

(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2004-503775
(P2004-503775A)

(43) 公表日 平成16年2月5日(2004.2.5)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/72	GO 1 N 27/72	2 G O 4 5
BO 1 D 57/02	BO 1 D 57/02	2 G O 5 3
BO 3 C 1/00	BO 3 C 1/00	4 D O 5 4
BO 3 C 5/00	BO 3 C 5/00	
GO 1 N 27/447	GO 1 N 33/483	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-510936 (P2002-510936)
 (86) (22) 出願日 平成13年6月14日 (2001.6.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年12月12日 (2002.12.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/019484
 (87) 国際公開番号 W02001/096857
 (87) 国際公開日 平成13年12月20日 (2001.12.20)
 (31) 優先権主張番号 60/211,757
 (32) 優先日 平成12年6月14日 (2000.6.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

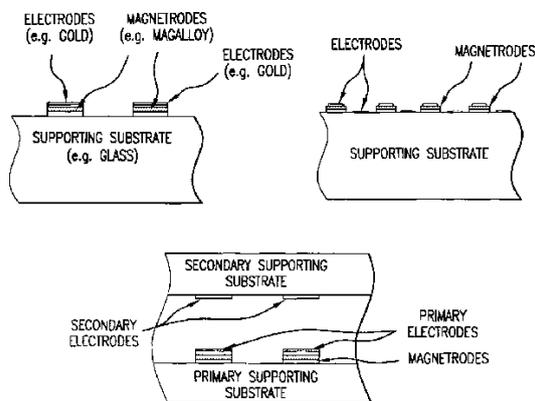
(71) 出願人 501306656
 ボード・オブ・リージェンツ、ザ・ユニヴァーシティ・オブ・テキサス・システム
 アメリカ合衆国、78701 テキサス、オースティン、ウェスト・セヴンス・ストリート 201
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 検体混合物の組み合わせた磁気泳動および誘電泳動の操作のための方法および装置

(57) 【要約】

磁気泳動と組み合わせた誘電泳動を使用して、物質を識別するための方法および装置。1つ以上の成分を有するサンプルが、チャンバの入口ポートに注入される。この入口ポートでキャリア誘電流動を起こして、チャンバ内に流動を作り出す。サンプルの成分に働くように誘電泳動力を生じさせる。サンプルの成分に働くように磁気泳動力を生じさせる。誘電泳動力と磁気泳動力との平衡を保って、チャンバ内で成分を位置付ける。次いで、この成分の誘電特性および磁気特性によって、チャンバの1つ以上の出口ポートでこの成分を収集する。成分は、チャンバからの流出時間および/またはチャンバ内での位置の関数として収集され得る。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

磁気泳動と組み合わせた誘電泳動を使用して、物質を識別する方法であって、該方法は、以下：

1つ以上の成分を有するサンプルをチャンバの入口ポートに注入する工程；

該入口ポートでキャリア媒介流動を起こして、該チャンバ内に流動を作り出す工程；

該成分に対して誘電泳動力を生じさせる工程；

該成分に対して磁力を生じさせる工程；

該誘電泳動力と磁力との平衡を保って、該チャンバ内で該成分を位置付ける工程；ならびに、

該成分の誘電特性および磁気特性によって、該チャンバの1つ以上の出口ポートで該成分を収集する工程、

を包含する、方法。

10

【請求項 2】

前記サンプルが、識別可能な磁気特性および誘電特性を有する1つ以上の標識と共に混合された1つ以上の検体を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

第一の標識が、第一の誘電特性および磁気特性を有し、かつ第一検体に対する結合親和力を有し、そして第二の標識が、第二の誘電特性および磁気特性を有し、かつ第二検体に対する結合親和力を有する、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記キャリア媒介流動により、前記成分が前記チャンバ内での位置に依存した速度で移動される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記収集工程が、前記成分の誘電特性および磁気特性によって、前記1つ以上の出口ポートから異なる時間で現れる異なる成分を収集する工程を包含する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記収集工程が、前記成分の誘電特性および磁気特性によって、前記1つ以上の出口ポートから異なる位置で現れる異なる成分を収集する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 7】

磁気泳動と組み合わせた誘電泳動を使用して、物質をバッチ様式で識別するための方法であって、該方法は、以下：

1つ以上の成分を有するサンプルのアリコートをチャンバの入口ポートに注入する工程；

該入口ポートでキャリア媒介流動を起こして、該チャンバ内に流動を作り出す工程であり、ここで、該チャンバ媒介流動により、該成分が該チャンバ内での位置に依存した速度で移動される、工程；

該成分に対して誘電泳動力を生じさせる工程；

該成分に対して磁力を生じさせる工程；

該誘電泳動力と磁力との平衡を保って、該チャンバ内で該成分を位置付ける工程；ならびに、

該チャンバの出口ポートからの流出時間によって該成分を収集する工程、

を包含する、方法。

40

【請求項 8】

前記サンプルが、識別可能な磁気特性および誘電特性を有する1つ以上の標識と共に混合された1つ以上の検体を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

第一の標識が、第一の誘電特性および磁気特性を有し、かつ第一検体に対する結合親和力を有し、そして第二の標識が、第二の誘電特性および磁気特性を有し、かつ第二検体に対

50

する結合親和力を有する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

磁気泳動と組み合わせた誘電泳動を使用して、物質を連続様式で識別するための方法であって、該方法は、以下：

1 つ以上の成分を有するサンプルをチャンバの入口ポートに連続的に注入する工程；

該入口ポートでキャリア媒介流動を起こして、該チャンバ内に流動を作り出す工程；

該成分に対して誘電泳動力を生じさせる工程；

該成分に対して磁力を生じさせる工程；

該誘電泳動力と磁力との平衡を保って、該チャンバ内で該成分を位置付ける工程；ならびに、

該成分の位置によって、該チャンバの複数の出口ポートから該成分を収集する工程、を包含する、方法。

10

【請求項 11】

前記サンプルが、識別可能な磁気特性および誘電特性を有する 1 つ以上の標識と共に混合された 1 つ以上の検体を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

第一の標識が、第一の誘電特性および磁気特性を有し、かつ第一検体に対する結合親和力を有し、そして第二の標識が、第二の誘電特性および磁気特性を有し、かつ第二検体に対する結合親和力を有する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

磁気泳動と組み合わせた誘電泳動を使用して、物質を識別する方法であって、該方法は、以下：

少なくとも 1 つの入口ポートおよび出口ポート、該チャンバと操作的に関連し、誘電泳動力を生じさせるように構成された電極アレイ、ならびに該チャンバと操作的に関連し、磁力を生じさせるように構成された 1 つ以上の永久磁石、を含むチャンバを提供する工程；物質をチャンバの入口ポートに注入する工程；

物質を識別し、そして該 1 つ以上の永久磁石上に収集するために、該磁石を使用して、該物質に対して磁力を生じさせる；工程

該収集した物質を該磁石と反発させるために、該電極を使用して、誘電泳動力を生じさせる工程；ならびに、

該チャンバの 1 つ以上の出口ポートで該物質を収集する、工程、を包含する、方法。

20

30

【請求項 14】

誘電泳動および磁気泳動を使用して、物質を識別する方法であって、該方法は、以下：

少なくとも 1 つの検体および複数の標識を含むサンプルを調製する工程であり、該複数の標識は、予め選択された誘電泳動特性および磁気特性を有し、該複数の標識のうちの少なくともいくつかは、該少なくとも 1 つの検体と結合して、検体 - 標識複合体を作製する、工程；

該サンプルをチャンバの入口ポートに注入する工程であり、該チャンバが分離チャネルを含む、工程；

該チャンバ中に電場を生じさせて該サンプルに対する誘電泳動力を起こさせるように、該チャンバに適合される少なくとも 1 つの電極要素に異なる位相で電気信号を提供する工程；

該チャンバ中で磁場を生じさせて該サンプルに対する磁気泳動力を起こさせるように、該チャンバに適合される少なくとも 1 つの磁気要素に、磁気信号を提供する工程；

該入口ポートでキャリア媒介流動を起こして、分離チャネル内に流体力学的流動プロフィールを作り出す工程であり、該キャリア媒介により、該少なくとも 1 つの検体および該検体 - 標識複合体が、該分離チャネル内での位置に依存した速度で移動される、工程；

該チャンバの出口ポートで該検体 - 標識複合体を収集する工程であり、ここで、類似の磁気特性および誘電特性を有する該検体 - 標識複合体が、単一の溶出ピークで該出口ポート

40

50

に到達する、工程、
を包含する、方法。

【請求項 15】

誘電泳動および磁気泳動を使用して、標的検体を識別する方法であって、該方法は、以下

：
少なくとも1つの検体および複数の標識を含むサンプルを調製する工程であり、該複数の標識は、予め選択された誘電泳動特性および磁気特性を有し、該複数の標識のうちの少なくともいくつかは、該少なくとも1つの検体と結合して、検体-標識複合体を作製する、工程；

チャンバに適合される少なくとも1つの電極要素に電気信号を提供する工程であり、該チャンバは、異なる位相で、該チャンバ中で電場を生じさせて該サンプルに対する誘電泳動力を起こさせる、分離チャンネルを含む、工程；

該チャンバ中で電場を生じさせて該サンプルに対する磁気誘電力を起こさせるように、該チャンバに適合される、少なくとも1つの磁気要素に磁気信号を提供する工程；

該チャンバの入口ポートに該サンプルを連続的に注入する工程；

該チャンバの複数の出口ポートで該検体-標識複合体を収集する工程であり、ここで、類似の磁気特性および誘電特性を有する該検体-標識複合体が、該複数の出口ポートのうち

の同じポートに到達する、工程、

を包含する、方法。

【請求項 16】

誘電泳動、磁気泳動およびフィールドフローフラクシヨネーションを使用して、サンプルを識別するための装置であって、該装置は、以下：

少なくとも1つ入口ポートおよび出口ポートを有するチャンバ；

該チャンバと操作的に関連し、該チャンバ内のサンプルの成分に対して誘電泳動力を生じさせるように構成された、電極アレイ；

該チャンバと操作的に関連し、該チャンバ内の該サンプルの成分に対して磁力を生じさせるように構成された、磁極アレイ、

を備える、装置であり、そして、

ここで、該電極および磁極は、相互に均衡を保ち、該サンプル内の成分の磁気特性および誘電特性に特徴的な該チャンバ内の位置に該サンプル内の成分を移動させる力を生じさせるように構成された、装置。

【請求項 17】

前記磁極アレイが、1つ以上の永久磁石を含む、請求項 16 に記載の装置。

【請求項 18】

前記出口ポートが、該チャンバを通して移動する流体のバンドを規定された位置で収集するように構成された複数のポートを含む、請求項 16 に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は、仮特許出願番号 60 / 211, 757 (2000年6月14日出願)、Peter R. C. Gascoyne、Jody V. Vykoukal および Frederick F. Becker による、タイトル「Method and Apparatus for Combined Magnetophoretic and Dielectrophoretic Manipulation of Analyte Mixture」の優先権を主張する。図面を含む上で参考された開示の全文は、放棄することなく、本明細書中で具体的に参考として援用される。

【0002】

以下の登録された米国特許は、本明細書によって参考として援用される：米国特許第 5, 858, 192 号、同第 5, 888, 370 号、同第 5, 993, 632 号、および同第 5, 888, 370 号。以下の特許出願は、本明細書中で参考として援用される：係属中の米国特許出願番号 09 / 249, 955 号、「Method and apparatus

us for programmable fluidic processing」、1999年2月12日出願；係属中の米国特許出願番号09/395,890号、「Method and apparatus for fractionation using generalized dielectrophoresis and field flow fractionation」、1999年9月14日出願；仮米国特許出願番号60/211,515号、「Dielectrically Engineered Microparticles」、2000年6月14日出願；仮米国特許出願番号60/211,514、「Systems and methods for cell subpopulation analysis」、2000年6月14日出願；および仮米国特許出願番号60/211,516、「Apparatus and method for fluid injection」2000年6月14日出願。 10

【0003】

(発明の分野)

本発明は、一体型の磁気泳動(magnetophoretic)操作および誘電泳動(dielectrophoretic)操作のための装置および方法に関する。

【0004】

(発明の背景)

