞侵襲を解析し、測定するために、液晶を使用するための装置および方法を提供する。特に好ましい態様において、本発明は、液晶成分を含むマトリックスおよび液晶を配向させるマトリックスを提供する。その他の好ましい態様において、基体自体が液晶である。これらの態様のそれぞれを更に詳細に以下に記述してある。典型的なアッセイ装置の多くが液晶ディスプレイ方法論による使用に限定されないことが認識される。特に、装置および方法の多くは、蛍光定量法、濃度測定、比色、および放射測定を含む（しかし、これらに限定されない）検出方法で有用である。

【0129】

10

発明の詳細な説明

本発明は、分子生物学、細胞生物学、免疫学、腫瘍学、幹細胞分化、一般的な研究室科学、および微生物学の分野に、並びに特に基体上の細胞の存在を検出し、かつ定量するための、酵素を含む細胞分泌産物を検出し、かつ定量し、並びに接着、分化、死滅、増殖、および遊走などの基本的な細胞挙動を定量するための液晶アッセイ法およびその他のバイオフォトニカリー・ベース・アッセイ法に基づいた方法および組成物に関する。細胞アッセイは、制御された条件下で、並びに細胞活性な薬剤に対する細胞反応性の評価のために行うことができる。液晶に基づいたアッセイ系（LCアッセイ法）は、国際公開公報第99/63329号（これは、参照によって本明細書に援用される）、およびGuptaら、*Science* 279: 2077-2080 (1998) に記述されている。また、Seung-Ryeol Kim, Rahul R. Shah, および Nicholas L. Abbott; *Orientations of Liquid Crystals on Mechanically Rubbed Film of Bovine Serum Albumin: A Possible Substrate for Biomolecular Assays Based on Liquid Crystals, Analytical Chemistry*; 2000; 72 (19); 4646-4653; Justin J. SkaifeおよびNicholas L. Abbott; *Quantitative Interpretation of the Optical Textures of Liquid Crystals Caused by Specific Binding of Immunoglobulins to Surface-Bound Antigens, Langmuir*; 2000; 16 (7); 3529-3536; Vinay K. GuptaおよびNicholas L. Abbott; *Using Droplets of Nematic Liquid Crystal To Probe the Microscopic and Mesoscopic Structure of Organic Surfaces, Langmuir*; 1999; 15 (21); 7213-7223. R. R. ShahおよびN. L. Abbott, *Principles for measurement of chemical exposure based on recognition-driven anchoring transitions in liquid crystals, Science*; 2001; 293 (5533): 1296-99を参照されたい。

20

30

40

【0130】

本発明のLCアッセイ法は、細胞の存在、空間分布、および状態を検出するために、並びに走化性もしくは細胞の接着および増殖を誘導する因子として作用するか、または環境の刺激に応答して細胞によって分泌される多種多様な分子（例えば、イオン、タンパク質、およびポリペプチド、脂質、多糖体、核酸、低分子量化合物などの化学的および生物学的材料）を検出し、定量するために、有用である。また、LCアッセイ法は、表面受容体の発現または成長因子、ケモカイン、サイトカイン、酵素、および細胞外マトリックスの成分などの分子の分泌に関して、個々の細胞表面上の領域差を研究するために使用されてもよい。また、本発明のLCアッセイ法は、基体に付着した細胞を検出し、定量するために（細胞接着、細胞分化、および細胞増殖のアッセイに直接適用できる）、並びに種々の細胞タイプ（例えば、癌細胞、リンパ球、細菌、古細菌など）の遊走をアッセイするために有用である。これにより、基本的な細胞のプロセスを促進し、効果を有さず、または阻害するであろう細胞活性な化合物の広範なアレイの影響の定量分析が可能となる。

【0131】

50

また、本アッセイ法は、疑わしい細胞活性因子との接触により細胞（または、細胞の特定のタイプ）の運動性の微妙な変化を識別するために使用することができる。実際に、本アッセイ法は、真核細胞、原核細胞、ウイルス細菌、真菌、ビーズ、および懸濁液の粒子を含む（しかし、これらに限定されない）種々の生物学的および非生物学的な実体を検出および定量するために使用することができる。本発明のLCアッセイ法は、これらの表面の妨

害を直接検出するために使用され、好ましい態様において、アッセイされる材料は、標識、蛍光色素、色のついた基体、または二次抗体を必要としない。

【0132】

さらに、本発明のLCアッセイ法は、1つまたは複数のタイプの標的細胞および適切な対照による1つまたは複数の細胞活性因子の効果を同時に定量することができるマルチアレイ形式に容易に適応できる。また、マルチアレイ形式に対する適応力は、本発明のLCアッセイ法を創薬などのハイスループットスクリーニングに適用する際に有用となる。また、本発明のLCアッセイ法は、液晶が数秒で表面の変化に応答して再適合するので、迅速である。

【0133】

本発明の一部の態様において、LCアッセイ法は、認識部分が好ましくは基体上の有機層を経て付着された基体を含む（例えば、米国特許第6,284,197号を参照し、これは参照として本明細書に組み入れられる）。好ましい態様において、基体または有機層は、一様に液晶を配向させるために役立つ。一部の好ましい態様において、基体表面は、摩擦、マイクロ／ナノ噴射（すなわち、粗度を作製するためにサブミクロン未満の粒子で表面を摩耗）、高圧水エッティング、または金属の斜方沈着によって調製される。一部の態様において、基体は、タンパク質コーティング表面から成る。一部の態様において、基体は、均一な、同質の、または平坦な面を提供するが、その他の態様において、表面は、不均一であり、および／またはポグラフィーな特色を含む。特に好ましい一部の態様において、基体は、定量することができるようパターン化される。

【0134】

整えられたナノ構造の異方性表面には、これらの表面上に配置された液晶フィルムに整列（例えば、アライン）を導入する。この基体の整列の影響は、基体のトポグラフィーな特色的寸法が標的分子のものにマッチしている表面上に固定された受容体に対する標的分子の特異的な結合によって除去することができる。細胞、微生物（例えば、細菌、ウイルス、真菌、寄生虫）、および粒状物質の検出および定量のための本明細書において想定されるもう一つの方法は、細胞、微生物、粒状物質、または非特異的もしくは特異的に分泌されるかまたは沈着されたタンパク質、またはその表面上のその他マトリックスの配置によって、下にあるナノ構造基体の整列の影響へのアクセスを単に遮断することである。

【0135】

したがって、一部の態様において、非特異的な様式で、細胞、微生物、および粒状物質の検出および定量を容易にするアッセイ基体が提供される。好ましくは、これらのアッセイ基体は、液晶を配向させる少なくとも1つのアッセイ領域を含む。好ましい態様において、液晶を配向させるアッセイ領域は、表面を含む。上記の通りに、表面は、液晶を配向させる内因性の特色（例えば、異方性の構造）を有してもよく、または表面は、これと共に液晶を配向させる粒子またはその他の材料（すなわち、外因性の配向材料）と組み合わせてもよい。これらの外因性の配向材料は、液晶を直接整列させてもよく、または磁場、電場、または偏光などの外部からの力の適用によって整列させてもよい。したがって、本発明は、表面を提供する任意の特定の方法または液晶を配向させるその他の構造に限定されない。例えば、一部の態様において、ナノロッド（nanorods）は、電場、磁場、および表面全体の流体の流れによって例示される原動力（しかし、これらに限定されない）を使用して表面上に沈着され、整列される。

【0136】

一部の好ましい態様において、本発明のアッセイ法は、試料である粒状物質の量、例えば、試料中のウイルス粒子の量を定量するために使用してもよい。現在、ウイルスは、通常バイオアッセイによって定量される（例えば、LD50、TCID50、またはブラーク滴定）。これらは、電子顕微鏡法を必要とするので、粒子数測定が行われることが多い。本発明のアッセイ法は、電場の拡散を介してウイルス粒子を基体表面に適用して、液晶で基体をおおうことによって、試料中のウイルス粒子を定量するために使用されてもよい。液晶の乱れは、配向された表面上の粒子数に関連がある。

10

20

30

40

50

【0137】

一部の好ましい態様において、関心対象の特定の細胞種がLC基体の表面全体に沈着され、付着し、および／または遊走するときに、液晶フィルムと接触して組織分布的な特色が、変化して、したがってLCフィルム上を覆っているアラインメントが変化することが想定される。遊走する細胞の場合、局部的な整列は、等方的に配向していない整った表面上をこれが通過することによって乱されるであろうし、またはランダムに整った表面に局所的に配向を導入してもよい。

【0138】

好ましい態様において、走化性因子の濃度およびLCアッセイ表面に接触される細胞数は、明確な細胞の遊走経路が観察可能であるように調節される。本発明によれば、配向の乱れは、偏光によって見ること、液晶の配向を変化させるために必要な限界電界を測定すること、および二色性の薬剤の存在下で見ることを含む、種々の方法によって検出することができる。

【0139】

その他の好ましい態様において、1つまたは複数の化学剤および細胞種を乱された表面の表面上に接触させ（例えば、整列させ）、その結果その後の細胞の接着および遊走により、不連続な運動経路に沿って予め乱れた液晶の一様な配向を生じる。整えられた液晶は、偏光フィルターを使用して、および／または特異的な波長もしくは光の波長を組み合わせて使用して見ることができる。一部の態様において、表面の配向の変化は、局在化され、事実上目立たない。その他の態様において、表面の配向の変化は、一般化される。

【0140】

したがって、本発明は、定量的LCアッセイ法を含むLCアッセイ法のための改善された基体および装置を提供する。簡便性のために、本発明の記述は、以下の説に分けてある：I. 基体；II. 有機層；III. 認識部分；IV. メソゲン層；V. パターン化された液晶；VI. 解析装置；VII. 細胞アッセイ法、およびVIII. 酵素電気泳動アッセイ法。

【0141】

I. 基体

本発明の実施に有用である基体は、任意の物理化学的に安定な材料で実際に作製することができる。好ましい態様において、基体材料は、メソゲン層の成分に対して反応しない。基体は、強固でもまたは柔軟であることもでき、光学的に透明でもまたは光学的に不透明であることもできる。基体は、絶縁体、導体、または半導体であることができる。さらに、基体は、実質的に液体、蒸気、および／または気体に不浸透性であることができ、または代わりに、基体は、これらのクラスの材料の1つまたは複数に浸透することができる。基体材料の例は、無機結晶、無機ガラス、無機酸化物、金属、有機ポリマー、およびこれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【0142】

A. 無機結晶およびガラス

本発明の一部の態様において、無機結晶および無機ガラスは、基体材料（例えば、LiF、NaF、NaCl、KBr、KI、CaF₂、MgF₂、HgF₂、BN、AsS₃、ZnS、Si₃N₄など）として利用される。結晶およびガラスは、当該技術分野の標準的な技術によって調製することができる（例えば、Goodman, C. H. L., *Crystal Growth Theory and Techniques*, Plenum Press, New York 1974を参照されたい）。または、結晶は、商業的に購入することができる（例えば、Fischer Scientific）。結晶は、基体の一成分であることができ、またはこれらは、1つまたは複数のさらなる基体成分で被覆することができる。したがって、例えば1つまたは複数の金属フィルムまたは金属フィルムおよび有機ポリマーで被覆した結晶を利用することも、本発明の範囲内である。さらに、結晶は、異なる材料、または同じ材料の異なる物理的な形態（例えば、ガラス）でできている基体のもう別の部分に接触する基体の一部の構成することができる。無機結晶および／またはガラスを利用するその他の有用な基体配置も、当業者にとって明らかであろう。

【0143】

10

20

30

40

50

B. 無機酸化物

本発明のその他の態様において、無機酸化物は、基体として利用される。本発明において有用な無機酸化物は、例えば、 Cs_2O 、 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 、 TiO_2 、 ZrO_2 、 CeO_2 、 Y_2O_3 、 Cr_2O_3 、 Fe_2O_3 、 NiO 、 ZnO 、 Al_2O_3 、 SiO_2 （ガラス）、石英、 In_2O_3 、 SnO_2 、 PbO_2 などを含む。無機酸化物は、フィルム、被支持粉末、ガラス、結晶などの種々の物理的な形態で利用することができる。基体は、複数の単一の無機酸化物または無機酸化物の複合体から成ることができる。例えば、無機酸化物の複合体は、層構造（すなわち、第1の酸化物上に沈着された第2の酸化物）を有することができ、または2つまたはそれ以上の酸化物は、隣接する非層構造で配置することができる。加えて、1つまたは複数の酸化物を種々の大きさの粒子として混合することができ、ガラスまたは金属シートなどの支持体上に沈着することができる。さらに、1つまたは複数の無機酸化物層を2枚のその他の基体層の間に介在させることができる（例えば、金属酸化物-金属、金属酸化物-結晶）。

10

【0144】

本好ましい態様において、基体は、液体および気体に不浸透性である強固な構造である。本態様において、基体は、金などの金属が蒸着によって層にされたガラス板から成る。なおさらなる好ましい態様において、基体は、チタンなどの第1の金属層が層にされたガラスプレート（ SiO_2 ）である。次いで、金などの第2の金属の層が第1の金属層上部に層にされる。

20

【0145】

C. 金属

本発明のなおさらなる態様において、金属は、基体として利用される。金属は、結晶、シート、または粉末として使用することができる。金属は、蒸着、スパッタリング、無電解析出、電解析出、および金属ナノ粒子を含む金属の予め形成された粒子の吸着または沈着を含む（しかし、これらに限定されない）当業者に既知の任意の方法によって裏張りに沈着させることができる。

30

【0146】

メソゲン層に対して化学的に不活性である任意の金属は、本発明の基体として有用である。また、メソゲン層に対して反応性または相互作用的な金属も、本発明において有用である。目下のところ基体として好ましい金属は、金、銀、プラチナ、パラジウム、ニッケル、および銅を含むが、これらに限定されない。一つの態様において、1つ以上の金属が使用される。1つ以上の金属は、合金として存在することができ、またはこれらは、層をなした「サンドイッチ」構造を形成させることができ、またはこれらは、側方にお互いに隣接させることができる。好ましい態様において、基体に使用される金属は、金である。特に好ましい態様において、使用される金属は、チタン上に層にされた金である。

30

【0147】

金属層は、液体、溶液、蒸気、および気体などの材料に浸透性または不浸透性であることができる。

40

【0148】

D. 有機ポリマー

本発明のさらに他の態様において、有機ポリマーが、基体材料として利用される。本発明の基体として有用な有機ポリマーは、気体、液体、および溶液中の分子に浸透する重合体を含む。その他の有用な重合体は、これらと同じ分類の化合物の1つまたは複数に不浸透性であるものである。

50

【0149】

有用な基体を形成する有機ポリマーは、例えば、ポリアルケン類（例えば、ポリエチレン、ポリイソブチレン、ポリブタジエン）、ポリアクリル類（例えば、ポリアクリラート、ポリメチルメタクリラート、ポリシアノアクリラート）、ポリビニル類（例えば、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセテート、ポリビニルブチラール、塩化ビニル）、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリウレタン、ポリアミド、ポリイミド、ポリスルホン、ポリシロキサン、ポリ複素環、セルロース誘導体（例えば、メチルセルロ

ース、酢酸セルロース、ニトロセルロース)、ポリシラン誘導体、フッ素化重合体、エポキシ、ポリエーテル、およびフェノール樹脂を含む (Cognard, J. ALIGNMENT OF NEMATIC LIQUID CRYSTALS AND THEIR MIXTURES, in Mol. Cryst. Liq. Cryst. 1: 1-74 (1982) を参照されたい)。現在、好適な有機ポリマーは、ポリジメチルシロキサン、ポリエチレン、ポリアクリロニトリル、セルロース材料、ポリカーボネート、およびポリビニルビリジニウムを含む。

【0150】

好みの本態様において、基体は、浸透性であり、かつ高分子膜または液体、蒸気、および/または気体に浸透するその他の材料に沈着されている金またはチタンを覆った金の層からなる。液体および気体は、純粋な化合物(例えば、クロロホルム、一酸化炭素)であることができ、またはこれらは、その他の分子(例えば、水性タンパク質溶液、空気中の除草剤、小有機分子のアルコール溶液)中に分散された化合物であることができる。有用な浸透膜は、柔軟なセルロース材料(例えば、再生セルロース透析膜)、強固なセルロース誘導体材料(例えば、セルロースエステル透析膜)、強固なポリフッ化ビニリデン膜、ポリジメチルシロキサン、およびトラック・エッティングされたポリカーボネート膜を含むが、これらに限定されない。

【0151】

さらに好みの態様において、浸透膜上の金の層は、それ自体が浸透性である。なおさらなる好みの態様において、浸透性の金の層は、約70オングストロームまたはそれ以下の厚さを有する。

【0152】

基体の透過性が考慮されず、また金属フィルム層が使用される態様において、フィルムは、特定の適用のために必要な程度の厚さであることができる。例えば、フィルムが電極として使用される場合、フィルムは、フィルムが光に対して透明または準透明のために必要とされる態様よりも厚くすることができる。

【0153】

したがって、好みの態様において、フィルムは、約0.01ナノメートル～約1マイクロメートルの厚さである。さらに好みの態様において、フィルムは、約5ナノメートル～約100ナノメートルの厚さである。さらに好みの態様において、フィルムは、約10ナノメートル～約50ナノメートルの厚さである。

【0154】

E. 基体表面

基体の表面の性質は、表面に結合されるメソゲン層のアンカリングに対して重要な効果を有することが想定される。表面は、機械的および/または化学的な技術の使用によって設計することができる。上記に列挙された基体の各々の表面は、実質的に滑らか(平面)であることができる。または、表面は、研磨、エッティング、溝付け、伸展、応力を加えること、衝撃を与えること、ナノ噴射、斜方沈着、または当業者に既知のその他の同様の技術によって粗くすること、またはパターン化することができる。さらに、整えられた表面は、平面上に沈着されるナノ-マイクロのサイズにした粒子の沈着(装飾)によって作製することができる。これらの粒子は、ナノスタンパーまたは「ネガティブな」ナノスタンパー(図1Aおよび1Bを参照されたい)を使用して整えられたアレイの表面上に配置されてもよく、またはランダムなアレイに配置して、その後に電場、磁場、および流体の流れ(しかし、これらに限定されない)によって例示される原動力を使用して整えられてもよい。特に関連があるのは、メソゲン化合物と接触している表面の質感である。

【0155】

したがって、1つの好みの態様において、基体は、ガラスまたは有機ポリマーであり、表面は、摩擦によって調製された。摩擦は、実質的に組織、紙、布地、ブラシ、研磨ペーストなどを含む任意の材料を使用して達成することができる。好みの態様において、摩擦は、ダイアモンド研磨ペーストを使用して達成される。もう一つの好みの態様において、メソゲン化合物に接触する基体面は、蒸着によって斜方沈着された金属層である。

10

20

30

40

50

さらに好ましい態様において、金属層は、金の層である。

【0156】

本発明のその他の態様において、異方性の表面は、ナノメートルスケール・ビーズにより、定義された入射角度（例えば、約5~85度、好ましくは約45度）で、基体をナノ噴射（例えば、1~200nm、好ましくは50~100nm）することによって調製される。ナノ噴射された表面を、表面上に金を斜めに沈着することなどによって修飾として利用することができ、または修飾することができる。

【0157】

なおさらなる態様において、本発明の装置のメソゲン表面は、適切な基体を伸ばして製造される。例えば、ポリスチレンなどの重合体基体を基体のガラス転移温度以上の温度に加熱すること、引張力を適用すること、および力を除去する前にガラス転移温度以下の温度に冷却することによって伸ばすことができる。

10

【0158】

一部の態様において、本発明は、種々の装置および方法に使用される不均一な特色を有する基体を提供する。一部の態様において、不均一性（heterogeneity）は、表面全体の形態の均一または不均一性の勾配である。例えば、金は、入射角を変化させることで基体上へ沈着させることができる。標準に近い入射角で沈着された金を含む領域では、液晶の非均一なアンカリングを生じると考えられるが、入射角が10度よりも大きかった領域では、一様に結晶が配向させると考えられる。または、不均一性は、基体全体に一様に分布された2つまたはそれ以上の異なるスケールのトポグラフィーの存在であってもよい。このような基体は、分析物の検出のダイナミックレンジを増大するために、または試料内の異なる大きさの分析物の存在を検出するために有用であることが想定される。

20

【0159】

また、基体は、フォトリソグラフィー（Kleinfieldら、J. Neurosci. 8: 4098-120 (1998)）、フォトエッチング、化学的エッチング、マイクロコンタクト・プリンティング（Kumarら、Langmivir 10: 1498-511 (1994)）、化学的スポットティングなどの技術を使用してパターン化することができる。

30

【0160】

基体上のパターンの大きさおよび複雑度は、利用される技術の解像度およびパターンが意図する目的によってのみ制限される。例えば、マイクロコンタクト・プリンティングを使用すると、200nm程度の小さな特徴が基体上に階層化された（Xia, Y.; Whitesides, G., J. Am. Chem. Soc. 117: 3274-75 (1995) を参照されたい）。同様に、フォトリソグラフィーを使用すると、1μm程度の小さな特徴を有するパターンが作製された（Hickmanら、J. Vac. Sci. Technol. 12: 607-16 (1994) を参照されたい）。本発明に有用なパターンは、ウェル、筐体、分配、壁、入口、出口、チャネル、トラフ、回折格子などの特徴を含むものを含む。

30

【0161】

好ましい本態様において、パターンングは、複数の隣接するウェルであって、各々のウェルは、隆起壁または隔壁によってもう一方から分離されており、かつウェルが液体により（fluidically）に連通しないウェルを有する基体を作製するために使用される。したがって、ウェルに配置された分析物（例えば、潜在的な走化性因子）、またはその他の物質は、実質的にそのウェルに閉じこめられたままである。もう一つの好ましい態様において、パターンングにより、装置を通るチャネルを作製することができ、これによって薬剤が装置に入り、および/または出ることができる。

40

【0162】

パターンは、基体上へ直接プリントすることができ、または代わりに、「リフトオフ（lift off）」技術を利用することができる。リフトオフ技術では、パターン化されたレジストを基体上に敷設し、有機層をレジストによって覆われていないこれらの領域に敷設し、その後にレジストを除去する。本発明の基体に使用するための適切なレジストは、当業者に既知である（例えば、Kleinfieldら、J. Neurosci. 8: 4098-120 (1998) を参照さ

50

れたい）。フォトレジストの除去に続き、第1の有機層とは異なる構造を有する第2の有機層を、最初にレジストによって覆った領域上の基体に結合させることができる。この技術を用いて、異なる化学的特徴の領域を有するパターンを有する基体を作製することができる。したがって、例えば、隣接するウェルのアレイを有するパターンは、パターン成分の疎水性／親水性、電荷およびその他の化学的特徴を変化させて作製することができる。一つの態様において、親水性の化合物は、疎水性の材料を使用して壁をパターン化することによって個々のウェルに閉じこめることができる。同様に、正または負に充電された化合物を、閉じこめられた化合物と同様の電荷を有する化合物でできている壁を有するウェルに閉じこめることができる。同様の基体配置は、基体上に直接所望の特徴を有する層をマイクロプリンティングすることでアクセスできる (Mrkish, M.; Whitesides, G.M., Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 25: 55-78 (1996) を参照されたい)。 10

【0163】

さらにもう一つの好ましい態様において、パターン化された基体は、液晶のアンカリング・アラインメントを制御する。特に好ましい態様において、基体は、自己構築される単層を形成する有機化合物でパターン化される。本態様において、有機層は、被支持メソゲン層の方位の配向および／または極性の配向を制御する。 20

【0164】

なおさらなる好ましい態様において、本発明は、粒子（好ましくは、その上に分布されたナノ～ミクロの大きさの粒子）を有する表面を提供する。このような粒子は、液晶を配向させる際の、および配置に応じて、表面に関連した特色を配向させるこ基礎をなすマスキングの際の両者における使用を見いだすことが想定される。一部の態様において、表面上にマイクロ～ナノ・サイズの粒子を沈着させるスタンピング装置が利用される（例えば、図1Aを参照されたい）。基体との機械的な接触によって基体へ移動される比較的碎けやすい材料からスタンプを作製することができる。このような移動性材料の例は、木炭、チヨーク、石鹼石、グラファイト、軽石、およびその他の容易に断片化され、かつ転写される材料を含むが、これらに限定されない。これは、破壊層が材料にデザインされるように調製された合成積層物を含むことができる。 20

【0165】

また、組織化され、または整列された粒子の機械的な移動（「ポジティブな移動スタンプ (positive transfer stamp)」）を使用して、整列された表面を作製することができる。このような装置は、図1Aと同様のデザインを有するであろうが、碎けやすい材料で構成された配列された稜の代わりに、これらは、粒子を拾いあげて、これらを試験表面上に整えられたアレイに沈着するために適した非消耗材料で構成される。例えば、トポグラフィーを含む疎水性のスタンプにより製造する。粒子は、トポグラフィーに沈着されたときに、細胞が培養される基体に移動されたときに液晶が整列されるように、構成され、または整列される。これらの粒子は、細胞が表面に沈着され、付着され、培養され、遊走されるときに、隠し、置換し、または再整列させることができる。移動スタンプの一部の好ましい態様において、粒子を収集するために、電場または磁場がスタンプ全体に適用される。さらなる好ましい態様において、適用される場は、整えられたアレイの試験基体に対する粒子の移動に影響を与えるように変化される。整えられた粒子のアレイは、その後に試験基体の表面上に配置されたLCフィルムのメソゲンを整列させる。本発明の一部の態様において、一旦基体に移動された粒子の配置により、取扱いおよび基体に対する化学的または物理的な付着による意図されない破壊に耐性になる。 40

【0166】

図2Aは、ネガティブなナノスタンピング装置の使用を表す。本態様において、ナノ～ミクロの大きさの粒子材料は、基体の試験表面全体にランダムに分布され、材料を整列された様式で除去し、異方性にパターン化された表面のままにして、LCフィルムにメソゲンを整列させるという「ネガティブなスタンピング」方法を使用して、異方性の整列を作製する。 50

【0167】

一部の態様において、基体表面は、基体表面全体に均一に分布された複数の磁性粒子（例えば、金属のナノロッド）をさらに含む。いくつかのこれらの態様において、磁性粒子は、基体表面上に加塩される。本発明は、制御された磁場または電流の適用によって、磁気ナノ粒子の配向を操作する（例えば、整列させる）ことができる想定すること。

【0168】

一部の態様において、平面表面上の細胞、微生物、または粒子は、電場、磁場、および/または最初の沈着（ナノまたはマイクロスタンパー装置を使用して）で整えられるか、または電場、磁場の使用、もしくは流体の流れの使用による沈着に引き続いて整えられる表面上に沈着されたナノおよび/またはマイクロ粒子の配置によって例示される方法（しかし、これらに限定されない）によって整列を液晶フィルムに導入することによって視覚化される。内因性の異方性のナノ構造基体を使用すること、または表面を飾っている異方性の整えられたナノおよび/またはマイクロ粒子を使用することなく、電場もしくは磁場で、または流体の流れによってLCフィルムを整える場合、これらの方によってLCフィルムに導入される整列は、細胞、微生物、および/または粒状物質、並びに特に固定された標的分子の存在下で、局所的に乱される。乱れの程度は、表面に材料（例えば、細胞、微生物、粒状物質）が存在することによって表される乱れのエレメントの存在にもかかわらず、一様に整えられたLCフィルムを維持するために必要とされる整列原動力（例えば電場）の大きさによって定量することができる。

【0169】

さらに、該原動力の適用の中止により、表面上に存在する細胞、微生物、および/または粒状物質は、これらの大きさおよび密度に比例してLC層に乱れを導入することが想定される。一部の態様において、分析物（例えば、粒状物質、細胞、または微生物）は、受動的に表面上へ配置され、表面と非特異的に結合するが；他の態様において、分析物は、平面（例えば、受容体に対する特異的な結合によって固定された標的分子）に特異的に固定される。この原理は、図2A、2B、および図3に図示してある。図2Aにおいて、メソゲンは、その標的分析物（300）を有する平面（100）上に固定された結合配列周辺にランダムに配置されていることが分かる。また、平面上で検出されるエレメントは、粒子、細胞、または微生物（細菌、真菌、ウイルス、寄生虫）であることができる。検出されるこれらのエレメントは、示したように表面に特異的に結合されていてもよく、または単に表面上で静止しているか、もしくは非特異的に（すなわち、少しも特異的な結合配列が存在しない）表面に結合させることができる。検出されるエレメントを有し、または有さない平面上において、メソゲンはランダムな分布（200）を有する。

【0170】

図2Bを参照し、電場（400）は、液晶中のメソゲンを整列させるために使用することができる原動力の例として使用されているが、液晶メソゲンを整列させるその他の原動力（磁場および流体の流れによって例証されるが、これらに限定されない）も使用することができる。原動力は、平面上にエレメントが存在することによりメソゲン層に乱れが入っていまうのを克服するのに十分であることが認識され得る。力が適用される間は、全てのメソゲンエレメントが整列される（200）。図3を参照し、整列させる原動力の適用を非常に減輕し、または中断したときの効果を図示してある。表面上の標的分析物、細胞、微生物、または粒子から間隔をおいて配置されたメソゲンエレメントは、整列されたままであった。標的分析物、細胞、微生物、または粒子に結合したメソゲンエレメントは、これらに乱れの導入をもたらす。この乱れは、多くの分子距離を隔てて伝えられ、偏光もしくは特異的な波長、または光の波長の組み合わせを使用して検出することができる。基体上の液晶の配向は、場の適用および結合した分析物がない場合には、配向性の自由の程度が低下される。これは、場を適用することによって液晶を不可逆的に変化させることができる意味する。このような界面の例は、液体-液体界面である（例えば、方位角の配向の低下）が、本発明はこの界面での操作に限定されない。固体の表面上での液晶のアンカーリングの低下の例は、当業者に周知である（Physics of Liquid Crystals, Prost and de Gennesを参照されたい）。

10

20

30

40

50

【0171】

さらに、その他の態様において、本発明は、平面が細胞、微生物、または粒状物質と共に播種される方法を想定する。液晶フィルムを表面上に配置し、原動力（例えば、電場、磁場、または流体の流れ）を使用してアラインメントを導入する。本発明は、任意の特定の作用機序に限定されない。実際に、作用機序の理解は、本発明を実施するために必要ではない。それにもかかわらず、液晶のアラインメントを維持するために必要な力の大きさは、表面上のエレメントが有する破壊力の程度に比例する。破壊力（すなわち、乱れをメソゲン層に導入する能力）の主な一因は、その大きさに関連する。一様に整列されたLCフィルムを維持するために必要な原動力の適用の関数として光伝達の変化の収集情報（例えば、曲線）は、異なるサイズの粒子の相対的な量についての定量的データを提供する。図4は、平面上に配置されたエレメントの2つの集団の間で、力／光透過曲線が有意に異なることを示す。

【0172】

図4において、実線は、わずかに優性なサイズと共に不均一なサイズの粒子を有する分析物の集団に関する力曲線を表し、点線は、比較的大きな粒子の均一な集団の存在に対応する。また、これらの曲線の位置は、表面上の粒子の数に依存する。所与の適用力（例えば、電場）に対して、より多くの粒子が表面上に存在する場合に、光の伝達がより大きい。すなわち、粒子は、適用される場によって促進される一様なアラインメントを防げる。

【0173】

さらに、ナノ構造またはマイクロ構造の基体を使用する以外に、LCを整え、または細胞、もしくはその他の粒状物質、微生物（細菌、真菌、ウイルス、寄生虫）、並びに特異的もしくは非特異的な分析物によって占有され、または占有されない基体の領域間で光学反対を増強するために、電場または磁場を使用することもできる。これらの態様は、更に詳細に下に記述してある。

【0174】

F. 液晶基体およびマトリックス

さらに、一部の態様において、液晶基体は、細胞の接着、動作、および収縮によって基体に伝えられる生体運動力を報告するために使用される。一部の態様において、LC基体は、基体タンパク質、細胞機能を補助するためのガラス、またはその他の生体適合性の重合体基体の接着によって機能する。その他の態様において、LC基体は、固形基体にわたって広がった低分子量のLCフィルム、液晶中に分散された粒子もしくはゲル化分子によって形成されるLCゲル、重合性の液晶、液晶中における重合体ネットワークの重合によって調製される重合体安定化液晶フィルム（重合体分散液晶ディスプレイに使用されるものと同じ）、または重合体安定化液晶（例えば、リオトロピック液晶）を含む。液晶フィルムの表面は、共有結合性の付着、例えば表面で活性な分子に結合された受容体を使用することによるか、または液晶基体の表面に吸着された重合体の使用による物理吸着を含む（しかし、これらに限定されない）当業者に既知の種々の固定化方法のうちの1つによって、表面上にアンカーされる受容体の固定化によって機能的にすることができる。

【0175】

一部の好ましい態様において、ハイブリッド液晶フィルムは、液晶および細胞外マトリックス（extracellular matrix: ECM）成分の組み合わせ、または液晶および細胞接着分子（例えば、ICAM、セレクチン、シンディーンス（syndecans））の組み合わせから調製される。本発明のもう一つの好ましい態様において、細胞外マトリックス成分またはECMの合成凝態は、マトリックスに付着した細胞の存在によって変化される液晶の整列を示す。液晶フィルムの乱れまたは整列の程度は、白色光を使用して、または特異的な波長もしくは光の波長の組み合わせを使用して、評価および定量することができる。

【0176】

さらにその他の態様において、液晶マトリックスの使用は、表面に配置された細胞からの生体運動力がマトリックスに伝達されて、光の通過を変化させることを報告するのに使用される。さらに、一部の態様において、細胞外マトリックス（例えば、コラーゲンまた

はフィブロネクチン)の薄いフィルム、細胞表面接着分子、細胞機能を維持して細胞外マトリックス成分または細胞機能を促進する特異的な結合配列(例えば、RGD)の固定化によって機能するであろう薄い重合性フィルム、およびハイブリッド細胞外液晶マトリックスは、接着、遊走、または収縮などの細胞過程によってこれらのフィルムに伝えられる生体運動力を報告するために使用される。

【0177】

なおさらなる態様において、液晶を配向させるために修飾されたマトリックス(例えば、ECM)が提供される。また、このようなマトリックスでは、接着、遊走、および侵襲アッセイ法における使用が見出される。

【0178】

11. 有機層

基体がメソゲン層をアンカーする能力に加えて、基体に付着された有機層も、同様にこのようなアンカリングを提供することができる。広範な有機層を本発明と連動して使用することができる。これらは、有機硫黄化合物(チオールおよびジスルフィドを含む)、オルガノシラン、両性分子、シクロデキストリン、ポリオール(例えば、ポリ(エチレンギリコール)、ポリ(プロピレンギリコール))、フラーレン、および生体分子(例えば、タンパク質、脂質、核酸、多糖体、リン脂質など)から形成される有機層を含むが、これらに限定されない。有機層を使用する好ましい態様において、層は、層がアッセイにおいて及ぼすであろう影響を考慮した後に選択される。例えば、細胞の遊走が考慮されるアッセイ法では、当業者であれば、反応の条件および細胞の遊走を妨害しないことが予測される有機層を選択すると考えられ、または当業者であれば、細胞の遊走を促進し、または遅延させることができると予測される有機層を選択することができよう。

【0179】

A. アンカリング

基体の表面に結合され、維持され、または吸着された有機層は、メソゲン層をアンカーすることができる。本明細書において使用されるものとして、「アンカリング(anchorin g)」の用語は、メソゲン相の分子によって採用される配向のセットをいう。メソゲン層は、特定の配向を採用し、一方で有機層とメソゲン層の間の界面の自由エネルギーを最小化する。メソゲン層の配向は、「アンカリングの方向」をいう。多くのアンカリング方向が可能である。

【0180】

採用される特定のアンカリング方向は、メソゲン層、有機層、および基体の性質に依存することが想定される。本発明において有用なアンカリング方向は、例えば、円錐アンカリング、縮重アンカリング、ホメオトロピック・アンカリング、多値安定(multistable)アンカリング、平面アンカリング、およびタイル(tiled)・アンカリング含む。平面アンカリングおよびホメオトロピック・アンカリングが好ましく、平面アンカリングが最も好ましい。

【0181】

表面によるメソゲン化合物のアンカリングは、多数の系について広範に研究されてきた(例えば、Jerome, Rep. Prog. Polys. 54: 391-451 (1991)を参照されたい)。表面によるメソゲン物質のアンカリングは、一般に、メソゲン層のバルク相の働く子の配向によって特定される。働く子の配向は、表面と比較して、極角(表面の標準から測定して)および方位角(表面の面で測定して)によって記述される。

【0182】

メソゲンのアンカリングの制御は、主に、無機(例えば、酸化ケイ素)基体に対する表面活性分子または重合体フィルムの被覆に続く研磨などの表面処理によって調製される有機表面の使用に基づいていた。有用であることが分かっているその他の系は、種々の基体とのオルガノシランの反応を介して調製される表面を含む(例えば、Yangら、In MICROCHEMISTRY: SPECTROSCOPY AND CHEMISTRY IN SMALL DOMAINS; Masuharaら編; North-Holland, Amsterdam, 1994; p. 441を参照されたい)。

【0183】

支持されるメソゲン層の方位および極配向の両者を制御するために、基体上の有機層によって形成される分子的にデザインされた表面を使用することができる。自己構築される単相 (SAMs) を表面上にパターン化することができる。例えば、斜めに沈着された金の上に $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{SH}$ 、および $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{SH}$ から作製されるパターン化された有機層により、90°ねじれた支持されたメソゲン層を作製する。有機層成分の鎖長および種の数を変化させることにより、その他のアンカリング様式にも容易にアクセスできる (GuptaおよびAbbott, Science 276: 1533-1536 (1997) を参照されたい)。

【0184】

アンカリング様式間の転位は、有機層の構造を変化させることによって一連の有機層上で得られた。メソゲン化合物のアンカリングに影響を与えることが見いだされている構造上の特色は、例えば、有機層内の分子密度、有機層を構成する分子の大きさおよび形状、並びにバルク有機層を構成する個々の層の数を含む。

【0185】

基体上の有機層の密度は、メソゲンをアンカリングする様式に対して影響を及ぼすことが示された。例えば、ホメオトロピックと縮重アンカリングの間の転位は、単層の密度を変化させることによって界面活性物質の単層上で得られた (Proustら、Solid State Comm. 11: 1227-30 (1972) を参照されたい)。したがって、基体上の有機層の密度を制御することによって、メソゲンをアンカリングする様式を目的に合わせることも本発明の範囲内である。

【0186】

有機層を構成する個々の分子の分子構造、大きさ、および形状も、アンカリング様式に影響を及ぼす。例えば、基体上の界面活性物質の脂肪族鎖の長さを変化させることにより、アンカリングの転位を誘導することができ；長鎖では、ホメオトロピック・アンカリングが得られ、短鎖では、円錐アンカリングが得られ、傾き角が増大するにつれ、鎖が短くなる (例えば、Porte, J. Physique 37: 1245-52 (1976) を参照されたい)。さらに、最近の報告では、メソゲン相の極角が、有機層の成分の選択によって制御することができる事が証明された。GuptaおよびAbbott, Langmuir 12: 2587-2593 (1996) を参照されたい。したがって、有機層成分の賢明な選択によって、アンカリング転位の程度、並びに転位のタイプを設計することも本発明の範囲内である。

【0187】

また、生体分子を有機層として使用することができる。(Seung-Ryeol Kim, Rahul R. Shah, および Nicholas L. Abbott; Orientations of Liquid Crystals on Mechanically Rubbed Films of Bovine Serum Albumin: A Possible Substrate for Biomolecular Assays Based on Liquid Crystals, Analytical Chemistry; 2000; 72 (19); 4646-4653. を参照されたい)。有機層として生体分子を使用するときの好ましい態様は、基体の表面上に有機層を化学的に固定化した後に、布地布で有機層を機械的に磨くことに基づく。

【0188】

本発明を実施する際に多種多様な有機層が有用である。これらの有機層は、単層、二重層、および多層を含むことができる。さらに、有機層は、疎水的相互作用、親水性相互作用、ファンデルワールス相互作用などを含む (しかし、これらに限定されない) 共有結合、イオン結合、物理吸着、化学吸着などによって付着することができる。

【0189】

好ましい本態様において、自己構築される単層を形成する有機層が使用される。表面上に液晶をアンカリングする研究において、薄い金の半透明のフィルム上のアルカンチオールから形成される自己構築される単層 (SAMs) の使用が報告されている (DrawhornおよびAbbott, APIes. Chem. 45: 16511 (1995) を参照されたい)。SAMが長い ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{SH}$) および短い ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{SH}$ または $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{SH}$) 脂肪族鎖を有する n-アルカンチオールから形成されたことを示す研究の主要な結果では、ホモトロピックに (homeotropically) メソゲンをアンカーすることができる。対照的に、単一成分の SAM では、室温で非

10

20

30

40

50

均一、平面、またはタイル・アンカリングを生じる。

【0190】

以下の議論では、自己構築される単層を典型的な有機層として利用する。この使用に限定されることは企図されない。自己構築される単層の種々の配置およびこれらの合成方法、結合特性、およびその他の特徴は、本発明に使用される各々の有機層に同様に適用されることが理解される。

【0191】

B.自己構築される単層

自己構築される単層は、一般に組織化された、厳密にパックされた線状分子として描かれる。固体基体上に分子単層を沈着するために、2つの広く使われている方法：ラングミュア-プロジェクト (Langmuir-Blodgett) 転位および自己構築がある。さらなる方法は、基体表面に単層前駆体を蒸着すること、溶液から重合体および多価電解質の層から層への沈着などの技術を含む (Guy Ladam, Pierre Schaaf, Frederic J. G. Cuisinier, Gero D echer, およびJean-Claude Voegel; Protein Adsorption onto Auto- Assembled Polyelectrolyte Films, Langmuir; 2001; 17 (3); 878-882)。

【0192】

本発明に有用なSAM層の組成は、広範囲な化合物構造およびモル比にわたり多様であることができる。一つの態様において、SAMは、1つの化合物だけから形成される。好ましい本態様において、SAMは、2つまたはそれ以上の成分から形成される。もう一つの好ましい態様において、2つまたはそれ以上の成分が使用されるときは、1つの成分が10~25炭素の間の鎖長を有する長鎖炭化水素であり、第2の成分は、1~9炭素原子の間の鎖長を有する短鎖炭化水素である。特に好ましい態様において、SAMは、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{SH}$ および $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{SH}$ 、または $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{SH}$ および $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{SH}$ から形成される。上記した態様のいずれかにおいて、炭素鎖は、末端 (例えば、 NH_2 、 COOH 、 OH 、 CN) で、鎖内の位置 (例えば、アザ、オキサ、チア) で、または末端および鎖内の位置の両方で機能することができる。

【0193】

メソゲン層は、1つのSAM層上に層にすることができる、または2つのSAM層にはさむことができる。メソゲン層が2つのSAMにはさまれる態様において、第2の基体は、任意に実質的に組成物においてSAMを有するものと同一であり、メソゲン層上に層化することができる。または、構成的に異なる基体をメソゲン層上に層化することができる。好ましい態様において、第2の基体は、浸透性である。さらにもう一つの好ましい態様において、2つの基体が使用されるが、基体のうちの1つだけが付着された有機層を有する。

【0194】

メソゲン層がSAMの2つの層にはさまれるときに、SAMの層のいくつかの構成順を利用することができます。例えば、1つの態様において、第1の有機層および第2の有機層は、実質的に同じ組成を有し、有機層は両方とも付着された認識部分を有する。この態様のバリエーションでは、第1および第2の有機層を実質的に同じ組成で利用し、層のうちの1つだけが認識部分を有する。

【0195】

もう一つの態様において、第1および第2の有機層は、実質的に異なる組成を有し、有機層のうちの1つだけが付着された認識部分を有する。さらなる態様において、第1の有機層および該第2の有機層は、実質的に異なる組成を有し、有機層は両方とも付着された認識部分を有する。

【0196】

好ましい本態様において、有機層は、実質的に同じ組成を有し、有機層の一方または両方がそれに対応して付着した認識部分を有する。

【0197】

認識部分は、当該技術分野において既知の多くの付着方法のいずれかによってSAMの表面に付着することができる。1つの好ましい態様において、反応性のSAM成分が基体に付着

10

20

30

40

50

され、認識部分は、その後に成分の反応基と認識部分の相補的な反応性基を介してSAM成分に結合される（例えば、Hegnerら、*Biophys. J.* 70: 2052-2066 (1996) を参照されたい）。もう一つの好ましい態様において、認識部分は、基体表面上のSAM成分を固定する前に、SAM成分に付着され：次いで、認識部分-SAM成分カセットが基体に付着される。なおさらなる好ましい態様において、認識部分は、置換反応を介して基体に付着される。本態様において、SAMは予め形成され、次いでSAM成分の一部分が、認識部分または認識部分を有するSAM成分によって置換される。

【0198】

C. 官能性を持たせたSAM

以下の議論は、反応性のSAM成分の基体表面に対する付着に焦点をあてる。この焦点は、簡便性のためだけのものであり、当業者であれば、SAM成分-認識部分が基体に対してこれを付着する前に予め形成される態様にも同様に適用されることを理解するであろう。本明細書において使用されるものとして、「反応性のSAM成分」は、基体に対する成分の付着に統いて、認識部分またはその他の種と反応するために利用できる官能基を有する成分をいう。

【0199】

反応性のSAM成分で利用できる反応の現在支持されている分類は、比較的穏やかな条件下で進行されるものである。これらは、求核置換（例えば、ハロゲン化アシルとアミンおよびアルコールの反応）、求電子置換（例えば、エナミン反応）、および炭素-炭素および炭素-ヘテロ原子の多重結合に対する付加（例えば、ミカエル反応、ディールス アルダー付加）含むが、これらに限定されない。これらの及びその他の有用な反応は、March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY, Third Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985において論議されている。

【0200】

本発明によれば、基体の表面は、複数の利用可能な反応性の官能基で基体表面を誘導体化するような方法で、反応性のSAM成分を基体表面に共有結合で結合することにより、SAM、成分、およびその他の種で官能性を持たせる。本発明を実施する際に使用することができる反応性基は、例えば、アミン、ヒドロキシル基、カルボン酸、カルボン酸誘導体、アルケン、スルフヒドリル、シロキサンなどを含む。

【0201】

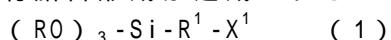
多種多様な反応タイプを、基体表面に官能性を持たせるために利用できる。例えば、ポリプロピレンなどのプラスチックで構築された基体をクロム酸酸化反応によって表面を誘導体化し、その後にヒドロキシル化されまたはアミノメチル化された表面に変換することができる。高度に架橋されたジビニルベンゼンから作製された基体をクロロメチル化し、その後に官能基を操作することによって表面を誘導体化させることができる。さらに、官能性を持たせた基体は、エッティングして、還元したポリテトラフルオロエチレンから作製することができる。

【0202】

基体がガラスなどのシリカ様 (siliceous) の材料で構築されるときは、表面のSi-OH、SiO-H、および/またはSi-Si基を官能化試薬と反応させることによって表面を誘導体化することができる。基体が金属フィルムでできているときは、その金属に対する結合活性を示す材料によって表面を誘導体化することができる。

【0203】

好ましい態様において、基体がガラスから作製される場合、以下のものなどのシリコーン修飾試薬によって基体表面上の基を変換することによって、ガラス面に対する反応性の基の共有結合形成が達成される：



式中、Rは、メチルまたはエチルなどのアルキル基であり、R¹は、シリコーンとXの間の結合基であり、およびXは、反応基または保護された反応基である。また、反応基は、後述するように認識部分であることができる。また、示したアルコキシの他に、ハロゲンまた

10

20

30

40

50

はその他の脱離基を有するシラン誘導体基も本発明に有用である。

【0204】

多くのシロキサン官能化試薬、例えば：

1. ヒドロキシアルキルシロキサン（表面シリル化（Silylate）し、ジボランで官能性を持たせ、アルコールを酸化するためのH₂O₂）

a. アリルトリクロロシラン3-ヒドロキシプロピル

b. 7-オクト-1-エニルトリクロロシラン8-ヒドロキシオクチル

2. ジオール（ジヒドロキシアルキル）シロキサン（表面をシリル化し、ジオールに加水分解する）

a. (グリシジルトリメトキシシラン (2,3-ジヒドロキシプロピルオキシ) プロピル 10

3. アミノアルキルシロキサン（中間の官能性を持たせる工程を必要としないアミン）

a. 3-アミノプロピルトリメトキシシランアミノプロピル

4. 二量体の二級アミノアルキルシロキサン

a. ビス (3-トリメトキシリルプロピル) アミンビス (シリルオキシプロピル) アミン

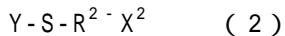
を使用することができる。

【0205】

シロキサン以外のSAM成分が使用されるときに、同じように有用な官能性を持たせる化学のアレイを利用できることは、当業者には明らかであろう。したがって、例えば同じように官能性を持たせたアルキル・チオールを金属フィルムに付着させ、その後に反応させて上記に例示したものなどの官能基を作製することができる。 20

【0206】

もう一つの好ましい態様において、基体は、少なくとも部分的に金フィルムなどの金属フィルムであり、および反応基は、その表面に対して結合活性を示す薬剤によって金属表面につながれる。好ましい本態様において、基体は、少なくとも部分的に金フィルムであり、金属表面と化学反応する基は、以下のものなどのチオール、スルフィド、またはジスルフィドを含む：



式中、R²は、硫黄とX²の間の結合基であり、X²は、反応基または保護された反応基である。また、X²は、後述するように認識部分であることができる。Yは、H、R³、およびR³-S-からなる群より選択されるメンバーであり、式中R²およびR³は、独立して選択される。R²およびR³が同じであるときは、対称性のスルフィドおよびジスルフィドを生じ、これらが異なるときは、非対称のスルフィドおよびジスルフィドを生じる。 30

【0207】

多数の官能性を持たせたチオール、スルフィド、およびジスルフィドは、商業的に入手可能である (Aldrich Chemical Co., St. Louis)。さらに、当業者は、さらにこのような分子を生成するために、これらに利用できる多くの合成物経路を有する。例えば、アミン官能性を持たせたチオールは、対応するハロアミン、ハロカルボン酸などから、硫化水素化ナトリウムとこれらのハロ前駆体の反応によって生成させることができる。例えば、Reid, ORGANIC CHEMISTRY of BIVALENT SULFUR, VOL 1, pp. 21-29, 32-35, vol. 5, pp. 27-34, Chemical Publishing Co., New York, 1.958, 1963を参照されたい。加えて、官能性を持たせた硫化物は、メルカプタン塩によるアルキルチオ-デ-ハロゲン化を介して調製することができる (Reid, ORGANIC CHEMISTRY OF BIVALENT SULFUR, vol. 2, pp. 16-21, 24-29, vol. 3, pp. 11-14, Chemical Publishing Co., New York, 1960を参照されたい)。本発明を実施する際に有用な化合物を生成するためのその他の方法は、当業者にとって明らかであろう。 40

【0208】

もう一つの好ましい態様において、官能化試薬は、それぞれの試薬分子につき複数の反応基を提供する。下記の化合物3などの試薬を使用して、基体表面上のそれぞれの反応部位は、本質において、2つまたはそれ以上の官能基に「増幅される」：

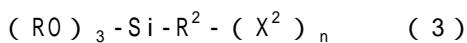
10

20

30

40

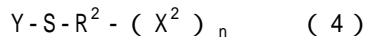
50



式中、Rは、メチルなどのアルキル基であり、R²は、シリコーンとX²の間の結合基であり、X²は、反応基または保護された反応基であり、nは2~50の間、より多く好ましくは2~20の間の整数である。

【0209】

また、同様の增幅分子が、基体が少なくとも部分的に金属フィルムである態様において有用である。これらの態様において、金属表面と反応する基は、式(4)のものなどのチオール、スルフィド、またはジスルフィドを含む：



上記に論議したとおり、R²は硫黄とX²の間の結合基であり、X²は反応基または保護された反応基である。また、X²は、認識部分であることができる。Yは、H、R³、およびR³-S-からなる群より選択されるメンバーであり、R²およびR³は、独立して選択される。

【0210】

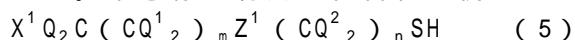
本発明の上記した態様においてR¹、R²、およびR³のために使用するR基は、アルキル、置換されたアルキル、アリール、アリールアルキル、置換されたアリール、置換されたアリールアルキル、アシル、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、アルコキシ、アシロキシ、アリールオキシ、アリールオキシアルキル、メルカプト、飽和した環状炭化水素、不飽和環状炭化水素、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、置換されたヘテロアリール、置換されたヘテロアリールアルキル、複素環、置換された複素環、および複素環式アルキル基を含むが、これらに限定されない。

【0211】

式1-4のそれぞれにおいて、上記R¹、R²、およびR³のそれぞれは、安定であるか、またはこれらは化学反応または光化学反応によって切断することができる。例えば、エステルまたはジスルフィド結合を含むR基は、それぞれ加水分解および還元によって切断することができる。また、例えば、ニトロベンジル誘導体、フェナシル基、ベンゾインエステルなどの光によって切断されるR基の使用も本発明の範囲内である。その他のこのような切断基も、当業者に周知である。

【0212】

もう一つの好ましい態様において、有機硫黄化合物は、部分的にまたは完全にハロゲン化される。本態様に有用な化合物の例は：



式中、X¹は、H、ハロゲン反応基、および保護された反応基からなる群より選択されるメンバーである。また、反応基は、後述するように認識部分であることができる。Q、Q¹、およびQ²は、独立してH、ハロゲンからなる群より選択されるメンバーであり、Z¹は、-CQ₂-、-CQ¹2、-CQ²2-、-O-、-S-、NR⁴-、-C(O)NR⁴、およびR⁴NC(OO-、式中R⁴は、H、アルキル、置換されたアルキル、アリール、置換されたアリール、ヘテロアリール、および複素環基からなる群より選択されるメンバーであり、mおよびnは、独立して0~40の間の数である。

【0213】

さらにもう一つの好ましい態様において、有機層は、上記の式5に従った化合物を含み、式中Q、Q¹、およびQ²は、独立してHおよびフッ素からなる群より選択されるメンバーである。なおさらなる好ましい態様において、有機層は、式(6)および(7)に従った構造を有する化合物を含み：



式中、Z¹およびZ²は、独立して-CH₂-、-O-、-S-、NR⁴、-C(O)NR⁴、およびR⁴NC(O)-からなる群より選択されるメンバーであり、式中R⁴は、H、アルキル、置換されたアルキル、アリール、置換されたアリール、ヘテロアリール、および複素環基からなる群より選択されるメンバーである。好ましい本態様において、近隣する分子のZ基は、誘引性の（例えば、水素結合）または反発性の（例えば、ファンデルワールス）相互作用のいずれに

10

20

30

40

50

も関与する。

【0214】

式6および7において、mは、0～40の間の数であり、nは、0～40の間の数であり、oは0～40の間の数であり、および、pは0～40の間の数である。

【0215】

さらに好ましい態様において、式6および7の化合物は、認識部分を有するハロゲン化されたか、またはハロゲン化されていないかのいずれかの有機硫黄化合物と運動して使用される。

【0216】

有機層がハロゲン化された有機硫黄化合物から形成されるとき、有機層は、单一のハロゲン化化合物または異なる構造を有する複数のハロゲン化化合物を含むことができる。さらに、これらの層は、非ハロゲン化された有機硫黄化合物を含むことができる。

【0217】

反応性の官能基(X^1 および X^2)は、例えば：

(a) N-ヒドロキシ琥珀酸エステル、N-ヒドロキシベンズトリアゾールエステル、酸ハロゲン化物、アシリルイミダゾール、チオエステル、p-ニトロフェニルエステル、アルキル、アルケニル、アルキニル、および芳香族エステルを含む(しかし、これらに限定されない)カルボキシル基、およびこれらの種々の誘導体；

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

(c) ハロアルキル基であって、ハロゲン化物が後で、例えばアミン、カルボキシレートアニオン、チオールアニオン、カルボアニオン、またはアルコキシドイオンなどの求核基によって置換することができ、これによりハロゲン原子の部位で新たな基の共有結合性の付着を生じる基；

(d) 例えば、マレイミド基などのディールス・アルダー反応に関与することができる求ジエン体基；

(e) 例えば、イミン、ヒドラゾン、セミカルバゾン、もしくはオキシムなどのカルボニル誘導体の形成を経て、またはグリニヤール付加もしくはアルキルリチウム付加などの機構を経て、その後にの誘導体化が可能であるようなアルデヒドまたはケトン基；

(f) 例えば、スルホンアミドを形成するために、その後にアミンと反応のためのスルホニルハロゲン化物基；

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

(h) 例えば、アシル化されたまたはアルキル化することができるアミンまたはスルフヒドリル基；

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

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

また、反応性部分は、認識部分であることができる。これらの基の性質は、以下に更に詳細に論議してある。

【0218】

反応性の官能基は、これらが、基体の表面上への官能性を持たせたSAM成分の付着を制御する反応に関与または干渉しないように選択することができる。代わりに、反応性の官能基は、保護基を存在させることによって反応に関与することを保護することができる。当業者であれば、選択された反応条件のセットと干渉することから特定の官能基を保護する方法を理解しているであろう。有用な保護基の例としては、Greeneら、PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, John Wiley & Sons, New York, 1991を参照されたい。

【0219】

好ましい態様において、認識部分を有するSAM成分は、基体表面に対して直接、および本質的に「安定な結合」を介して不可逆的に付着されている。「安定な結合」は、本明細

10

20

30

40

50

書に使用されるものとして、広範な条件（例えば、アミド、カルバミン酸塩、炭素-炭素、エーテルなど）にわたってその化学的完全性を維持する結合である。もう一つの好ましい態様において、認識部分を有するSAM成分は、「切断可能な結合」によって基体表面に付着される。「切断可能な結合」は、本明細書に使用されるものとして、認識部分-分析物複合体のその他の結合を分解させない条件下で、切断を受けるように設計されている結合である。切断可能な結合は、ジスルフィド結合、イミン結合、炭酸塩結合、およびエステル結合含むが、これらに限定されない。

【0220】

特定の態様において、バルクのSAM成分のものとは異なる構造を有するSAM成分に付着された認識部分を有することは、有利である。本態様において、認識部分が結合される基は、「スペーサー・アーム」または「スペーサー」と称する。このようなスペーサー・アームを使用すると、認識部分に隣接したSAMの性質を制御することができる。有効に制御される性質は、例えば、疎水性、親水性、表面活性、並びに基体および/またはSAMの面から認識部分の距離を含む。例えば、アルカンチオールで構成されるSAMでは、認識部分は、アミンで終結したポリ(エチレンギリコール)を介して基体またはSAMの表面に付着することができる。スペーサー・アームおよび多くのその他のSAMの組み合わせは、当業者に理解される。

【0221】

基体表面の親水性は、アミン-、ヒドロキシル-、およびポリヒドロキシルを含有する極性分子との反応によって増強することができる。代表例は、ポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリ(エチレンギリコール)、およびポリ(プロピレンギリコール)を含むが、これらに限定されない。これらの化合物のための適切な官能性付与の化学およびストラテジーは当該技術分野において既知である（例えば、Dunn, R. L.ら編、POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D. C. 1991を参照されたい）。

【0222】

基体表面の疎水性は、例えば、長鎖ジアミン、長鎖チオール、-アミノ酸などの疎水性のスペーサー・アームを使用して調整することができる。代表的な疎水性のスペーサーは、1,6-ヘキサンジアミン、1,8-オクタンジアミン、6-アミノヘキサン酸、および8-アミノオクタン酸を含むが、これらに限定されない。

【0223】

また、基体表面は、界面活性特性を有するスペーサーを基体表面に付着することによって界面活性に作製することができる。この目的のために有用な化合物は、例えば、1-アミノドекан酸などの例えば、アミノ化されたか、またはヒドロキシル化された洗浄性の分子を含む。

【0224】

もう一つの態様において、スペーサーは、基体またはSAMから認識部分を遠ざけるために役立つ。この特徴を有するスペーサーは、いくつかの用途を有する。例えば、基体またはSAM表面に非常に近くに保持されている認識部分は、入って来る分析物と作用できず、または許容不可能でゆっくりと反応するであろう。分析物がそれ自体立体的にダメージを受けているときは、一体構造の基体が2つの成分の接近を妨げるため、認識部分-分析物の複合体形成を引き起こす反応は、望ましれずに遅くなることがあり、または全く生じない。

【0225】

もう一つの態様において、基体表面および/またはSAMの物理化学的な特徴（例えば疎水性、親水性、界面活性、高次構造）は、バルクのSAMの成分とは組成が異なり、かつ認識部分を有さない一価の部分を付着することによって変化される。本明細書において使用されるものとして、「一価の部分」は、1つの反応性の官能基だけを有する有機分子をいう。この官能基により、基体に分子を付着させる。「一価の部分」は、上記した二官能性の「スペーサー」基と対照をなす。このような一価の基は、基体表面の親水性、疎水性、

10

20

30

40

50

結合特徴などを修飾するために使用される。この目的ために有用な基の例は、長鎖アルコール、アミン、脂肪酸、脂肪酸誘導体、ポリ(エチレングリコール)モノメチルエーテルなどを含む。

【0226】

2つまたはそれ以上の構造的に異なる部分がSAMの構成要素として使用されるときは、成分は、SAM成分の混合物として基体と接触させることができ、または代わりに、成分は、個々に添加することができる。SAM成分が混合物として添加される様において、溶液中の成分の混合物のモル比と同じ比で混合されたSAMを生じる。SAMが構築される様式に応じて、2つの成分は、島状に相分離されない(BainおよびWhitesides, J. Am. Chem. Soc. 111: 7164 (1989)を参照されたい)。SAMのこの特色により、認識部分または大きな修飾基を、これらの分子間の立体障害などの特定の相互作用が最小になるような様式で、固定するために使用することができる。

【0227】

また、SAMの個々の成分は、経時的な方法で基体に結合することができる。したがって、1つの様において、第1のSAM成分は、第1の化学量論的に等価よりも少ない官能基で表面を「不十分にラベリングすること(under labeling)」によって基体の表面に付着される。第1の成分は、末端の反応性基もしくは認識基、スペーサー・アームまたは一価部分に好ましいSAM成分である。その後に、第2の成分を基体と接触させる。この第2の成分は、化学量論的に等価、化学量論的に過剰のいずれで添加することができ、または再び不十分にラベリングして、部位を第三の成分のために開放したままにするために使用することができる。

【0228】

III. 認識部分

本発明の一部の様において、基体に付着され、または結合された「認識部分」は、もう一つの分子もしくは分子群(例えば、分析物)または細胞と結合するか、またはそうでなければ相互作用するように利用される。例えば、一部の様において、認識部分は、官能性を持たせたスペーサー・アームまたは官能性を持たせたSAM成分のいずれかに付着させ、次に基体に付着されるか、または結合させる。さらに、認識部分は、重合体表面によって提示させることができる(例えば、摩擦された重合体表面)。

【0229】

一部の好ましい様において、認識部分は、有機官能基を含む。好ましい本様において、有機官能基は、アミン、カルボン酸、薬物、キレート薬、クラウンエーテル、シクロデキストリン、またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるメンバーである。

【0230】

もう一つの好ましい様において、認識部分は、生体分子である。なおさらなる好ましい様において、生体分子は、ポリペプチドまたはタンパク質(例えば、特異的な、受容体または細胞受容対認識配列[例えば、RGD])、抗原結合タンパク質、ペプチド、核酸(例えば、単一のヌクレオチドまたはヌクレオシド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、および一本鎖およびより多くの鎖をもつ核酸)、脂質、リン脂質、またはこれらの組み合わせである。好ましい本様において、認識部分は、ビオチンである。本発明の一部の様において、認識成分は、抗原結合タンパク質である。抗原結合タンパク質は、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、Fab断片、およびFab発現ライブラリーを含むが、これらに限定されない。特に好ましい様において、タンパク質およびポリペプチド認識部分は、細胞の付着および機能を支持する細胞外マトリックス(例えばタイプI、II、III、およびIVを含むコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン)において通常見いだされるタンパク質およびペプチド配列を含む。一部の様において、ペプチド配列は、短い機能的な配列(例えば、RGD)として付着されるか、または機能的な配列がより長いペプチド配列内に含まれていてもよい(例えば、x-RGD-x)。ペプチド配列の例は、RGD、EILDV、LDV、LDVP、IDAP、PHSRN、SLDVP、およびIDSPを含む既知の全てのインテグリン結合配列を含むが、これらに限定されない。

【0231】

当該技術分野において既知の種々の手順は、ポリクローナル抗体の產生のために使用されてもよい。抗体を產生するためには、ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどを含む（しかし、これらに限定されない）種々の宿主動物をエピトープに対応するペプチドで注射することによって免疫にことができる。好ましい態様において、ペプチドは、免疫原性のキャリア（例えば、ジフテリアトキソイド、ウシ血清アルブミン（BSA）、またはキーホール・リンペット・ヘモシアニン（KLH））に抱合される。免疫応答を増大するために、フロイント（完全および不完全）、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン、ジニトロフェノール、並びにBCG（ウシ型弱毒結核菌ワクチン）およびコリネバクテリウム・パルバム（*Corynebacterium parvum*）などの潜在的に有用なヒト・アジュバントを含む（しかし、これらに限定されない）種々のアジュバントが宿主種に応じて使用されてもよい。

【0232】

モノクローナル抗体の調製のためには、培養において連續的に細胞株によって抗体分子の產生をもたらす任意の技術を本発明で使用することが見いだされるであろうことが想定される（例えばHarlowおよびLane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYを参照されたい）。これらは、最初にKohlerおよびMilsteinによって開発されたハイブリドーマ技術（KohlerおよびMilstein, *Nature* 256: 495-497 [1975]）並びにヒトB-細胞ハイブリドーマ技術（例えばKozborら、*Immunol. Tod.*, 4: 72 [1983] を参照されたい）およびヒト・モノクローナル抗体を產生するEBV-ハイブリドーマ技術（Coleら、*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 [1985]）を含むが、これらに限定されない。

【0233】

加えて、単鎖抗体の產生のために記述された技術（米国特許第4,946,778号；本明細書に参照として組み入れられる）を認識部分として役立つ特異的な単鎖抗体を產生する際に使用することが見いだされるであろうことが想定される。さらに、抗体断片を產生するために任意の適切な技術を、有用な認識部分である抗体断片を作製する際に使用することが見いだされるであろうことが想定される。例えば、このような断片は、抗体分子のペプシン消化によって作製することができるF(ab')2断片；F(ab')2断片のジスルフィド架橋を還元することによって作製することができるFab'断片、および抗体分子をパパインおよび還元剤で処理することによって作製することができるFab断片を含むが、これらに限定されない。なおさらなる態様において、認識部分は、抗原結合タンパク質を示すファージを含む。