ライフサイエンス全体にわたる生体材料の特徴付けおよび調製を可能にする最も重要な能力の1つは、混合物中の標的成分の認識、ならびにこの標的成分を選択的に操作し、相互作用し、そして/または単離する能力である。これらの工程を達成する当該分野で公知の方法は、磁気標識技術を含む。これらの方法において、磁石に結合し得、そして標的粒子、細胞または分子(本明細書中で「標的検体」と呼ばれる)に優先的に結合する改変された表面を有する磁気感受性粒子(本明細書中で、「磁気標識」または「標識」と呼ばれる)が使用される。優先的な結合を提供する標識の表面特徴としては、抗体、化学的反応性基およびレセプターリガンドが挙げられるが、これらに限定されない。このような表面改変磁気感受性標識は、標的検体に結合する傾向があり、この標的検体に対してこれらの標識が検体の混合物中での優先的な結合能力を有する。 20

【0005】

結合後、この磁気標識は、この標識付近の磁場の不均質性を増大するためのメカニズムを通常備える磁石によって生じる不均質な磁場により収集され得る。無視し得る磁化率を有し、そして磁気感受性標識に結合せず、検体-標識複合体を形成しなかった混合物中の検体は、磁石によって収集されず、洗い流され得る。続いて、磁場は除去され得、そしてこの検体-標識複合体は、放出され得、そして別個の画分中に収集され得る。 30

【0006】

従って、これらの異なる捕捉特徴を使用することによって、現在の磁気標識方法により、標的検体は、粒子、細胞または分子の混合物から単離され得る。これらの磁気標識方法を使用して、さらなる処理、分析または研究のために標的検体を保持し得る(当該分野で「ポジティブ選択」として公知である)。あるいは、磁場により保持されない検体は、収集され、そしてさらなる処理、分析または研究のために使用され得る(当該分野で「ネガティブ選択」として公知である)。磁気標識法の用途は広範であるが、現在の方法は、多数の有意な欠点を有する。例えば、混合物中の全ての磁気標識は、表面改変状態または標的検体との結合状態で存在し得るいずれの差異にもかかわらず、収集磁石に結合するため、複数の標的検体を同時に識別し、そして単離することが不可能である。磁気標識が標的検体に結合した程度を、磁氣的収集後にさらなる測定工程を実施することなく、決定することもまた不可能である。例えば、それらの表面に結合した標識の数の変化によって特徴付けられる細胞垂集団を識別または単離することは不可能である。なぜなら、標識に結合する全ての細胞は、その数にかかわらず、現在の磁気的方法により収集されるからである。最後に、現在の方法は、収集チャンバまたはカラム内における表面上への磁気標識の捕捉に基づき、そして標的検体はクランプ内に収集される傾向がある。これは、代表的に、チャンバまたはカラムへの付着のためにサンプルの回収を制限し、そして標識された検体中 40 50

の所望でない標識されていない検体を捕捉し得、それにより回収された標的検体の純度を制限する。

【0007】

標的検体の混合物からの識別、操作、分離および単離のより新しいアプローチは、標的検体自体の誘電特性の利用または誘電標識技術の使用に基づく。米国特許第5,993,630号および同第5,888,370号（これらは本明細書中で参考として明確に援用される）において、本願の特定の発明者は、流体力学的流動プロファイルの特性と共に、粒子の固有の誘電特性を利用することによって、この粒子を識別、分離および単離するための誘電泳動法の使用を教示する。

【0008】

標的因子の同定および選別のための誘電ビーズに関する同時に出願された仮特許出願において、本発明者らは、有用な誘電特性および磁気特性を組み込んだ標識を設計し得る方法を教示する。このような標識により、標的検体は、誘電泳動法によって識別および操作され得る。標識の有用な属性としての磁気特性と誘電特性とを合わせることによって、これらの方法は、標識自体間および検体-標識複合体間の両方の識別のさらなるレベルを可能にする。例えば、本開示は、異なる標識型の「カクテル」中の異なる標識型の認識を可能にする、異なる「誘電性フィンガープリント」を有する異なる型の標識が、どのように設計され得るかを教示する。検体、標識または検体-標識複合体は、これらの誘電的方法における分離を達成するために、カラム内に捕捉される必要がないため、これらはクランプ内に標識していない検体を捕捉しにくい。さらに全ての検体は、誘電分離の間、潜在的に付着性の表面から離れて維持され得、その結果、サンプル回収効率が改善される。それにもかかわらず、標的粒子、細胞または分子の固有の誘電特性、あるいはそれらの誘電標識の固有の誘電特性はなお、複雑な混合物中の複数の標的検体間の十分な識別を可能にしない。

【0009】

さらに、異なる検体間の最高の識別を有する現存の誘電方法（誘電泳動フィールドフローフラクショネーション（DEP-FFF法）と呼ばれる）は、サンプル混合物中の検体にかかる誘電泳動力と沈降力との間のバランスを利用する。このようなバランスは、重力場または遠心場に関する装置の特定の配向が存在する場合にのみ認められ得る。これは、空間のような微小重力環境における適用のための方法の使用を除外または制限する。誘電泳動力と沈降力との間のバランスを達成する必要性はまた、検体の混合物および分離されるべき検体を運ぶ懸濁媒体の相対密度を制限する。例えば、標的検体、または誘電標識の場合には、検体-標識複合体は、有効なDEP-FFF分離のために、懸濁媒体よりわずかに（代表的には、2~20%）大きい密度を有するべきである。最後に、標的検体または標的検体-標識複合体に対して作用する沈降力は通常小さく、そして分離チャンパ内の空間において均質であるため、代表的に、検体または検体-標識複合体が、力のバランスが生じる誘電分離装置内の位置に到達するのに何分もかかる。

【0010】

従って、サンプルがDEP-FFFセパレーターに導入された後、サンプルをある「緩和時間」の間静止させて、分離工程が始まる前に検体に沈降時間を与えることがしばしば必要である。この緩和時間は、しばしば、合わされた分離工程の残りの全てを完了するのにかかる時間に匹敵するため、この工程は、分離手順を顕著に遅らせ、そして不都合である。

【0011】

（発明の要旨）

磁気分離方法論および誘電分離方法論の両方におけるこれらの問題を解決するために、本発明は、新規な標的方法論および操作手順を開示し、ここで標的検体-標識複合体は、磁気力だけでなく、誘電力にも同時に供される。1つではなく2つの外的適用され制御可能な力の使用は、標識の操作のための多能性および検体-標識複合体間を識別する非常に改良された能力を導入する。

10

20

30

40

50

【0012】

本明細書中に開示される方法は、流体力学的流動プロフィール内の異なる高さに標的検体を位置決めする工程に基づく。以前の 방법은、重力と誘電泳動力のバランスによってこのような位置決めを達成したが、本発明は、誘電力と磁気力のバランスによって位置決めを達成する。詳細には、誘電泳動効果、磁気泳動効果および流体力学的効果が、検体を同時に、識別、操作、画分化、同定および/または単離するために利用され得る新しい装置および方法が本明細書中に記載される。

【0013】

本発明の以下の目的は、この増大の結果として可能になり得る。第1に、本発明の方法により、いくつかの標的検体は、単一の分離工程で同時に識別および単離され得る。第2に、標的検体は、分離器内に収集される必要はなく、実際に、本発明によると、この標的検体は、これらが分離の間に付着し得る任意の表面と接触するのを防がれ得る。このことは、所望でない検体が標的検体の画分の中に捕捉されるかなり問題を減少するだけでなく、検体の回収効率を改善する。第3に、本発明に従う装置は、任意の配向で、ならびに微小重力環境で作動し得る。第4に、以前の方法により得られ得るよりはるかに優れた識別を得ることが本発明の目的である。第5に、検体-標識複合体を位置決めするために使用される磁気泳動(MAP)力場および誘電泳動(DEP)力場の両方は、空間内で不均質であるため、位置決め力は沈降力より大きくあり得、従って、本発明に従う位置決めは、重力による沈降が使用される場合よりも迅速に起こり得る。このことは、分離前の「緩和時間」を減少または排除する。第6に、本発明は、ビーズ標的方法論が十分に利用され得るという改良点を導入する。

10

20

【0014】

(詳細な説明)

新規な方法を十分に理解するために、それらの操作の基礎をなす重要な物理的原理を導入することが役立つ。これを達成するために、誘電泳動力および磁気泳動力は、電極(本明細書中で使用する場合、「電極」とは、任意の電気的通路、例えば、伝導体のアレイを意味する)および磁極(magnetode)(本明細書中で使用する場合、「磁極」とは、任意の磁気的経路、例えば、高い透磁性を有する常磁性材料のストリップを意味する)のアレイの付近で空間的に変動し、これらが誘電分極率および磁化率の両方を有する物体に作用する場合に、平衡になり得る力の条件を示し、そして流体力学的流動プロフィールを議論するために議論され、そして示される。次いで、代表的な実施形態および適用が示される。

30

【0015】

1) 誘電泳動力、 F_{DEP}

誘電率 ϵ^* 、および複素誘電率 ϵ_s^* の媒体中に懸濁された、容積 v および複素誘電率 ϵ_p^* の粒子(これは、固体、細胞、ウイルス、細菌、分子、または懸濁媒体とは異なりこの媒体中に保持される任意の他の局在化配置の物質を含み得る)であって、誘電泳動(DEP)力および磁気泳動(MAP)力に同時に供される、粒子を考える。これらの力が電極および磁極のアレイによって与えられる場合、電場および磁場の不均質な分布を引き起こすものは何か? 座標 x, y, z を有する空間内の所定の点において、電極/磁極の座標枠を参照し、電場および磁場は、それぞれ、 $E(x, y, z)$ および $H(x, y, z)$ であるとさらに仮定する。(磁場はまた、本開示の目的のために、永久磁気要素のアレイによって生成され得ることが理解されるべきである。)

40

双極子近似(dipole approximation)に従って、DEP力が、以下によって与えられる:

(表1の等式1を参照のこと)。

【0016】

ここで、 R は、粒子の半径であり、この粒子は、単純化のために、球形であると仮定し、 f_{CM} 因子は、クラウジウス-モソッティ因子であり、この因子は、粒子の懸濁媒体に対する粒子の振動数依存性誘電分極率に影響を与え、そして ω は、AC電場の振動数であ

50

る。非球形粒子の場合において、四重より高次のDEP力成分が有効である状態を記載することが理解され、等式(1)よりも複雑な表現が、当業者に公知(例えば、X. J. Wangらに記載されるより高次の極の分析を参照のこと)であるように適用される。

【0017】

誘電分極力におけるさらなる背景が、Thomas B. Jones, 「Electromechanics of Particles」、第3章(Cambridge University Press, 1995)において見出され得る。

【0018】

(2. 磁気泳動力、 $F_{M A P}$)

不均一な磁場中に配置された体積 v および透磁率 μ^*_p の粒子は、磁気泳動力：

10

(表1の等式2を参照のこと)

を受ける。ここで、 μ_s は、懸濁媒体の透磁率であり、 R は、この粒子の半径であり、そして k_{cm} 因子は、粒子の懸濁媒体に対する粒子の磁気分極率を記載する磁気クラウジウス-モソッティ因子である。ここで、 μ_H は、適用された磁場の振動数であり、そして静的場に対して0の値を有する。誘電等式(1)と同様に、 μ_s および μ_p は、懸濁媒体および粒子それぞれの複素透過率である。静的磁場の場合において、これらの透磁率は、実際の静的透磁率のパラメータ μ_s および μ_p それぞれに対して減少する。

【0019】

本発明者は、誘電等式(2)が、誘電等式(1)の磁気アナログであることに留意する。

あるいは、この粒子が、永久磁気容量 m を有する場合、この磁気泳動力は、以下：

20

(表1の等式3を参照のこと)

である。

【0020】

粒子は、永久磁気分極成分および誘導磁気分極成分の両方を有することが可能である。この場合において、等式(2)および(3)の組み合わせが、適用される。例えば、粒子は、高い透過率を有し、そして同時に、磁気の残り(remnance)を示し得る。

【0021】

磁気泳動力におけるさらなる背景が、Thomas B. Jones, 「Electromechanics of Particles」、第3章(Cambridge University Press, 1995)において見出され得る。

30

【0022】

(3. 電場および磁場の空間的变化)