【0234】

認識部分がポリヌクレオチドまたはポリペプチドである一部の態様において、複数の認識部分を光活性化化学、マイクロコンタクト・プリンティング、およびインクジェット式のプリンティングを使用して基体上に配列される。特に好ましい態様において、フォトリソグラフィーが利用される（例えば、米国特許第6,045,996号；第5,925,525号；および第5,858,659号；それぞれ、本明細書に参照として組み入れられる）。基体照射部位を定義する一連のフォトリソグラフィー・マスク、続く特異的な化学合成工程を使用して、本プロセスにより、アレイ中の予め定義された位置にそれぞれのプローブで高密度オリゴヌクレオチドのアレイを構築する。多数のプローブ・アレイを、例えば大きなガラス・ウエハース状に同時に合成する。次いで、ウエハースを小立方体にして、個々のプローブ・アレイを射出成形したプラスチックのカートリッジにパックし、これにより、環境からこれらを保護し、かつハイブリダイゼーションのためにチャンバーとして役立つ。

【0235】

その他の態様において、核酸認識成分は、適切な基体上に電気的に捕獲される（例えば米国特許第6,017,696号；第6,068,818号；および第6,051,380号を参照され；それぞれ、本明細書に参照として組み入れられる）。マイクロエレクトロニクスの使用により、この

10

20

30

40

50

技術では、その半導体マイクロチップ上の指定された試験部位へおよび試験部位から、電荷を持った分子の自発運動および濃縮が可能にする。所与の標的に対して独特のDNA捕捉プローブが、マイクロチップ上の特異的な部位に電気的に配置され、または「アドレス指定」されている。DNAは、強い負電荷を有するので、正電荷の領域に電気的に移動させることができる。

【0236】

なおさらなる態様において、認識部分は、表面張力の相違を利用することによって適切に基体上に整列させる（例えば、米国特許第6,001,311号；第5,985,551号；および第5,474,796号を参照されたい；それぞれ、本明細書に参照として組み入れられる）。この技術は、液体が化成皮膜によって与えられた表面張力の相違によって、平面上で分離することができるという事実に基づく。一旦このように分離されれば、オリゴヌクレオチドプローブは、試薬のインクジェットプリントによってチップ上に直接合成される。表面張力によって定義されたその反応位置を有するアレイは、各々4つの標準的なDNA塩基に対して1つの、4つの圧電ノズルのセットのもとでX/Y移動ステージ上に取り付けられる。移動ステージは、アレイの各々の列に沿って移動し、適切な試薬が、各々の反応位置にデリバリーされる。例えば、アミダイトA(amidite A)は、アミダイトAがその合成工程の間などに結合される部位にのみデリバリーされる。共通の試薬および洗浄液は、全ての表面を浸水させ、次いでこれらを急速な回転によって除去することによってデリバリーされる。

【0237】

なおさらなる態様において、認識部分は、適切な基体上へスポットされる。このようなスポットは、毛細管またはマイクロピペットで人手によって、またはAffymetrixおよびGislonから利用できるものなどの自動化されたスポット装置によって行うことができる（例えば、米国特許第5,601,980号；第6,242,266号；第6,040,193号；および第5,700,637号；を参照されたい；それぞれ、参照として本明細書に組み入れられる）。

【0238】

認識成分がアミンであるときは、好ましい態様において、認識部分は、アミンに結合することによって反応する分析物上の構造（例えば、カルボニル基、アルキルハロ基）と相互作用すると考えられる。もう一つの好ましい態様において、アミンは、関心対象の分析物（例えば、カルボン酸、スルホン酸）上の酸性部分によってプロトン化される。

【0239】

特定の好ましい態様において、認識成分がカルボン酸であるときは、認識部分は、錯体化（例えば、金属イオン）によって分析物と相互作用すると考えられる。さらに他の好ましい態様において、カルボン酸は、分析物（例えば、アミン）上の塩基性基をプロトン化する。

【0240】

もう一つの好ましい態様において、認識部分は、薬物部分である。薬物部分は、臨床用途のためにすでに許容された薬剤であることができ、またはこれらは、その使用が実験的である薬物であるか、もしくはその活性または作用機序が調査下であることができる。薬物部分は、所与の病状で証明された作用を有することができ、または所与の病状で望ましい作用を示すと仮定することができるだけである。好ましい態様において、薬物部分は、これらが選択の分析物と相互作用する能力についてスクリーニングされた化合物である。したがって、本発明を実施する際に有用な薬物部分は、種々の薬理活性を有する広範な薬物分類に由来する薬物を含む。

【0241】

有用な薬剤の分類は、例えば、非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDS）を含む。NSAIDSは、例えば、以下の区分にから選択することができる：（例えば、プロピオン酸誘導体、酢酸誘導体、フェナム酸（fenamic acid）誘導体、ビフェニルカルボン酸誘導体、およびオキシカム（oxicam））；ヒドロコルチゾンなどを含むステロイド性の抗炎症剤；抗ヒスタミン性薬（例えば、クロルフェニラミン、トリプロリジン）；鎮咳剤（例えば、デキストロメトルファン、コデイン、カルミフェン（carmiphen）、およびカルベタベンタン）；鎮

10

20

30

40

50

痒薬（例えば、メチジリジン（methidilizine）およびトリメプリジン（trimeprazine））；抗コリン剤（例えば、スコポラミン、アトロピン、ホマトロピン、レボドパ）；制吐薬および制嘔吐薬（例えば、シクリジン、メクリジン、クロルプロマジン、ブクリジン（buclizine））；摂食障害薬（例えば、ベンズフェタミン、フェンテルミン、クロルフェンテルミン、フェンフルラミン）；中枢刺激剤（central stimulant drug）（例えば、アンフェタミン、メタンフェタミン、デキストロアンフェタミン、およびメチルフェニデート）；抗不整脈薬（例えば、プロパノロール、プロカインアミド、ジソピラミド、キニジン、エンカイニド（encainide））；P-アドレナリン作用性遮断薬（例えば、メトプロロール、アセブトロール、ベタキソロール、ラベタロール、およびチモロール）；強心剤（例えば、ミルリノン、アムリノン、およびドブタミン）；降圧剤（例えば、エナラブリル、クロニジン、ヒドララジン、ミノキシジル、グアナドレル、グアネチジン）；利尿剤（例えば、アミロライド、およびヒドロクロロチアジド）；血管拡張薬（例えば、ジルチアゼム、アミオダロン、イソクスプリン、ニリドリン、トラゾリン、およびベラパミル）；血管収縮薬（例えば、ジヒドロエルゴタミン、エルゴタミン、およびメチルセルジド）；抗潰瘍剤（例えば、ラニチジン、およびシメチジン）；麻酔剤（例えば、リドカイン、ブピバカイン、クロルプロカイン（chlorprocaine）、ジブカイン）；抗うつ薬（例えば、イミプラミン、デシプラミン、アミトリピチリン、ノルトリピチリン）；トラキライザおよび鎮静剤（例えば、クロルジアゼポキシド、ベナシチジン（benacytizine）、ベンズキナミド、フルラゼパム、ヒドロキシジン、ロクサビン、およびプロマジン）；抗精神病薬（例えば、クロルプロチキセン、フルフェナジン、ハロペリドール、モリンドン、チオリダジン、およびトリフロペラジン）；抗菌薬（抗菌性の、抗真菌薬、抗原生動物剤、および抗ウイルス剤）。

10

20

30

40

50

【0242】

本組成物に組み入れるために好ましい抗菌薬は、例えば、ラクタム系の薬物、キノロン系の薬物、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、テトラサイクリン、エリスロマイシン、アミカシン、トリクロサン、ドキシサイクリン、カブレオマイシン、クロルヘキシジン、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、クリンダマイシン、エタンプトール、ヘキサミジンイソチオナート、メトロニダゾール；ペンタミジン、ゲンタマイシン、カナマイシン、リネオマイシン（lineomycin）、メタサイクリン、メテナミン、ミノサイクリン、ネオマイシン、ネチルマイシン（netilmycin）、パロモマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン、ミコナゾール、およびアマンファジン（amanfadine）の薬学的に許容される塩、並びに および デフェンシン、マゲイニン、セクロピン（cecropin s）、バクテネシン（bactenecin）、およびインドリシジン（indolicidin）含む（しかし、これらに限定されない）抗菌性ペプチドを含む。

【0243】

本発明を実施する際に使用するその他の薬物部分には、抗悪性腫瘍薬（例えば、アンチアンドロゲン剤（例えば、ロイプロリドまたはフルタミド）、細胞破壊薬（例えば、アドリアマイシン、ドキソルビシン、タキソール、シクロホスファミド、ブスルファン、シスプラチニン、a-2-インターフェロン）抗卵胞ホルモン（例えば、タモキシフェン）、代謝拮抗剤（例えば、フルオロウラシル、メトトレキセート、メルカブトプリン、チオグアニン）が含まれる。

【0244】

また、認識部分は、ホルモン（例えば、メドロキシプロゲステロン、エストラジオール、ロイプロリド、メgestroール、オクトレオチド、またはソマトスタチン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、アンジオテンシンII、その他の小さなペプチドホルモン、並びにリゾホスファチジン酸、血小板活性化因子、およびエイコサノイドなどのホスホリピックホルモン）；筋弛緩剤（例えば、シンナメドリン、シクロベンザブリン、フラボキサート、オルフェナドリン、パパベリン、メベベリン、イダベリン（idaverine）、リトドリン、デフェノキシラート（dephenoxylate）、ダントロレン、およびアズモレン（azumolen））；鎮痙薬；骨活性薬（例えば、ジホスホナートおよびホスホノアルキルホスフィナー

ト薬化合物) ; 内分泌調整薬(例えば、避妊剤(例えば、エチノジオール、エチニルエストラジオール、ノルエチンドロン、メストラノール、デソゲストレル、メドロキシプロゲステロン)、糖尿病のモジュレータ(例えば、グリブリドまたはクロルプロパミド)、テストラクトンまたはスタノゾロールなどのアナボリック、アンドロゲン(例えば、メチルテストステロン、テストステロン、またはフルオキシメステロン)、抗利尿薬(例えば、デスモプレッシン)、並びにカルシトニン)を含むことができる

【0245】

また、エストロゲン(例えば、ジエチルスチルベストロール)、糖質コルチコイド(例えば、トリアムシノロン、ベタメタゾンなど)、およびノルエチンドロン、エチノジオール、ノルエチンドロン、レボノルゲストレルなどのプロゲストーベン(progenstogens)も本発明において有用であり; 甲状腺の薬剤(例えば、リオチロニンまたはレボチロキシン)または抗甲状腺薬(例えば、メチマゾール) ; 抗高プロラクチン血症薬(例えば、カベルゴリン(cabergoline)) ; ホルモン抑制因子(例えば、ダナゾールまたはゴセレリン)、分娩促進薬(例えば、メチルエルゴノヴィンまたはオキシトシン)、並びにミオプロストール(mioprostol)、アルプロスタジル、またはジノプロストンなどのプロスタグランジンも使用することができる。

【0246】

その他の有用な認識部分は、免疫調節性の薬物(例えば、抗ヒスタミン剤、ロドキサミド(Iodoxamide)および/またはクロモリンなどの肥満細胞安定剤、ステロイド(例えば、トリアムシノロン、ベクロメタゾン、コルチゾン、デキサメサゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ベクロメタゾン、またはクロベタゾール)、ヒスタミンH₂アンタゴニスト(例えば、ファモチジン、シメチジン、ラニチジン)、免疫抑制薬(例えば、アザチオプリン、シクロスボリン)などを含む。スリンダク、エトドラク、ケトプロフェン、およびケトロラクなどの消炎作用を有するその他の群も使用される。本発明と組み合わせて使用される他剤は、当業者には明らかであろう。

【0247】

認識成分がキレート剤、クラウンエーテル、またはシクロデキストリンであるときは、ホストゲスト化学は、認識部分と分析物の間の相互作用を支配すると考えられる。ホストゲスト化学の使用により、相当程度の認識部分-分析物の特異性を本発明の装置に設計することができる。特異的な化合物に結合する化合物の使用は、当業者にとって周知である。例えば、Pittら、*The Design of Chelating Agents for the Treatment of Iron Overload*、*INORGANIC CHEMISTRY IN BIOLOGY AND MEDICINE* ; Martel, A. E.編 ; American Chemical Society, Washington, D.C., 1980, pp. 279-312 ; Lindoy, L. F., *THE CHEMISTRY OF MACROCYCLIC LIGAND COMPLEXES* ; Cambridge University Press, Cambridge, 1989 ; Dugas, H., *BIOORGANIC CHEMISTRY* ; Springer-Verlag, New York, 1989およびその中に含まれる参照を参照されたい。

【0248】

さらに、その他の分子に対するキレート剤、クラウンエーテル、およびシクロデキストリンを付着させることができる多くの経路が、当業者に利用可能である。例えば、Mearesら、*Properties of In Vivo Chelate-Tagged Proteins and Polypeptides*、*MODIFICATION OF PROTEINS: FOOD, NUTRITIONAL, AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS* ; Feeney, R. E., Whitaker, I. R.編, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982, pp. 370-387 ; Kasinaら、*Bioconjugate Chem.* 9: 108-117 (1998) ; Songら、*Bioconjugate Chem.* 8: 249-255 (1997) を参照されたい。

【0249】

好みの本態様において、認識部分は、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)またはジエチレントリアミンペント酢酸(DTPA)などのポリアミノカルボキシレートキレート薬である。これらの認識部分は、例えば、商業的に入手可能なジアンヒドリド(Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI)を利用することによって、SAMまたはスペーサー・アームの任意のアミンで終わる成分に付着することができる。

10

20

20

30

30

40

40

50

【0250】

なおさらなる好ましい態様において、認識部分は、タンパク質、核酸、リン脂質脂肪酸誘導体、ペプチド、または抗体などの生体分子である。本発明の実施に有用な生体分子は、任意の供与源に由来することができる。生体分子は、天然の供与源から単離することができ、または合成法によって製造することができる。タンパク質は、天然のタンパク質または変異したタンパク質であることができる。突然変異は、化学的突然変異誘発、部位特異的変異誘発、または当業者に既知の突然変異を誘導するその他の手段によって生じさせることができる。本発明を実施する際に有用なタンパク質は、例えば、酵素、抗原、抗体、構造タンパク質、転写制御因子、および受容体を含む。抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルのいずれかであることができる。ペプチド、脂質、炭水化物、および核酸は、天然の供与源から単離することができ、または完全にまたは部分的に合成起源の物であることができる。

【0251】

認識部分がタンパク質または抗体である態様において、タンパク質は、タンパク質の表面上で利用できるいずれかの反応性ペプチド残基によって、SAM成分またはスペーサー・アームにつなぐことができる。好ましい態様において、反応基は、アミンまたはカルボキシレートである。特に好ましい態様において、反応基は、リジン残基のε-アミン基である。さらに、これらの分子は、非特異的な相互作用（例えば、化学吸着、物理吸着）によって基体またはSAMの表面上に吸着させることができる。

【0252】

抗体である認識部分は、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、リン脂質、リポ多糖、糖、または薬物などの小分子、除草剤、殺虫剤、感染因子、化成物、および戦争の薬剤である分析物を認識するために使用することができる。特異的な分子に対する抗体を生じさせる方法は、当業者に周知である。米国特許第5,147,786号；第5,334,528号；第5,686,237号；第5,573,922号を参照されたい；それぞれ、参照として本明細書に組み入れられる。また、表面に抗体を付着するための方法も当該技術分野において既知である（Delamarcheら、Langmuir 12: 1944-1946 (1996) を参照されたい）。

【0253】

ペプチドおよび核酸は、SAM成分またはスペーサー・アームに付着することができる。天然由来および合成のペプチドおよび核酸が本発明と組み合わせて使用される。これらの分子は、任意の利用できる反応基によってSAM成分またはスペーサー・アームに付着することができる。例えば、ペプチドは、アミン、カルボキシル、スルフヒドリル、またはヒドロキシル基を介して付着することができる。このような基は、ペプチド鎖に対するペプチド末端に、または部位内部に存在し得る。核酸は、塩基の反応基（例えば、環外のアミン）または糖部分の利用できる水酸基（例えば、3'-または5'-ヒドロキシル）を介して付着することができる。多糖体、リン脂質、脂肪酸誘導体、およびその他の脂質を糖残基または脂質部分のヒドロキシル基を経て、並びにカルボキシル基またはアミノ基を経て付着することができる。ペプチドおよび核酸鎖は、1つまたは複数の部位でさらに誘導体化して、適切な反応基を鎖上へ付着させることができる（Chrisselら、Nucleic Acids Res. 24: 3031-3039 (1996) を参照されたい）。

【0254】

ペプチドまたは核酸が完全にまたは部分的に合成分子であるときは、反応基またはマスクされた反応基を合成のプロセスの間に組み込むことができる。ペプチドおよび核酸への反応基の組み入れに適した多くの誘導体化された単量体が当業者に既知である（例えば、THE PEPTIDES: ANALYSIS, SYNTHESIS, BIOLOGY, Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Gross, E. および Melenhofer, J. 編, Academic Press, New York (1980) を参照されたい）。多くの有用な単量体が商業的に入手可能である（Bachem, Sigma他）。このマスクされた基は、合成に続いて、次いでマスクを取ることができ、その時にSAM成分またはスペーサー・アームとの反応のためにこれを利用することができる。

【0255】

10

20

30

40

50

その他の好ましい態様において、ペプチドは、直接基体に付着される (Freyら、Anal. Chem. 71. 68 : 3187-3193 (1996) を参照されたい)。特に好ましい態様において、ペプチドは、システイン残基上のスルフヒドリル基を介して金基体に付着される。もう一つの好ましい態様において、ペプチドは、チオールを介して、例えば、ヨードアセトアミド、クロロアセトアミド、ヨウ化ベンジル、臭化ベンジル、ヨウ化アルキル、または臭化アルキルで終了するスペーサー・アームに付着される。同様の固定化技術が当業者に既知である (例えば、Zullら、J Ind Microbiol. 13 : 137-143 (1994) を参照されたい)。

【0256】

もう一つの好ましい態様において、認識部分は、関心対象の分析物と包接錯体を形成する。特に好ましい態様において、認識成分は、シクロデキストリンまたは修飾されたシクロデキストリンである。シクロデキストリンは、多くの微生物によって産生される一群の環状のオリゴ糖である。シクロデキストリンは、バスケット様の形状を有する環構造を有する。この形状により、シクロデキストリンはこれらの内部孔部に多くの種類の分子を含むことができる (例えば、Szejtli, J., CYCLODEXTRINS AND THEIR INCLUSION COMPLEXES ; Alcademias Klado, Budapest, 1982 ; およびBenderら、CYCLODEXTRIN CHEMISTRY, Springer-Verlag, Berlin, 1978を参照されたい)。

【0257】

シクロデキストリンは、例えば、薬物、殺虫剤、除草剤、および戦争の薬剤を含む有機分子のアレイと共に包接錯体を形成することができる (Tenjarlaら、J Pharm. Sci. 87 : 425-429 (1998) ; Zughulら、Pharm. Dev. Technol. 3 : 43-53 (1998) ; およびAlbersら、Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 12 : 311-337 (1995) を参照されたい)。重要なことに、シクロデキストリンは、これらの包接錯体中の化合物の鏡像異性体を区別することができる。したがって、1つの好ましい態様において、本発明は、鏡像異性体の混合物中の特定の鏡像異性体の検出を提供する (Koppenhoeferら、J. Chromatogr. A 793 : 153-164 (1998) を参照されたい)。

【0258】

シクロデキストリン認識部分は、スペーサー・アームを介してSAM成分に、または直接基体に付着することができる (Yamamotoら、J. Phys. Chem. B 101 : 6855-6860 (1997) を参照されたい)。シクロデキストリンをその他の分子に付着する方法は、クロマトグラフィーおよび薬学の技術分野において当業者に周知である (Sreenivasan, Appl. Polym. Sci. 60 : 2245-2249 (1996) を参照されたい)。

【0259】

IV. メソゲン層

メソゲン層を形成する任意の化合物または化合物の混合物は、本発明と組み合わせて使用することができる。メソゲンは、サーモトロピックなまたはリオトロピックな液晶を形成することができる。メソゲン層は、連続的であることができ、またはパターン化することができる。

【0260】

サーモトロピックおよびリオトロピックな液晶はいずれも、ネマチック状態、キラルなネマチック状態、スマクチック状態、極性のスマクチック状態、キラルなスマクチック状態、フラストレーション相 (frustrated phases)、およびディスコチック相 (discotic phases) を含む多くの形態で存在することができる。

【0261】

(表1) 液晶アッセイ装置に使用するために適したメソゲンの分子構造

メソゲン	構造
アニサルダジン	$\text{CH}_3\text{-O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH=N-N=CH-C}_6\text{H}_4\text{-O-CH}_3$
NCB	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}-\text{C}_6\text{H}_4\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CN}$
CBOOA	$\text{C}_9\text{H}_{19}\text{-O-C}_6\text{H}_4\text{-N=CH-C}_6\text{H}_4\text{-CN}$
Comp A	$\text{C}_7\text{H}_{15}-\text{C}_6\text{H}_4\text{-C}_6\text{H}_4\text{-COO-C}_6\text{H}_4\text{-NCS}$
Comp B	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{-O-C}_6\text{H}_4\text{-O-CO-C}_6\text{H}_4\text{-O-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CN}$
DB ₇ NO ₂	$\text{C}_7\text{H}_{15}-\text{C}_6\text{H}_4\text{-O-CO-C}_6\text{H}_4\text{-O-CO-C}_6\text{H}_4\text{-NO}_2$
DOBAMBC	$\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{-O-C}_6\text{H}_4\text{-CH=N-C}_6\text{H}_4\text{-CH=CH-COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(C}_2\text{H}_5\text{)}\text{CH}_3$
<i>n</i> Om <i>n</i> =1, <i>m</i> =4: MBBA <i>n</i> =2, <i>m</i> =4: EBBA	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{-O-C}_6\text{H}_4\text{-CH=N-C}_6\text{H}_4\text{-C}_m\text{H}_{2m+1}$
<i>n</i> OBA <i>n</i> =8: OOBA <i>n</i> =9: NOBA	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{-O-C}_6\text{H}_4\text{-COOH}$
<i>nm</i> OBC	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{-O-CO-C}_6\text{H}_4\text{-C}_6\text{H}_4\text{-O-C}_m\text{H}_{2m+1}$
<i>n</i> OCB	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{-O-C}_6\text{H}_4\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CN}$
<i>n</i> OSI	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{-O-C}_6\text{H}_4\text{-C}_6\text{H}_4\text{-COO-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(C}_2\text{H}_5\text{)}\text{CH}_3$
98P	$\text{C}_3\text{H}_7\text{-[CH}_2\text{(CH}_3\text{)]}_5\text{-O-C}_6\text{H}_4\text{-N=C}_6\text{H}_4\text{-C}_8\text{H}_{17}$
PAA	$\text{CH}_3\text{-O-C}_6\text{H}_4\text{-N=N-C}_6\text{H}_4\text{-O-CH}_3$
PYP906	$\text{C}_9\text{H}_{19}\text{-C}_6\text{H}_4\text{-N=C}_6\text{H}_4\text{-O-C}_6\text{H}_{13}$
<i>n</i> Sm	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{-O-C}_6\text{H}_4\text{-CO-S-C}_6\text{H}_4\text{-C}_m\text{H}_{2m+1}$

10

20

30

40

50

【0262】

現在好ましいメソゲンを表1に示してある。特に好ましい態様において、メソゲンは、4-シアノ-4'-ペンチルビフェニル、N-(4メトキシベンジリジン)-4-ブチルアニリン、およびこれらの組み合わせから選択されるメンバーである。

【0263】

メソゲン層は、実質的に純粋な化合物であることができ、またはメソゲンの特徴を増強または変更するその他の化合物を含むことができる。したがって、1つの好ましい態様において、メソゲン層は、第2の化合物、例えばアルカンをさらに含み、ネマチック相および等方性相が存在する温度領域を超えて膨張する。この組成物のメソゲン層を有する装置の使用により、より優れた温度範囲にわたって分析物認識部分の相互作用を検出することができる。

【0264】

一部の好ましい態様において、メソゲン層は、二色性の色素または蛍光化合物をさらに含む。本発明において有用な二色性色素および蛍光性化合物の例は、アゾベンゼン、BTBP、ポリアゾ化合物、アントラキノン、ペリレン色素などを含むが、これらに限定されない。特に好ましい態様において、蛍光化合物の二色性の色素は、アッセイを読み込むために偏光を必要としないように、液晶の配向依存性を補足するように選択される。一部の好ましい態様において、液晶の吸光度が可視領域である場合、配向の変化は、クロス偏光を伴わない環境照明を使用して観察することができる。その他の好ましい態様において、二色性の色素または蛍光化合物は、蛍光計と組み合わせて使用され、蛍光の変化は、液晶の配

向の中の変化を検出するために使用される。

【0265】

もう一つの好ましい態様において、分析物は、最初に認識部分と相互作用し、メソゲン層は、等方性の相に導入される。その後に、メソゲン層を冷却して、液晶相を形成する。メソゲン層の領域内に分析物が存在すると、ネマチック相と等方性相の間の平衡を害し、これらの部位で異なる割合および程度の核形成を引き起こす。ネマチックと等方性の領域の間の相違は、明白に検出することができる。

【0266】

V. パターン化された（整えられた）液晶

平面および曲面上のメソゲン層をパターン構成するための1つのアプローチは、メソゲン層の極性（表面から間隔をおいて配置される）および方位性（表面の面において）配向の両者を配向するようにパターン化された分子のSAMの使用に基づく。この方法は、単純かつ柔軟であり、表面にSAMをパターン化するための最近確立された任意の手順（例えば、マイクロコンタクト・プリンティングまたはフォト・パターニング）（Talovら、J. Am. Chem. Soc. 115: 5305 (1993); Kumarら、Acc. Chem. Res. 28: 219 (1995)、およびその中の参照；Xiaら、J. Am. Chem. Soc. 117: 3274 (1995)、およびその中の参照；Jackmanら、Science 269: 664 (1995)）を使用することができる。これらの方法のいずれかを使用して、液晶をパターン化するSAMを数百ナノメートルからミリメートルの範囲の大きさに容易に延ばすことができ（Xiaら、J. Am. Chem. Soc. 117: 3274 (1995)およびその中の参照）、メソゲン層の平面の（表面に対して平行）およびホメオトロピック（表面と直角をなす）配向の両方が可能であり；重合体フィルムの研磨に基づく方法は、主にメソゲン層の面内のアラインメントの操作をもたらし、メソゲン層をホメオトロピックに整列させることができない。有用なSAMの1つのクラスでは、液晶のアラインメントのために使用されるポリイミドのフィルムの約半分の表面エネルギー（~19mJ/m²）を有し；低エネルギー表面は、高エネルギーのものよりも分子吸着質およびダスト粒子によって汚染されにくい。また、SAMは、平面ではない表面でパターン化することができる（Jackmanら、Science 269: 664 (1995)）、SAMが形成されるパターン化されたメソゲン構造を曲面上で繰り返すことができる。

【0267】

非平面の表面上にメソゲン層の配向をパターン化する能力により、調整できる複合型回折-屈折装置の製作のための手順が提供される。例えば、回折性および屈折性の光学プロセスの組み合わせに基づいた装置では、無収差またはレンズの色の補正、スペクトルのばらつき、単一の光学エレメントからの画像化、およびその他の光の操作が可能である（Reslerら、Opt. Lett. 21, 689 (1996); S. M. Ebstein, 同書, p. 1454; M. B. Stem, Microelectron. Eng. 32, 369 (1996); Gotoら、Jpn. J. Appl. Phys. 31, 1586 (1992); Magieraら、Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng., 2774, 204 (1996)）。また、曲面上のメソゲン層でパターン化する能力は、広い視野角を有するディスプレイを製作するための経路を提供する。

【0268】

好ましい本態様において、調整できるハイブリッド装置では、光の操作が可能となる。さらに好ましい態様において、装置は、屈折性-折性の装置である。なおさらなる好ましい態様において、装置は、単一の光学エレメントから画像化することができる。さらにもう一つの好ましい態様において、装置は、無収差またはレンズの色の補正が可能である。さらに別の好ましい態様において、装置は、スペクトルをばらつかせることができる。

【0269】

もう一つの好ましい本態様において、SAMは、電極として使用するために適した材料の上に層化される。好ましい態様において、材料は、金属フィルムである。さらに好ましい態様において、金属フィルムは、金フィルムである。

【0270】

本発明のパターン化されたメソゲン層は、電場の使用によって調整することができる。

10

20

30

40

50

好ましい態様において、電場は、可逆的にメソゲン層を配向させるために使用される。なおさらなる好ましい態様において、電場は、メソゲン層の表面に対して垂直に、またはその面に適用される。もう一つの好ましい態様において、配向されたメソゲン層は、層から回析される光の強度を調整する。

【0271】

SAM成分に関する上記の議論では、反応基を有するSAM成分および認識部分を有するSAM成分が本発明の本側面の状況において等しく適用される。したがって、SAMの成分は、任意の多種多様な適切な分子から選択することができる。好ましい本態様において、SAMは、 $R^{21}CH_2(CH_2)_{14}SH$ および $R^{31}CH_2(CH_2)_{15}SH$ であって、式中 R^{21} および R^{31} は、独立して、上記のとおり、水素、反応基、および認識基からなる群より選択されるメンバーであるものを含む。

【0272】

VI. 解析装置

本発明の装置は、有機層または無機層（例えば、金属、金属塩、または金属酸化物）とメソゲン層を接触させることができ任意の配置であることができる。大きさおよび形状における唯一の限界は、装置が使用される状況またはそれが企図される目的から生じるものある。装置は、平面または非平面であることができる。したがって、本発明を実施するために、いかなる数の偏光子、レンズ、フィルター、光などの使用も本発明の範囲内である。

【0273】

多くのメソゲン層の変化は、環境照明下で目視によって検出することができるが、メソゲン層の変化を検出するための任意の手段を本装置に組み込み、または組み合わせて使用することができる。したがって、メソゲン層の変化の検出を助けるために、種々の光の供与源、顕微鏡、分光測定、電気技術などの使用も本発明の範囲内である。

【0274】

スペクトルの可視領域の光を利用する態様において、光は、単にメソゲン層の細部を照らすために使用することができる。代わりに、光は、メソゲン層を通過させることができ、透化され、吸収され、または反射される光の量を測定することができる。装置は、米国特許第5,739,879号（参照として本明細書に組み入れられる）に記述されたものなどのバックライティング装置を利用することができる。また、紫外線および赤外線領域の光も本発明に有用である。

【0275】

したがって、もう一つの側面において、本発明は、ハロ有機硫黄を含むメソゲン層の光学集合組織を変化させるための方法を提供する。メソゲン層の光学集合組織は、ハロ有機硫黄のハロゲン含量を選択することによって制御される。以下の節では、本発明に従った多くの新規装置を記述してある。

【0276】

A. 被覆されたスライド

一部の態様において、本発明のアッセイ装置は、光が通過することができる基体（例えば、透明および不透明な基体）上に、本明細書の種々のアッセイ形式を被覆することによって作製される。本発明は、任意の特定のタイプの基体の使用に限定されない。実際に、シリカおよび石英基板を含む（しかし、これらに限定されない）種々の基体の使用が想定される。一部の態様において、基体は、商業的に入手可能なスライド（例えば、顕微鏡スライド）と同じ寸法を有すし、一方で、その他の態様において、基体の寸法は、最終用途または基体を解析するために使用される器械のタイプ（例えば、プレートリーダー）に対応して多様である。

【0277】

好ましい態様において、異方性の整列領域（すなわち、分析ゾーン）は、スライド上にアッセイ形式の被覆前または後に、スライド上に作製する。いずれにせよ、異方性の整列領域には、液晶を配向させる。好ましい態様において、異方性の整列領域は、実質的に基

10

20

30

40

50

体表面の全てを占めるが、その他の態様において、分離した異方性の領域が形成される。このような領域を作製する方法は、本明細書の他の場所に更に詳細に記述されており、金などの金属の斜方沈着、布または研磨材のような軟らかい材料による基体表面の研磨、研磨粒子（例えば、シリカ）を含むガス流によるナノ剥離、液体によるエッティング、および基体上へのタンパク質の固定化に続く研磨を含むが、これらに限定されない。

【0278】

本発明は、任意の特定の数の異方性の整列領域に限定されない。実際に、このような領域の数、または分析ゾーンは、1から複数のゾーンで変化させることができる（例えば1から1534のゾーン）。一部の態様において、分析ゾーンは、標準的な市販のマルチウェル・プレート寸法および空間分布に対応している。この分析ゾーンの分布により、市販のマルチウェル・プレートリーダーで解析できることが想定される。その他の態様において、分析ゾーンは、標準的なマルチウェル・プレートのウェルの寸法よりも小さくまたは大きくすることができる。さらなる態様において；分析ゾーンは、顕微鏡の対物レンズ（例えば、5×、10×、または20×対物レンズ）の視界に対して少なくとも同じ寸法に対応している。この配置により、自動化された顕微鏡観察系での組込みが容易になることが想定される。