不均一な電場および磁場が、交流電圧を電極アレイに印可することによって、および磁化力を磁極アレイに印加することによって形成されると想定する。図1は、非伝導基材(例えば、ガラス)上にパターン化された導体(例えば、 $0.5\mu\text{m}$ 厚の金の層)を含む電極アレイを示す。電極要素(2および3)は並行であるが、干渉縞効果(fringing effect)は、電圧が、電極母線1と4との間に印加される場合、電極要素のパネルの上側および下側に空間的に不均一な電場を形成する。ここで、電極パネルの上側の不均一な電場の分析(X. J. Wangら(Exhibit C)において議論される)は、フリンジ場(fringing field)領域に配置される粒子が受ける誘電泳動力が、近似関係：

40

(表1の等式4を参照のこと)

に従って、電極のパネルからの粒子の距離に依存するということを明らかにする。

【0023】

ここで、 F_{DEPO} は、所定の印加電圧および所定の粒子特性に関する定数であり、 h は、電極面からの粒子の距離であり、そして h_{DEP} は、電極アレイの形状に依存する定数である。

【0024】

これに対して磁気アナログにも、印加される。図1の電極2および3が、電極代わりに磁極(例えば、薄膜磁極)であると考えられ、そして磁石が、母線1および4において極と

50

接続される場合、空間的に不均一な磁場が、薄膜磁気要素の面の上面および下面に形成される。磁極アレイの付近に配置された磁気的に感受性の（または永久的に磁性の）粒子は、等式（2）（または等式（3））に従う磁気泳動力を受ける。この電気的な場合と類似して、この粒子は、以下の関係：

（表1の等式5を参照のこと）

に従って、磁気トラックの面の面からの距離 h の増加に伴って減少する、磁気泳動力を受ける。ここで、 $h_{M A P}$ は、崩壊定数である。ここで、 $F_{M A P 0}$ は、磁極母線1と4との間に適用される磁石の所定の強さ、およびこの粒子の所定の磁気特性に関する定数である。

【0025】

ここで、電気力および磁気力が、同時に適用される場合を考慮する。電極アレイおよび磁極アレイの両方は、支持基板上に同時に存在し得る。さらに、電極アレイおよび磁極アレイの形状特性は、類似しているか、または類似していなくてもよい。形状的な非類似性が存在するか、または他の一般的な条件が、互いに対して磁場または電場を歪ませるように作用する場合、パラメータ $h_{D E P}$ および $h_{M A P}$ の値は、互いに異なり、そして粒子に作用する電気力および磁気力は、電極および磁極の面からの粒子距離において、異なる依存性を示す。

【0026】

磁気泳動力は、生物学的標識適用において、通常、陽性（すなわち、誘引性）の標識であるが、条件は、このような適用において、この誘導泳動力を陰性にするように選択され得る。この場合において、粒子に作用する誘導泳動力および磁力が、互いに反対に作用することが可能である。等式（4）および（5）において、 $h_{D E P} < h_{M A P}$ である場合、以下：

（表1の等式6を参照のこと）

のように、等式（1）および（2）を使用して、力が釣り合っている場合の電極面および磁極面からの距離 h について、独特の値を見出すことが可能である。ここで、 $G_{D E P}$ および $G_{M A P}$ は、電極要素および磁極要素の空間的な特性に関する幾何学的関数であり、 V_0 は、電極母線に印可される電圧であり、そして B_0 は、磁極母線に印可される磁場である。この等式は、粒子が、以下：

（表1の等式7を参照のこと）

（所定の h は、表1の等式8を参照のこと）

の場合、電極および磁極（これらの、要素は、同一面であると想定される）の面から高さ h で平衡状態になることを明らかにする。

【0027】

あるいは、この粒子が、永久磁気モーメントを有し、それらの磁気モーメントが、飽和値に到達した場合、等式（3）に記載される磁気泳動力は、関係（5）に従って減少し、そして以下：

（表1の等式8Aを参照のこと）

の崩壊定数 $h_{M A P}$ は、この電極アレイおよび磁気アレイの形状が同一である場合であっても、誘電泳動の崩壊定数 $h_{D E P}$ と異なる。この場合において、以下：

（表1の等式9を参照のこと）

（所定の h は、表1の等式10を参照のこと）

の場合に、平衡状態の高さに達する。

【0028】

この場合において、誘電泳動場および磁気泳動場は、空間的に完全に一致した電極 - 磁極構造から発生され得る。この誘電泳動力は、印可された電圧の2乗に依存するが、この磁力は、印可された磁場に直線的に依存する場合にも留意のこと。等式（10）において、磁性粒子の磁場は、磁極アレイからの電場で整列化されたままであると想定される。磁性粒子が、印可される磁場を用いて完全に整列化し得ない場合、磁気泳動力は、当該分野で公知のように、等式（3）によって与えられる力よりも小さい。DEP力およびMAP力

10

20

30

40

50

が釣り合う高さは、磁極および電極が同一面でない場合に、代替の等式セットによって記載され、この代替の等式は、電極および磁気要素の他の配置に対する、誘電泳動力および磁気泳動力を記載するために誘導され得ることに留意のこと。この開示は、このような場合の全てをカバーすることが意図され、そして上の式は、この技術を教示する例示的な目的のためであることを意味する。

【0029】

(4. 上層フィールドフローフラクション)

薄いチャンネルを通して層流レジームの下を移動する流体は、流体学的流動プロファイルを想定し、これにより、流体速度は、このチャンネルの中心部において、チャンネル壁からの距離と共に最大速度まで増加する。流動プロファイルが放射状である場合、例えば、この速度は、以下：

10

(表1の等式11を参照のこと)

によって与えられ、ここで、 h は、チャンネル壁からの距離であり、 D は、チャンネルの高さであり、そして $\langle v \rangle$ は、チャンネル中の流体の平均速度である。

【0030】

フィールドフローフラクション(FFF)の方法は、1以上の適用された力の場による、流体力学的流動プロファイル内の粒子の位置決め依存し、この力の場は、異なる物理学的な特性を有する粒子に差動的に影響を与える。この力の場の影響を介して、流動プロファイルにおいて異なる高さで位置決めされた粒子は、異なるスピードの流体により運搬され、これにより分離される。

20

【0031】

本発明は、分離されるべき粒子の位置を、相反する誘電泳動力および磁力を釣り合わせることによって、流体学的流動プロファイル内で制御することによる方法を開示する。しかし、重力はまた、粒子に作用し、そして流体力学的流動プロファイルにおける、それらの位置または速度に影響を与え得ることが理解される。このような場合において、重力、電気力および磁力の組み合わせが、粒子の位置および速度を決定する。DEP-FFF適用における重力の効果および使用は、米国特許第5,993,630号および同第5,888,370号(既に、本明細書中で参考として援用されている)に記載されている。

【0032】

粒子を位置決めするためのDEP力およびMAP力を利用するために、チャンネル内で、不均一な電場および磁場を発生する、電極および磁極(または永久磁気要素)を取り込むチャンネルを利用する。これらの場は、チャンネルに導入されるキャリア流体内の粒子に、誘電泳動力および磁気泳動力を引き起こす。このチャンネルに関する粒子の位置は、これらの力によって影響される。このキャリア流体がチャンネルを流れる場合、チャンネル中の所定の位置での流体の速度は、その位置に依存し、従って、この粒子が流体によって運搬される速度は、粒子位置での誘電泳動力および磁気泳動力の効果によって影響される。

30

【0033】

例えば、所定の粒子が、磁力および誘電力の両方に対して感受性である場合、その高さは、等式(8)または等式(10)に従う誘電泳動力および磁気泳動力の釣り合いによって制御され得、そしてこの流体は、等式(11)によって与えられる速度で粒子を運搬し得る。粒子18に作用するMAP力およびDEP力ならびに流体力学的流動プロファイル16は、図2Aに示される。図2Aに示されるように、誘電泳動力10は、磁気泳動力12と相反する。流動の矢印14は、このチャンバ20内の流体流動の方向を示す。例示的な実施形態において、放射状の流動プロファイルである、流体力学的プロファイル16が、図2Aにさらに示される。電極要素22および磁気要素24もまた、図2Aの例示的な実施形態において示される。特徴的な高さに対する粒子の動きは、図2Bにおいて示され、ここで、この流体は、左から右へとゆっくりと流れる。実際に、図2Bに示されるよりも、より大きいか、または同様に小さい特徴的な高さの差が、検体の識別および分離のために利用され得る。

40

【0034】

50

類似の物理的特性を有する粒子は、全て、流動チャンネルにおいて同じ特徴的高さに位置し、従って、同じ速度で流体によって輸送される。異なる物理的特性を有する粒子は、異なる特徴的な高さ（流体流動速度が異なる）に位置する。従って、これらは、異なる速度でチャンバを通過して輸送される。この原理を使用して、異なる粒子型の混合物の分画が達成され得る。例えば、粒子混合物を含むサンプルがこのような流動チャンバの一端に導入され、流体流動によってチャンバを通過して運ばれる場合、異なる粒子型は、異なる速度で運ばれ、そして異なる時間で流動チャンバの出口端部から出て、ここで、これらが分離画分に収集され得る。所定の粒子が、流動チャンネルの入口から出口端部に進むのにかかる時間は、「保持時間」として当該分野において公知である。本発明は、検体の分画、分離、単離、同定および特徴付けのために、チャンネル内での粒子の位置および/または保持時間を制御するための誘電泳動、磁気泳動および流体力学的原理の組み合わせに関する。

10

【0035】

（粒子の誘電特性および磁気特性）

粒子の誘電特性および磁気特性に影響する因子は、当該分野において周知である。粒子が検体 - 標識複合体から構成される場合、複合体の特性が、一般的に、複合化されていない検体または複合化されていない標識の特性とは異なることが理解される。これは、本明細書中に開示される本発明の識別能力に対して重要な意味を有する。具体的には、磁気標識と非磁性検体との会合が、標識または検体のいずれかの誘電特性とは異なる誘電特性を有し、そして検体の磁気特性とは異なる磁気特性を有する磁気検体 - 標識複合体を生じることが理解されるべきである。

20

【0036】

一般的に、標識および検体は、それらの比誘電率、透磁率、容積、および懸濁媒体の電荷分布に対する影響に依存する、誘電特性および磁気特性を複合体に与える。本明細書中に記載される分離が誘電泳動力および磁気泳動力の平衡に依存するので、検体 - 標識複合体は、従って、会合していない検体を有する標識の溶出特性とは異なる、DEP - MAP分離器における溶出特性を通常示す。

【0037】

従って、本発明に従う方法によって、標識が、検体に関するそれらの会合状態に従って識別され得、そして分離され得る。例えば、異なる数の磁性標識を結合した細胞は、分離の間、異なる特性を示し、それらの識別、特徴付け、および単離を可能にする。従って、例えば、EGFレセプターに対する抗体についてより少ない結合部位を有する細胞は、より多くの数のレセプターを有する細胞から分離され得る。別の例として、複合体化していない標識は、細胞、粒子、分子および他の標的検体と会合した標識から分離され得る。

30

【0038】

さらに、異なる種類の標識からなる「カクテル」は、それぞれの型の標識が異なる誘電的および磁氣的「指紋 (finger print)」を有するように、作製され得る。次いで、この混合物における各型の標識は、異なる標的検体とのそれぞれの結合状態に従って、独立して、識別され得、分離され得、同定され得、そして特徴付けられ得る。このようなカクテルの標識は、単一の分離工程で、混合物内の複数の検体標識の同時分析を可能にする。

40

【0039】

（重力の影響）

図2Aは、分離器内の粒子に作用し、そして平衡位置に粒子を位置付けるために作用するMAPおよびDEP力を示す(図2B)。分離が重力場で行われる場合(分離が地球上で行われる場合)、重力が粒子上に作用することが理解されるべきである。粒子に作用するこの力の大きさは、 $F_{\text{沈降}} - v_g (d_p - d_s)$ であり、ここで、 v は、粒子の体積であり、 d_p は、その密度であり、そして d_s は、懸濁媒体の密度である。図2Aの力の図に関する重力の方向は、地球の重力場に関して分離器の実施形態の配向に依存する。重力が F_{MAP} または F_{DEP} と同じ方向の成分を有する場合、粒子の位置に影響する傾向もまたある。従って、式(8)および(10)は、実際、重力の項の追加によって改変され

50

る必要があり得る。さらに、重力が、図 9 A における流体流動の方向に作用するかまたは流体流動の方向に逆らって作用する成分を有する場合、式 (1 1) によって与えられる粒子の速度は、沈降速度の項の追加によって改変される。例えば、重力が流動の方向に作用する場合、さらなる沈降速度成分は、

【 0 0 4 0 】

【 数 1 】

$$v_{sed} = \frac{1}{6} \frac{\tau(d_p - d_s)g}{\eta}$$

10

として、ストークスの法則によって与えられる。

【 0 0 4 1 】

これらの重力の効果が重力場に関して分離装置の適切な整列によって除外され得るか、またはこれらが標識、検体または検体 - 標識複合体の密度特性の利用するために活用され得ることが理解されるべきである。

【 0 0 4 2 】

最後に、DEP力を提供するために使用される電場が容易に切換可能であり、そして特定の所望の型の識別を達成するために、分離の間、特定の適用にカスタマイズされ、そしてプログラミングされ得ることが注意されるべきである。分離の間の時間にわたって、電場を変化させるプロセスは、プログラミングと呼ばれる。DEP - FFF分離を改善するためのプログラム可能性の使用は、係属中の米国特許出願番号第 0 9 / 2 4 9 , 9 5 5 号 (本明細書中において明確に参考として援用される) に記載される。磁場はまた、本明細書中に開示される本発明のフレキシビリティ、識別および能力をさらに向上させるためにプログラミングされ得る。

20

【 0 0 4 3 】

(例示的な実施形態)

誘電泳動力および磁気泳動力の組み合わせによって位置付けられる分析を活用する、分離器の 2 つの例示的な実施形態が記載される。第 1 の実施形態において、これは、キャリア流体の流動速度プロファイルを活用せず、そしてサンプルの連続的なプロセッシングに適し、検体混合物は、アレイの電極および磁極 (magnetrode) を備えるチャンバを 30 通って連続的に流れ得る。次いで、検体は、電場および磁場から生じる、組み合わされた誘電泳動力および磁気泳動力に供される。流動チャンネル内で十分な時間が費やされる場合、これらの力は、検体が同定され得るか、分離され得るかまたは単離され得るように、DEPおよびMAP力が平衡になるキャリア媒体流動プロファイル流れ内の特徴的な位置の十分近くに検体を移動させる。従って、検体は、それらの誘電特性および磁気特性に依存する位置で流動チャンネルから出る。異なる検体は、流動チャンネル壁に関して位置に従って特徴付けられるかまたは分離され得、ここで、これらは、出口ポートの適切な配列の使用によって流動チャンネルを出る。

30

【 0 0 4 4 】

第 2 の型の実施形態において、これは、キャリア流体の流動速度プロファイルが活用され、そしてサンプルのバッチプロセッシングに最も適しており、サンプル検体混合物が、体積において分離チャンバよりも通常ずっと小さい単一のサンプルとして注入されることを除いて、類似の装置および操作の様式が使用される。次いで、このアリコートは、キャリア媒体により流動チャンネルを 40 通って運ばれる。また、DEPおよびMAP場において十分な時間を費やす場合、検体は、識別され得るかまたは分離され得るように、それらの作用するDEPおよびMAP力が平衡になるキャリア流体流動プロファイル内の位置の十分近くに移動する。次いで検体がキャリア媒体流動プロファイルにおけるそれらの位置に従って異なる速度で運ばれるので、それらは、異なる特徴的時間で流動チャンネルから出る。上記で使用される「十分な時間」とは、検体、標識および検体 - 標識複合体が、それらが通常、識別されるか、検出されるか、または分離され得る位置に移動するのに十分な時間を、

40

50

M A PおよびD E P力場で費やすことを意味する。実際には、これは、M A PおよびD E P力が正確に平衡になる位置にそれらが来る時間よりも短くあり得る。

【0045】

2つの実施形態についての装置の特定の局面を、ここで記載する。出口ポート（連続的様式の実施形態について検体の分離および単離を達成するために複数でなければならない）を除いて、2つの実施形態の他の局面は同一であり得る。しかし、複数の出口ポートを有する実施形態がまたバッチ様式で操作され得ることが理解されるべきである。

【0046】

誘電泳動操作についての例示的な電極アレイは、図2および3に示される。これらは、支持基板（ガラスなど）の上にパターン化された導体（例えば、金など）の薄いフィルムからなる平面アレイである。これらのアレイは、公知のフォトリソグラフィックおよびEビームパターン化技術によって製造され得る。これらまたは異なる形態の電極アレイを使用して、本明細書中に開示される分離器にD E P力を提供し得る。電極は、電気メッキされるか、プリントされるか、エッチングされるか、またはチャンバ壁に固定されるか、あるいはそれ以外で流動チャンネル内またはその周りに位置付けられて、これらがシグナル発生器に接続される場合に、流動チャンネル内に不均一な電場を作製し得る。

【0047】

磁気泳動操作のための例示的な磁極アレイは、図3に示されるパターンと類似または異なるパターンを有し得る。磁気の場合、磁極は、薄いフィルム材料、合金、または磁気的に感受性の材料（例えば、磁気セラミックスまたはフェライト）、磁気的に感受性のワイヤ、またはストリップ、ワイヤ、または他の永久磁石材料の配置からなり得る。これらは、チャンバ壁に取り付けられ得るかまたは流動チャンネル内に不均一な電場を提供する能力を生じる任意の位置に位置付けられ得る。

【0048】

磁場および電場を同時に提供するのに適した例示的な電極および磁極の組み合わせは、図4A～Cに断面で示される。図4Aは、電極要素および磁極要素が組み合わされた例示的な構造を示す。具体的には、図4Aは、電極22が磁極24の上に配置され、磁極24が構造26の上に配置されていることを示す。代替の実施形態において、磁極24は、電極22の上に配置され得る。例えば、このような構造は、単一のフォトマスクからリソグラフィによりパターン化され得る。磁極要素および電極要素の形状が異なる、より複雑なパターンのスキームは、例として図4Bに示されるように、フォトリソグラフィのための2つ以上のパターン化マスクを使用して作製され得る。図4Bに示されるように、電極要素22は、磁気要素24に隣接して配置される。当該分野で公知の他の方法は、電極アレイおよび磁極アレイを作製するために使用され得る。さらなる電極または電極アレイが、例えば、図4Cに示されるように、チャンバ内の他の所に組み込まれ得ることが理解される。図4Cに示されるように、1次電極構造22に加えて、2次電極構造28は、対向する基板30上に配置される。例示的な実施形態において、2次電極構造30は、1次電極構造22と同じ厚みおよび幅であり得るか、または異なるサイズであり得る。例示的な電氣的励起スキームは、図5に示される。

【0049】

例示的な磁場励起スキームは、図6に示される。図2に示される形態または他の任意の形態をとる、永久磁石材料のアレイはまた、外部磁場の必要なしに、流動チャンネル内に磁場を提供するために使用され得る（図7）。電極のアレイはまた、図7Bに示されるアレイへの磁極経路の必要なしに、チャンバの外側に配置される磁極から誘導される磁場に不均一性を導入するために使用され得る。

【0050】

バッチ様式分離について、誘電および磁気分離原理を使用する分離器の例示的な実施形態は、図8に拡大形態で示される。図8は、スロットI Vが切り抜かれたガスケットI I Iを間にはさむ2つの側壁I IおよびI I Iから構成される薄いチャンバIの拡大図を示す。組み立てられた場合、チャンバは、ガスケットスロットが流動チャンネルになるような様

10

20

30

40

50

式で、例えば、締め具で留められる (c l a m p i n g) そして / または接着されること
によって、一緒に密接に保持される。入口ポート V および出口ポート V I は、キャリア流
体およびサンプルの進入および退出を可能にする。実際には、複数のポート V および V I
が存在し得る。

【 0 0 5 1 】

代替の実施形態において、流動チャンネルは、エッチング、機械加工、アブレーション、リ
ソグラフィ手段、または当該分野で公知の他の任意の手順によって、スロット切断から
直接的に一方または両方の側壁に誘導され得る。あるいは、流動チャンネルは、スパッタリ
ング、スピニング、プリンティングまたは薄膜堆積によって、一方または両方の
側壁に適用される材料から誘導され得るか、デバイスの本体に切り出され得るかまたは形
成され得、あるいは射出成形され得るか、当該分野において公知の他の任意の手順によ
って作製され得る。

10

【 0 0 5 2 】

電極 V I I および磁極 V I I I のアレイが、流動チャンネルに存在する。これらは、それ自
体の内部のチャンネル内にあり得るか、チャンバの 1 つ以上の壁によって支持され得るか、
またはチャンバの外側であり得る。電気信号が、単一ジェネレータ I X から接続される。
磁界は、磁石 X から、バス X I および X I I を介して、それぞれ、電極および磁極に提供
される。

【 0 0 5 3 】

連続様式の分離についての第二の実施形態が、図 9 に示される。図 9 は、出口ポート V I
を除いて図の全ての要素が、図 8 に記載されるものと同じものである、代替の実施形態を
示す。図 9 において、出口ポート構成は、電極および磁極要素、ならびに流動チャンバの
壁から、特定の規定された距離で、流動チャンバを通して移動する流体のバンドを収集す
るよう構成された複数のポートを含む。具体的に、図 9 a は、流動チャンネルから異なる
距離で流動チャンネルを通して移動するキャリア流体が、例えば、6 個の排出ポートを通し
て流動チャンネルからどのように除去され得るかを示す。それにより、図の底部の、チャン
バフロアーから異なる位置で、キャリア媒体に運ばれる検体または標識または検体 - 標識
複合体は、異なる排出ポートを通して排出される。

20

【 0 0 5 4 】

(バッチ様式操作の説明)

バッチ様式を使用する例示的な分離において、以下の工程が行われる：

(1) 1 つ以上の検体を含むサンプルを、誘電的特性および磁気的特性ならびに 1 以上の
型の標的検体に対する結合親和性を有する標識と混合する。所望ならば、区別可能な磁気
的特性および誘電的特性ならびに結合親和性を有する、異なる検体のための標識が、この
工程と組合せて使用され得る。

30

【 0 0 5 5 】

(2) 標的検体と標識との間の適切な結合を確実にするために十分なインキュベーション
時間の後に、検体 / 標識混合物の計量されたアリコート、分離チャンネルの入口端部に注
入する。

【 0 0 5 6 】

(3) 磁界および A C 電界を、分離チャンネル中の磁極 / 電極アレイに印加する。この工程
は、サンプル注入工程の前であってもよいし、このサンプル注入工程の後でもよい。

40

【 0 0 5 7 】

(4) M A P 力および D E P 力が釣り合う、電極および磁極アレイに対する位置に十分に
近く、検体および検体 - 標識混合物が接近する間の適切な緩和時間の後、キャリア媒体の
流動が、分離チャンネルの入口端部で開始する。

【 0 0 5 8 】

(5) このキャリア媒体が、分離チャンネル内に流体力学的流動プロファイルを確立し、そ
してチャンネル壁に対するそれらの位置に依存する速度で分離チャンネルを通して検体およ
び検体 - 標識複合体を運ぶ。この位置は、印加された磁界および A C 電界に依存し、そして

50

例示的な実施形態において、流体力学的流動プロフィールおよび重力によって影響され得る。

【0059】

(6)異なる検体および検体-標識複合体が、異なる時間にチャンバの出口端部から出現し、そして別個の画分に収集され得るかまたは種々の測定方法によって検出され得る。類似の磁気特性および誘電特性を有する検体-標識複合体は、分離チャンネルで作用する磁気力および誘電力の相乗作用によって同様に配置されるので、これらは、キャリア媒体によって類似の速度で運ばれ、そして単一の溶出ピークでチャンネル出口に一緒に出現する。対照的に、異なる特性を有する検体および検体-標識複合体は、磁界および電界の相乗作用によって異なって配置され、キャリア媒体によって異なる速度で運ばれ、そして異なる時間でチャンネル出口に出現する。このようにして、検体の混合物は、区別され得、そしていくつかの特徴的なピークまたはバンドに時間的に分離され得る。例示的な実施形態のいずれかは、バッチ様式で操作され得る。

10

【0060】

(連続様式操作の説明)