【0279】

一部の好ましい態様において、異方性の領域が作製された基体は、被覆材料で被覆される。一部の態様において、被覆は、シルクスクリーンプリント法、フレキソ印刷プリント法、マイクロコンタクトプリント法、セリアグラフプリント法、インクジェット式プリント法、インタリゴプリント法、オフセットプリント法、ハイデルベルク・プレス・プリント法、および温熱レーザープリント法などの商業上既知の手順の使用によって達成される。本発明は、いずれの特定の被覆材料の使用に限定されない。実際に、疎水性の被覆材料、親水性の被覆材料、電気伝導エレメントを含む被覆材料、および電気絶縁材料することを含む被覆材料を含む種々の被覆材料の使用が想定される。このような材料の特定の例には、ポリウレタン、ポリエチレン、GORTEX（ポリテトラフルオロエチレン）、DACRON（ポリエチレンテトラフタラート）、TEFLON（ポリテトラフルオロエチレン）、PVDF（ポリフッ化ビニリデン）、BSAなどのタンパク質、ラテックス、ポリスチレン、シリコーン、セルロース、およびニトロセルロースを含むが、これらに限定されない。好ましい態様において、被覆材料は、本明細書の他の場所に更に詳細に記述したアッセイ形式を形成するために適用される。なおさらなる態様において、被覆材料は、ミクロな液体のチャネルを作製するために適用される（例えば、米国特許第6,509,085号を参照し、これは参照として本明細書に組み入れられる）。必要な場合、被覆材料は、基体に適用後に硬化される（例えば、UV照射または赤外線によって）。

【0280】

適用される被覆材料の厚さは、変化させることができる。一部の好ましい態様において、厚さは、約1マイクロメートル～約100マイクロメートルであり、より多くの好ましい態様において、厚さは、約5マイクロメートル～約35マイクロメートルまであり、および最も好ましい態様において、厚さは、約20マイクロメートル～約25のマイクロメートルである。

【0281】

さらなる好ましい態様において、非被覆領域は、光を透過するが、被覆領域は、実質的に光の透過を遮断するように、色素を被覆材料に含ませる。本発明は、任意の特定の色素の使用に限定されない。実際に、黒、赤、および青の色素を含む種々の色素の使用が想定される。

【0282】

一部の態様において、第2の未処置のまたは処理された基体（例えば、ガラススライド）が、硬化前に被覆スライドに配置される。次いで、硬化により、2つの基体がお互いに接着するように、圧力を基体に適用する。一部の態様において、圧力は、ローラーを介して基体を移送することによって適用される。次いで、対となった基体は、硬化して光学セ

10

20

30

40

50

ルを生じる。

【0283】

なおさらなる態様において、被覆材料は、圧感接着剤を含む。一部の態様において、圧感接着剤を含む被覆材料は、1から複数の分析ゾーンを定義する。一部の態様において、圧感接着剤を含む被覆材料は、色素をさらに含む。好ましい態様において、色素は、黒である。なおさらなる態様において、圧感接着剤を含む被覆材料は、重合性の被覆材料（例えば、アクリルまたはTEFLON重合体）を含み、複合型被覆材料を提供する。一部の好ましい態様において、圧感接着剤は、低粘着度である。

【0284】

その他の態様において、圧感接着剤は、もう一つの被覆材料によるプリント後に、基体上にプリントされる。基体上にプリントされる圧感接着剤のパターンは、種々の配置を有することができる。例えば、一部の態様において、圧感接着剤は、分析ゾーン周辺で矩形の外形線にプリントされる。その他の態様において、圧感接着剤は、基体の周囲の複数の点に適用される。さらに他の態様において、圧感接着剤は、分析ゾーンを含む第1の基体をカバーために使用される第2の未処置の基体のみに適用される。一部の態様において、圧感接着剤は、光学セルの構築の前に取り除くことができる取り外し可能な裏材を含む両面テープである。その他の態様において、両面テープは、取り外し可能な裏材を含まない。

【0285】

上記の通り、好ましい態様において、被覆材料は、ミクロな液体を作製するために適用される。一部の態様において、ミクロな液体のチャネルにより、基体上の進入ポートに配置された試料の分析ゾーンへの流体の移動が可能となる。一部の好ましい態様において、基体上部は、試料、リンス溶液、または液晶溶液を受けるための貯蔵所を含む。ミクロな液体のチャネルは、貯蔵所および排出口の終端と流体連通されている。好ましい態様において、ミクロな液体のチャネルは、チャンバー圧力の小さな変異によって、流速にこれといった影響を与えないような寸法である。

【0286】

ミクロな液体のチャネルを介した液体（例えば、試料、洗浄液溶液、または液晶）のデリバリーのための原動力は、シリンジポンプ、ディスポーザブルなメディセル（Medicell）ポンプ、排出口でのウィッキング材料の配置、ドロップ・ポンピング（すなわち、小さな滴から大きな滴への移動）、入口の上の液体カラムの上に配置、入口での陽圧の配置、および／または排出口での陰圧の配置を含む（しかし、これらに限定されない）さまざまな方法で供給される。陽圧は、空気ポンプまたはポンベ入りガス（例えば、窒素気体）と組み合わせて実質的にかなり封緘されたチャンバーを使用することによってデリバリーすることができる事が想定される。同様に、陰圧は、真空ポンプと組み合わせて実質的に封緘されたチャンバーを使用することによってデリバリーすることができる。減圧は、流水およびベンチュリ管バルブの使用、ACまたはDCポンプ、バネを充填したネガティブ・シリンジポンプ、または弾性を有するバルブ・シリンジ・ピベッターなどの変形可能なバルブを含む（しかし、これらに限定されない）種々の方法によって適用されてもよい。

【0287】

一部の態様において、少なくとも1つのマイクロチャネルをその中に有する基体を含むアッセイ装置は、試料中の分析物の量を定量するために利用される。これらの態様は、任意の特定の方法にて製造されたアッセイ装置に限定されない点に注意しなければならない。例えば、一部の態様において、マイクロチャネルを含むアッセイ装置は、プリントによって製造されるが、その他の態様において、マイクロチャネルを含むアッセイ装置は、微小成形（micromolding）またはリソグラフィーによって製造される。一部の態様において、マイクロチャネルは、液晶を配向させる少なくとも1つの表面を含む。このような表面は、ナノ研磨、摩擦、および金属の斜方沈着を含む（しかし、これらに限定されない）種々の手段によって製造されてもよい。さらなる好ましい態様において、液晶を配向させる表面を含むマイクロチャネルは、認識部分で装飾される。認識部分を付着するための方法

10

20

30

40

50

は、上に詳述してある。必要に応じて、基体は、好ましくは、マイクロチャネルに試料、
アッセイ試薬（例えば、メソゲン）、および洗浄溶液を導入するための貯蔵所および出入
り口を含む。それぞれの場合において、貯蔵所または出入り口は、マイクロチャネルに対して液体連通されている。

【0288】

操作の際には、分析物を含有することが疑われる試料を、試料中に存在する分析物が認識部分に結合することができる条件下で、マイクロチャネルを通して流させる。次いで、メソゲンをマイクロチャネルに適用し、液晶の整列の存在または非存在について、基体を解析する。液晶の解析は、レンズを備えている顕微鏡およびプレートリーダーを含む（しかし、これらに限定されない）本明細書に更に詳細に記述された任意の手段によって行うことができる。認識部分-基体結合が存在する領域は、液晶が整列されていないことによって同定されるが、結合がない領域は、整った液晶の存在によって同定されることが想定される。さらに、試料は、ミクロな液体のチャネルに沿って流れるため、結合は、チャネルの遠位端とは逆に、チャネルへの侵入点でより大きい。換言すれば、試料中の分析物の量は、試料がチャネルに沿って流れるにつれて減少する。この効果は、試料中の分析物の量を定量するために使用されてもよく、これは、液晶の整列が崩壊されるマイクロチャネル全体の長さに比例する。

【0289】

一部の態様において、試料中の分析物の量の正確な定量を提供するために、段階希釈した試料を同時に適用してもよいように、基体は、複数のマイクロチャネルを含む。その他の態様において、試験試料を、別々のミクロな液体のチャネルに同時に試料を流して、対照試料と比較する。液晶の乱れが崩壊されているマイクロチャネルの領域における相違は、試験試料中の分析物の量に比例する。実施例5では、この方法の例を提供する。

【0290】

B. プレートリーダー

本発明は、分析物の結合によるメソゲンの配向の変化を検出するためのプレートリーダーの使用を想定する。プレートリーダーは、本明細書に記述されているLCアッセイ装置と、および更に米国特許第6,171,802号に記述した（参照として本明細書に組み入れられる）リオトロピックLCアッセイ法と連動して使用されてもよい。特に、本発明は、透過され、または反射された光を定量することに基づいて、液晶のフィルムを通過する光の透過を定量するための方法およびプロセスを含む。

【0291】

本発明は、任意の特定の作用機序に限定されない。実際に、作用機序の理解は、本発明を実施するために必要とされない。それにもかかわらず、整えられたナノ構造基体は、これらの表面上に配置された液晶の薄いフィルムに対して整列を伝えることが想定される。これらの整えられた液晶のフィルムは、これらを通過する偏光面を保存する。液晶が90度ねじれた歪みなどの明確な歪みを有する場合、液晶は、明確かつ予測可能な方法で透射光の偏光を変化すると考えられる。整えられた液晶のフィルムは、他と異なる特異的な光の波長を吸収する（ランダムに整えられた液晶のフィルムと比較して）ことがさらに想定される。

【0292】

本発明の一部の態様において、LCアッセイ装置の検知面（すなわち、認識部分で装飾される表面）に結合した標的分子または分子の量は、検知面と接触している試料中に存在する標的分子の濃度／量と共に増加する。好ましい態様において、結合した標的分子の量により、下にあるナノ構造検知基体の性質によって整えられた液晶の薄いフィルムに導入される乱れの程度が変化する。一部の態様において、液晶の薄いフィルムに存在する整列の程度により、クロス偏光で見たときに、フィルムを透過する光の量を決定する。その他の態様において、特異的な光の波長を使用して見たときに、液晶の薄いフィルムに存在する整列の程度により、フィルムを透過する光の量を決定する。さらに他の態様において、液体との界面の反射率は、液晶の配向によって変化し得る。したがって、一部の態様において

10

20

30

40

50

て、LCアッセイ装置の斜照明を利用して、反射された光の収集および解析を行う。

【0293】

したがって、本発明は、クロスまたは平行偏光で見たときに、LCアッセイ装置を通る光の透過、適切な波長の光で照明されたLCアッセイ装置を通る光の透過、またはLCアッセイ装置の表面から反射する光（すなわち、特異的な波長の偏光または非分極光）を検出するためのプレートリーダーの使用を想定する。特に好ましい態様において、LCアッセイと連動して使用されるように設計されたプレートリーダーが提供される。本発明のその他の態様では、LCアッセイの読み込みに適応されたELISAリーダーおよび蛍光定量的なリーダーなどの修飾された商業的に入手可能なリーダーを提供する。

【0294】

本発明に使用するため適応されたプレートリーダーの非限定の例は、国際公開公報第03/019,191号において見いだされ、これは本明細書に参照として組み入れられる。好ましい態様において、2つの偏光フィルターが、クロスまたは平行偏光の配置にプレートリーダーの光学経路に配置される。一方のフィルターは、試料を通過する前に光経路の放射側に配置され、一方、第2の偏光フィルターは、光が試料を通過した後に、しかし光ダイオード、光電子増倍管、またはCCDなどの検知装置によって収集される前に、光の経路の解析側に配置されている。LCアッセイ装置内の整えられた液晶は、偏光面を維持し、光の収集装置および検出装置に達する光の量は、クロス偏光を介して見たときに著しく減少され、または平行偏光で見たときに著しく強められる。LCアッセイ装置の液晶のランダムな組織化では、クロス偏光を通過して収集装置および検出装置に達する光の偏光面および量は、比較的影響を受けない。したがって、好ましい態様において、LCアッセイ装置の認識部分による標的分子の結合は、LCの薄いフィルムの上に、結合した標的分子の量と共に増大する乱れを導入する。その他の好ましい態様において、整えられた領域上に細胞が存在すると、LC上に乱れを導入する。その他の態様において、特異的なバンドパスフィルタ、光が試料に出会う前に光路の励起側に、並びに光路の発光側に配置される（光が通過した後に、または試料によって反射されるが、光の収集装置および検出装置（例えば、光ダイオード、光電子増倍管、またはCCD）に達する前に配置される。この配置は、反射され、および透過された光を定量するために有用である。

【0295】

また、本発明は、プレートリーダーに使用するため構成されたLCアッセイ装置を提供する。好ましい態様において、LCアッセイ装置は、標準的な商業的に入手可能なプレート（例えば24、96、384、1536ウェルプレート）の寸法に従ってフォーマットされまたは配列される。一部の態様において、LCアッセイ装置は、所与の市販のリーダーに正確フィットする適切な外寸の表面（例えば、認識部分が付着した基体）を含む。一部の態様において、基体は、その表面全体に一様な形態を含み、その他の態様において、基体は、その表面全体に形態の勾配を含むが、さらにその他の態様において、形態の領域は、市販のプレートリーダーによって読み出される領域に対応した分離された領域に限定される。認識部分は、基体表面上に、任意の適切な配置で配列されてもよい。例えば、一部の態様において、単一の結合抗体、ポリペプチドもしくはタンパク質、リン脂質、ポリヌクレオチド、または炭水化物を表面全体に均一に分布させる。その他の態様において、単一の結合抗体、ポリペプチドもしくはタンパク質、リン脂質、ポリヌクレオチド、または炭水化物を表面全体に勾配にして分布させる。さらに他の態様において、単一の結合抗体、ポリペプチドもしくはタンパク質、リン脂質、ポリヌクレオチド、または炭水化物を市販のリーダーによる読み込まれる適切なアラインメントに分離した点で配列させる。なおさらなる態様において、種々の異なる単一の結合抗体、ポリペプチドもしくはタンパク質、リン脂質、ポリヌクレオチド、または炭水化物を市販のリーダーによって読み込まれる適切なアラインメントに点で配列させる。さらに他の態様において、種々の異なる単一の結合抗体、ポリペプチドもしくはタンパク質、リン脂質、ポリヌクレオチド、または炭水化物を表面に沿ったゾーンに配列させる。それぞれのゾーンは、異なるポリペプチドもしくはタンパク質、細胞受容体、または結合配列を含む。プレートは、予め定められた点（例えば、96ウ

10

20

30

40

50

エルプレートのウェルの位置に対応する点)で読み込まれる。プレートリーダーの配置に對してゾーンを設計することにより、どの「ウェル」表示が、それぞれのゾーンに対応するかが既知となる。その他の態様において、多くのナノ構造検知表面を含む特異的に設計されたウェル挿入物(商業的に入手可能な6、12、24、96、384、または1536ウェルプレートで使用されるためのもの)が、LCアッセイ法を行うための商業的に入手可能なマルチウェル・プレートと組み合わせて使用されると考えられる。

【0296】

一部の態様において、プレートリーダーは、ミクロな液体のチャネルの反応面を同定するために利用される。これらの態様において、基体の中の1つまたは複数のミクロな液体のチャネルの位置が、市販のマルチウェル・プレートの列およびウェルの位置と対応する基体が提供される。次いで、プレートリーダーは、ミクロな液体のチャネルに沿ってディスクリート(discreet)領域を読み込むために利用される。この方法により、所与の反応(すなわち、認識部分に対する分析物の結合)を生じるマイクロチャネルに沿って遠くても検出できることが想定される。次いで、存在する分析物の量を定量するために反応の距離を使用することができる。読み出しの空間分解能は、ミクロな液体のチャネルに沿ってより多くの領域を読み出すことによって増大することができるが認識される。これは、1534ウェルプレートを読み出すように構成されたプレートリーダーを利用することによって達成することができる。

【0297】

さらに、一部のマイクロプレートリーダーは、読み取りエレメントがマルチウェル・プレートのウェル位置に對応して割り当てられた診断領域のスキャンを行う走査モードを有する。本発明は、反応面が同定されるように、ミクロな液体のチャネルに沿って多数の位置から読み込むための、このようなリーダーの使用を想定する。または、走査型リーダーは、反応面を同定するためにミクロな液体のチャネルの長さを走査するために利用される。同様に、プレートリーダーは、分析物に曝露された基体の表面上における反応の直線的な領域を測定するために使用することができる。本態様において、反応は、ミクロな液体のチャネルに限られず、代わりに、基体表面上の1つまたは複数の領域全体に進むことができる。次いで、反応(例えば、細胞の遊走による液晶の整列の乱れ)が生じた1つまたは複数の領域の範囲を決定するために、プレートリーダーにプログラムされた多数の分析ゾーンが読み出される。ソフトウェアは、プレートリーダーの検出エレメントの位置および動作、並びにその後のバイオフォトニックアウトプットの解析の両者を最適化するように修正することができる。例えば、検出エレメントは、予め定められた分析ゾーンから、市販のプレートリーダー(例えば、24、96、384、または1536プレートのウェル位置に對応する)によって現在使用される、多数のディスクリート読み、もしくは連続的な直線的なスキャンを獲得するようにプログラムし、またはこの文書に詳述したアッセイ法に使用するための新規のプレート・デザインと対応する新規の位置から読みを獲得するようにプログラムすることができる。これらの装置および方法は、液晶アッセイに使用するために限定されず、代わりに、蛍光性、比色、および濃度測定アッセイ法などの異なるアッセイ法に広く適用できることが認識される。

【0298】

また、本発明は、プレートリーディング装置およびLCアッセイ装置を含むアッセイ系であって、プレートリーディング装置およびLCアッセイ装置は、LCアッセイ装置の少なくとも1つの表面を通過し、または表面から反射される、プレートリーディング装置から提供される光がプレートリーディング装置の検出ユニットによって検出されるアッセイ系を提供することが認識される。適切な検出ユニットは、CCDs、光ダイオード、および光電子増倍管を含む。

【0299】

本発明に従って修正されてもよい商業的に入手可能なプレートリーダーは、Nalge Nunc International Corporation (Rochester, NY)、Greiner America, Inc. (Lake Mary, FL)、Akers Laboratories Inc., (Thorofare, NJ)、Alpha Diagnostic Internationala

10

20

30

40

50

I, Inc. (San Antonio, TX)、Bioteck Instruments, Inc., (Winooski, VT)、Tecan U.S. (Durham, NC)、およびQiagen Inc. (Valencia, CA) を含むが、これらに限定されない。

【0300】

3. マルチウェル・プレートリーダーと共に使用するための基体ホルダー

一部の態様において、本発明は、マルチウェル・プレートリーダーと使用するための基体ホルダーを提供する。好ましい態様において、スライドホルダーの寸法は、市販のマルチウェル・プレートの基体寸法と一致し、その結果、基体（例えば、スライドまたはスライドから作製された光学セル）は、マルチウェル・プレートリーダーに配置されたホルダーおよびホルダーに配置することができる。一部の態様において、基体ホルダーは、複数の基体（例えば、2~4基体）を受けるように構成される。一旦、基体を含む基体ホルダーが、プレートリーダーに配置されると、解析ゾーンをプレートリーダーで読み取ることができる。したがって、好ましい態様において、個々の基体は、基体の分析ゾーンが、市販のマルチウェルのウェルの間隙の位置と対応するような位置に保持される。基体ホルダーは、ステンレス、チタン、アルミニウム、アルミニウム合金、プレキシガラスまたはポリカーボネートなどの重合物質、木材、およびガラスを含む（しかし、これらに限定されない）種々の材料から構築することができる。

【0301】

本発明のアッセイ基体ホルダー（100）の1つの態様を図48に示してある。アッセイ基体ホルダー（100）は、支持体表面（200）を含む。好ましい態様において、支持体表面（200）の寸法は、市販のマルチウェル・プレートの寸法と実質的に同じである。換言すれば、支持体表面（200）のフットプリントは、市販のマルチウェル・プレートのフットプリントと実質的に同じである。さらなる好ましい態様において、支持体表面（200）は、その中にアッセイ基体（400）を挿入することができる少なくとも1つのカットアウト（300）を有する。図示した態様において、アッセイ基体ホルダーは、4つのアッセイ基体を収容し、そのうちの1つを基体ホルダー内に挿入させて示してある。好ましくは、カットアウトの寸法は、アッセイ基体の挿入およびアッセイ基体ホルダーからの取り出しを容易にするために、開放領域（500）が挿入されたアッセイ基体（400）の側面に沿って提供される。図48に示したアッセイ基体（400）は、被覆表面（700）によって定義される結晶を配向させる複数のアッセイ領域（600）を含むプリントされた液晶アッセイ基体である。

【0302】

本発明の基体ホルダーは、本発明の液晶装置での使用に限定されないことが認識される。実際に、比色、蛍光定量、および化学発光によるアッセイ形式を含む（しかし、これらに限定されない）種々のアッセイ形式において基体ホルダーの使用が見いだされる。したがって、分析ゾーンは、各々のこれらの異なるアッセイ形式のそれぞれに使用するために構成することができる。

【0303】

4. 液晶アッセイ装置で使用するための携帯ビューアー

一部の態様において、本発明は、本発明の液晶アッセイ装置と連携して使用するための携帯ビューアーを提供する。好ましい態様において、携帯ビューアーは、ホルダーと共に接眼拡大鏡を含み（例えば、8×または10×拡大鏡）、拡大鏡の焦点にアッセイ装置を設置することができる。一部の好ましい態様において、スライドホルダーは、基体上の分析ゾーンを一様に照明することができる白い拡散スクリーンさらに含む。なおさらなる態様において、拡大鏡は、利用者が反応の距離（例えば、ミクロな液体のチャネルに沿って生じる反応の距離）を測定することができる標線を含む。さらなる好ましい態様において、ホルダーは、異なる分析ゾーンを見る能够ないように、拡大鏡の焦点下で基体を移動することができる。

【0304】

VII. 細胞アッセイ法

以下の節では、本発明の種々の態様をさらに記述する。しかし、本発明は、以下の態様

に態様に限定されることは企図されない。実際に、当業者であれば、容易に細胞の遊走、接着、増殖、および細胞学的な特色的検出に向けて開示された態様を、その他の分野および学問分野の適用に使用するために適用し、適応することができるであろう。

【0305】

A. 細胞接着および増殖アッセイ法

本発明は、基体上に存在する細胞数を決定するために液晶を使用するために有用な多くの態様を想定する。これらの態様により、細胞接着および細胞増殖アッセイを行うことができる事が想定される。好ましい態様において、細胞接着および細胞増殖アッセイ法は、ナノ構造基体であって、その基体上には、その上に適用されたLC層を整えるナノ～ミクロの大きさの粒子を有する表面の播種または装飾によって導入されているナノ構造基体上で行われる。

【0306】

任意の特定の機構または理論に限定されないが、本発明は、これらのアッセイ法において、その表面上に配置されたLCを配向させないように、細胞によって占有される領域が平面とおおよそ同等であることを想定する。したがって、基体上に存在する細胞の数は、表面積に比例すると考えられる。所与の細胞の数によって占められる表面積間の正確な関係は、使用される細胞種および株、並びに使用される培養条件に依存することが想定される。

【0307】

本発明の一部の好ましい態様において、整えられた基体に付着した細胞によって占められる領域は、整列されていない（すなわち、乱れた）液晶の領域によって特徴付けられる。したがって、細胞によって占められる領域は、種々の方法を使用して定量することができる。好ましい態様において、アッセイ装置は、CCD、光ダイオード、または光電子増倍管と連動してクロス偏光を使用して解析される。この系では、乱れがある領域を通って透過する光の量の増大を解析することができる。さらなる好ましい態様において、細胞によって占められた領域を報告するために、特定の光の波長を液晶の薄いフィルムと組み合わせて使用する。

【0308】

さらに本発明のその他の好ましい態様において、液晶の基体は、液晶の基体表面に付着された細胞の存在により、基体の光学的な外見の変化変化を引き起こすように調製される。

【0309】

細胞の接着、増殖、および遊走アッセイ法に適した基体は、摩擦されたタンパク質表面、摩擦された重合体の表面（例えば、組織培養ポリスチレン）、リソグラフィーで作製された原板の微小鋳造によって形成された整えられた重合体基体、金フィルムの斜方沈着、およびナノスタンパーまたはネガティブ・ナノスタンパーを使用する最初の沈着によって整えられた表面に播種されたナノ～ミクロの大きさの粒子またはランダムに表面上に播種され、その後に電場、磁場、および流体の流れによって例示される（しかし、これらに限定されない）原動力によって整えられた粒状物質を含むが、これらに限定されない。細胞接着および増殖アッセイ法に適したさらなる基体は、液晶の基体である。適切な液晶基体は、望ましくは低分子量の液晶、重合体の液晶、リオトロピックもしくはサーモトロピックな液晶、または細胞外マトリックスを含むものなどの生物学的な重合体を含む、液晶および重合体の複合体から調製される。

【0310】

特に好ましい一部の態様において、生物学的な部分は、共有結合性または非共有結合性に基体の表面と結合される。適切な生物学的部分は、糖、タンパク質（例えば、コラーゲンなどの細胞外マトリックスタンパク質、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、オステオポンチン、トロンボスポンジン、細胞接着分子-1 (ICAM-1)、ICAM-2、コンドロイチン硫酸などのプロテオグリカン、フォンビルプラント因子、エンタクチン、フィブリノーゲン、テネイシン、粘膜アドレシン細胞接着分子 (Mucosal adressin cell adhesi

10

20

30

40

50

on molecule: MAdCAM-1)、C3b、およびMDC(メタロプロテアーゼ / ジスインテグリン / システインリッチ)タンパク質)、核酸、特異的な受容体、および細胞受容体認識配列(例えば、RGD、EILDV、LDV、LDVP、IDAP、PHSRN、SLDVP、GRGDAC、およびIDSPなどのカドヘリン、免疫グロブリンスーパーファミリー、セレクチン、ムチンおよびインテグリン結合配列)を含むが、これらに限定されない。一部の態様において、これらの生物学的な部分は、整えられた基体または表面と結合する。その他の態様において、生物学的な部分が結合された表面または基体は、摩擦などの方法によって整えられる。本発明の細胞の接着、遊走、収縮、および増殖の態様における摩擦されたタンパク質 / ペプチド基体表面の使用により、研究者は、これらの成分の影響を調査し、およびアッセイ条件を最適化することができる想定される。例えば、摩擦されたタンパク質基体の使用によって、播種された細胞の接着が促進され、更に細胞機能(例えば、接着、収縮、増殖、および遊走など)が促進されるであろうことが想定される。しかし、一部の態様において、摩擦されたタンパク質基体の相互作用から独立した細胞機能を研究することも望ましく、したがって、一部の態様では、重合性の基体を使用してもよい。本発明のさらに他の態様は、金および微小成形された表面の斜方沈着などの、非生物学的な形態の基体の機能付与および製作により接着されたタンパク質 / ペプチド部分を組み合わせた基体を提供する。

【0311】

本発明の細胞接着および増殖アッセイ法の一部の態様は、実験条件の複製および対照を同時に実施することができる複数の異なるアッセイ領域を提供する。さらに他の好ましい態様において、本発明のアッセイ装置は、標準的な市販のプレートリーダー(例えば、24、96、384、1536などのウェルプレート)に適合するフットプリントを有するように設計される。その他のさらに一部の態様において、市販のプレートおよびプレートリーダーで使用するために、単純なナノ構造挿入物が提供される。

【0312】

B. 細胞遊走アッセイ法

本発明の特定の態様は、対照条件下における、および1つまたは複数の関心対象の化合物に反応する際の、基体上の細胞の遊走(例えば、ランダムな移動、並びに誘引または反発)を定性的および/または定量的に決定するためのアッセイ法を提供する。特に、本発明は、下記に詳しく述べる通り、関心対象の細胞に対する1つまたは複数の試験化合物のポジティブな、中性の、またはネガティブな走化性およびケモキネシスの効果を区別するために最適化された種々のアッセイ形式を想定する。

【0313】

一部の態様において、本発明は、細胞浸潤アッセイ法を提供する。これらのアッセイ法は、腫瘍性の転化および腫瘍型の相対的な積極性(感染度)の指標として有用であることが想定される。これらのインビトロ・アッセイ法は、浸潤を防止/最小化する際の治療薬の有効性を確立するために使用される。一部の好ましい態様は、細胞外マトリックスと組み合わせてナノ構造基体の使用が利用される。図5は、マトリックス(100)の浸潤が、隣接するナノパターン化された領域(200)からの細胞の減少を生じることにより、存在する細胞の相対的な数を報告すると考えられるデザインを示す。パターン化された基体上の細胞数の減少は、隣接するマトリックスが良好に浸潤していることを表す。

【0314】

一部の好ましい態様において、ECM上に液晶を配置することによるECMの浸潤の程度が読み出される。本発明は、任意の特定の作用機序に限定されない。実際に、作用機序の理解は、本発明を実施するために必要でない。それにもかかわらず、ECMへの細胞の浸潤のプロセスにより、ECMの構造に変化が引き起こされ、これが表面に配置された液晶の配向に反映される。なおさらなる本発明の好ましい態様において、ECMは、細胞によるECMの浸潤がない場合に一様にLCを配向させるように、わずかに異方性の構造で調製される。浸潤した細胞によって引き起こされるECMの構造に対する変化は、LCの一様な配向の乱れを引き起こす。本発明のその他の態様において、ECM内への細胞の浸潤のプロセスにより、異方性の構造の導入が生じ、これが表面上に配置されたLCの整列の増大に反映される。

【0315】

本発明のさらに他の態様において、液晶フィルムを整列させるナノパターン化された表面を有する細胞外マトリックスが提供される。図6を参照し、細胞を右手表面上にのみ(100)播種する。細胞(400)によるECM(200)への浸潤(これは、擦り込まれ、プリントされ、鋳造され、または装飾されて、その表面(300)上にLCを整列させるように、その表面上にナノ～ミクロの大きさの粒子が配置されている)により、試験領域のその表面上に配置されたLCフィルムを通る光の透過の変化を生じる(例えば、細胞が初めに播種されてECMにある場合)。図6において、ECM(200)の浸潤により、最初に播種した領域(100)およびECM(100)の両方において、LCメソゲンのアラインメントの変化を生じるであろうことを認めることができる。その表面上の細胞が減少することにより、最初に播種した領域(100)において変化し、従ってLCメソゲンを整列させるためのより広い表面領域が提供される。細胞浸潤によって引き起こされるマトリックスの微妙な変化により、ECM(200)のLCメソゲンの配向の変化を生じ、これは、ナノパターン化された表面に、およびその後にその表面上に配置されたLCの薄いフィルムに含まれるメソゲンに中継されると考えられる。

【0316】

この態様は、また、細胞バイオメカニクスの研究に使用されてもよく、ここでは、細胞の接着、遊走、および収縮によって例示される(しかし、これらに限定されない)プロセスによって引き起こされる表面力学の微妙な変化が、偏光により見ること、および適切なフィルターの使用によって、および特定の波長の光の使用によって観察可能であるLCの配向の変化によって報告されることが想定される。

【0317】

本発明のもう一つの態様において、整えられたLCおよび細胞外マトリックス(ECM)成分から構成されるハイブリッド3次元マトリックスにより、マトリックスによって、またはマトリックス内で細胞機能を維持すると考えられるものが提供される。好ましい態様において、ハイブリッドマトリックスは、メソゲン、糖、タンパク質(例えばコラーゲンなどの細胞外マトリックスタンパク質、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、オステオポンチン、トロンボスポンジン、細胞接着分子-1(ICAM-1)、ICAM-2、コンドロイチン硫酸などのプロテオグリカン、フォンビルプラント因子、エンタクチン、フィブリノーゲン、テネイシン、粘膜アドレシン細胞接着分子(MAdCAM-1)、C3b、およびMDC(メタロプロテアーゼ/ジスインテグリン/システインリッチ)タンパク質)、核酸、特異的な受容体、および細胞受容体認識配列(例えば、RGD、EILDV、LDV、LDVP、IDAP、PHSRN、SLDVP、GRGDAC、およびIDSPなどのカドヘリン、免疫グロブリンスーパーファミリー、セレクチン、ムチンおよびインテグリン結合配列)によって例示される成分(しかし、これらに限定されない)(単独または共に)の混合物をゲル化することによって形成される。好ましい態様において、配向させる電場を適用すると共に、ゲルプロセスを行う。これにより、ゲル化後に安定となる整列されたメソゲンを有するマトリックスを生じる。このゲル化手順により、その他のマトリックス成分も配向されることが想定される(これらの相対的な電荷および電荷分布の非対称に応じて)。配向されたハイブリッド複合体は、電場、磁場を使用して、または複合体の機械的分断によって調製することができる。一部の態様において、商業的に入手可能な基底膜様の複合体(例えば、形質転換細胞株(EHS)から収集されるマトリゲル(Matrigel)(商標))を液晶の種と混合されるECM成分として使用する。液晶は、サーモトロピックまたはリオトロピック液晶であることができる。リオトロピック液晶である場合、好ましいメソゲンは、膜を崩壊させない表面、および膜を崩壊させないディスコチックなメソゲンを含む。

【0318】

一部の好ましい態様において、細胞は、図6に図示したように、マトリックスに隣接して播種され、または細胞は、マトリックスの表面上に播種され、細胞によるマトリックスの浸潤は、LCの配向の変化によって示される。

【0319】

10

20

30

40

50

本発明の好ましい態様において、マトリックスは、それが異方性の構造を具備するように調製される。この異方性の構造は、機械的な剪断、並びに電場および磁場の使用を含む（しかし、これらに限定されない）当業者に明らかである多くの方法のうちの1つによって誘導される。異方性の構造の存在により、マトリックスの異方性の光学的性質が引き出されるであろう。これらの異方性の光学的性質は、複屈折および二色性を含むことができる。侵入した細胞の存在は、マトリックスの異方性の光学的性質の変化によって検出される。これらは、偏光およびアナライザー、または単色のおよび/または変更された光を使用して決定することができる。