(1)1つ以上の検体を含むサンプルを、誘電的特性および磁気的特性ならびに1以上の型の標的検体に対する結合親和性を有する標識と混合する。所望ならば、区別可能な磁気的特性および誘電的特性ならびに結合親和性を有する、異なる検体のための標識が、この工程と組合せて使用され得る。この混合物は、標的検体と標識との間の適切な結合が生じるに十分な時間インキュベートされる。

20

【0061】

(2)磁界およびAC電界を、分離チャンネル中の磁極および電極のアレイに印加する。

【0062】

(3)(1)からの検体/標識混合物が、流動チャンネルの入口ポートに連続的に注入される。

【0063】

(4)キャリア媒体が、分離器の複数の排出ポートから引き出される(図9を参照のこと)。異なる検体画分が、各ポートから出現する。

【0064】

このようにして、検体および検体-標識複合体の混合物が、異なる排出ポートから出現する画分に連続的に分離され得る。

30

【0065】

(誘電泳動力による磁気粒子の放出)

本明細書中に開示される発明は、MAP力およびDEP力の相互作用(具体的には、釣り合い)に依存する検体、標識および検体-標識複合体の区別のための方法を記述する。

【0066】

DEP力はまた、磁気標識適用における永久磁石と関連した一般的な問題を克服するために使用され得る。具体的に、現在の磁気分離技術は、それらが収集された後に磁気標識および検体-標識複合体を放出するために、磁場を取り除く能力に依存する。磁気分離は、通常、磁界が外部手段(例えば、永久磁石または電磁石)によって印加される分離チャンネルまたは分離カラムを使用して達成される。磁気標識および検体-標識複合体の収集の後に、分離チャンネルまたは分離カラムは永久磁石の近傍から取り除かれなければならないか、または電磁石が切られなくてはならず、この結果、これらの標識および標識-検体複合体が放出される。収集された検体を放出するために、磁界を取り除くためのこの要求は、分離チャンネル自体の内部にある永久磁石または永久磁石のアレイの使用を排除する。

40

【0067】

本発明は、この制限が克服されることを可能にする。これは、本発明に従う装置が、磁気標識および標識-検体複合体がDEP力によって収集チャンネル内の磁気要素から反発されることを可能にするからである。例えば、図6Aは、永久磁石の一体化アレイを有する分離チャンネルを示す。

50

【0068】

本明細書中の他の箇所で、DEP力が、磁気標識および検体 - 標識複合体の磁極または永久磁気要素への付着を防止するために十分であることを仮定する。しかし、代替の様式の操作において、DEP力は、切られるかまたは低レベルに維持される一方で、磁界は存在する。相殺するDEP力が存在しない場合、磁気標識および検体 - 標識複合体が、磁気要素に引かれ、接近しそして接触し、そして磁気要素上に固定化される。この様式の操作において、従って、分離チャンバは、最初に、従来の磁気分離チャンバまたはカラムのように機能し、そして懸濁媒体からの標識および検体 - 標識複合体を保持する。

【0069】

しかし、収集の後、DEP力は、十分に高いレベルにスイッチングされて、磁界を除去する必要がなしに、磁気要素から、収集された磁気標識および検体 - 標識複合体を反発させ、そして解離させる。ある一定時間の間の小さい容量から大きな容量への、電極アレイに印加された電圧を上昇させることによる、DEP力によって磁氣的に収集された種の解離によって、異なる標識および検体 - 標識複合体が、異なる時間に放出され得、そして分離チャンバからフラッシュされ得、そして異なる画分に収集され得ることに注意すべきである。

【0070】

この様式の操作は、永久磁気要素が、分離チャンバに組込まれることを可能にし、この特徴は、微小流体実施形態において特に有用である。永久磁石要素の組み込みを可能にすることによって、より強力な外部磁石についての必要性が排除される。あるいは、磁界を取り除く必要性を排除することによって、所望ならば、固定された外部磁石が使用され得る。

【0071】

(例示的な適用)

本発明による装置および方法を使用して、種々の物質が、磁化され得る。特に、本発明によって、以下の物質の識別、分離、同定、検出、操作および単離が達成され得る：

(a) 細胞サブ集団であって、例えば、以下を含む：

- ・それらの抗体および誘電プロフィールに従う血球（例えば、CD34⁺、CD8⁺、CD4⁺、CD14⁺、CD18⁺、CD5⁺など）；
- ・血液由来の稀な細胞（例えば、転移性細胞（例えば、EGF⁺、CD5⁺、上皮マーカー⁺など）；
- ・針生検からの標的細胞；
- ・母体液体 (maternal fluid) 由来の有核胎児細胞（例えば、母体血液からの赤血球、臍帯血 (chord blood)、羊水など）；
- ・グラム陽性細菌からのグラム陰性細菌；
- ・体液由来の寄生生物および寄生された細胞（例えば、マラリア）および正常な細胞；
- ・血液、尿、唾液、羊水、針生検からの細菌；

(b) マイコプラズマ、真菌、およびウイルス粒子サブ集団であって、血液、尿、唾液、羊水、針生検由来のサブ集団を含む；

(c) 食品処理工場、食品配給、レストラン、家を維持する公衆衛生、細菌戦 (bio warfare)、バイオテロ行為の検出における水分析のための、環境からの潜在的に病原性の細胞、ウイルス粒子、マイコプラズマ、真菌胞子、細菌胞子；

(d) 分子サブ集団であって、以下を含む；タンパク質（例えば、診断剤および予後剤、バイオテクノロジーのための分離物、研究、医薬品における）；

・核酸（例えば、診断剤および予後剤、バイオテクノロジー遺伝子治療、研究、医薬品における）；

・脂質（例えば、診断剤および予後剤、バイオテクノロジー遺伝子治療、研究、医薬品における）；

・複合体分子（例えば、診断剤および予後剤、バイオテクノロジー遺伝子治療、研究、医薬品における）；

(e) 無機質 (例えば、鉱石の選鉱 (b e n f i c a t i o n) 、環境サンプル、診断および予後サンプル (例えば、堆積物、骨など) のための) ;

(f) 空間のための医薬品 (f o r s p a c e m e d i c i n e) (重力、遠心力、大きな磁石のない分離) ;

(g) 細胞オルガネラおよび他の生物学的構造物であって、以下を含む :

・核、染色体、リボソーム

・ミトコンドリア

・エンドソーム、プレブ、ペルオキシソーム、および他のリボソーム要素

・膜会合物 (小胞体、形質膜、核膜、ウイルスカプセル、細菌複合体、孢子アセンブリなどを含む) ; ならびに

(h) 標識への結合の程度に関して、細胞、オルガネラ、または他の粒子。(例えば、異なる数の E G F レセプターによって特徴付けられる異なる細胞サブ集団が、E G F についてのモノクローナル抗体で改変された標識によって識別され得る) 。

【 0 0 7 2 】

(表 1)

【 0 0 7 3 】

【 表 1 】

$$(1) \bar{F}_{DEP} = 2\pi\epsilon_s R^3 f_{cm}(\epsilon_s^*, \epsilon_p^*, \omega_E) \bar{\nabla} E(x, y, z)^2$$

$$(2) \bar{F}_{MAP} = 2\pi\mu_s R^3 k_{cm}(\mu_s^*, \mu_p^*, \omega_H) \bar{\nabla} H(x, y, z)^2$$

$$(3) \bar{F}_{MAP} = \mu_s R^3 \bar{m} \bar{\nabla} \cdot \bar{H}(x, y, z)$$

【表1】の続き

$$(4) F_{DEP} = F_{DEP0} e^{-h/h_{DEP}}$$

$$(5) F_{MAP} = F_{MAP0} e^{-h/h_{MAP}}$$

(6)

$$F_{DEP} + F_{MAP} = 2\pi\epsilon_s R^3 f_{cm}(\epsilon_s^*, \epsilon_p^*, \omega) G_{DEP} V_o^2 e^{-h/h_{DEP}} + 2\pi\mu_s R^3 k_{cm}(\mu_s^*, \mu_p^*, \omega) G_{MAP} B_o^2 e^{-h/h_{MAP}} = 0$$

$$(7) \frac{\epsilon_s f_{cm}(\epsilon_s^*, \epsilon_p^*, \omega_E) G_{DEP} V_o^2}{\mu_s k_{cm}(\mu_s^*, \mu_p^*, \omega_H) G_{MAP} B_o^2} = e^{h \left(\frac{h_{DEP} - h_{MAP}}{h_{DEP} h_{MAP}} \right)}$$

$$(8) h = \left(\frac{h_{DEP} h_{MAP}}{h_{DEP} - h_{MAP}} \right) \ln \left\{ \frac{\epsilon_s f_{cm}(\epsilon_s^*, \epsilon_p^*, \omega_E) G_{DEP} V_o^2}{\mu_s k_{cm}(\mu_s^*, \mu_p^*, \omega_H) G_{MAP} B_o^2} \right\} \text{ を与える}$$

(8a)

$$F_{DEP} + F_{MAP} = 2\pi\epsilon_s R^3 f_{cm}(\epsilon_s^*, \epsilon_p^*, \omega_E) G_{DEP} V_o^2 e^{-h/h_{DEP}} + \mu_s R^3 \bar{m}(\mu_s^*, \mu_p^*, \omega) G_{MAP} B_o e^{-h/h_{MAP}} = 0$$

$$(9) \frac{2\pi\epsilon_s f_{cm}(\epsilon_s^*, \epsilon_p^*, \omega_E) G_{DEP} V_o^2}{\bar{m} G_{MAP} B_o} = h \left(\frac{h_{DEP} - h_{MAP}}{h_{DEP} h_{MAP}} \right)$$

$$(10) h = \left(\frac{h_{DEP} h_{MAP}}{h_{DEP} - h_{MAP}} \right) \ln \left\{ \frac{2\pi\epsilon_s f_{cm}(\epsilon_s^*, \epsilon_p^*, \omega_E) G_{DEP} V_o^2}{\bar{m} G_{MAP} B_o} \right\} \text{ を与える}$$

$$(11) v(h) = \frac{1}{6} (v) \frac{h}{D} \left(1 - \frac{h}{D} \right)$$

10

20

30

40

50

本明細書中に開示されそして特許請求される組成物および/または方法の全ては、本発明の開示の観点から過度な実験を行うことなく作製され、そして実施され得る。本発明の組成物および方法は、特定の実施形態の点から記載されるが、変更が、本発明の概念、意図、および範囲から逸脱することなく、本明細書中に記載される組成物および/または方法、ならびにこの方法の工程またはこの方法の工程の順番に適用され得ることが当業者に明らかである。当業者に明らかである全てのこのような類似の置換および改変が、添付の特許請求の範囲に規定されるように本発明の意図、範囲および概念内にあると見なされる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、非伝導基材（例えば、ガラス）上にパターン化された導体（例えば、 $0.5\ \mu\text{m}$ 厚の金の層）を含む電極アレイを示す。

【図2】図2Aは、粒子18に作用するMAP力およびDEP力ならびに流体力学的流動プロフィール16を示す。図2Bは、特徴的な高さに対する粒子の動きを示す。

【図3】図3は、誘電泳動操作についての例示的な電極アレイを示す。

【図4】図4は、磁場および電場を同時に提供するのに適した例示的な電極および磁極の組み合わせを断面で示す。

【図5】図5は、例示的な電気的励起スキームを示す。

【図6】図6は、例示的な磁場励起スキームを示す。

【図7】図7は、外部磁場の必要なしに、流動チャンネル内に磁場を提供するために使用され得る、図2に示される形態または他の任意の形態をとる、永久磁石材料のアレイを示す。

【図8】図8は、バッチ様式分離について、誘電および磁気分離原理を使用する分離器の例示的な実施形態を拡大形態で示す。

【図9】図9は、連続様式分離についての第二の実施形態を示す。

【図2】

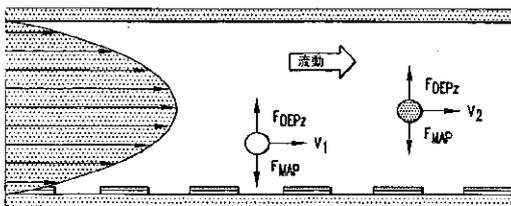


FIG. 2A

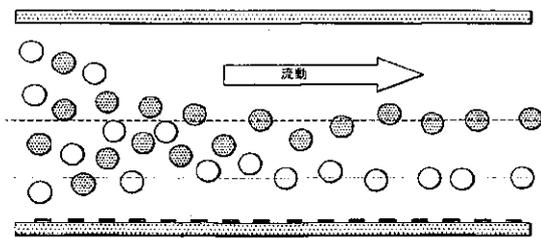


FIG. 2B

【図4】

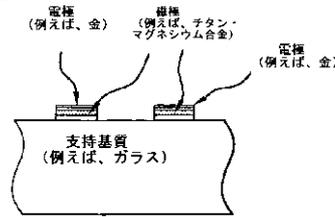


FIG. 4A

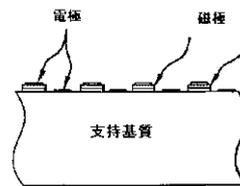


FIG. 4B

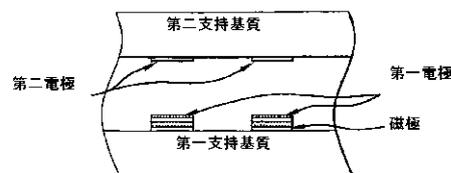


FIG. 4C

10

20

【 図 5 】

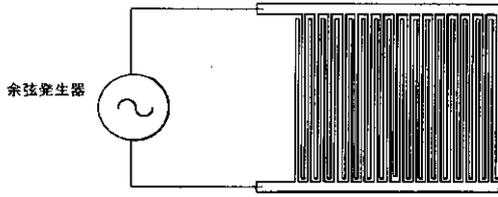


FIG. 5A

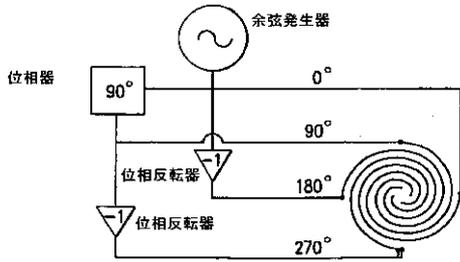


FIG. 5B

【 図 7 】

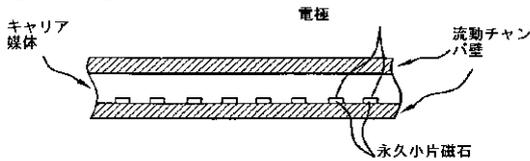


FIG. 7A

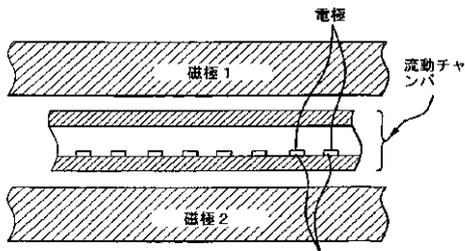


FIG. 7B

【 図 6 】

以下の図A、BおよびCにおける共通要素:

電極、磁極および流体流動経路を取り込む分離チャンバアセンブリ

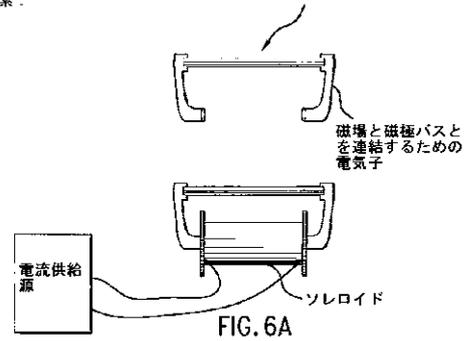


FIG. 6A

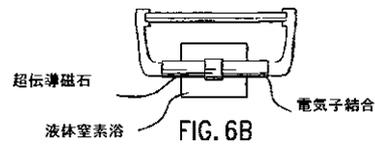


FIG. 6B

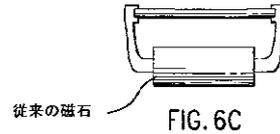


FIG. 6C

【 図 8 】

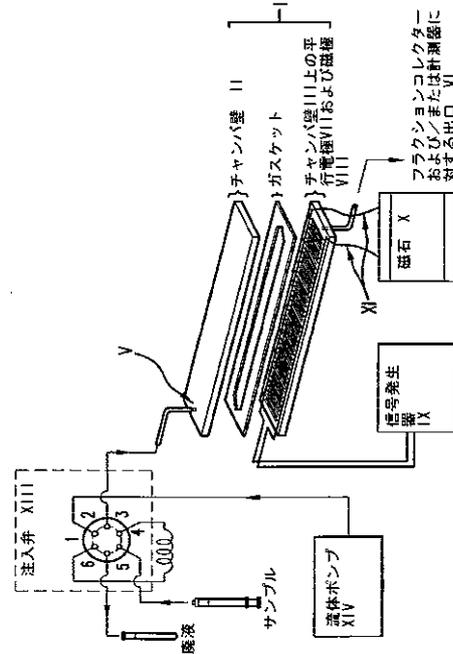


FIG. 8

【図 9】

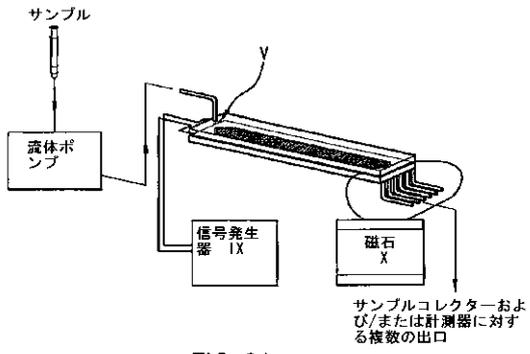


FIG. 9A

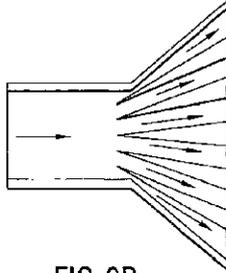


FIG. 9B

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96857 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 30/00
Houston, TX 77024 (US); VYKOUKAL, Jody [US/US],
1937 Dryden No. 2, Houston, TX 77030 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/0484
- (22) International Filing Date: 14 June 2000 (14.06.2000)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/211,757 14 June 2000 (14.06.2000) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 60/211,757 (CON)
Filed on 14 June 2000 (14.06.2000)
- (71) Applicant (for all designated States except US): BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM [US/US]; 201 West 7th Street, Austin, TX 78701 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): GASCOYNE, Peter, R., C. [US/US]; 5513 Lakeside, Bellville, TX 77401 (US); BECKER, Frederick, E. [US/US]; 8 Hunters Branch,
- (74) Agent: BARRETT, Michael, C.; Fulbright & Jaworski, L.L.P., Suite 2400, 600 Congress Avenue, Austin, TX 78701 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, 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, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GL, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, NG, TD, TG).

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

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



WO 01/96857 A2

(54) Title: METHOD AND APPARATUS FOR COMBINED MAGNETOPHORETIC AND DIELECTROPHORETIC MANIPULATION OF ANALYTE MIXTURES

(57) Abstract: Methods and apparatuses for discriminating matter utilizing dielectrophoresis combined with magnetophoresis. A sample having one or more constituents is injected into an inlet part of a chamber. A carrier medium flow is initiated at the inlet port to establish flow within the chamber. A dielectrophoretic force is generated to act on the constituents of the sample. A magnetophoretic force is generated to act on the constituents of the sample. The dielectrophoretic force and magnetophoretic forces are balanced to position the constituents within the chamber. The constituents are then collected at one or more outlet ports of the chamber according to the dielectric and magnetic characteristics of the constituents. The constituents may be collected as a function of time of exit from the chamber and/or position within the chamber.

WO 01/96857

PCT/US01/19484

DESCRIPTION**METHOD AND APPARATUS FOR COMBINED MAGNETOPHORETIC
AND****5 DIELECTROPHORETIC MANIPULATION OF ANALYTE MIXTURES**

This application claims priority to provisional patent application Serial No. 60/211,757 filed June 14, 2000, entitled, "Method and Apparatus for Combined Magnetophoretic and Dielectrophoretic Manipulation of Analyte Mixtures" by Peter
10 R.C. Gascoyne, Jody V. Vykoukal, and Frederick F. Becker. The entire text of the above-referenced disclosure, including figures, is specifically incorporated by reference herein without disclaimer.

The following issued U.S. patents are hereby incorporated by reference: U.S.
15 Patent Nos. 5,858,192, 5,888,370, 5,993,632, and 5,888,370. The following patent applications are hereby incorporated by reference: pending U.S. patent application serial number 09/249,955 for "Method and apparatus for programmable fluidic processing" filed February 12, 1999; pending U.S. patent application serial number 09/395,890 for "Method and apparatus for fractionation using generalized
20 dielectrophoresis and field flow fractionation" filed September 14, 1999; provisional patent application Serial No. 60/211,515 filed June 14, 2000 for "Dielectrically-Engineered Microparticles" filed June 14, 2000; provisional U.S. patent application serial number 60/211,514 for "Systems and methods for cell subpopulation analysis" filed June 14, 2000; and provisional U.S. patent application serial number 60/211,516
25 for "Apparatus and method for fluid injection" filed June 14, 2000.

Field of the Invention

The present invention relates to an apparatus and methods for combined magnetophoretic and dielectrophoretic manipulation.

30

Background of the Invention

One of the most important capabilities that enables the characterization and preparation of bio-materials throughout the life sciences is the recognition of target

WO 01/96857

PCT/US01/19484

components in a mixture and the ability to selectively manipulate, interact, and/or isolate them. Methods known in the art to accomplish these steps include magnetic labeling techniques. In these methods, magnetically-susceptible particles (herein termed "magnetic labels" or "labels") are used that can be attracted to a magnet and
5 have modified surfaces that bind preferentially to target particles, cells, or molecules (herein termed "target analytes"). The surface characteristics of the labels that provide for preferential binding can include, but are not restricted to, antibodies, chemically-reactive groups, and receptor ligands. Such surface-modified magnetically-susceptible labels tend to become attached to target analytes to which
10 they have preferential binding capacities within a mixture of analytes.

After attachment, the magnetic labels may be collected by an inhomogeneous magnetic field created by a magnet that is usually equipped with a mechanism for increasing the magnetic field inhomogeneity in the vicinity of the labels. Analytes in
15 the mixture having negligible magnetic susceptibility and that have not become bound to the magnetically susceptible labels to form analyte-label complexes are not collected by the magnet and can be washed away. Subsequently, the magnetic field can be removed and the analyte-label complexes can be released and collected in a separate fraction.

20 Thus, by using these differential trapping characteristics, current magnetic labeling methods allow target analytes to be isolated from a mixture of particles, cells, or molecules. These magnetic labeling methods can be used to retain the target analytes for further processing, analysis, or study (known in the art as "positive selection"). Alternatively, the analytes that are not retained by the magnetic field may
25 be collected and used for further processing, analysis, or study (known in the art as "negative selection"). While the use of magnetic labeling methods is widespread, current methods have a number of significant disadvantages. For example, because all magnetic labels in a mixture are attracted to the collection magnet regardless of
30 any differences there may be in their surface modification or binding state with target analytes, it is impossible to discriminate between, and isolate, multiple target analytes simultaneously. It is also impossible to determine the extent to which magnetic labels have bound a target analyte without additional measurement steps after magnetic

WO 01/96857

PCT/US01/19484

collection. For example, it is impossible to distinguish between or isolate cell subpopulations that are characterized by variations in the number of labels bound to their surfaces since all cells that bind labels, regardless of the number, are collected by current magnetic methods. Finally, current methods depend on trapping the magnetic labels on surfaces in a collection chamber or column and the target analytes tend to be collected in clumps. This typically limits sample recovery because of adhesion to the chamber or column and may entrap unwanted unlabelled analytes within the labeled analytes thereby limiting the purity of the recovered target analytes.

10 A newer approach to the discrimination, manipulation, separation and isolation of target analytes from a mixture is based on the exploitation of the dielectric properties of the target analytes themselves or the use of dielectric labeling techniques. In U.S. Patent Nos. 5,993,630 and 5,888,370 which are hereby expressly incorporated herein by reference, certain of the inventors of the present application teach the use of dielectrophoretic methods for the discrimination, separation and isolation of particles by exploiting their intrinsic dielectric properties in conjunction with the characteristics of a hydrodynamic flow profile.