【0320】

図7を再度参照し、一部の態様において、細胞を最初に右に播種する。この表面からの細胞の減少により、これらがマトリックスに侵入すること、並びにこれらの浸潤により、左のハイブリッド（LC-ECM）マトリックスのLCの配向の変化を生じさせていることがあきらかとなる。また、このハイブリッドマトリックスは、平面（すなわち、非配向）または不透明な基体とともに使用することができる。

【0321】

図7において示した態様において、細胞を右の基体上に播種すると、マトリックス内に埋め込まれたメソゲンの配向の変化として現れる細胞の浸潤と共に、左のハイブリッドマトリックスの変化が生じる。細胞を最初に播種した領域は、LCフィルム中にメソゲンを整列するナノ構造基体であり、したがって、細胞の存在および相対的な数を報告すると考えられる。細胞は、左のハイブリッドマトリックスに侵入するので、右の細胞数の減少は、細胞の浸潤によって引き起こされるハイブリッドマトリックスの変化と共に同時に報告される。一部の態様において、走化性の勾配が細胞に供給される。

【0322】

その他の態様において（図8に示した）、細胞播種領域は、光に対して不透明体であるか、または単に液晶メソゲンのアラインメントを引き起こすように構築されたのではない基体を含む。本態様において、細胞の存在およびその後の最初の播種領域（100）におけるこれらの数の減少は報告されないが、これらの良好なハイブリッドマトリックスの浸潤は、報告されるであろう。

【0323】

一部の態様において（図9に示した）、細胞（100）をハイブリッドECM-LCマトリックス（200）の表面上に播種すると、マトリックスの浸潤が表面から生じる。浸潤は、メソゲンの配向の変化として検出される。この独特のハイブリッドマトリックスの多能性により、細胞接着、細胞収縮、および細胞浸潤の動態力学を研究するアッセイ法にその能力が使用されることが明らかである。本発明は、任意の特定の作用機序に限定されない。実際に、作用機序の協定は、本発明を実施するために必要でない。それにもかかわらず、メソゲンのアラインメントが、マトリックスにより（表面上に播種される細胞）またはマトリックス内に（マトリックスに侵入する細胞）及ぼされる微小な力によって乱されることが想定される。好ましい態様において、メソゲンアラインメントの変化は、偏光の通過またはその他の光の特異的な波長もしくは波長の組み合わせの変化によって報告される。なおさらなる好ましい態様において、本発明は、メソゲン-装飾されたマトリックス、好ましくは、メソゲン-装飾ECMを提供する。メソゲンは、マトリックスの成分（例えば、ECM）に対して反応させるために利用できる一級アミン、カルボン酸、およびチオールを使用してマトリックスに付着される（例えばECM）。

【0324】

その他の態様において、メソゲンを組み込んでいるマトリックスは、ゲル化することができるより大きな細胞外マトリックス（ECM：200）内でプレ整列されたLCマトリックス（100）を包埋することによって調製される（例えば、図10を参照されたい）。本発明は、任意の特定の作用機序に限定されない。実際に、作用機序の理解は、本発明を実施するために必要でない。それにもかかわらず、ECMの変化がLCマトリックスに中継されることが想定される。その他の態様において、ECMは、これらがこれらの等方性の状態にあるとき

10

20

30

40

50

に、メソゲンに溶解され、次いでメソゲンが液晶の状態に転換される。状態のトランスフォーメーションは、溶媒の温度および／または蒸発を変化することによって達成することができる。この手順により、液晶ゲルの性質を有する液晶／ECM複合体の形成がなされる。液晶ゲルは、低分子量および高分子量のゲル化剤を使用して調製されることが当業者によって知られている。一部の好ましい態様において、ECMは、商業的に入手可能なMATRIX Lである（例えば、Monvoisin A. Bisson C. Si-Tayeb K. Balabaud C. Desmouliere A. Rosenbaum J. ; Involvement of matrix metalloproteinase type-3 in hepatocyte growth factor-induced invasion of human hepatocellular carcinoma cells ; International Journal of Cancer 97 (2) : 157-62, 2002を参照されたい）。

【0325】

その他の好ましい態様において、ハイブリッドメソゲン／マトリックスは、タイプIコラーゲンおよび／またはブタの粘膜下のマトリックスを含む（例えば、Rosenthalら、The mucosal invasion model: a novel in vitro model for evaluating the invasive behavior of mucocutaneous malignancies Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery. 127 (12) : 1467-70, 2001 ; Galvezら、Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling. Journal of Biological Chemistry. 276 (40) : 37491-500, 2001.を参照されたい）。これらのマトリックスは、浸潤アッセイのために最も広く使われているマトリックスであるが、本発明は、これらの使用に限定されない。実際に、ヒト羊水膜に由来するAmgelを含む（しかし、これらに限定されない）その他のマトリックスの使用が想定される（例えば、Siegalら、Development of a novel human extracellular matrix for quantitation of invasiveness of human cells. Cancer letters 69 : 123-32. 1993を参照されたい）。

【0326】

ハイブリッドLC-マトリックスは、浸潤アッセイに加えてその他の多くの用途を有することが想定される。LC-マトリックスは、細胞バイオメカニクスの研究における使用が見いだされ、この場合、プロセスによって引き起こされるマトリックスの微妙な変化（例えば、細胞接着、細胞遊走、および細胞収縮）が、LC配向の変化によって報告される。好ましい態様において、このような変化は、フィルターをかけた偏光でLC-マトリックスを見ることによって検出される。さらに、LCの配向は、温度変化に非常に感受性であるため、LC-マトリックスは、個々の細胞および細胞集団の代謝活性の変化を報告するために有用である。好ましい態様において、液晶基体は、また、細胞の表面への接着によって基体に伝えられるストレスを報告するために使用することができる。本発明の本態様において、細胞は、液晶基体の表面上に維持される。基体は、ECMで装飾することができる。

【0327】

同様に、パターン化された表面を有するECM（図6）は、接着、遊走、および収縮によって例示される（しかし、これらに限定されない）イベントによって引き起こされる表面（細胞によって占められる表面と隣接する）に誘導される変化を報告するために使用することができる。次いで、これらの変化は、その表面上で配置されたLCフィルムによって、また、その後に見られる偏光または光の特異的な波長によって報告される。

【0328】

なおさらなる態様において、本発明の基体およびハイブリッドマトリックスは、収縮アッセイ法での使用が見いだされる。基体およびハイブリッドマトリックスが有用である収縮アッセイ法の最もありふれた形態は、ゲル収縮アッセイ法である（例えば、Firemanら、Morphological and biochemical properties of alveolar fibroblasts in interstitial lung diseases. Lung. 179 (2) : 105-17, 2001 ; Ballasら、Delayed wound healing in aged rats is associated with increased collagen gel remodeling and contraction by skin fibroblasts, not with differences in apoptotic or myofibroblast cell populations. Wound Repair Regeneration. 9 (3) : 223-37, 2001 ; Royら、Exertion of tractional force requires the coordinated up-regulation of cellcontractilit

10

20

30

40

50

y and adhesion. *Cell Motility & the Cytoskeleton*. 43 (1) : 23-34, 1999 ; および Leeら、*Extracellular matrix and pulmonary hypertension: control of vascular smooth muscle cell contractility*. *American Journal of Physiology*. 274 (1Pt 2) : H76-82, 1998を参照されたい)。

【0329】

また、単一細胞の収縮は、時に収縮がインビトロで最大に刺激された後に、断面領域を測定することによって評価される(例えば、Pangら、*Single-cell contraction assay for human ciliary muscle cells. Effect of carbachol*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 34 (5) : 1876-9, 1993を参照されたい)。もう一つのアッセイ法は、マトリックスの2次元の伸縮性の歪みの微速度ビデオマイクロスコピーでの記録から計算される個々の細胞によって及ぼされる力を記述する。例えば、Royら、*An in vitro force measurement assay to study the early mechanical interaction between corneal fibroblasts and collagen matrix*. *Experimental Cell Research*. 232 (1) : 106-17, 1997を参照されたい。

【0330】

また、本発明は、関心対象の細胞の生体力学的伝達イベントを報告するための方法および組成物を提供する。例えば、特定の態様において、細胞の接着、遊走、および収縮に関連した生体力学的伝達イベントを非特異的に報告するために、適切な液晶膜を使用する。任意の特定の機構または理論に限定されないが、本発明は、これらの態様において、検出可能なイベントは、結晶膜自体の整列の変化であることを想定する。想定される細胞伝達アッセイ法の多くの非限定の態様を以下の実施例に示してある。1つの態様において、液晶フィルムは、リン脂質と結合されて、その後に自発的に関心対象の細胞によって吸着される。もう1つの例において、エラストマー液晶の材料が使用され、関心対象の細胞に接触される。さらにもう一つの態様において、重合体で安定化されたか、または重合体に分散された液晶が使用され、関心対象の細胞に接触される。もう1つの例において、液晶ゲルが使用され、関心対象の細胞によって接触される。さらにもう一つの例において、液晶を整列させるように微小成形されたコラーゲンゲルが使用され、関心対象の細胞に接触される。本態様において、関心対象の細胞は、コラーゲンゲルに付着することができ、次いで実験計画法、細胞種、および培養条件によって要求される期間インキュベートされる。細胞収縮によって伝えられるストレスの変化は、液晶層に検出可能な変化を引き起こす。以下に記述されるさらにその他の態様では、生体力学的伝達イベントを報告するための新規のハイブリッド細胞外マトリックス-液体クリスタリン複合体を利用する。

【0331】

図11は、細胞の大集団による、並びに個々の細胞による収縮力を評価することができる本発明の態様を示す。細胞(300)を細胞外マトリックス(200)のナノ構造表面(100)上に播種し、その表面上に配置された液晶メソゲンを整列させる。細胞の収縮(400)により、ナノ構造表面(500)の規則的な配列構造の変化が生じ、次いでこれがLCメソゲンのアラインメントの変化によって報告される。細胞は、細胞を成体色素または非生体色素(蛍光定量的および非蛍光定量的で)で染色することによってLCアラインメントの解読として同時に映されてもよい。二重の照射により(偏光と共におよびなしで)個々の細胞の局在化、およびLCアラインメントにおけるこれらの位置および出現を、観察される変化と相関させることができる。

【0332】

さらに、これらのマトリックス-LC相互作用およびハイブリッドマトリックスの使用により、これらの表面上に播種した個々の細胞の力を検査することができ、これにより、細胞の接着、遊走、および収縮の動態力学についての洞察を提供する。

【0333】

本発明は、基体を横切って遊走する細胞が、ナノ力学的な力を生じ、これが整えられた表面を乱し、または乱れた表面を整列させることを想定する。両方の場合において、細胞の通過によって生じる表面整列の変化は、液晶フィルムによって検出されて、報告される

10

20

30

40

50

。また、遊走細胞は、遊走の間にそれらの経路から整えられた表面粒子を掃引し、遊走後に上部に配置されたLCフィルムに乱れを導入する。もう一つの変形例は、その表面全体にランダムに分配され（播種されて）、ランダムに配向された（長軸に関して）ナノ～ミクロの大きさの粒子を有するナノ構造基体の使用である。これは、近くに間隔のあいた領域を生じ、LCフィルムに乱れを導入して、下にあるナノ構造基体の整列の影響を効率的に部分的にマスキングする。播種密度は、単細胞の大きさを基準として多くの粒子が表面上に存在するようにする。細胞の遊走により、下にあるナノ構造基体のマスクがはずれ、単に整えられたメソゲンの軌道を生じる。粒子は、コロイド金、その他の金属、軽石、グラファイト、シリカ、およびガラスビーズを含む（しかし、これらに限定されない）任意のナノ～ミクロの大きさの不活性材料であることができる。外部から適用される電場（荷電粒子について）、磁場（磁性粒子について）、または表面に対してこれらを接着させるための粒子表面の化学的および物理的な処理の使用によって例示される（しかし、これらに限定されない）付属的な安定化力の使用によって表面を装飾した粒子により、表面上のLCの流れの間に、置換に対して耐性にすること（すなわち、粒子が洗い流されるのを防止すること）ができることが想定される。

【0334】

本発明のアッセイ装置は、これらの整列または乱れの変化を検出するように設計されている。したがって、一部の態様において、液晶を配向させ、または配向させない少なくとも1つのアッセイ領域を有する基体が提供される。一部の好ましい態様において、アッセイ領域は、以下により詳細に記載したように、1つまたは複数の生物学的な部分と結合される。しかし、アッセイ領域は、生物学的な部分と結合されることは必ずしも必要とはされない。さらなる好ましい態様において、アッセイ領域は、アレイに配置される。特に好ましい一部の態様において、アレイは、プレート読み込み装置の読み出しゾーンに整列される。本発明の一部の態様において、アッセイ装置は、多くの形態上の特色と共にさらに提供される。例えば、一部の態様において、装置のアッセイ領域は、細胞、培地、または試験化合物を含むために基体に形成されなくともウェルを有する。その他の好ましい態様において、アッセイ装置は、アッセイ領域から分離された試験化合物領域または複数の試験化合物領域をさらに含む。これらの領域は、アッセイに使用するための1つまたは複数の試験化合物を提供し、アッセイ領域に1つまたは複数の試験化合物のデリバリーするために有用である。一部の態様において、試験化合物領域は、アッセイ領域と比較してアッセイ装置上の周辺部に位置するが、その他の態様において、試験化合物領域は、アッセイ領域と比較して中央に位置し、一方で、なおさらなる態様において、試験化合物領域は、アッセイ領域に点在する。また、これらのレイアウトの種々の組み合わせも本発明によって想定される。一部の態様において、試験化合物領域は、アッセイ領域に対して少なくとも1つの試験化合物の勾配（例えば、濃度勾配）を提供するように配置される。2つまたはそれ以上の試験化合物の勾配は、同じ方向または異なる方向ができる。その他の態様において、試験化合物領域は、1つまたは複数のアッセイ領域に少なくとも1つの試験化合物を比較的一定量でデリバリーするように配置される。特に好ましい一部の態様において、試験化合物領域は、貯蔵所に配置された特定の試験化合物に対する細胞の反応が、性質上走化性またはケモキネシスであるかどうかの解析を実現するように設計される。一部の好ましい態様において、試験化合物領域は、基体に形成されたチャンネル、マイクロチャネル、またはウェルである。その他の好ましい態様において、試験化合物領域は、所与の試験化合物をアッセイ装置に放出する多孔性または非多孔性の物質の形態である。なおさらなる態様において、試験化合物領域は、電界の操作、温熱勾配、および基体表面上の毛管作用による材料（例えば、試験化合物）の差動的移動によって提供される。その他の本発明の好ましい態様において、走化性またはケモキネシスの薬剤は、表面上に固定される。これらの薬剤は、表面上に一様な濃度で存在することができ、これらは表面上にパターン化することができ、またはこれらは表面全体の濃度の勾配にして存在させることができる。表面上に固定された薬剤は、表面から放出されて、細胞によって引き起こされる表面の微小環境の変化を使用することによってこれらを細胞に利用可能にして、

10

20

30

40

50

薬剤の放出をトリガーしてもよく、または外部から制御される変量（例えば、照明または電位の適用）を使用して、表面から薬剤の放出を調節することができる。その他の本発明の好ましい態様において、薬剤は、表面から放出されないが、細胞の膜成分と相互作用し、これにより細胞行動に影響を及ぼす。

【0335】

さらなる一部の好ましい態様において、本装置のアッセイ領域は、生物学的な部分と結合される。一部の態様において、本明細書に開示したアッセイ法のために適した乱れた（例えば、ランダムに整えられた）基体または基体上のアッセイ領域は、適切な基体表面上へ1つまたは複数の生物学的な部分（例えば、糖、タンパク質（例えばコラーゲンなどの細胞外マトリックスタンパク質、ラミニン、フィプロネクチン、ピトロネクチン、オステオポンチン、トロンボスponジン、細胞接着分子-1 (ICAM-1)、ICAM-2、コンドロイチン硫酸などのプロテオグリカン、フォンビルプラント因子、エンタクチン、フィブリノーゲン、テネイシン、粘膜アドレシン細胞接着分子 (MAdCAM-1)、C3b、およびMDC (メタロプロテアーゼ / ジスインテグリン / システインリッチ) タンパク質）、核酸、特異的な受容体、および細胞受容体認識配列（例えば、RGD、EILDV、LDV、LDVP、IDAP、PHSRN、SLDVP、GRGDAC、およびIDSPなどのカドヘリン、免疫グロブリンスーパーファミリー、セレクチン、ムチンおよびインテグリン結合配列））を付着することによって（例えば、共有結合性にまたは非共有結合性に）作製される。もう一つの態様において、整えられた基体または基体上のアッセイ領域は、1つもしくは複数、または先に述べた生物学的な部分を重合体表面に対して共有結合性または非共有結合性に結合し、その後に表面を研磨して整列を生じさせることによって作製される。本発明は、適切な基体表面を作製する際に考慮される工程の順番によって限定されることは企図されない。例えば、一部の態様において、基体は、生物学的な部分を付着する前に整えられる。その他の態様において、基体は、生物学的な部分の付加の後に整えられる。実際に、特異的なガイダンスが提供されること、および当業者であることを考慮すれば、本明細書に開示されたアッセイ法に使用される適切な基体組成を製造するために、多くの処理イベントおよび工程を適応できる。

【0336】

その他の態様において、整えられた基体は、複数の均一に分布された粒子（例えば、磁気ナノ粒子）と適切な表面を接触させ、整列されたときにメソゲン層を配向させることによって作製される。上記において詳細に記載されているように、粒子は、ナノスタンピング装置によって、表面に適用されてもよく（ポジティブなナノスタンプ）または表面から除去されてもよい（ネガティブなナノスタンプ）（図1Aおよび1Bを参照されたい）。特に好ましい態様において、粒子は、磁場を使用して整列された磁気ナノ粒子である。もう一つの好ましい態様において、金属ナノロッドは、遊走する細胞によって容易に置換するために十分小さい。

【0337】

本発明の一部の態様において、アッセイ装置における全体的な細胞移動の範囲は、表面整列が変化される基体の比率を解析することによって決定される（例えば、整えられたものから乱れたものへの変化および逆も同じ）。整列されたか、または整列されていない範囲を解析するための好ましい方法は、上記において詳細に記載されており、2つの偏光子を含む系、CCD、光電子増倍管、光ダイオード、プレート読み込み装置、および光の特定の波長の伝達の解析の使用を含む。その他のアッセイの結果を解析するための方法を以下に記述してある。

【0338】

多くの特に好ましいアッセイ装置および系は、ここで記述されている。本発明は、これらの特定の態様に限定されないことが理解される。走化性 / ケモキネシスの効果を識別するための本発明の1つの態様は、図13に示したモデル・アッセイ法に図示してある。エレメント(100)は、適切な基体（整えられ、または乱れたもの）を示す。試験化合物貯蔵所(200)が、基体(100)の左縁部上に提供される。一部の態様において、貯蔵所(200)および基体(100)は、試験化合物が基体(100)およびアッセイ領域にゆっくり運搬さ

10

20

30

40

50

れ、または拡散して、基体表面上で細胞(300)に接触するように設計される。液体の非常に薄いフィルムを使用することにより、重合体の添加によって粘着性の培地を作製することによって、または対流を停止させるが、細胞の移動は可能であるゲル中に全部の系を入れることによって、対流を最小にすることができることが想定される。その他の態様において、これらのエレメントは、試験化合物がより迅速に毛管作用を経て細胞(300)をカバーする培地中に拡散するように設計される。アッセイの実施の際には、関心対象(300)の細胞を基体上のアッセイ領域(100)に播種する。一つの態様において、細胞の運動性に対する試験化合物の効果は、以下の通りに決定することができる。試験化合物を貯蔵所(200)に配置し、細胞(300)を再びアッセイ領域に播種するか、または全ての基体全体にランダムに分配させる。

10

【0339】

一部の態様において、拡散を介してデリバリーされる試験化合物の勾配を提供するために、特にデザインされた貯蔵所を利用する。図14は、試験化合物が貯蔵所(100)に配置されることにより、細い管(200)に沿って拡散し、試験基体の非常に近接した小さな開口部(300)から出ることができる1つの可能性のあるデザインを示す。装置の実際の寸法は、特定のアッセイ法の要求および試験化合物がデリバリーされる試験表面積(およびその運搬に付随する培地の体積)に応じて変更される。貯蔵所の組成物および導出管は、ガラス、ポリプロピレン、ポリスチレン、およびシリコーンを含む(しかし、これらに限定されない)種々の材料であることができる。

20

【0340】

貯蔵装置は、アッセイ装置の内部デザインに組み込まれてもよく、または商業的に入手可能なもしくはカスタムメイドのデザインのマルチウェル・プレートで使用するための挿入物として提供されてもよい。このアッセイ・デザインは、液晶アッセイ法での使用に限定されず、比色、蛍光定量、濃度測定、およびその他のアッセイ形式での使用が見いだされることが認識される。

30

【0341】

試験化合物が走化性である場合、細胞経路は、実質的に直線的であり、正味の遊走は、リザーバ孔の方を向く(図14の300)。アッセイ領域300内の細胞の移動により、乱れた領域を生じ(整えられた基体上に)、またはランダムに整えられた基体の表面全体の細胞の機械的な移動によって整列を導入し、これを上記の通りにアッセイすることができる。特に好ましい態様において、遊走経路の相対的な直線性を決定するために、画像分析ソフトウェアが使用される。

30

【0342】

また、これらの試験化合物を「徐放性タブレット」に処方することもでき、これを試験表面のいくつかの位置に配置する。タブレットの段階的な溶解により、局所的に高い濃度の原化合物を生じる。いくつかの徐放性タブレットは、外部からの制御下で配置される; 例えば; 溶解の割合を電位の照射によって制御する。

40

【0343】

また、装置は、必ずしも貯蔵所(200)を含む必要はないことが認識される。貯蔵所(200)を必要としないアッセイ法の非限定の例として、基体(100)は、アッセイ領域に細胞(300)を播種すること、および付随する細胞培地と共に試験化合物を提供することによって調製される。細胞の活性を増大する化合物は、対照化合物と比較して、細胞運動性に対してポジティブな効果を有する。好ましい態様において、アッセイ領域は、液晶を配向させるように整えられる。アッセイ領域内における細胞300の移動により、上述したとおりにアッセイすることができる乱れた領域を生じる。一部の態様において、試験化合物を試験化合物領域にまたは一般に培地に添加することを含む別々のアッセイの解析を使用して、試験化合物の走化性および/またはケモキネシスの効果を区別することができる。

【0344】

図15は、細胞の運動性および遊走に対する試験化合物の効果を研究するためのさらにもう一つのアッセイ系を示す。基体(100)は、異なった表面の整列を有する第1の領域(20

50

0) および第2の領域(300)を含む。一部の態様において、第1の領域(200)は、液晶を整列させるように整列されるが、第2の領域(300)は、液晶を整列させない。好ましい態様において、基体(100)は、また、試験化合物貯蔵所(400)を含む。

【0345】

図15に示したアッセイ系を使用する1つの想定されるプロトコルを以下に示してある。使用者は、第1および第2の領域(200および300)上に一様な様式で細胞を播種する。試験化合物を、試験化合物領域(400)を経て提供された播種された細胞を伴う培地中の基体(100)に導入する。細胞遊走の定量は、第2の領域(300)の細胞数を測定することによって第1の領域(200)に存在する細胞の数を測定することによって、または第1の領域(200)および第2の領域(300)に存在する細胞数を比較することによって行うことができる。試験化合物がケモキネシスである場合、第1の領域(200)または第2の領域(300)の細胞数の著しい変化(増減)はないはずである。しかし、試験化合物が走化性である場合、第1の領域(200)の細胞の数が著しく増大され、第2の領域(300)の細胞が減少すると考えられる。化合物が走化性に対してネガティブな効果を有する場合、第2の領域(300)の細胞数が減少し、同時に第1の領域(200)の細胞数が増大すると考えられる。

【0346】

さらにもう一つの態様において、図16に示すように、貯蔵所(200)および異なった表面の整列の2つの分離した領域(300および400)を有する基体(100)が提供される。したがって、特定の態様において、基体(100)は、液晶を整列させる整えられた基体の第1の領域(300)、および液晶を整列させない基体の第2の領域(400)をさらに提供する。さらなる態様において、基体(100)上に関心対象の細胞を播種するために、細胞播種領域(500)(くぼみまたはウェルによって例示されるが、限定されない)が提供される。本発明の一部の態様において、細胞が2つの別々の基体上の細胞播種領域(500)に播種される方法が提供される。播種された細胞のそれぞれの群を付着させて、十分な期間、通常1~24時間(細胞種および培養条件によって決定される)培養することができる。次いで、培地をそれぞれの基体上に配置し、十分な新しい培地をそれぞれの基体をカバーするように添加する。次いで、試験化合物を第1の基体をカバーする培地中か、または第2の例の貯蔵所(200)のいずれかに配置する。両基体上の細胞を試験化合物の存在下で十分な期間(細胞種および培養条件にしたがって)インキュベートさせる。次いで、第1の領域(300)上の細胞数を決定する。本発明は、培地に添加された試験化合物を有する基体および貯蔵所(300)のみに添加された試験化合物を有する基体から得られる結果の比較により、試験化合物が走化性またはケモキネシスであるかどうかの決定をすることができる想定する。ケモキネシス活性により、領域300および領域400の両方の細胞数の増大を生じると考えられ、一方、走化性により、貯蔵所の試験化合物の放出点に最も近い領域(300)の細胞数の増大(ケモキネシスの場合よりも大きい)を引き起こし、およびネガティブな走化性の効果では、貯蔵所供与源(400)からさらに離れて配置された試験領域の細胞数の増大を引き起こし、同時に液晶を整列させるパターン化された領域(300)において減少を生じる。好ましい態様において、ウシ胎児血清(FBS)をプラスした培地および培地だけの適切な対照でも行われる。

【0347】

なおさらなる態様において、図16に記述した基体は、全基体(100)が液晶を配向させるように構成されるように修飾される(図17、18、および19を参照されたい)。これらの態様において、細胞を細胞播種領域(500)に播種し、試験化合物を貯蔵所(400)に添加する。細胞(600)を刺激して、細胞播種領域の外へ移動される場合は、試験化合物は走化性であり、刺激の勾配の方へ遊走して定向性を示す。(図17を参照されたい)。この効果は、第1の試験領域(200)および/または第2の試験領域(300)に存在する細胞数を決定することによって決定することができる。試験領域は、任意の異なる物理的な特徴を有しない。これらは、単にデータ集めのために使用されるゾーンであり、商業的に入手可能なプレートリーダーによって読み出される領域と対応するように構成されていてもよい。

【0348】

10

20

30

40

50

第1の領域(100)の細胞の、第2の領域(200)のものに対する比が約1である場合、試験化合物は、ケモキネシスであり、したがって細胞播種領域に細胞の外の移動を示すが、刺激の勾配にかかわらず遊走の際に定向性を示さなかった。(図18を参照されたい)。フィールドA(200)またはフィールドB(300)のいずれかに細胞が入るのを誘導することができないか、または極めて少しだけ誘導する試験化合物は、細胞の遊走に対してほとんど、またはまったく影響を及ぼさない(図19を参照されたい)。

【0349】

細胞播種領域(500)がデザインに組み込まれていない場合、第1(200)および第2の(300)試験領域全体に一様に分配されている細胞は、単にケモキネシスの化合物の場合と有意な細胞数の差は示さないと考えられる(すなわち、増殖を促進しない)。このようなデザインの使用(すなわち、特異的な細胞播種領域に限定されるのではなく、均一に分布された細胞)により、ポジティブおよびネガティブな走化性を決定することができるであろうが、効果がないこととポジティブなケモキネシスとは区別されないであろう。

【0350】

さらに他の態様において、本発明は、細胞の運動性および遊走に対する多数の試験化合物の相互作用を決定するためのアッセイ材料および方法を提供する。図20A-Cは、細胞遊走に対する3つの試験化合物の相互作用の効果および潜在性を決定するための想定されるアッセイ配置を示す。簡単には、図20A-Cは、複数のアッセイ領域(200)を有する適切な基体(100)を提供し、それぞれが整えられた基体の局在化された領域を提供する。図20A-Cに示した態様において、複数のアッセイ領域(200)は、基体(100)の外周周辺に同心円上に配置されるが、本発明は、この配置に限定されることは企図されない。多くの試験化合物の効果を決定することができる、多くの変形例の配置が想定される(例えば、基体(100)上に配列されたアッセイ領域の行および列、または基体(100)上の中央点から放射するアッセイ領域のバンドなど)。その他の態様において、2つまたはそれ以上のタイプ(例えば、整えられた基体の局部的な領域および/または乱れた基体の局部的な領域)のアッセイ領域が基体上に提供される。好ましい態様において、各々のアッセイ領域(200)は、細胞があるところを除いて、液晶のアラインメントが可能な構造の基体表面ゾーンを示す。好ましい態様において、図20A-Cに示したように、種々の試験化合物が、試験化合物位置(301-304)の基体(100)上に提供される。これらの態様のいくつかにおいて、それぞれの位置(301-304)は、別々の貯蔵所となる。しかし、現在図20A-Cに示したように、本発明は、位置(301-304)の数または配置によって限定されることは企図されない。実際に、一部の態様において、4つの位置よりも多く、または少なく提供され、および/または基体(100)上の位置の配置は、変更される(例えば、行およびまたは基体(100)上の中央点から放射する位置など)。図20A-Cで提供する態様において、位置301は、試験化合物Aと接触され、位置(302)は、試験化合物Bと接触され、位置(303)は、試験化合物Aと再び接触され、および位置(304)は、試験化合物Cと接触される。図20A-Cに示した態様において、基体(100)は、また、細胞を播種するための細胞播種領域(400)(例えば、くぼみ)を提供する。さらなる態様では、細胞を播種するための1つまたは複数の位置(400)の変形例配置を提供する。さらに、全ての試験領域(200)を含む試験基体(100)全体に一様に細胞を播種することができる。インキュベーション後、(時間は、細胞種、細胞株、および培養条件に依存する)、ポジティブな走化性の効果は、ポジティブな効果を有する因子(位置301-304)の近くに細胞が蓄積することによって明らかにされる。

【0351】

図20Aに示した基体を使用する1つの想定される細胞遊走アッセイ・プロトコルを以下に記述してある。簡単には、細胞を、位置(400)に播種して、十分な期間、通常1~24時間(細胞種および培養条件によって決定される)付着することができる。この付着期間の後、試験化合物を含む細胞培地を位置(301-304)に配置する。さらなるインキュベーション期間(細胞種および培養条件によって決定される)を提供して、播種された細胞を試験化合物に接触させることができる。アッセイ領域(200)のそれぞれに存在する細胞の数

10

20

30

40

50

は、本明細書に記載されている方法および組成物を使用して決定される。例えば、試験化合物が、単独で作用し、その他の化合物との相乗作用を示すことができなかった場合、最大数の細胞が、その化合物が基体(100)に対してそれぞれ接触された位置(301-304)に直接整列されたアッセイ領域(200)に存在すると考えられる。ポジティブな相互作用が試験化合物A(位置301および303)と試験化合物B(位置302)またはC(位置304)のいずれかとの間で生じる場合、最大数の細胞が、試験化合物が基体(100)に接触されたそれぞれの位置(301-304)の中間の位置に位置すると考えられる。図20Bは、位置302(化合物B)に位置する試験化合物のポジティブな走化性の効果を示し、これは、試験化合物貯蔵所の位置302に最も近い試験領域(200)に位置する細胞数の増大によって明らかにされる。図20Cは、2つの異なる試験化合物(因子Aの位置301および303並びに因子Bの位置302)の間で観察される細胞遊走に対する相乗的な相互作用によって予測される結果を示す。

【0352】

その他の態様において、基体は、1つまたは複数のアッセイゾーンから提供するように設計される。いくつかのこれらの態様において、単一の基体は、多数の異なったアッセイゾーンを提供して多数の対照と共に重複して決定することができるように製造される。好みの態様において、これらのアッセイゾーンのそれぞれは、図11-20に示した基体(例えば、上記した複数の基体フォーマットを含む)と対応するように構成される。特に好みの態様において、これらの基体は、商業的に入手可能なプレートリーダーで使用するために構成される(例えば、アッセイ基体は、空間的に市販のプレートリーダーによって認識される試験位置と対応する異なったゾーンを提供するように設計される[例えば24、96、384、1536ウェル形式のプレート])。さらなる好みの態様において、アッセイ基体は、市販のプレートのウェルおよびプレートリーダーに挿入されるように構成する提供される。

【0353】

図21は、開示されたアッセイ基体が商業的に入手可能な24ウェルのプレートリーダーに適合するように設計されている一態様を示す。図21は、24個の個々のアッセイ表面の標準的な6×4配置を含む基体を表す。

【0354】

簡単には、24個のアッセイ表面の各々に、関心対象の種々の試験に接触させるためのアッセイ領域(100)および貯蔵所(200)を表した。特に好みの態様において、図21に示したプレート配置では、貯蔵所系を利用してあり、更に詳細に本明細書に記述したが、これにより走化性およびケモキネシスの細胞遊走を区別することができる。さらにもう一つの態様において、図22は、図21にて示したアッセイ・プレート配置の適応を示し、個々のアッセイゾーンのそれぞれに播種するための細胞播種領域(400)を提供する(例えば、くぼみ)。

【0355】

さらなる態様では、単一の基体表面および単一の貯蔵所を使用する商業的に入手可能なプレートリーダー(例えば、24、96、384、1536ウェル形式)によって読み込むようにデザインされたアッセイ基体を提供する。例えば、図23は、単一の基体表面(100)が24~1536個の間のアッセイ領域(200)のアレイを提供するようにデザインされている、一つの想定される態様を示す。いくつかのこれらの態様において、基体(100)は、1つまたは複数の試験化合物の貯蔵所(300)をさらに提供するように構成される。

【0356】

一部の態様において、図23に示した基体は、第一および第二の基体全体に均一に端から端まで細胞を播種することによって利用される。次いで、使用者は、播種された細胞を十分な期間(細胞種および培養基に応じて)通常1~24時間、それぞれの基体に付着することができる。第1の基体は、細胞培地に添加される試験化合物と接触される。第2の基体は、貯蔵所(300)に添加された試験化合物と接触される。次いで、それぞれの基体を試験化合物が播種された細胞に対して作用させるために適した期間(細胞株および培養条件に応じて)インキュベートする。インキュベーション期間終了後、細胞をカバーする培地を

10

20

30

40

50

除去して、液晶の薄いフィルムを、付着した細胞を伴う基体の表面上に配置する。次いで、それぞれの基体の各々のアッセイ領域の細胞数を目視検査によってまたは自動化されたプレートリーダーを用いて決定する。化合物が走化性である場合、貯蔵所（300）により近いアッセイ領域（200）では、細胞数が増大されると考えられ、貯蔵所（300）からのアッセイ領域（200）は、対照基体（100）と比較して、および試験因子が細胞をカバーする培地に添加されたアッセイと比較して、さらに細胞数が減少した。

【0357】

さらにもう一つの態様において、本発明は、单一基体上の多数の試験化合物の細胞遊走に対する効果を決定するためのアッセイ材料を提供する。好ましい態様において、これらの基体は、商業的に入手可能なプレートリーダーに適合する大きさおよび形状（例えば、24、96、384、1536ウェル形式）を有するように設計される。図24は、1つの想定される多数の試験化合物アッセイ基体を示す。図21に示したアッセイ基体（100）は、24の異なるアッセイ領域（200）を提供する。図24に示した形式において、アッセイ系が一度に最高12個の異なる関心対象の化合物を試験することができる。しかし、本発明は、24ウェルの形式に限定されることは企図されない。実際に、本発明のその他の態様では、96、384、および1536ウェル形式から提供し、これらの形式は、容易に市販のプレートリーダーに適応でき、それぞれ関心対象の48、192、～768の化合物の同時試験を提供するであろう。簡単には、図24は、各々の12の試験ゾーン（100）が、2つの適切なアッセイ領域（200及び210）、播種細胞のための任意の細胞播種領域（300）（例えば、くぼみ）、および基体（100）に関心対象の試験化合物を接触させるための貯蔵所（400）から構成されている、多数のアッセイ領域の形式にされたアッセイ・プレートを表す。特定の態様において、アッセイ領域（200）は、液晶をアンカーすることができる整えられた基体の局在化された領域を提供する。その他の態様において、全てのプレートは、適切なアッセイ基体を提供するように設計される（例えば、全ての表面は、液晶をアンカーすることができる）。一部の態様において、アッセイ領域（200および210）は、ディスクリートゾーンであるが、その他の態様において、アッセイ領域（200および210）は、単にプレートリーダーによって読み込まれる領域である。試験ゾーンは、プレートリーダーによって読み込まれる1つ、2つ、または複数の領域を含むことができる。図24において、試験ゾーン（100）は、プレートリーダーによって読み込まれる2つの領域（200および210）から構成される。本発明は、特に図24に示した配置が多数の試験化合物の細胞の遊走（例えば、走化性対、ケモキネシス）に対する効果を区別するために非常に適していることを想定する。

【0358】

図24は、単一のプレート上の12個の異なるアッセイを行うことができる24ウェル形式の使用を示す。このデザインにより、ケモキネシスから走化性を区別することができる。図24において、細胞は、領域300に播種することができ、付着させることができることが分かる。試験化合物または適切な対照培地は、指定された貯蔵所領域（400）に配置される。化合物がケモキネシスである場合、細胞遊走の刺激があるが、方向の優先度は、細胞によって明示されず、領域200および210は、適切な対照と比較してより多くの細胞数を明示するであろう。試験化合物が走化性である場合、細胞数の増大は貯蔵所（200）に最も近い読み出し領域で際立っており、貯蔵所（210）からさらに離れた領域において見いだされる以上であろう。

【0359】

一部の態様において、図24に示した基体は、アッセイ・プレート（100）全体のそれぞれの領域（図24は、細胞播種位置に限定されるように図示してある）（300）に細胞を均一に播種することによって利用される。一様に分配された細胞を十分な期間（細胞種および培養条件に応じて）基体（100）に付着させる。次いで、試験化合物または適切な対照培地を貯蔵所（400）に添加する。適切なインキュベーション時間（例えば、細胞種および培養条件によって決定される）の後、プレートを読み込む。操作の際に、試験化合物をウェルの貯蔵所に添加する。ゾーンA（位置200）が、一貫してゾーンB（位置210）よりも多くの細胞数を示す場合は、試験化合物の走化性の効果が示される。これらのプレート形

10

20

30

40

50

式では、蛍光定量、比色、および濃度測定技術を含むその他のバイオフォトニック検出技術での使用を見いだすことが認識される。

【0360】

本発明のさらに他の態様において、基体は、複数のアッセイ領域上に1つまたは複数の試験化合物の一様な勾配を生じさせるために2つまたはそれ以上のミクロな液体なチャンネルを含むように設計される。例えば、図25は、3つのミクロな液体なチャンネルを使用する本発明の1つの想定される態様を示しており、それぞれの化合物について複数のアッセイ領域を有する単一のアッセイ・プレート上で3つの異なる関心対象の化合物の同時試験が可能である。簡単には、図25は、上部、中央部、および底部パネル（それぞれA、B、およびC）に分割された48ウェルのアッセイ・プレートを示す。それぞれのパネルA、B、およびCは、単一のアッセイ・プレート上で8個の個々の細胞運動性および遊走性の試験領域がある。したがって、好ましい態様において、細胞の運動性および遊走性に対する3つの試験化合物の各々の効果を8回プローブすることができる。しかし、本発明は、図25に示したアッセイ配置に限定されることは企図されない。実際に、本発明は、他の商業的に認識されたウェル形式の多くの態様を想定する。例えば、本発明は、96ウェルのアッセイ・プレート形式を使用する態様を特に想定する。このようなアッセイ形式では、8個の試験化合物を12回、12個の試験化合物を8回、その他同時に試験することができる。図25のパネルAに関して、それぞれの試験領域（100）は、2つの最適に整えられたアッセイ領域（200および210）、並びに細胞を播種するための細胞播種領域（300）（例えば、くぼみ）、並びに試験化合物を試験領域に分配するように構成された貯蔵所およびミクロな液体なチャンネル（400）のネットワークを含む。ネットワーク（400）は、ミクロな液体なチャンネル（例えば430）を経て複数の試験ゾーン貯蔵所（例えば420および440）と流体連絡された主貯蔵所（410）を含む。一部の態様において、アッセイ領域（200および210）は、ディスクリートゾーンであるが、その他の態様において、アッセイ領域（200および210）は、単にプレートリーダーによって読み込まれる領域である。試験領域は、プレートリーダーによって読み込まれる1つ、2つ、または複数の領域を含むことができる。図25を参照し、アッセイ領域（200）は、示したそれぞれの複製（100）に対して垂直な列AおよびBに整列される。好ましい態様において、貯蔵所およびミクロな液体なチャンネル（400）は、それぞれのパネルを水平に二分し、それぞれの複製の左縁部を形成する。また、このデザインの柔軟性により、初期の貯蔵所（410）において混合され、または分離したプレート・デザインにおいて異なる貯蔵所に供給される場合には、単一の化合物のまたは多数の化合物を同時に試験できることが認められ得る（例えば、図26を参照されたい）。

【0361】

アッセイ・プレートを使用する、図25に示した細胞の遊走および運動性の1つの想定されるアッセイ法を以下に記載してある。簡単には、細胞をパネルA、B、およびCのそれぞれの細胞播種領域（300）に播種する。細胞を十分な期間（細胞種および培養条件に応じて）基体（300）に付着させる。異なる（または、同一の）試験化合物をそれぞれパネルA、B、およびCの各々の主貯蔵所（410）に添加し、その結果試験化合物は、それぞれの試験領域貯蔵所にネットワークを経て送達される（例えば、420および440）。それぞれの試験化合物をそれぞれの試験領域中の細胞に対して十分な期間（細胞種および培養条件に応じて）作用させる。それぞれの試験領域を解析し（例えば、最適に修飾された市販のプレートリーダーおよび適切なソフトウェアを使用して、または視覚的に顕微鏡で）列AおよびBに整列されたアッセイゾーンに遊走したそれぞれの複製中の細胞数を決定する（「読み込む」）。好ましい態様において、「読み込む」工程は、上で詳細に記載したように、液晶で基体をおおうことによって行う。一部の態様において、このプレート・デザインおよび原理は、細胞の画像化または内因性の酵素活性などの細胞生存度の間接的な指標のための標準的な染色プロトコルを使用して、比色および蛍光定量によるプレートリーダーと組み合わせて使用される。

【0362】

10

20

30

40

50

本発明のさらに他の態様において、アッセイは、細胞の運動性および遊走に対する試験化合物の抑制的、付加的、または相乗的な効果を決定するために提供される。例えば、図26に示した好ましい態様に関して、最適に整えられたアッセイ・プレート(100)は、標準的な市販のプレートリーダーと適合するよう配列されたアッセイ領域(400および500)および2つまたはそれ以上の分離した貯蔵所(200および300)のアレイによって構成される。図26を参照すると、この態様では、ゾーンA、ゾーンB、およびゾーンCと標識された3つの異なる試験ゾーンを提供するように設計されていることが分かる。使用の際に、特定の細胞種に対して走化性であることが既知の第1の化合物を貯蔵所(200)のうちの1つに配置し、第2の試験化合物を他方の貯蔵所(300)に添加する。このプレート・デザインにより、2つの試験化合物の評価および対照培地に対する比較が可能となる。細胞を上記の態様にて説明したように、任意の細胞播種領域(600)の基体上に播種し、付着させる。試験化合物Aは、ゾーンAの試験貯蔵所(300)に配置される、試験化合物Bは、ゾーンBの試験貯蔵所(300)に配置され、対照培地は、ゾーンCの試験貯蔵所(300)に配置される。連絡するミクロな液体なチャンネルにより、既知の走化性薬(210)および試験化合物(310)を局部的な試験領域貯蔵所に提供し、これらの因子を試験基体上の細胞に勾配に送達する。アッセイ領域(400および500)の細胞の存在は、好ましくは上記の通りに液晶で基体をおおうことによってアッセイされる。対照アッセイと結果を比較することによって、試験化合物の効果を簡単に決定することができる。既知の走化性因子は、細胞を刺激して、この化合物(210)を含む局部的な貯蔵所に最も近いアッセイ領域内に移動させるであろう。試験化合物が(ゾーンAおよびBにおいて、貯蔵所300に沈着して、および局部的な貯蔵所310に送達される)既知の走化性因子によって刺激される走化性を阻害することができる場合、対照(ゾーンCのもの)と比較して、わずかな細胞が試験貯蔵所(500)に最も近い試験領域に局在化されるであろう。さらに、試験薬剤が相乗的または相加的に走化性を刺激する場合、対照と比較して、より多くの細胞がゾーン500に位置するであろう。化合物が既知の走化性因子の存在下で完全に細胞の遊走を阻害する場合、対照と比較して、わずかな細胞がアッセイ領域500および600に位置するであろう。特定の態様において、このデザインは、比色および蛍光定量的なアッセイと連動して使用することが予想される。好ましい態様において、細胞数の検出には、試験基体上の液晶の薄いフィルムの配置(液晶メソゲンを整列させるアッセイゾーンと共に)および任意の付着された細胞を使用する。前述したように、細胞の存在により、局所的にナノ構造基体がマスキングされ、したがってLCが基体の整列の影響に近づくのを防止する。好ましい態様において、これは、偏光、光の波長の特異的な波長または組み合わせを使用して検出され、および定量される。

【0363】

さらなる態様では、すでに記述した細胞浸潤アッセイ法に使用するための分離された試験ゾーンを作製するために、このデザインの多くの貯蔵所およびミクロな液体なチャンネルを使用する(例えば、図5~9を参照されたい)。これにより、試験化合物が細胞浸潤を防止する能力を決定することができ、これは、抗新生物化合物の開発において治療効果がありそうなことの指標として使用される。

【0364】

開示されたアッセイ配置のさらなる態様およびバリエーションも本発明の範囲内である。一部の態様において、本明細書に記述されるアッセイ基体上に播種された細胞は、1つまたは複数の蛍光分子、放射性同位元素などでその表面を標識する。一部の態様において、ラベリングにより、開示されたアッセイ系によって生じるシグナルの検出性および感受性が増大することが想定される。例えば、特定の態様において、領域の液晶の乱れおよび整列を解析し、次いで蛍光を解析することによって細胞数を決定するために、標準的な市販のプレートリーダー(本明細書に記述されるLCアッセイ形式に適用するために適応されたもの)を使用する。当該技術分野において、細胞ラベリング技術および標識された細胞の検出は周知である。

【0365】

10

20

30

40

50

本発明のその他の好ましい態様において、液晶、蛍光定量、比色、または濃度測定の読み出し方法を使用する細胞遊走アッセイ法を行うために有用である、非対称の（例えば、部分的に透明な、および部分的に不透明な）パターン化された基体が提供される。液晶アッセイ法の態様において、非対称にパターン化された基体は、メソゲンを整える整列領域を提供し、またはメソゲンを整えていない乱れた領域を（例えば、ランダムなパターニング）提供するように構成される。本発明は、走化性の細胞遊走からケモキネシスを区別するためのツールを提供することによって、細胞遊走に対する試験化合物の効果を決定するために、非対称の基体を使用する特定の態様が有用であることを想定する。非対称の基体を使用する態様および本明細書に開示される種々の液晶に基づいたアッセイ配置の裏にある原理は、基本的には同じである。しかし、蛍光定量、比色、または濃度測定に基づいた方法は、関心対象の細胞が、生体染色、比色定量染色（例えば、死細胞のアッセイについては）もしくは蛍光染色されるときに、これらの態様での使用が見出され、またはさもなくば、提供された基体が光学的に透明および光学的に不透明な領域の両者で非対称的にパターン化されているときに、標識される。

10

【0366】

好ましい態様において、細胞（例えば、少なくとも1つの細胞）が、アッセイ基体の光学的に不透明部分に播種される。いくつかのこれらの態様において、細胞は、細胞播種領域（例えば、アッセイ基体のくぼみ）に播種される。他の態様において、細胞を基体全体に単に均一に分配し、適切な条件下で十分な期間付着させる。光学的に透明および光学的に不透明なものの両方を含む試験領域（またはパターン化され、および非パターン化領域；そのパターン化された領域は、LCメソゲンを配向させる）は、市販のプレートリーダーによって読み出されるアッセイ領域と対応するように構成することができる。

20

【0367】

本明細書に開示される特定の態様において、試験化合物は、1つまたは複数の貯蔵所に配置され、アッセイは、上記した液晶に基づいたアッセイ法に使用されるものと同様のプロトコルを使用して行われる。他の態様において、非対称的にパターン化されたアッセイ基体は、少なくとも1つの貯蔵所を流体接続する少なくとも1つのミクロな液体なチャンネル、並びに光学的に不透明および光学的に透明な基体の領域をさらに提供する。

30

【0368】

本発明は、透明な領域または非対称の基体の液晶を整列させるようにパターン化された領域上で遊走する細胞を検出することを想定する。不透明な領域または非対称の基体の液晶を整列させない領域上で遊走する細胞は、検出されない。

40

【0369】

図27は、想定される非対称アッセイ配置の一態様を示す。図27を参照すると、パネルAは、液晶アッセイ法で使用するための非対称的にパターン化されたナノ構造基体の使用を示し、パネルBは、細胞の存在を検出する比色、蛍光定量、放射測定、および他のアッセイ法で使用するための非対称の不透明な基体のデザインを示す。アッセイ基体は、液晶メソゲンを整列させるようにパターン化されたか（パネルA）または細胞検出の他のアッセイ法で使用するための実質的に透明であるか（パネルB）の第1の領域（100）と、液晶を配向させず、したがって液晶アッセイで細胞の存在を報告しないか（パネルA）または実質的に不透明であり、細胞検出の他のアッセイ法（比色および蛍光定量アッセイ法によって例示されるが、これらに限定されない）を使用して細胞の存在を報告しないか（パネルB）の第2の領域（200）を含む。特定の態様において、領域（100）および（200）の中央には、細胞を播種するために提供された位置（300）（例えば、くぼみ）がある。図27の領域は、半円として描いてある。しかし、実質的に透明および実質的に不透明な領域は、アッセイ法の性質および使用した検出装置に応じて、大きさおよび形状がなってもよいことが理解される。一部の態様において、本発明の非対称の態様を使用するためのプロトコルは、上記した従来のLCアッセイ配置に使用するためのものと実質的に同じである。

50

【0370】

図28は、細胞遊走に対して走化性の効果を発揮する試験化合物において予想される効果を示す。矢印(100)は、走化性の勾配が左側から始まっていることを示す。パネルAは、液晶アッセイ法で使用するための非対称の基体の使用を示す。細胞の存在は、これらが、液晶メソゲンを整列させるようなナノ構造にされている領域(パネルAの基体Aの左側およびパネルAの基体Bの右側)に位置するときにのみ報告される。走化性のシグナルの方向に関して、異なって配向されている対になった非対称的にパターン化された基体(パネルAおよびBの基体A対基体Bを参照されたい)を使用して結果を比較することによって、装置の使用者は、所与の試験化合物が効果を有しないかどうか、または走化性もしくはケモキネシスを誘導するどうかを選別することができる想定される。走化性の刺激により、細胞は、走化性シグナル(100)の起源の方に移動する。パターン化された基体が左(パネルAの基体A)に配向されるときに、細胞数の著しい増加が検出される。

【0371】

図28のパネルBは、細胞数をアッセイするその他のイメージング装置において比色または蛍光定量的なプレートリーダーで使用するための非対称的にパターン化された基体の使用を示す。液晶アッセイ基体と同様に、基体の半分だけが(基体Aの左部分およびパネルBの基体Bの右部分)、細胞数を決定することができる。

【0372】

図29は、ケモキネシスを刺激する試験化合物について予測される結果を示す(例えば、刺激に関して方向ベクトルを有さずに細胞遊走の増大を示すことによる)。試験化合物の勾配は、左側(100)から始まっている。パネルA(基体AおよびB)は、液晶アッセイにて予想される結果を図示しており、パネルBは、比色または蛍光定量的アッセイ法をに使用して予想される結果を図示している。対照と比較して、より多くの細胞が検出され(例えば、化学走性刺激は提供されなかった)、細胞の存在を検出することができる基体部分が、試験化合物の勾配の方向(100-左から生じている)に関して左に(基体A)または右に(基体B)配向されるかどうかに関係なく、同数の細胞が検出される。

【0373】

非対称の基体の態様では、細胞の遊走および運動性のアッセイを行うための一般的なスキームおよび本明細書に開示した態様の1つの適応がある点に注意することが重要である。したがって、本発明は、基体が上で詳細に記載したように、1つまたは複数のマイクロチャネルおよび1つまたは複数の貯蔵所を含むであろうことを特に想定する。同様に、非対称にパターン化された態様では、多数のアッセイ領域のマイクロアレイ並びにプレートリーダーの大きさおよび形式(例えば、標準的な24、96、384、1536ウエルプレートリーダー形式に従う)に同様に適応できる。

【0374】

一部の好ましい態様において、アッセイは、アレイに配向された非対称的にパターン化された複数(例えば、2、4、12、24、48、96またはそれ以上)の領域を含む。特に好ましい態様において、近接する(例えば、隣接する)非対称的基体領域を光学的に不透明なおよび光学的に透明な領域に隣接させるために代わりの(例えば、反対の)配向を形成するように配列される。図30~32は、細胞遊走に対する試験化合物(または、いくつかの試験化合物および既知の化合物)の影響を決定するためにデザインされた、想定される非対称的にパターン化されたいくつかのアッセイ配置を図示する。

【0375】

図30を参照すると、複数の非対称的にパターン化されたアッセイ領域(200)および(300)が基体(100)上にアレイ形式で構成されている。EEからCCの図解は、液晶アッセイで使用するための非対称的にパターン化された基体の使用を示すが、図27~29に詳述したように、マルチアレイ形式の基体表面の非対称的サンプリングの原理は、比色または蛍光定量的なアッセイで使用するためにも適用される。それぞれの非対称的にパターン化されたアッセイ領域(200)および(300)は、液晶メソゲンを整列させるためにパターン化された領域(400)および液晶メソゲンを整列させない平面の領域(500)を提供する。細胞の存在は、メソゲンを整列させることができるアッセイ領域に、液晶メソゲンを付加後に

10

20

30

40

50

報告されるだけである。隣接する非対称的にパターン化されたアッセイ領域((200)、および(300))は、それぞれの平面領域(400)およびパターン化された領域(500)に関して対向する配置で配向され、かつ試験化合物の勾配(700)の起源の部位に関して直交して位置する。好ましい態様において、それぞれの非対称的にパターン化されたアッセイ領域((200)、および(300))のパターン化された領域(500)には、細胞播種位置(例えば、くぼみ)(600)を提供する。図30に示した態様では、少なくとも1つの試験化合物を保持し、分散するために基体(100)の一縁部に貯蔵所(700)をさらに提供する。

【0376】

図30に図示したアッセイ配置では、貯蔵所(700)から非対称的にパターン化されたアッセイ領域((200)および(300))の距離が増大するので、貯蔵所(700)から非対称的にパターン化されたアッセイ領域((200)および(300))へ試験化合物の次第に希釈された濃度(点線)を提供することが想定される。非対称的にパターン化されたアッセイ領域((200)および(300))から得られる細胞遊走データの解析により、試験化合物の相対的な能力に関しての情報が与えられる。例えば、強力な走化性の試験化合物は、所与の期間における、貯蔵所(700)から遠い非対称的にパターン化されたアッセイ領域((200)および(300))の化合物の出所(700)の方への細胞の遊走を、わずかに走化性の試験化合物よりも強く刺激する。好ましい態様において、非対称的にパターン化されたアッセイ領域((200)、および(300))を基体(100)上に配向させて、自動化されたデータ収集および解析を実現する(例えば、プレートリーダーを使用する)。

【0377】

図31は、基体(100)が、試験化合物に接触することが禁じられている、非対称的にパターン化されたアッセイ領域(800)の対照として役立つ1つまたは複数の列を提供するというもう一つの態様を示す。また、図31および32は、1つまたは複数のミクロな液体のチャンネル(例えば、図31の900および図32の750及び850)が基体(100)全体の試験化合物の一様なデリバリーを提供するアッセイ配置を図示する。

【0378】

本発明は、上記された、並びに図30および31の、非対称的にパターン化されたアッセイ配置に限定されることは企図されない。実際に、単一基体上で、非対称的にパターン化された多数のアッセイ領域(例えば、48、64、96、384、または1536、またはそれ以上)を使用するときに、多くのアッセイ領域配置が可能である。図32は、第1の貯蔵所(700)および付随する既知の走化性薬を含むミクロな液体のチャンネル(750)が、第2の貯蔵所(800)および付随する試験化合物を含むミクロな液体なチャンネル(850)に近接して配置される態様を簡単に図示する。図32に示した非対称的アッセイ配置において図示した他のエレメントは、それぞれ図30および31に記述したものと共通している。図32に図示したモデル・アッセイ配置では、試験化合物が既知の走化性の因子に影響を及ぼす能力を評価することを提供する(例えば、増大または阻害する)ことが想定される。

【0379】

パターン化された表面を有する非対称の基体を使用する一部の態様において、アッセイ領域は、その全表面を通じてパターン化されると考えられるが、光の伝透化を防止してしまう根底にある不透明な成分の非対称的存在のために、非対称的なサンプリングが生じると考えられる。図33は、このような態様の一つを示す。図33において、パネルAは、アッセイ領域(100)の上面図であり、パネルBは、同じアッセイ領域の断面図である。アッセイ領域は、そのサンプリング能力において非対称であり、光は領域200を通るが、領域300を通らないことが分かる。アッセイ領域の全ての表面は、液晶メソゲンを整列させるためにナノパターン化される(600)。しかし、ナノパターン化された表面は、非対称的に不透明な基体であり、領域200の基礎をなす光学的に透明な(400)および領域300の基礎をなす光学的に不透明な(500)である。したがって、光学的に透明である基体(200)の部分においてのみ(それは、これらの表面上に配置された液晶メソゲンの配向を妨害する)、表面上の細胞の存在に関して、データを収集する。このデザインは、非対称的にパターン化されたか、または非対称的に不透明な基体を利用する上記された態様の全てに適用を

10

20

30

40

50

有する（例えば、図27～32を参照されたい）。

【0380】

プレートリーダーが単一の試験領域内で非対称的な読み込みをするようにをプログラムすることによって、このストラテジーを使用することが可能である。現在、多くの市販のプレートリーダーでは、単一のウェル内の多くの読み込みをし、読みを平均する。先の記述において概説したように、リーダーは、試験領域内で非対称的に読みをするようにプログラムすることができ、したがって、走化性およびケモキネシスを決定するために使用することができる。これらの態様を図34に図示してある。

【0381】

一部の好ましい態様において、プレートリーダーは、細胞の外側に伝播する集団の周囲の位置を決めて、直径を確かめるために、検出エレメントが単一の分析ゾーン内で、または分析ゾーンをスキャンするために多くのディスクリート読みを得るようにプログラムされる。本態様において、細胞は、異なった細胞播種領域上の中央に播種される。一部の態様において、細胞は、以下に記載された細胞播種装置を使用して播種され、分析ゾーン（24、96、384、または1536マルチウェル・プレートの単一のウェルの中心など）内の離れた位置に細胞の分布を制限する。細胞を付着させるために（培養条件および細胞種に対して時間依存的）細胞播種装置において最初にインキュベーションした後、細胞播種装置を除去し、非付着細胞を洗浄によって穏やかに除去した。次いで、細胞を有する基体を再びインキュベートし（培養条件および細胞種に対して時間依存的）、最初の細胞播種領域から外への細胞の遊走は、プログラムされた検出エレメントおよび分析的ソフトウェアを使用して決定した。因子が、細胞遊走を促進する培地に添加される（因子の勾配が培地中に存在しないように）場合、外側に遊走する細胞の外形は、因子が細胞遊走を刺激する能力に比例した円の直径を有する円を概略的に定義する。

【0382】

同様に、この手順は、細胞遊走を阻害する化合物を評価するために使用することができる。このようなアッセイ法は、癌の治療のための可能性のある治療的な化合物をスクリーニングするために重要である。一部の好ましい態様において、この手順は、試験化合物が血管内皮細胞の遊走を阻害する能力を評価するために使用され、癌治療法に使用される化合物のためのポジティブな指標として使用されることが多い。検出エレメントおよび分析ソフトウェアの機械的ドライバのプログラミングは、当業者によって容易に果たされる。一部の態様において、細胞播種領域は、細胞を含むことを光学的に読み出すことを避けるために不透明であるか、または透明であることができ、定義された領域に播種された細胞の周辺を記録して、これらの位置を決定した。その他の態様において、検出エレメントは、最初の細胞播種領域からの読みを得ることを避けるようにプログラムされる。

【0383】

このアプローチは、液晶に基づいたアッセイ法での使用に限定されず、比色、光学的な濃度測定、蛍光定量、および放射測定法などのバイオフォトニック技術に広く適用すべきである点に注意されなければならない。このストラテジーを用いて、ケモキネシスを走化性から区別するアッセイ法を初めに播種された細胞に対する走化性の勾配を提供（走化因子の勾配を作製するために流体送達系または分解可能なペレットを使用する）し、次いで分析ゾーン内で細胞位置の多くの読みを得ることによって行うことができる。ソフトウェアにより、分析ゾーン内の分離した領域のいずれかの解析を実現するか、または生じる細胞の散在性のコロニーの大きさおよび長軸を決定するために使用する。化合物がケモキネシスである場合、分散された細胞は、最初の細胞播種領域周辺に均一に分布され、ケモキネシス化合物の能力に比例した円の直径を有するほぼ円形の外形を生じると考えられるが、走化性の化合物では、因子の供与源の方へ優先して細胞を誘導し、相対的な化合物の走化性の能力に比例した長軸直径を有する生じると考えられる。この手順は、検出エレメントおよび分析ソフトウェアの間隙の位置を決定するソフトウェアを修飾することによって行うことができる。本発明のもう一つの態様において、液晶メソゲンの薄いフィルムを、これらが基体に付着された細胞の存在および間隙の位置を報告するように配向させるため

10

20

30

40

50

に原動力（電界、磁場、および温度場を含むが、これらに限定されない）を使用する。本態様において、メソゲンは、細胞と直接接觸してない。この態様では、付着された細胞が、インピーダンス（例えば、電気および/または磁気および/または温度）の定義されたゾーンを生じ、これが液晶フィルムに伝えられる原動力を減らすという事実を利用する。この態様の例を図35に示してある。細胞（100）を非電導性基体（200）上に播種して、付着させる（付着時間は、細胞種および培養条件に依存する）。基体（200）には、細胞の付着性および機能を補助する成分（例えばコラーゲンなどの細胞外マトリックスタンパク質、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、オステオポンチン、トロンボスponジン、細胞接着分子-1（ICAM-1）、ICAM-2、コンドロイチン硫酸などのプロテオグリカン、フォンビルプラント因子、エンタクチン、フィブリノーゲン、テネイシン、粘膜アドレシン細胞接着分子（MAdCAM-1）、C3b、およびMDC（メタロプロテアーゼ/ジスインテグリン/システィンリッチ）タンパク質）、核酸、特異的な受容体、および細胞受容体認識配列（例えば、RGD、EILDV、LDV、LDVP、IDAP、PHSRN、SLDVP、GRGDAC、およびIDSPなどのカドヘリン、免疫グロブリンスープーファミリー、セレクチン、ムチンおよびインテグリン結合配列を含むが、これらに限定されない）の吸着または共有結合形成によって機能を持たせてもよい。一旦付着されると、液晶メソゲンの薄いフィルム（300）は、細胞が付着される表面の反対側の基体の表面と接觸して配置される。付着された細胞については、細胞が上部分または下部の表面上にある場合で相違を生じない。一旦閾値レベルが達成されたならば、液晶メソゲンを配向させることができる原動力（400、ダイアグラムの下部の上の大きな矢印によって示した）を基体（100）全体に適用する。原動力の大きさは、細胞が付着されていない領域の基体（200）被せられた液晶メソゲンを配向させるためのちょうど閾値以上にセットされる。閾値近くでは、付着された細胞のインピーダンスが、これらの付着部位のすぐ反対側の基体（200）上に位置するメソゲンの配向を防げると考えられる。細胞、基体を通過し、およびその後にLCフィルムを通過する原動力のディファレンシャルな減弱は、ダイアグラム（500）の上部に異なる大きさの矢印によって示してある。これにより、メソゲンが原動力によって配向されている液晶フィルムの領域およびメソゲンが十分な大きさの原動力に曝露されずに、メソゲンの配向を生じない領域（細胞付着性ゾーンに相関する）を生じる。

【0384】

好みの態様において、原動力は、基体の両側に配置された第1および第2の電極によって適用される電場である。好みの態様において、電解水溶液が、基体の細胞側と第1または第2の電極との間に組み込まれる。電極は、固体スラブ-タイプ電極が好ましく、ワイヤー・メッシューからできていることがより好み。操作の際に、電位差が基体全体に適用される。細胞の存在により、撮像される細胞が引き起こす液晶の配向を乱す方法で電場系が乱される。

【0385】

この態様は、細胞付着性および細胞増殖性のアッセイに有用な細胞数の検出のための適用を有する。さらに、原動力のインピーダンスの大きさは、基体に対する堅固な細胞付着性と直接相関するので、この態様は、試験化合物の毒作用を評価するため有用である。細胞に対して毒性のある化合物は、下側の基板に対する付着の脆弱化および消滅を引き起こし、次いで定量可能なインピーダンスの減少を生じ、したがって原動力による配向の影響に対して感受性の細胞によって占められる領域の反対側のメソゲンをマスクすると考えられる。

【0386】

図36は、本発明のもう一つの態様を示す。本態様では、細胞（100）を、その中に10nm～1mの直径の穿孔（300）を有する基体（200）上に播種する。このような基体は、フォトリソグラフィー、X線リソグラフィー、およびe-ビームリソグラフィーを含むが、これらに限定されない種々の技術を使用して製造することができる。記載された穿孔のアレイは、事実上絶縁である基体に導入され、表面に細胞が付着されるのとは反対側の表面上に位置する液晶メソゲンに原動力が伝わるのを防止する。LCメソゲンの薄いフィルムを配置す

10

20

30

40

50

る前に、薄い伝導液体層（細胞に対して生物学的に不活性）を細胞の反対側の表面に配置する。これにより、既知の空間分布の読み出しの異なったゾーンを作製し、情報処理のための自動化されたプロセスの開発が容易になると考えられる。