20 In a concurrently filed provisional patent application concerning dielectric beads for the identification and sorting of target agents, the inventors teach methods by which labels that incorporate useful dielectric and magnetic properties may be designed. Such labels allow target analytes to be discriminated and manipulated by dielectrophoretic methods. By combining magnetic and dielectric properties as useful attributes of the labels, these methods allow for additional levels of discrimination between both the labels themselves and analyte-label complexes. For example, the disclosure teaches how different types of labels may be designed that have distinct "dielectric fingerprints" that allow for the recognition of the different label types within a "cocktail" of different label types. Because analytes, labels or analyte-label complexes do not have to be trapped in a column in order to achieve separations in these dielectric methods, they are less susceptible to entrapping unlabeled analytes within clumps. In addition, all analytes can be kept away from potentially adherent surfaces during dielectric separations so that sample recovery efficiency is improved. Nevertheless, the intrinsic dielectric properties of target particles, cells, or molecules,

WO 01/96857

PCT/US01/19484

or of their dielectric labels may still not allow for sufficient discrimination between multiple target analytes in complex mixtures.

Furthermore, the existing dielectric methods having the most discrimination
5 between different analytes (termed Dielectrophoretic Field-Flow Fractionation (DEP-
FFF methods) exploit a balance between dielectrophoretic and sedimentation forces
on analytes in the sample mixture. Such a balance can only be realized if there is a
specific orientation of the apparatus with respect to a gravitational or centrifugal field.
This precludes or limits the use of the methods for applications in microgravity
10 environments such as space. The need to attain a balance between dielectrophoretic
and sedimentation forces also places constraints on the relative densities of the
suspending medium that carries the analyte mixture and the analytes to be separated.
For example, the target analyte or, in the case of dielectric labeling, the analyte-label
complex, must have a density that is slightly (typically 2-20%) higher than the
15 suspending medium for effective DEP-FFF separation. Finally, because the
sedimentation force acting on a target analyte or target analyte-label complex is
usually small and uniform in space within the separation chamber, it typically takes
many minutes for analytes or analyte-label complexes to reach positions in the
dielectric separation apparatus where a balance of forces occurs.

20

Thus it is often necessary to allow a sample to sit for some "relaxation time"
after it is introduced into a DEP-FFF separator to give analytes time to sediment
before separation steps are initiated. Since this relaxation time is often comparable to
the time taken to complete all of the rest of the separation steps combined, this step
25 significantly slows the separation procedure and is inconvenient.

Summary of the Invention

To overcome these problems in both magnetic and dielectric separation
methodologies, the present invention discloses novel labeling methodology and
30 manipulation procedures in which target analyte-label complexes are subjected to not
only magnetic but also dielectric forces simultaneously. The use of two externally
applied and controllable forces rather than one introduces versatility for manipulation

WO 01/96857

PCT/US01/19484

of the labels and a greatly improved ability to discriminate between analyte-label complexes.

5 The methods disclosed herein depend upon positioning target analytes to different heights within a hydrodynamic flow profile. Whereas previous methods achieved such positioning through the balance of gravitational and dielectrophoretic forces, the present invention achieves positioning through a balance of dielectric and magnetic forces. Specifically, disclosed herein is a new apparatus and methods that allow dielectrophoresis, magnetopheresis and hydrodynamic effects to be exploited
10 simultaneously for the discrimination, manipulation, fractionation, identification and/or isolation of analytes.

The following objects of the present invention are made possible as a result of this enhancement. First, the methods of the present invention allow several target
15 analytes to be discriminated and isolated simultaneously in a single separation step. Second, target analytes do not have to be collected in the separator and, indeed according to the present invention, can be prevented from contacting any surface to which they may adhere during separation. This not only greatly reduces the problem of trapping of unwanted analytes within target analyte fractions, but also improves
20 analyte recovery efficiencies. Third, apparatus according to the present invention can operate in any orientation, as well as in microgravity environments. Fourth, it is an object of the present invention to obtain discrimination that is much greater than that obtainable by previous methods. Fifth, because both the magnetophoretic (MAP) and dielectrophoretic (DEP) force fields used to position the analyte-label complexes are
25 inhomogeneous in space, the positioning force may be greater than a sedimentation force, thus positioning according to the present invention can occur quicker than in cases where gravitational sedimentation is used. This reduces or eliminates the "relaxation time" prior to separation. Sixth, the present invention introduces improvements that allow bead labeling methodologies to be fully exploited.

30

Detailed Description

To fully understand the new methods it is helpful to introduce the key physical principles that underlie their operation. To accomplish this, dielectrophoretic and

WO 01/96857

PCT/US01/9484

magnetophoretic forces are discussed and shown to vary spatially in the vicinity of arrays of electrodes (as used herein, "electrode" means any electric pathway, for example an array of conductors) and magnetrodes (as used herein, "magnetrode" means any magnetic pathway, for example, a strip of paramagnetic material having a high permeability), show the conditions for these forces to be brought into balance when they act on bodies having both dielectric and magnetic susceptibilities, and discuss hydrodynamic flow profiles. Exemplary embodiments and applications will then be given.

10 1) The Dielectrophoretic force, F_{DEP}

Consider a particle (which may include a solid, cell, virus, bacterium, molecule, or any other localized arrangement of matter that is distinct from and carried within a suspending medium) of volume v and complex permittivity ϵ_p^* suspended in a medium of real permittivity ϵ_s^* and complex permittivity ϵ_s^* that is subjected to simultaneous dielectrophoretic (DEP) and magnetophoretic (MAP) forces. What if these forces are imposed by arrays of electrodes and magnetrodes that give rise to electrical and magnetic field inhomogeneity distributions? Let us further assume that at a given point in space with coordinates x, y, z referred to the electrode/magnetrode coordinates frame, the electric and magnetic fields are $E(x,y,z)$ and $H(x,y,z)$, respectively. (It is to be understood that the magnetic field may also be generated by an array of permanently magnetic elements for the purposes of this disclosure).

According to the dipole approximation, the DEP force is given by:

25

See equation 1 of Table 1.

Here, R is the radius of the particle, which for simplicity is assumed to be spherical, the f_{CM} factor is the Clausius-Mossotti factor, which reflects the frequency-dependent dielectric polarizability of the particle with respect to its suspending medium, and ω_p is the frequency of the AC electrical field. It is understood that in the case of non-spherical particles and to describe situations in which quadruple and higher order DEP force components are significant, more complicated expressions

30

WO 01/96857

PCT/US01/19484

than equation (1) will apply as is known in the art (see for example the analysis of higher order poles set forth in X.J. Wang *et al*).

Further background on dielectrophoretic forces may be found in Thomas B. Jones, "Electromechanics of Particles," Ch. 3 (Cambridge University Press, 1995).

2) The magnetophoretic force, F_{MAP}

A particle of volume v and magnetic permeability μ_p placed into an inhomogeneous magnetic field will experience a magnetophoretic force

10

See Equation 2 of Table 1

Here, μ_s is the magnetic permeability of the suspending medium, R is the radius of the particle, and the k_{cm} factor is the magnetic Clausius-Mossotti factor describing the magnetic polarizability of the particle with respect to its suspending medium. Here ω_H is the frequency of the applied magnetic field and will have the value 0 for a static field. In analogy with the dielectric equation (1), μ_s and μ_p are the complex permeabilities of the suspending medium and particle, respectively. In the case of a static magnetic field, these reduce to the real, static magnetic permeability parameters μ_s and μ_p , respectively.

20

The inventors note that equation (2) is the magnetic analog of dielectric equation (1). Alternately, if the particle has a permanent volume magnetization m , then the magnetophoretic force will be

25

See Equation 3 of Table 1

It is possible for a particle to have both permanent and inducible magnetic polarization components. In that case a combination of equations (2) and (3) may apply. For example, a particle may have a high permeability and at the same time demonstrate magnetic remnance.

30

WO 01/96857

PCT/US01/9484

Further background on magnetophoretic forces may be found in Thomas B. Jones, "Electromechanics of Particles," Ch. 3 (Cambridge University Press, 1995).

3) Spatial variations of electric and magnetic fields

5 Assume that the inhomogeneous electrical and magnetic fields are created by applying an alternating voltage to an electrode array and a magnetizing force to a magnetrode array. FIG. 1 represents an electrode array comprising a conductor (e.g., 0.5 μm thick layer of gold) patterned on a non-conducting substrate (e.g., glass). While the electrode elements (2 and 3) are parallel, fringing effects create spatially
10 inhomogeneous electrical fields above and below the plane of the electrode elements if an electrical voltage is applied between electrode buses 1 and 4. Analysis of the inhomogeneous electrical field above the electrode plane here, as discussed in X.J. Wang *et al.* (Exhibit C), reveals that the dielectrophoretic force experienced by a particle placed in this fringing field region will depend upon the distance of the
15 particle from the plane of the electrodes according to the approximate relationship:

See Equation 4 of Table 1

Here F_{DEP0} is a constant for a given applied voltage and given particle
20 properties, h is the distance of the particle from the electrode plane, and h_{DEF} is a constant that depends on the geometry of the electrode array.

A magnetic analog for this also applies. If the electrodes 2 and 3 of FIG. 1 are considered to be magnetrodes (e.g. thin film magnetrodes) instead of electrodes and if
25 a magnet is connected with poles at buses 1 and 4, then a spatially inhomogeneous magnetic field will be created above and below the plane of the thin film magnetic elements. A magnetically susceptible (or permanently magnetic) particle placed in the vicinity of the magnetrode array will experience a magnetophoretic force according to equation (2) (or equation (3)). In analogy with the electrical case, the
30 particle will experience a magnetophoretic force that falls with increasing distance h from the plane of the plane of the magnetic tracks according to the relationship:

See Equation 5 of Table 1

WO 01/96857

PCT/US01/9484

where h_{MAP} is a decay constant. Here F_{MAP0} is a constant for a given strength of the magnet applied between the magnetrode buses 1 and 4 and for given magnetic properties of the particle.

5

Now consider the case where electrical and magnetic forces are applied simultaneously. Both electrode and magnetrode arrays may be present simultaneously on a supporting substrate. Further, the geometric characteristics of the electrode and magnetrode arrays may be similar or dissimilar. When geometrical dissimilarity exists, or other prevailing conditions act to distort the magnetic or electric field with respect to one another, the value of the parameters h_{DEP} and h_{MAP} will differ from one another and the electrical and magnetic forces acting on a particle will exhibit different dependencies on the particle distance from the plane of the electrodes and magnetrodes.

15

While magnetophoretic forces are usually positive (*i.e.* attractive) in sign in biological labeling applications, conditions may be chosen to make the dielectrophoretic forces negative in such applications. In this case it is possible for the dielectrophoretic and magnetic forces acting on a particle to oppose one another. If $h_{DEP} < h_{MAP}$ in equations (4) and (5), then it is possible to find a unique value for the distance h from the electrode and magnetrode plane where the forces balance, using equations (1) and (2) as:

20

See Equation 6 of Table 1

25

where G_{DEP} and G_{MAP} are geometrical functions relating to the spatial characteristics of the electrode and magnetrode elements, V_0 is the voltage applied to the electrode buses, and B_0 is the magnetic field applied to the magnetrode buses. This equation reveals that a particle will come to an equilibrium at a height h from the plane of the electrodes and magnetrodes (assuming these elements are coplanar) when:

30

See Equation 7 of Table 1

WO 01/96857

PCT/US01/0484

giving $h = \text{See Equation 8 of Table 1}$

Alternately, if the particles have a permanent magnetic moment or their
 5 magnetic moment has reached a saturation value, then the magnetophoretic force
 described in equation (3) will fall according to relationship (5) and the decay constant
 h_{MAP} in

Equation 8A of Table 1

10

will differ from the dielectrophoretic decay constant h_{DEP} , even if the geometry of the
 electrode and magnetrode arrays are identical. In this case, equilibrium height is
 attained when:

See Equation 9 of Table 1

15

giving $h = \text{See Equation 10 of Table 1}$

In this case the dielectrophoretic and magnetophoretic fields can be generated
 from a spatially coincident electrode-magnetrode structure. Note also in this case that
 20 while the dielectrophoretic force depends on the square of the applied voltage, the
 magnetic force depends linearly on the applied magnetic field. It is assumed in
 equation (10) that the magnetic field, of the magnetic particle remains aligned with
 the magnetic field from the magnetrode array. If magnetic particles are unable to
 fully align in this way with the applied magnetic field, then the magnetophoretic force
 25 will be smaller than that given by equation (3), as is known in the art. Note also that
 the height at which DEP and MAP forces balance will be described by an alternative
 set of equations if the magnetrodes and electrodes are not coplanar and that alternative
 equations may be derived to describe the dielectrophoretic and magnetophoretic
 forces for other configurations of electrodes and magnetic elements. This disclosure
 30 is intended to cover all such cases and the above equations are meant to be for
 illustrative purposes in teaching the art.