【0387】

その他の態様において、細胞間接着の完全性を評価することができる試験基体上で、細胞をコンフルエントに増殖させる。電場の伝導に対して抵抗性の経上皮膜を利用するアッセイ法と同様に、このアッセイ法は、機能形態学の研究に、感染微生物の病理生物学の研究のために、試験化合物の毒作用の評価に、および新生物の感染度のインピトロ評価に適用を有する（Zakら）。この態様の例を図37Aおよび37Bに挙げてある。細胞（100）を、原動力（例えば、電場および／または磁場および／または温度場）を伝導する基体（200）上に播種する。上皮細胞をインキュベートし、コンフルエントに増殖させ、この時点で、これらは細胞間結合（300）を発達させており、基体およびその後に液晶メソゲン（400）の薄いフィルム内を通じて伝達する原動力に対してこれらがより耐性になる。原動力の閾値近くでは（図解の下部の大きな矢印（500））、無処理の細胞の単層がLCメソゲンを整列させるために十分な原動力の伝達を防げる。無処理の上皮単層による原動力の減弱は、図37Aの上部の小さな矢印（600）によって示してある。

【0388】

図37Bは、上皮細胞に対して中毒性である試験化合物に対する曝露の結果を示す。この場合、細胞の毒性（100）は、細胞間結合（300）の破壊、および細胞の反対側の表面に位置するメソゲン層内への原動力の伝達に対する上皮層のインピーダンス（耐性）の減少によって現れる。この場合、原動力（大きな矢印600によって示した）は、メソゲン層を整列させるために十分である。この液晶メソゲンの配向の変化は、本出願において先に述べた全ての手段によって定量することができる。液晶メソゲンの配向の配向変化は、試験化合物に対して曝露する前および後に連続的にモニターすることができ、または予め決定された時点で定量することもできる。

【0389】

一部の態様において、基体（100）は、原動力を伝達することができ、細胞の付着および機能を補助するできる伝導材料を含む中央窓（300）を有する絶縁材（200）から成る（例えば、原動力として電場を使用する場合はガラス）。これらの関係を図38Aに示してある。

【0390】

図38Bは、細胞を有するこの基体の使用を図示する。細胞（400）を、絶縁材（200）を含み、かつLCメソゲンを配向させるために使用される原動力に対して伝導性である中央窓（300）を含む基体（100）上に播種する。一旦コンフルエントに達すると、成熟した細胞間接着を形成し（500）、これが原動力の通過に対する耐性に寄与する。

【0391】

もう一つの態様において、培養における細胞の電気的活性を報告するために、LCメソゲンを使用する。研究のための関心対象の細胞のタイプは、ニューロン細胞、心臓細胞、および筋細胞を含むが、これらに限定されない。本態様において、細胞は、標準的な実験室プラスチックまたはガラス容器で培養される。研究される細胞のタイプに対して非毒性か、および／またはメソゲン層と相互作用することが示されているリン脂質の薄いフィルムの付加によって細胞から分離されたLCメソゲンの薄いフィルム。細胞中の電気的活性により、細胞にすぐ隣接したLCメソゲンの配向の変化を生じる。この配向の変化は、先に述べた技術の全てを使用して視覚化することができる。

【0392】

C. 細胞学アッセイ

なおさらなる態様において、本発明は、細胞膜中の細胞骨格のアラインメントを報告するための組成物および方法を提供する。例えば、特定の態様において、液晶は、細胞膜を介して伝えられる細胞骨格エレメントの整列を報告するために使用される。一部の態様において、液晶層は、関心対象の細胞上に直接配置される。その他の態様において、関心

10

20

30

40

50

象の細胞のは、可溶化されて（例えば、界面活性物質を使用して）、液晶層に対して細胞骨格を曝露する。一部の態様において、液晶層は、界面活性物質であることができる（例えば、リオトロピック液晶）。

【0393】

本発明のその他の態様において、特異的な（または、非特異的な）細胞分泌性産物の產生を定量するための組成物および方法が提供される。本発明は、細胞外に産物の分泌を誘導する1つまたは複数の化合物との関心対象の細胞の接触に応答して、特異的な分泌性産物の分泌を定量することに向けられた特異的な態様をさらに想定する。好ましい態様において、ナノ構造基体は、その表面に組み込まれた特異的な結合配列と共に製造される（例えば、成長因子またはサイトカインなどの細胞の特異的なタンパク質産物を結合するようにターゲットされる）。関心対象の細胞を基体上に播種し、適切な条件下で付着させ、培養する。本発明の好ましい態様において、細胞を支持する表面は、第2の表面であり、第1の表面は、その表面に組み込まれた特異的な結合配列と共に製造されている表面である。この第2の表面は、第1の表面の上または下に配置されてもよい。液晶反応の勾配を作製することにより、細胞周辺でハロー効果として視覚化され、最も高い特異的な因子の濃度で、細胞に最も近くなる。（図39を参照されたい）。簡単には、図39は、液晶反応のゾーン（200）が、細胞による特異的な分泌性産物の分泌により、関心対象（100）の細胞周辺で生じることを示す。細胞によって分泌される産物の量の推定は、細胞を囲んでいる液晶反応の直径（環）に相関し得ることが想定される。例えば、1つの特異的な態様において、本明細書に開示されるアッセイ法および技術により、EGFなどの1つまたは複数の栄養性因子にに対する曝露に応答して神経成長因子（NGF）の細胞分泌を評価することができる。

【0394】

上記例から、本発明により、種々の環境の刺激に対する単一細胞または小さな群の細胞の細胞分泌性反応を調査することができることが明らかである。また、これらの技術およびアッセイ基体により、さらなる細胞によってデリバリーされる環境刺激に応答して非対称的に分泌される細胞因子を検出および定量することができることが明らかである。（図40を参照されたい）。図40は、もう一つの細胞（300）の存在によって影響される特異的な分泌性産物の分泌により、関心対象（100）の細胞によって產生される液晶反応のゾーン（200）示す。例としては、隣接して位置するニューロン細胞（300）によって放出される因子による、上皮細胞（100）による因子の分泌の刺激である。

【0395】

さらに他の態様において、本明細書に開示される分泌反応アッセイ法は、上で開示した基体、貯蔵所、およびミクロな液体の系で使用するために適応され、その結果、液晶表面全体に確立された1つまたは複数の化合物の勾配に応答して、細胞の分泌源プロフィールを定量することができる。例えば、図41は、2つの細胞（200）の分泌反応（300）が、基体上の貯蔵所（400）によって確立された化合物の勾配に応答して適切な液晶表面（100）を介して報告されたことを示す。

【0396】

本発明の好ましい態様において、マイクロメートルおよびナノメートル・サイズのチャネルが細胞を支持する表面にパターン化される。チャネルに沿った液体の流れにより、チャネルをカバーする細胞からの分泌性産物の試料採取が可能となる。チャネルから収集される分泌産物は、質量分析、UV-Vis吸収分光法、ELISA、ゲル電気泳動、および分泌性の産物に適用可能なその他の解析方法などの従来の解析法により、当業者に周知である液晶の使用を含む方法を使用してアッセイすることができる。

【0397】

細胞分泌産物アッセイ法は、本明細書に開示されたいずれの細胞の遊走および運動性のアッセイ配置で使用するためにも設計する（例えば、適応させる）ことができ、したがって、細胞遊走に関連して非対称的な分泌を検出できることが想定される。図42において、基体（100）（試験化合物貯蔵所（400）を有する）を横切って遊走する間の細胞（200）の非特異的な相互作用により、その跡に基体（100）の表面の整列の変化を生じ、これが

10

20

30

40

50

液晶層（300）によって報告され、細胞（200）の存在は、整えられた基体が上部に配置された液晶層に到達するのを細胞がブロッキングすることによって報告され、および細胞の特異的な分泌性産物（500）の存在は、基体（100）のナノ構造表面に組み込まれた特異的な受容体によって報告される。基体（100）の表面を横切ってデリバリーされる可溶性因子の勾配に応答して、細胞（200）による非対称的な分泌プロセス（500）を示すために、貯蔵所（400）をこの態様に組み込んだ。

【0398】

細胞の代謝状態の変化により、出熱の変化を生じる。液晶内の整列には、温度が強力に作用することができるので、細胞の出熱の変化を検出するために液晶を使用することができる。例えば、熱量測定の変化は、LPSでの刺激を経た食作用などの代謝の変化と関係することがある。これは、単にナノ構造（整えられた）基体上の単一細胞もしくは細胞群の上にLCを配置することによって、またはハイブリッドECM-LCを使用することによって行うことができる。本発明の好ましい態様では、細胞培養のために使用される温度と同じ温度で相転移を有する液晶の混合物を利用する。本発明の好ましい態様において、液晶を相転移の方へ冷却し、液晶の出現を温度の減少の間モニターする。液晶は、細胞を培養する液晶の基体であることができる。本発明の好ましい態様は、リン脂質または細胞と相互作用するその他の生物学的な受容体で装飾されている液晶の基体である。液晶は、また、リオトロピック液晶であることができる、したがって、細胞培養は、細胞の画像化の間に細胞を被っている液晶の存在下で生じることができる。

【0399】

D. プレート上部装置

また、本発明は、マルチウェル（すなわち、8、16、24、96、364など）プレートと組み合わせて使用される新規のプレート上部装置を提供する。一部の態様において、プレート上部装置は、アッセイに利用されるメソゲンのための表面のアンカリングを提供する。図43を参照、本発明のプレート・タイプ装置（100）の1つの態様は、プレート上面（200）を含む。複数の長形部材（300）が、プレート上面（200）から外側に延びる。好ましい態様において、プレート上部部材は、遠位端表面（500）を有する遠位端（400）を含む。好ましい態様において、長形部材（300）は、円筒体である。さらなる好ましい態様において、遠位端（400）は、光学的に透明な、非複屈折材料（例えば、ポリカーボネート）で構成される。さらなる好ましい態様において、遠位端表面（500）は、メソゲンを配向させるように構成される。摩擦された表面、斜方沈着された金属を有する表面、ナノ噴射された表面を含む（しかし、これらに限定されない）任意の適切な表面プレパレーションを使用してもよい。

【0400】

図44を参照し、プレート上部装置は、長形部材（300）の数に等しいウェル（600）の数を有するマルチウェル・プレート（100、一部のみを示してある）上に、長形部材（300）が対応するウェル（600）に延長するように配置される。好ましくは、長形部材（300）は、液晶（700）の薄いフィルムが長形部材（300）の遠位端（400）の間に存在するよう、ウェル（600）の底に実質的に延長する。さらに他の好ましい態様において、長形部材（300）の寸法は、余分な液晶メソゲンがウェル（600）に配置された長形部材（300）の側面に沿って、上へ通過するように、ウェル（600）内の寸法よりもわずかに小さいだけにする。この配置により、液晶フィルム（700）と長形部材（300）の遠位端（400）の一種な接触を生じることが想定される。

【0401】

また、本発明は、マルチウェル・プレートのウェル内の予め定められた領域に、細胞をデリバリーするために有用なプレート上部を提供する。図45を参照し、細胞デリバリー・プレート上部（100）は、プレート上部（図示せず）から下向きに延長する複数の長形部材（200）を含む。プレート上部がマルチウェル・プレート（300）上に配置されるときに、長形部材は、長形部材（200）の遠位端（500）は、ウェル（400）の表面（600）に接触するように、マルチウェル・プレートのウェル（400）内に延長する。一部の好ましい態

10

20

30

40

50

様において、表面(600)は、実質的に平らである。その他の好ましい態様において、ウェル(600)の表面は、その中にくぼみを有する。好ましくは、遠位端(500)は開口部(550)を含む。一部の好ましい態様において、開口部は、約1~4mmである。さらなる一部の好ましい態様において、開口部550の縁は、ガスケット材料で被覆されており、表面(600)で確実にしっかりとシールされる。ガスケット材料の非限定の例は、シリコーン、ラテックス、およびワセリンを含む。その他の態様において、開口部(550)の縁は、細胞の漏出またはシリンダ開口部の周囲を越えた遊走を妨げるために疎水性の材料で被覆される。好ましい態様において、長形部材(200)は、細胞の溶液が長形部材(200)から表面(600)に通過してもよいように中空である。特に好ましい態様において、長形部材(200)は、円錐体の形状である。しかし、本発明は、長形部材(200)の任意の特定の形状に限定されない。例えば、長形部材(200)は、円柱形および三角形の形状であってもよい。さらなる好ましい態様において、長形部材(200)は、細胞がウェル(400)の中心に送達されるように、マルチウェル・プレート(300)のウェル(400)に関して配向される。本発明のプレート上部は、任意の特定の材料に限定されない。実際に、プレート上部は、ステンレスまたは組織培養ポリスチレンから形成されていてもよい。

【0402】

使用の際に、細胞の溶液は、長形部材(200)へピペットで移される。細胞は、ウェル(200)の表面(600)に定着させ、付着させることができられる。指定された期間(細胞種および培養条件によって決定されるインキュベーション時間)付着させた後に、プレート上部を除去して、非接着細胞を穏やかに洗浄することによって除去する。次いで、培地をウェルに添加して、標準的なプレート上部をマルチウェル・プレート上に配置する。なおさらなる態様において、プレート上部装置は、細胞浸潤アッセイを行うために使用される。これらの態様において、プレート上部装置を使用して(または、他のいくつかの方法によって適用して)、細胞を基体上へ播種し、付着させる。付着されない細胞をリンスして流し、細胞を標識する(例えば、蛍光色素または生体色素で)。次いで、基体をマトリックスで被う。マトリックスは、基体膜様の複合体コラーゲン1または他の細胞外マトリックスなどの細胞外マトリックスであることができ、または寒天であることができる。細胞は、インキュベートすることができる。次いで、更に詳細には上記したように、播種点からどの程度細胞が遊走したかを決定するために、プレートリーダーを使用する。換言すれば、プレートリーダーは、細胞が標識された細胞を検出することによって細胞が遊走した領域を同定するために使用することができる。また、この方法は、マトリックスを利用しない場合を以外に、遊走アッセイを行つるために利用してもよい。

【0403】

VIII. 酵素電気泳動アッセイ法

さらに他の態様において、本発明は、酵素アッセイ法の結果を報告するために液晶を利用する装置および方法を提供する。特に、本発明の液晶アッセイ装置は、その基質に対する酵素の作用を報告するために使用し得ることが想定される。一部の好ましい態様において、基質は、パターン化するか、またはそうでなければこれらがメソゲンを配向させるように、上記の通りに処理される(例えば、コラーゲン、MATRIGEL、および他の基体に関する記述を参照されたい)。次いで、分析物または分析物を含む疑いがある試料(基体上で作用する酵素であることができる)を、分析物が基質と相互作用し、または基体に対して作用することができるように基質と接触させる。次いで、液晶を基質に適用する。基質に対する分析物による活性は、液晶中の欠乏または整列によって検出される。

【0404】

他の態様において、酵素基質を、液晶を配向させる表面(例えば、金が斜めに沈着された表面)に対して、表面上の酵素基質の配置が液晶の配向を防ぐように適用する。次いで、分析物または分析物を含む疑いがある試料を、分析物が酵素基質と相互作用し、または酵素基質に対して作用することができるように酵素基質と接触させる。次いで、液晶を酵素基質に適用させる。酵素基質に対する分析物による活性は、液晶中の整列の存在によって検出される。

10

20

30

40

50

【0405】

一部の態様において、酵素基質を共有結合で表面上に固定し、次いで、液晶が酵素基質によって整列されるように摩擦する。次いで、酵素基質に対して特異的な酵素活性を含むことが疑われる試料を酵素基質と接触させる。反応を生じさせることができる期限の後に、次いで、液晶を基体に適用する。酵素基質に対して作用することができる酵素の存在は、液晶アラインメントの非存在によって検出する。一部の好ましい態様において、酵素基質は、基体表面上の複数の分析ゾーンに存在する。さらなる好ましい態様において、試料は、ミクロな液体のチャンネルを経て分析ゾーンに運搬される。なおさらなる態様において、液晶アラインメントの減少の程度は、試料中の酵素含量に比例する。

【0406】

さらに他の態様において、酵素基質は、異方性を導入するために表面上へナノスタンプされる。酵素基質に対する試料中の酵素の作用により、異方性の減少が生じ、これは、液晶の適用によって検出される。また、このアプローチは、免疫グロブリンなどの認識部分を有する異方性を作製するために使用することができるが認識される。

【0407】

上記した酵素電気泳動法は、種々の酵素の研究についての使用が見出される。本方法は、一度に1つの酵素基質を解析することに限定されない。例えば、1つ以上の酵素基質が所与の分析ゾーンのいずれに適用されてもよい。同様に、本方法は、任意の特定の試料タイプに限定されない。一部の態様において、試料は、水性である。その他の態様において、試料は、切断された組織であり（例えば、凍結切片組織）これを分析ゾーンと接触して、インキュベートすることができる。次いで、切断された組織を取り除き、分析ゾーンをリシスして、液晶の適用によって画像化を行う。本発明は、また、任意の特定のタイプの分析ゾーンに限定されない。一部の態様において、分析ゾーンは、円形または四角である。その他の態様において、分析ゾーンは、ミクロな液体のチャンネルである。試料がチャンネルを通じて流れを生じるときに、チャンネル内の酵素の量は、ミクロな液体なチャンネルに沿った長さに比例し、この中で液晶アラインメントが乱される。

【0408】

さらに他の態様において、試料は、酵素基質に適用される前に部分的に精製される。例えば、試料が、基質に対して作用することができる複数の酵素を含むであろう場合、非標的酵素または酵素は、非標的酵素を除去するマイクロアフィニティーカラムに沿って試料を通すことによって除去されてもよい。好ましい態様において、非標的酵素に特異的な抗体で被覆されているマイクロまたはナノ-ビーズを含むマイクロアフィニティーカラムである。

【0409】

実施例

1. 細胞アッセイに使用されるナノ構造基体の製作

液晶（LC）細胞アッセイ法に使用するためのLCを整列させるナノ構造基体は、1) ナノスケール成形、2) ナノ研磨材、3) 斜方沈着された金フィルムを使用して製造した。

【0410】

ナノ成形された基体は、シリコーンで調製された硬い原型からポリウレタンおよびポリスチレンの铸造によって製造した。シリコーン原型は、電子ビームリソグラフィーによって調製し、原型中に存在する形態、幅200nmおよび高さ50nmを有した。研究では、これらの基体を水性媒体（リン酸緩衝食塩水）中に少なくとも24時間浸漬しただけでは、形態の損失を引き起こさないことを示した。さらに、比較的大規模な特色のため、これらの基体は、非特異的なタンパク質吸着に応答しなかった（LCアラインメントの点で）。深さトラック50nmを有するポリウレタンの微小成形されたナノ構造基体を、10%のウシ胎児血清を含む細胞培養培地（MEM）と共に4時間インキュベートした。LCを整列させる能力は、影響を受けなかった。偏光顕微鏡によって観察すると、トラック内の領域は、暗く均一であったが、トラック外の領域は、明るかった。ナノ構造領域と表面の非構造領域の間のLCのアラインメントのはっきりとした外側の分解が顕微鏡によって観察された。

10

20

30

40

50

【0411】

手で微細な市販の布やすりでスライドを研磨することによって、ガラススライド上に研磨表面を作製した。さらに、摩擦を通して圧力を適用した。液晶フィルムを研磨したスライド表面上に適用し、偏光フィルターで見た。液晶フィルムは、クロス偏光を介して見たときに暗いようにみえたことから、液晶は、ナノ研磨された表面上に整列されていることを示す。10%のウシ胎児血清を含む細胞培養培地（MEM）を表面上でインキュベートした。LCのフィルムを表面に添加した。偏光レンズで見たときに、LCの表面上は整列されており、LCのアラインメントは、ナノ研磨された表面に対するタンパク質吸着によって影響されないことを示す。

【0412】

斜方沈着された金フィルムをガラススライド上で調製した。金は、斜めの入射角（12.5度）で、蒸気によりガラススライドにぶつけて沈着させた。この方法により、ナノメートルスケールの統計的な形態を有する表面とした。スライドを、10%のウシ胎児血清を含む細胞培養培地（MEM）と共にインキュベートした。細胞培養培地の除去に続き、LCの層を適用し、偏光フィルターを介してスライドを視覚化した。液晶は、スライド上で整列されていた。これは、このような表面が、液晶における細胞のアッセイ法に有用なことを示す。

【0413】

2. 液晶は、確実に細胞数を報告する

CHO K1細胞を、液晶を整える、異方性に整列された斜めに金が沈着されたナノ構造基体上でDMSO中に播種した。細胞を4時間付着させた。培地を除去して、細胞をメタノール、グルタルアルデヒドで固定し、またはこれらを固定しないままにした。スライドを窒素の流れの中で乾燥するか、または湿ったままにし、次いでネマチックLCのフィルムでカバーした。5CB、E7、およびTL205を含む種々のLCフィルムでは、水和の状態または固定の方法を問わず、正確に細胞の存在を報告することが可能であった。3.14mm²あたりに100、300、600、1200細胞を有する基体（約5,600～67,000細胞相当が24ウェルのプレートの単一の15mm直径に播種される）を偏光フィルターを介して画像化し、イメージをNIH Imageソフトウェアを使用してグレイスケールの強度について解析した。細胞の存在は、LCフィルムが、下にあるナノ構造基体の整列の影響に接近するのを局的に防げる。したがって、細胞を直接被うLCフィルムの領域では、乱れがあり、光の偏光面を維持しない。したがって、クロス偏光配置で見たときに、伝達される光の量は、細胞数に比例する。これらのデータを図47に示してある。

【0414】

3. LC反応の安定度

細胞で行った実験において、LCアッセイ法では、明白なシグナルを提供し、測定可能な変化もなく1週間持続することに留意されたい。LCの付加の前に固定された細胞で、およびLCで被覆された生細胞に対しては、このことは事実であった。

【0415】

4. LCは、細胞移動を阻害しない

Matrigel（MEMで1:1希釈した）およびLC TL 205を同体積で混合し、エマルジョンを37で30分間インキュベートしたガラススライドに適用した。Hepa-1c1c7（肝臓の齧歯類細胞株）をマトリックス上に置き、2時間インキュベートした。細胞を顕微鏡で視覚化した。LC TL 205の存在下において、細胞は、Matrigel上にトラックを形成した。この実験では、LC 205が細胞の移動に対して抑制性ではなく、LCによるMatrigel上の細胞の移動の画像化が可能であることを示す。

【0416】

5. ミクロな液体のチャンネルおよび液晶を使用する分析物の定量

本例は、ミクロな液体のチャンネルに沿った液晶の乱れを使用して試料中の分析物の量を定量する実験の結果を記述する。5つのマイクロチャネルを（深さ25μmごとに幅1mm）をPDMSのブロック上に形成し、ガラススライドの上に支持した。PBS（対照）またはビオ

チン-ウシ血清アルブミン (BSA) を含む試料を、濃度を変化させて : 12.5、25、50、または $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ で貯蔵所に入れ、毛管力によってマイクロチャネルに移動させた。基体を 60 ~ 90 分間 37 度でインキュベートした。インキュベーションの後、減圧を適用し、マイクロチャネルおよび貯蔵所から液体を除去した。次いで、PDMSをガラススライドからはがして、水でリーンスして、窒素気体の流れの中で乾燥させて、OTS処理したガラススライド上に配置する。液晶 (E7) を毛管力によってその貯蔵所を介してそれぞれのマイクロチャネルに導入した。マイクロチャネル内部の液晶のアラインメントの画像は、偏光顕微鏡によってとった。

【 0 4 1 7 】

液晶は、結合したタンパク質がない場合は、PDMS上でホメオトロピック配向であると思われる。レンズで見たときに、この領域は暗く、相同である。ビオチン-BSAがマイクロチャネルの表面上に存在するときは、液晶は、そのホメオトロピック配向を損なう。この乱れは、タンパク質が結合される領域での光の伝達によって証明される。試料中のタンパク質の濃度が高くなるにつれ、マイクロチャネルに沿った乱れの領域が長くなつた。標準としてマイクロチャンネル (1mm) の幅を使用することによって画像から測定した。より高濃度のビオチン-BSAを有するさらなる実験でも (6.25 ~ 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 同様の結果を示した。

【 0 4 1 8 】

6. 液晶による酵素電気泳動活性の検出

タンパク質基質の酵素消化は、酵素に曝露した後に基質上に置かれた液晶の層配向によって検出することができる。これを示すために、本発明者らは、ガラススライド上に斜方沈着された金 (45) の薄いフィルムを調製した。金スライドは、アルカンチオールの自己構築单層で官能性を持たせた (2mM, C16SH)。コラーゲンIVの溶液 (BD Biosciences, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 37 度で 2 時間スライド上でインキュベートした。活性化MMP-9 (Chemicon) の 0.005 IGEPALを有する 5mM のトリス緩衝液、pH7.5 の溶液中の 1pg 総酵素を表面に添加し、37 度で 30 分間インキュベートした。表面を水で洗浄し、窒素の流れで乾燥させて、1滴の液晶を表面上に配置した。液晶のアラインメントを顕微鏡で観察し、液晶アラインメントの乱れの程度を Scion ソフトウェアを使用して測定した。

【 0 4 1 9 】

液晶を SAM で調製した表面上に規則的な傾向で整列させる。コラーゲンIVが存在する表面上では、偏光フィルターで見たときに、液晶は、乱れがあるように見える。MMP-9がコラーゲンIVを消化する場合、基礎をなす SAM が曝露され、液晶が、SAM上で整列する。図49は、コラーゲンIVを呈する表面が、液晶層 (0 分) のアラインメントの乱れを生じさせるが、1pgのMMP-9と共に 30 分間インキュベーション後には、コラーゲンIVが消化され、液晶が、曝露された SAM (30 分) 上で整列することを示す。

【 0 4 2 0 】

上記の明細書において言及した全ての刊行物および特許は、本明細書に参照として組み入れられる。本発明の範囲および精神から逸脱することなく、記載された本発明の方法および系の各種の改変および変更は、当業者には自明のことであろう。本発明は、特定の好みの態様に関して記述されているが、請求される発明は、このような特定の態様に過度に限定されるべきではないことが理解されるはずである。実際に、化学工学、細胞生物学、もしくは分子生物学、または関連した分野の当業者にとって明らかである本発明を実施するための記載された方法の種々の修飾は、特許請求の範囲の範囲内であることが企図される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 4 2 1 】

【 図 1 A 】 本発明に使用されるナノスタンパーの模式図である。

【 図 1 B 】 本発明に使用されるネガティブナノスタンパーの模式図である。

【 図 2 A 】 ランダムな配向のメソゲンの模式図である。

【 図 2 B 】 電場によって誘導されるメソゲンの配向の模式図である。

10

20

30

40

50

【図3】電場などの原動力を減輕または効果を減ずることの模式図である。

【図4】光伝達と原動力の間の関係の図画描写である。

【図5】マトリックスを組み込む本発明の装置の模式図である。

【図6】マトリックスを組み込む本発明の装置の模式図である。

【図7】マトリックスを組み込む本発明の装置の模式図である。

【図8】マトリックスを組み込む本発明の装置の模式図である。

【図9】マトリックスを組み込む本発明の装置の模式図である。

【図10】マトリックスを組み込む本発明の装置の模式図である。

【図11】基体上に粒子を組み込む本発明の装置の模式図である。

【図12】マトリックスを組み込む本発明の装置の模式図である。

【図13】本発明の細胞アッセイ装置を描写したものである。

【図14】本発明の細胞培養装置の模式図である。

【図15】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図16】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図17】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図18】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図19】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図20A】使用中の本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図20B】使用中の本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図20C】使用中の本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図21】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図22】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図23】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図24】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図25】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図26】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図27】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図28】使用中の本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図29】使用中の本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図30】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図31】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図32】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図33】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図34】使用中の本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図35】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図36】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図37A】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図37B】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図38A】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図38B】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図39】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図40】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図41】使用中の本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図42】本発明のアッセイ装置の模式図である。

【図43】本発明のプレート上部の模式図である。

【図44】図43のプレート上部による液体の配向の模式図である。

【図45】マルチウェル・プレートのウェルの中央に細胞を配向させるためのプレート・カバーの模式図である。

【図46】ミクロな液体のチャンネルを使用する分析物および液晶の定量の結果を表すグラフである。

10

20

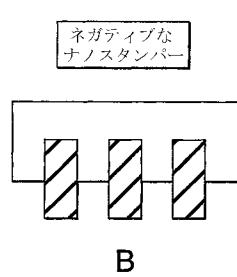
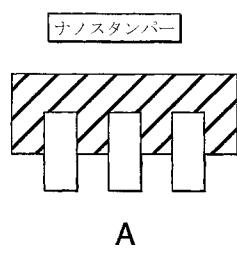
30

40

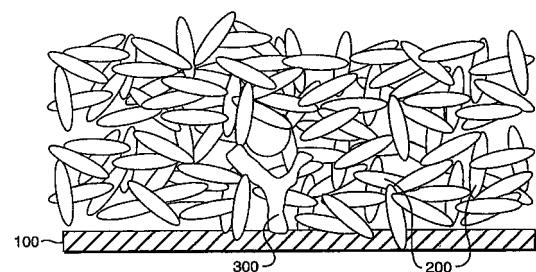
50

- 【図47】液晶アッセイ法で細胞数を決定するための実験の結果を表すグラフである。
- 【図48】本発明の基体ホルダーの模式図である。
- 【図49】酵素電気泳動法実験の結果のグラフである。

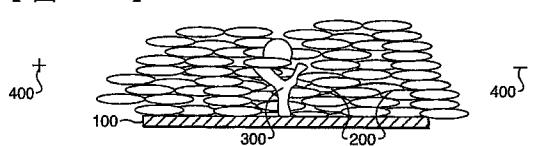
【図1】



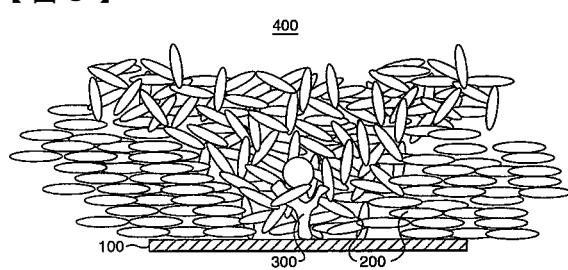
【図2A】



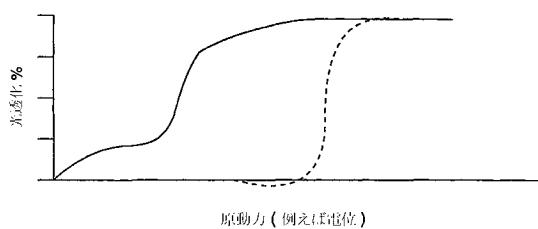
【図2B】



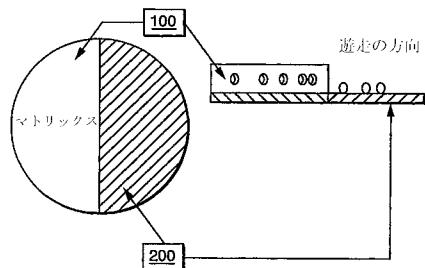
【図3】



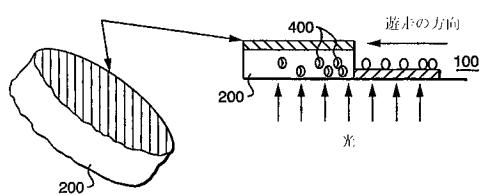
【図4】



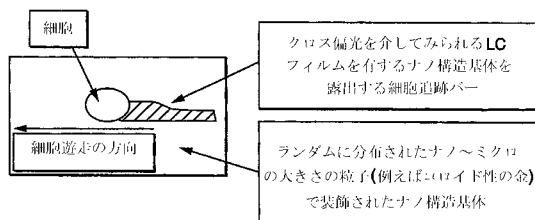
【図5】



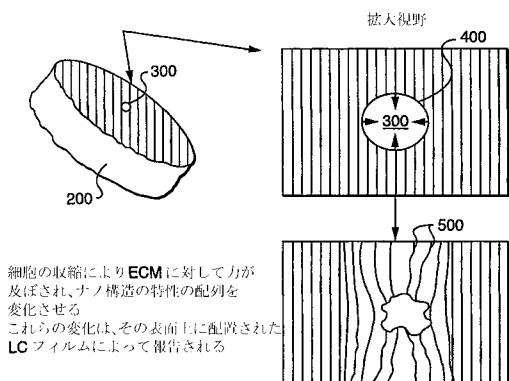
【図6】



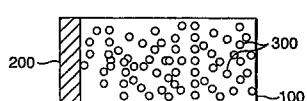
【図11】



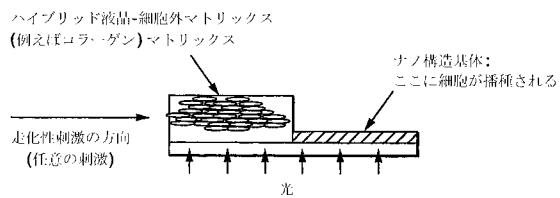
【図12】



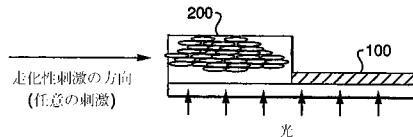
【図13】



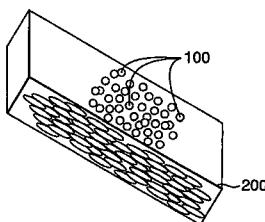
【図7】



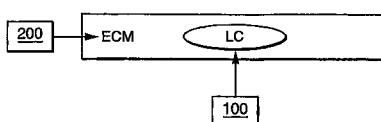
【図8】



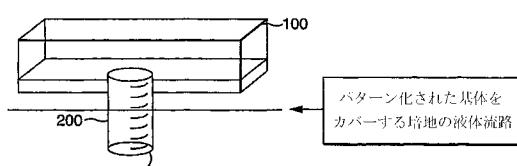
【図9】



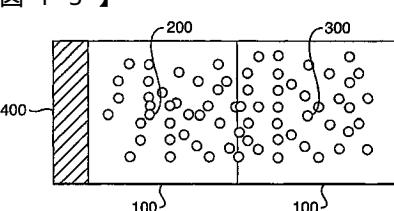
【図10】



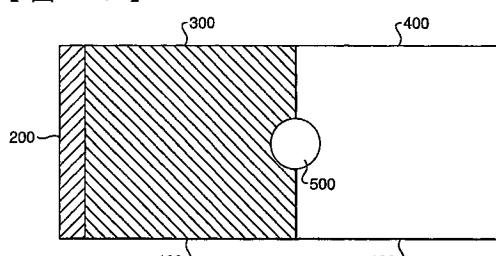
【図14】



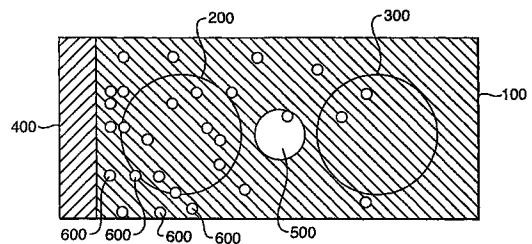
【図15】



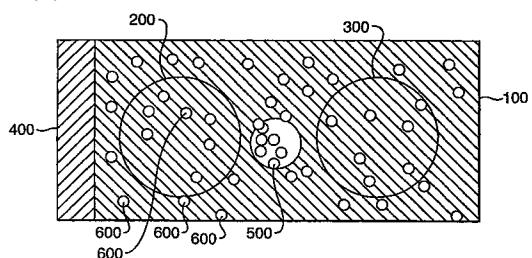
【図16】



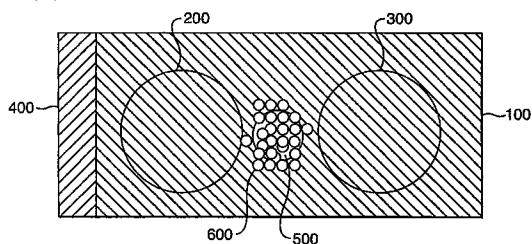
【図17】



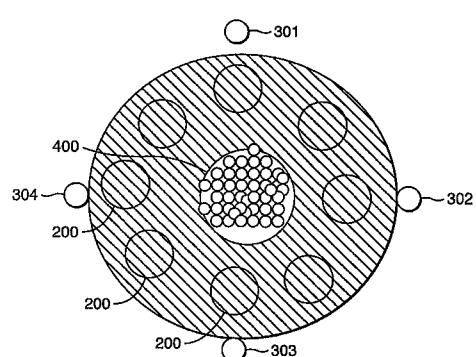
【図18】



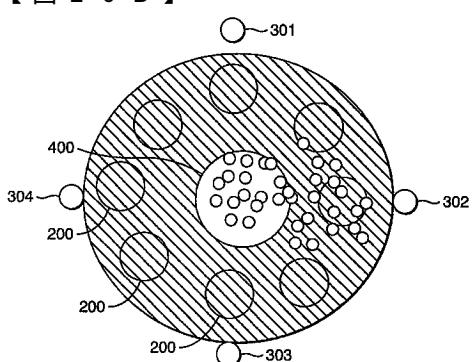
【図19】



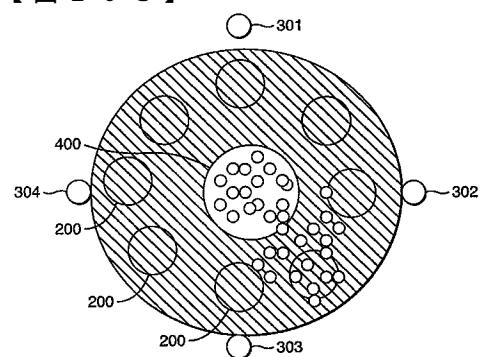
【図20A】



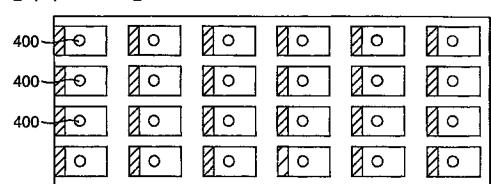
【図20B】



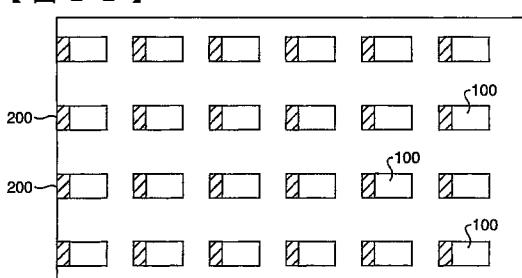
【図20C】



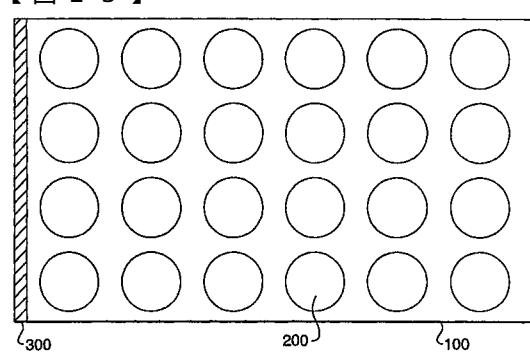
【図21】



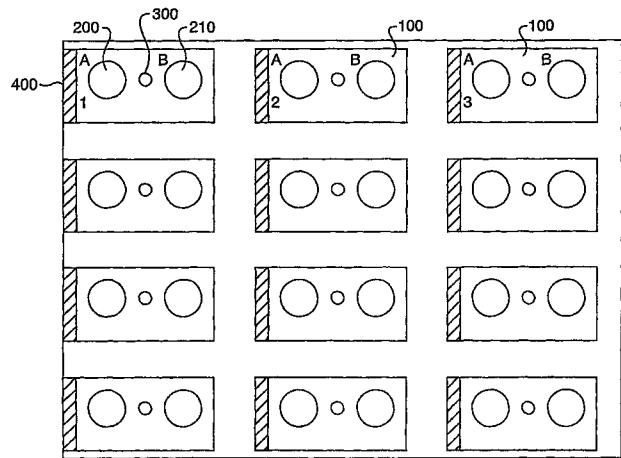
【図22】



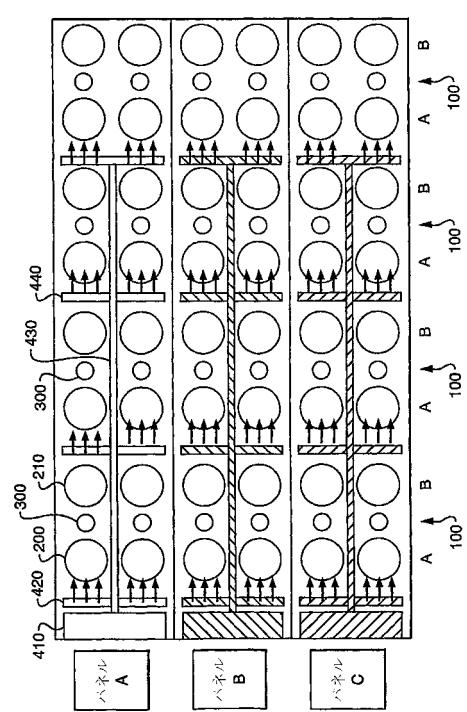
【図23】



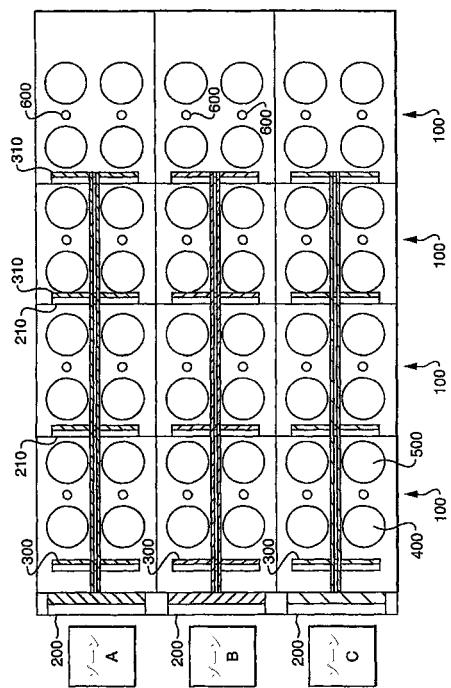
【図24】



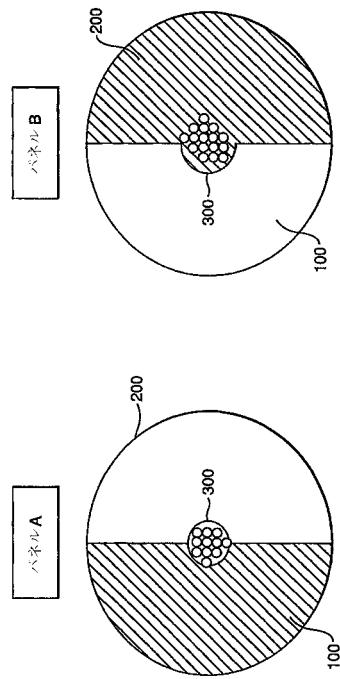
【図25】



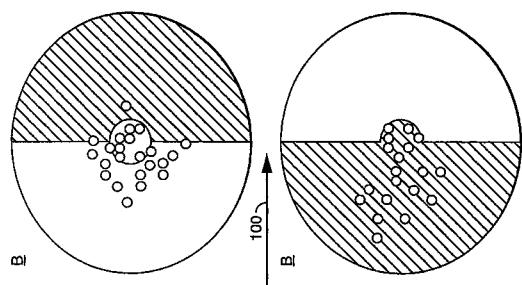
【図26】



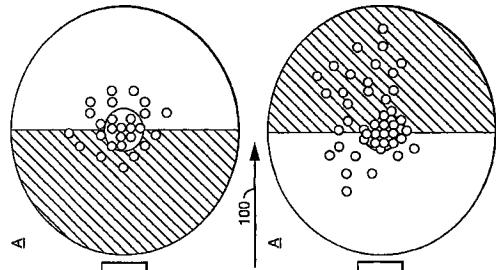
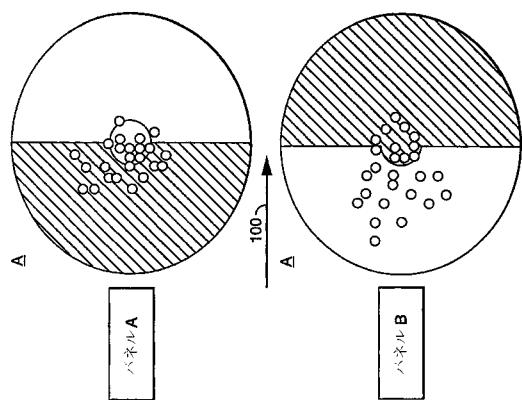
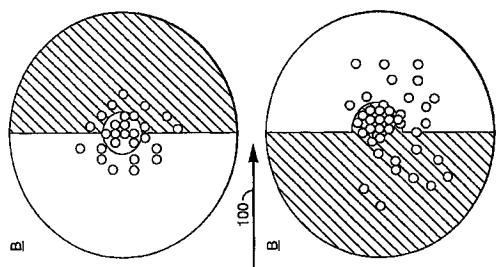
【図27】



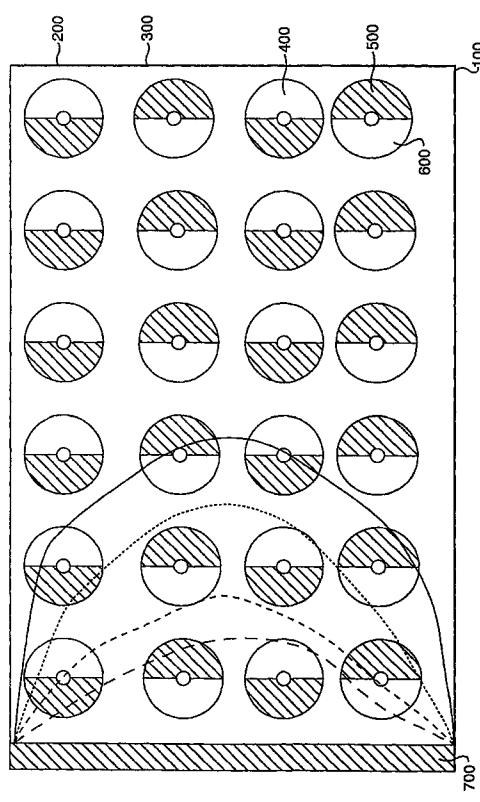
【図28】



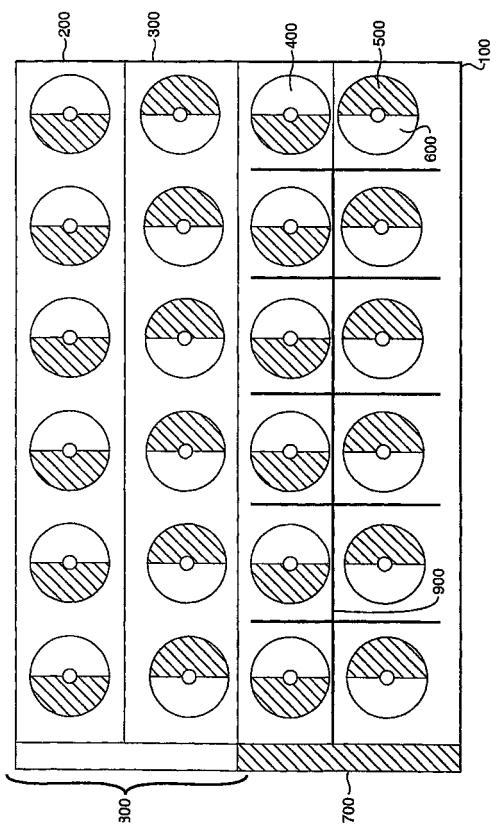
【図29】



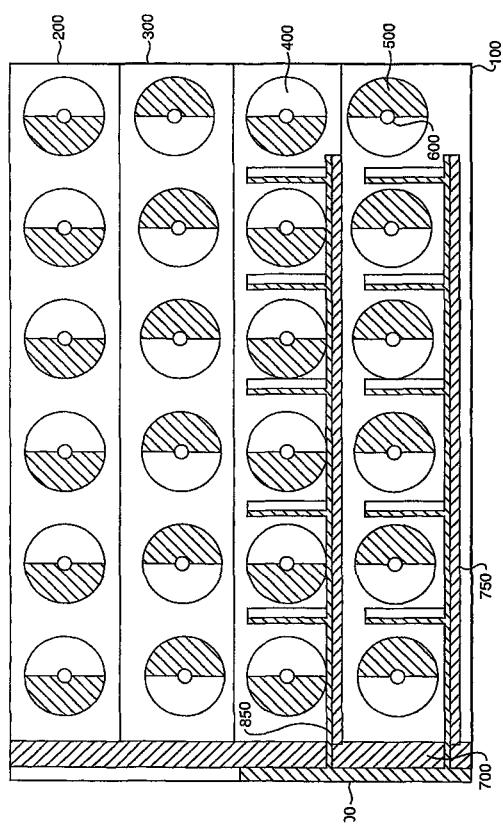
【図30】



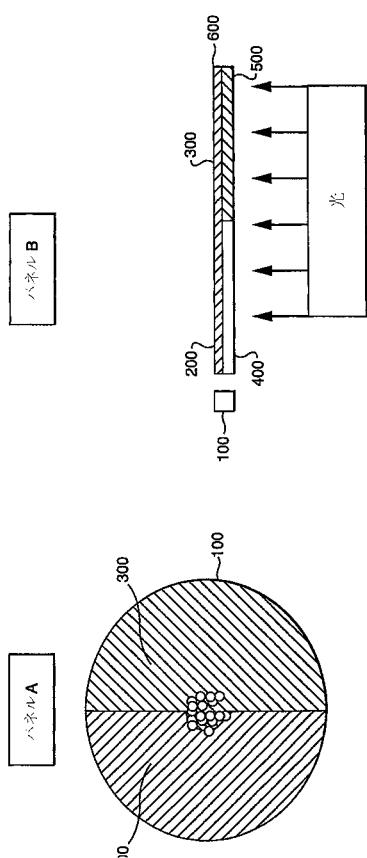
【図31】



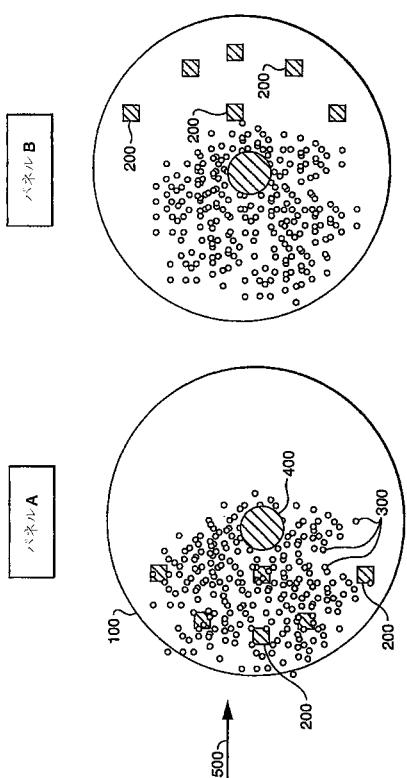
【図3-2】



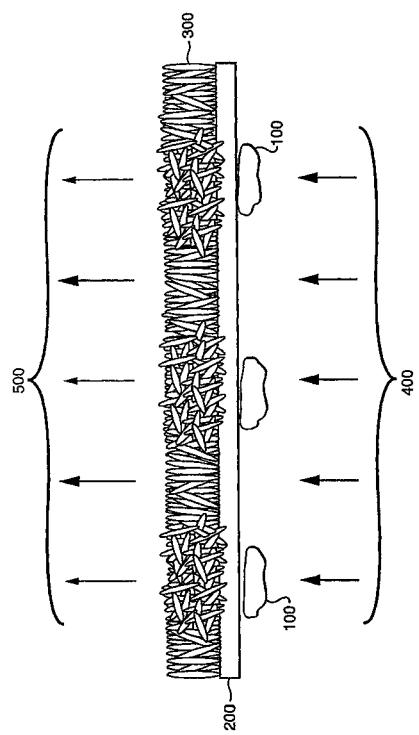
【図3-3】



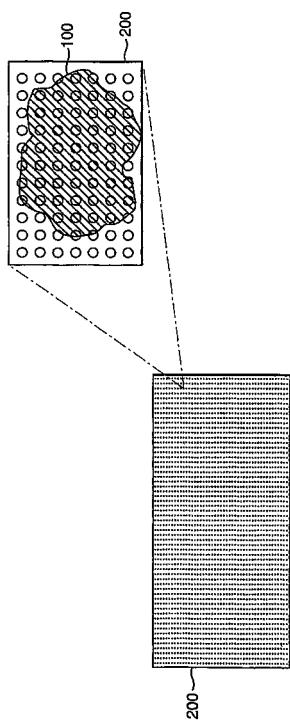
【図3-4】



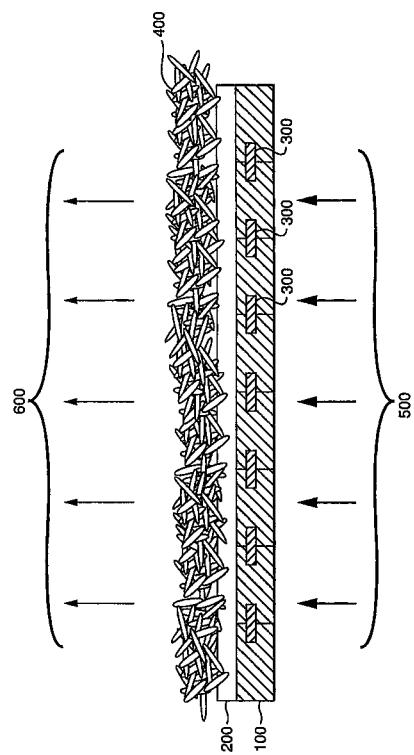
【図3-5】



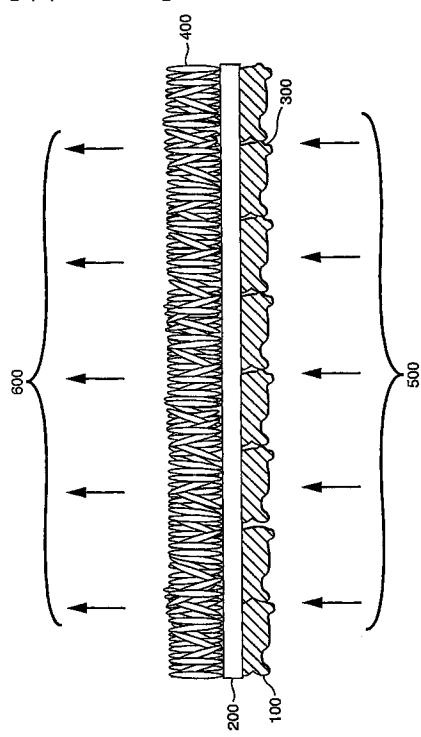
【図36】



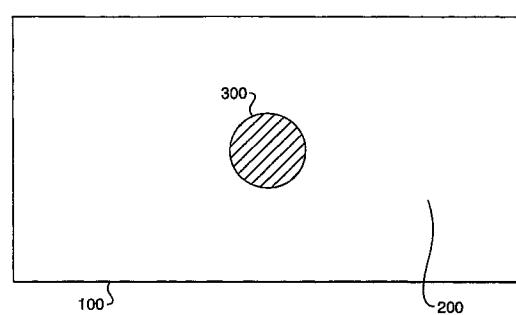
【図37A】



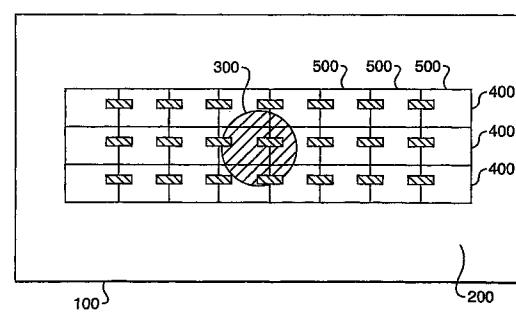
【図37B】



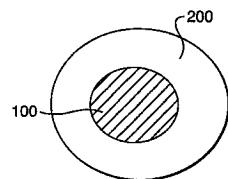
【図38A】



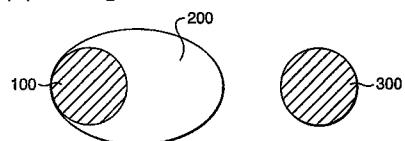
【図38B】



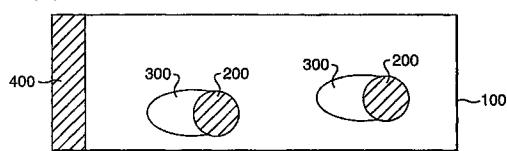
【図39】



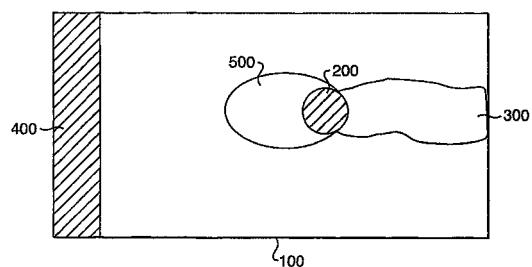
【図40】



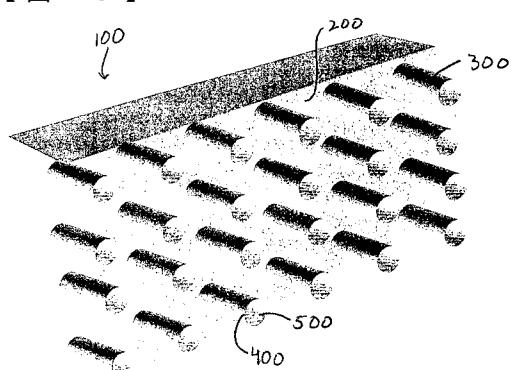
【図41】



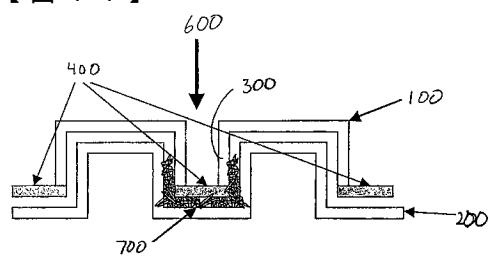
【図42】



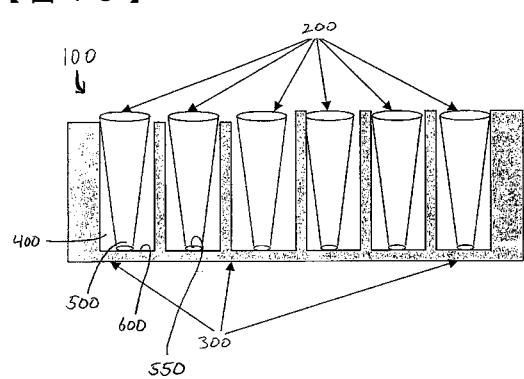
【図43】



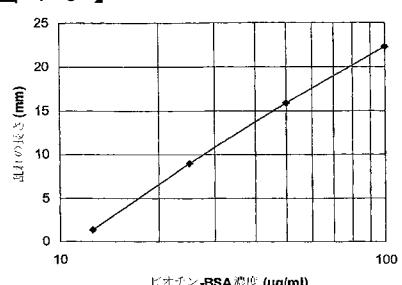
【図44】



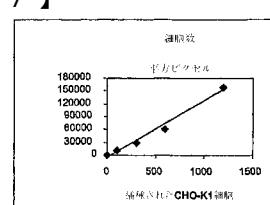
【図45】



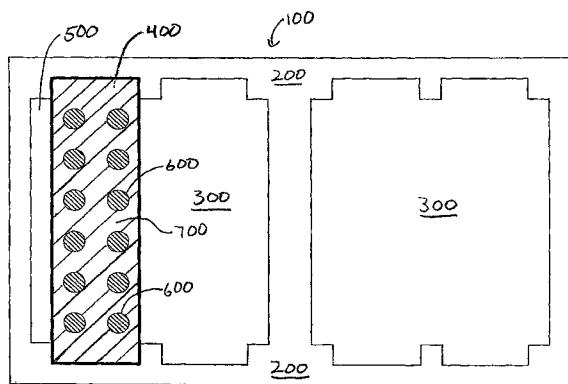
【図46】



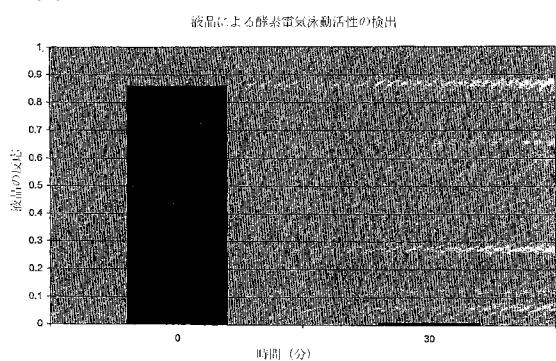
【図47】



【図4.8】



【図4.9】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/16158																				
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : G01N 33/53 US CL : 435/7.1, 283.1; 349/123 <i>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</i>																						
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1, 283.1; 349/123																						
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																						
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST																						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">US 6,201,588 A (WALTON et al) 13 March 2001 (13.03.2001), see entire document.</td> <td style="padding: 2px;">1-201</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	US 6,201,588 A (WALTON et al) 13 March 2001 (13.03.2001), see entire document.	1-201														
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																				
A	US 6,201,588 A (WALTON et al) 13 March 2001 (13.03.2001), see entire document.	1-201																				
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
* Special categories of cited documents: <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%; padding: 2px;">"A"</td> <td style="width: 20%; padding: 2px;">document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td style="width: 20%; padding: 2px;">"T"</td> <td style="width: 40%; padding: 2px;">later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">"E"</td> <td style="padding: 2px;">earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td style="padding: 2px;">"X"</td> <td style="padding: 2px;">document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">"L"</td> <td style="padding: 2px;">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)</td> <td style="padding: 2px;">"Y"</td> <td style="padding: 2px;">document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">"O"</td> <td style="padding: 2px;">document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td style="padding: 2px;">"&"</td> <td style="padding: 2px;">document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">"P"</td> <td style="padding: 2px;">document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"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)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family	"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																			
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																			
"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)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																			
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family																			
"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 21 February 2005 (21.02.2005)		Date of mailing of the international search report 09 MAR 2005																				
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer  Leon Lankford Telephone No. 571-272-1600																				

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 01 N 33/483 (2006.01)	G 01 N 33/483	C
G 01 N 37/00 (2006.01)	G 01 N 37/00	1 0 1
	G 01 N 37/00	1 0 2

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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

TEFLON

(72) 発明者 イスラエル バーバラ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 マウンテン ホレブ バイキング ロード 503

(72) 発明者 アボット ニコラス

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 マディソン ジェファーソン ストリート 2120

F ターム(参考) 2G045 AA24 BB20 BB22 BB24 CB01 CB21 DA36 DA54 FA11 FB12

GC15 HA16

4B029 AA08 AA21 AA27 BB01 BB15 BB16 BB20 CC01 CC02 CC03

CC08 FA01 FA09 FA13 FA15 GA03

4B063 QA01 QA05 QA18 QQ05 QQ21 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR48

QR56 QR57 QR69 QR74 QR84 QS24 QS32 QS36 QS39 QX01

专利名称(译)	用于测定细胞的底物，装置和方法		
公开(公告)号	JP2006501860A	公开(公告)日	2006-01-19
申请号	JP2004549903	申请日	2003-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	鸭嘴兽技术有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	鸭嘴兽技术有限责任公司		
[标]发明人	マーフィークリストファー イスラエルバー/バラ アボットニコラス		
发明人	マーフィー クリストファー イスラエル バーバラ アボット ニコラス		
IPC分类号	C12M1/34 C12M1/00 C12Q1/02 C12Q1/25 G01N33/48 G01N33/483 G01N37/00 A61B B01L3/00 B01L9/00 C12N5/00 C12Q1/00 C12Q1/04 C12Q1/06 C12Q1/68 G01N1/00 G01N15/10 G01N33/50 G01N33/52 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569 G01N35/00		
CPC分类号	B01L3/502761 B01L3/50853 B01L9/52 B01L2200/0663 B01L2200/0668 B01L2300/046 B01L2300 /0654 B01L2300/0822 B01L2300/0877 B01L2300/0893 B01L2400/0406 B01L2400/0415 B01L2400 /0442 B01L2400/0487 B82Y30/00 G01N33/5029 G01N2015/1006		
FI分类号	C12M1/34.A C12M1/00.A C12Q1/02 C12Q1/25 G01N33/48.M G01N33/483.C G01N37/00.101 G01N37 /00.102		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BB20 2G045/BB22 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA36 2G045 /DA54 2G045/FA11 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/HA16 4B029/AA08 4B029/AA21 4B029/AA27 4B029/BB01 4B029/BB15 4B029/BB16 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029 /CC08 4B029/FA01 4B029/FA09 4B029/FA13 4B029/FA15 4B029/GA03 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ21 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063 /QR48 4B063/QR56 4B063/QR57 4B063/QR69 4B063/QR74 4B063/QR84 4B063/QS24 4B063/QS32 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/382446 2002-05-22 US 10/443419 2003-05-22 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及分子诊断领域，尤其涉及基于液晶分析形式的诊断。特别地，本发明提供了改进的基质和使用液晶测定法定量样品中分析物的量的方法。本发明还提供了通过使用液晶测定形式检测分析物与基质的非特异性结合的材料和方法。

メソゲン	構造式
アニサルダジン	CH ₃ -O-  -CH=N-N=CH-  -O-CH ₃
NCB	C _n H _{2n+1} -  -  -CN
CBOOA	C _n H ₁₅ -O-  -N=CH-  -CN
Comp A	C _n H ₁₅ -  -COO-  -NCS
Comp B	C _n H ₁₇ -O-  -O-CO-  -O-CH ₂ -  -CN
DB _n NO ₂	C _n H _{2n+1} -O-  -O-CO-  -O-CO-  -NO ₂
DOBAMBC	C ₁₀ H ₂₁ -O-  -CH=N-  -CH=CH-COO-CH ₂ -CH _n H _{2n+1} -C ₂ H ₅
nOm n=1, m=4; MBBA n=2, m=4; EBBA	C _n H _{2n+1} -O-  -CH=N-  -C _n H _{2n+1}
nOBA n=8; OOBA n=9; NOBA	C _n H _{2n+1} -O-  -COOH
nmOBC	C _n H _{2n+1} -O-CO-  -  -O-C _m H _{2m+1}
nOCB	C _n H _{2n+1} -O-  -  -CN
nOSI	C _n H _{2n+1} -O-  -COO-  -CH ₂ -CH _n H _{2n+1} -C ₂ H ₅
98P	C ₂ H ₇ -[CH ₂ (CH ₃) ₂]-O-  -N=C ₂ H ₁₇
PAA	CH ₃ -O-  -N=N-  -O-CH ₃
PYP906	C ₉ H ₁₉ -  -O-C ₆ H ₁₃
nSm	C _n H _{2n+1} -O-  -CO-S-  -C _m H _{2m+1}

[0 2 6 2]