4) Hyperlayer Field Flow Fractionation

WO 01/96857

PCT/US01/19484

A fluid moving under a laminar flow regime through a thin channel assumes a hydrodynamic flow profile whereby the velocity of the fluid increases with distance from the channel walls up to a maximum velocity at the center of the channel. If the flow profile is parabolic, for example, then the velocity is given by

5

See Equation 11 of Table 1

where h is the distance from the channel wall, D is the height of the channel, and $\langle v \rangle$ is the mean velocity of the fluid in the channel.

10

The method of field-flow fractionation (FFF) depends upon positioning particles within a hydrodynamic flow profile by one or more applied force fields which differentially affect particles having different physical properties. Particles positioned at different heights in a flow profile through the influence of the force fields are carried by the fluid at different speeds and are thereby separated.

The present invention discloses methods by which the positions of particles to be separated are controlled within a hydrodynamic flow profile by balancing opposing dielectrophoretic and magnetic forces. It is understood, however, that gravitational forces may also act on the particles and affect their positions or velocities in the hydrodynamic flow profile. In such cases, a combination of gravitational, electric and magnetic forces will determine particle positions and velocities. The effect and use of gravity in DEP-FFF applications has been described in U.S. Patent Nos. 5,993,630 and 5,888,370 already incorporated herein by reference.

25

To exploit DEP and MAP forces for positioning particles, a channel is utilized that incorporates electrodes and magnetodes (or permanently magnetic elements) that generate inhomogeneous electric and magnetic fields within the channel. These fields create dielectrophoretic and magnetophoretic forces on particles within a carrier fluid introduced into the channel. The position of the particles with respect to the channel is influenced by these forces. If the carrier fluid flows through the channel, then the velocity of the fluid at a given position in the channel will depend upon that position, and the velocity with which a particle will be carried by the fluid will therefore be

30

WO 01/96857

PCT/US01/9484

influenced by the effect of the dielectrophoretic and magnetophoretic forces on the particle position.

For example, if a given particle is susceptible to both magnetic and dielectric forces, its height may be controlled by the balance of dielectrophoretic and magnetophoretic forces according to equation (8) or equation (10) and the fluid will carry the particle at a velocity given by equation (11). The MAP and DEP forces acting on a particle 18 and the hydrodynamic flow profile 16 are shown in FIG. 2A. As shown in FIG. 2A, the dielectrophoretic force 10 opposes the magnetophoretic force 12. Flow arrow 14 shows the direction of fluid flow within the chamber 20. Further shown in FIG. 2A, is the hydrodynamic profile 16, which in the exemplary embodiment is a parabolic flow profile. Also shown in the exemplary embodiment of FIG. 2A are electrode elements 22 and magnetic elements 24. The movement of particles to characteristic heights is represented in FIG. 2B, in which the fluid flows slowly from left to right. In practice, larger or similar smaller differences in characteristic heights than those shown in FIG. 2B may be exploited for analyte discrimination and separation.

Particles possessing similar physical properties will all be positioned at the same characteristic height in the flow channel and therefore be transported by the fluid at the same rate. Particles having different physical properties will be positioned at different characteristic heights where the fluid flow velocity is different. Therefore, they will be transported through the chamber at different rates. Using this principle, the fractionation of a mixture of different particle types can be accomplished. For example, if a sample containing a particle mixture is introduced at one end of such a flow chamber and carried through the chamber by fluid flow, then different particle types will be carried at different velocities and emerge from the outlet end of the flow chamber at different times where they may be collected in separate fractions. The time taken for a given particle to travel from the inlet to the outlet end of the flow channel is known in the art as its "retention time". The present invention concerns the combination of dielectrophoretic, magnetophoretic and hydrodynamic principles to control the positions and/or retention times of particles in a channel for the purposes of fractionation, separation, isolation, identification and characterization of analytes.

WO 01/96857

PCT/US01/9484

Dielectric and magnetic properties of particles

The factors influencing the dielectric and magnetic properties of particles are well known in the art. In the case where the particle is comprised of an analyte-label complex, it should be appreciated that the properties of the complex will, in general, differ from those of an uncomplexed analyte or an uncomplexed label. This has important implications for the discriminating ability of the invention disclosed herein. Specifically, it should be recognized that the association of a magnetic label with a non-magnetic analyte will result in a magnetic analyte-label complex that has dielectric properties that differ from those of either the label or the analyte, and magnetic properties that differ from those of the analyte.

In general, the label and analyte will contribute dielectric and magnetic properties to the complex that depend on their relative permittivities, permeabilities, volumes, and influences on the charge distributions of the suspending medium. Because the separations describe herein depend upon a balance of dielectrophoretic and magnetophoretic forces, analyte-label complexes will therefore usually exhibit elution characteristics in a DEP-MAP separator that differ from those of labels having no associated analytes.

The methods according to the present invention therefore allow labels to be discriminated and separated according to their association state with respect to analytes. For example, cells that have bound different numbers of magnetic labels will exhibit different characteristics during separation, allowing for their discrimination, characterization, and isolation. Therefore, cells having fewer binding sites for antibodies against EGF receptors may be separated from cells having a greater number of receptors, for example. As another example, labels that are uncomplexed can be separated from labels that are associated with cells, particles, molecules and other target analytes.

In addition, "cocktails" consisting of different types of labels may be produced in which each type of label has a different dielectric and magnetic "fingerprint". Each type of label in the mixture may then be independently discriminated, separated,

WO 01/96857

PCT/US01/19484

identified, and characterized according to its respective binding state with a different target analyte. Such cocktails of labels allow for the simultaneous analysis of multiple analyte targets within a mixture in a single separation step.

5 Influence of Gravity

FIG. 2A shows the MAP and DEP forces acting on particles within a separator and acting to position particles at equilibrium positions (FIG. 2B). It is to be understood when separations are conducted in a gravitational field, as they are on earth, that a force of gravity will also act on the particles. The magnitude of this force acting on a particle is $F_{\text{sediment}} = v_g(d_p - d_s)$, where v is the particle volume, d_p is its density, and d_s is the density of the suspending medium. The direction of the gravitational force with respect to the force diagram in FIG. 2A will depend upon the orientation of the separator embodiment with respect to the earth's gravitational field. If the gravitational force has a component in the same direction as F_{MAP} or F_{DEP} , then it will also tend to influence the position of the particle. Therefore, equations (8) and (10) may, in practice, need to be modified by the addition of a gravitational force term. In addition, if the gravitational force has a component that acts in or against the direction of fluid flow in FIG. 9A, then the velocity of the particle given by equation (11) will be modified by the addition of a sedimentation velocity term. For example, if the gravitational force acts in the direction of flow, the additional sedimentation velocity component given, by Stoke's law, as

$$v_{\text{sed}} = \frac{1}{6} \frac{r(d_p - d_s)g}{\eta}$$

It is to be understood that these gravitational effects may be eliminated by appropriate alignment of the separation apparatus with respect to the gravitational field, or that they may be exploited in order to take advantage of density characteristics of the labels, analytes or analyte-label complexes.

Finally, it should be noted that the electrical fields used to provide the DEP force are easily switchable and may be customized to particular applications and programmed during separations to achieve specific desired types of discrimination.

WO 01/96857

PCT/US01/9484

The process of changing the field over time during separation is called programming. Use of programmability to improve DEP-FFF separations is described in pending U.S. patent application serial no. 09/249,955, which is expressly incorporated herein by reference. It is to be understood that the magnetic field may also be programmed to further enhance the flexibility, discrimination and capabilities of the invention disclosed herein.

Exemplary embodiments

Two exemplary embodiments of separators are described that exploit analyte positioning by a combination of dielectrophoretic and magnetophoretic forces. In the first embodiment, which does not exploit the flow velocity profile of the carrier fluid and is suitable for continuous processing of samples, analyte mixtures may be flowed continuously through a chamber equipped with arrays of electrodes and magnetrodes. Analytes are then subjected to the combined dielectrophoretic and magnetophoretic forces resulting from the electric and magnetic fields. Providing they spend sufficient time within the flow channels, these forces move analytes sufficiently close to characteristic positions in the carrier medium flow profile stream at which the DEP and MAP forces balance so that they may be identified, separated, or isolated. Therefore, analytes emerge from the flow channel at positions that depend on their dielectric and magnetic characteristics. Different analytes may be characterized or separated according to the positions, with respect to the flow channel walls, at which they exit the flow channel by use of an appropriate arrangement of exit ports.

In the second type of embodiment, in which the flow velocity profile of the carrier fluid is exploited and which is best suited to batch processing of samples, a similar apparatus and mode of operation is employed, except that the sample analyte mixture is injected as a single sample that is usually much smaller in volume than the separation chamber. This aliquot is then carried through the flow channel by a carrier medium. Again, provided they spend sufficient time in the DEP and MAP fields, analytes move sufficiently close to positions in the carrier fluid flow profile where the DEP and MAP forces acting on them are balanced so that they may be discriminated or separated. Because the analytes are then carried at different speeds according to their positions in the carrier medium flow profile, they emerge from the flow channel

WO 01/96857

PCT/US01/9484

at different characteristic times. It should be understood that a "sufficient time", as used above, means that analytes, labels and analyte-label complexes spend enough time in the MAP and DEP force fields to move to positions at which they may usefully be discriminated, detected, or separated. In practice, this may be less than the time taken for them to come to positions where the MAP and DEP forces exactly balance.

Specific aspects of the apparatus for the two embodiments will now be described. Except for the exit ports, which must be multiple to achieve separation and isolation of analytes for the continuous mode embodiment, other aspects of the two embodiments may be identical. However, it is to be understood that the embodiment having multiple outlet ports may also be operated in batch mode.

Exemplary electrode arrays for dielectrophoretic manipulations are shown in FIGS. 2 and 3. These are planar arrays consisting of a thin film of conductor, such as gold or the like, patterned onto a supporting substrate, such as glass or the like. These arrays may be fabricated by known photolithographic and ebeam patterning techniques. Electrode arrays like these, or of different forms, may be used to provide DEP forces in the separators disclosed herein. Electrodes may be electroplated, printed, etched or affixed to the chamber walls, or otherwise positioned in or around the flow channel to create an inhomogeneous electrical field in the flow channel when they are connected to a signal generator.

Exemplary magnetode arrays for magnetophoretic manipulations may have similar or different patterns to those shown in FIG. 3. In the magnetic case, the magnetodes may consist of thin film metals, alloys, or magnetically susceptible materials such as magnetic ceramics or ferrites, magnetically susceptible wires, or strips, wires or other arrangements of permanently magnetic material. These may be attached to the chamber walls or positioned in any location at which they result in the ability to provide an inhomogeneous electrical field within the flow channel.

Exemplary electrode and magnetode combinations suitable for simultaneously providing magnetic and electric fields are shown in cross-section in

WO 01/96857

PCT/US01/19484

FIGS. 4A-C. FIG. 4A shows an exemplary structure in which the electrode and magnetrode elements are combined. Specifically, FIG. 4A shows electrodes 22 disposed above magnetrodes 24, which is disposed on structure 26. In alternate embodiments, the magnetrodes 24 may be placed above electrodes 22. Such a structure may be, for example, lithographically patterned from a single photo mask. More complex patterning schemes in which the geometry of the magnetrode and electrode elements differ may be fabricated using two or more patterning masks for photolithography as shown in the example FIG. 4B. As shown in FIG. 4B, the electrode elements 22 are located adjacent the magnetic elements 24. Other methods known in the art may be used to create electrode and magnetrode arrays. It is understood that an additional electrode or electrode array may be incorporated elsewhere in the chamber as illustrated, for example, in FIG. 4C. As shown in FIG. 4C, in addition to the primary electrode structure 22, a secondary electrode structure 28 is disposed on an opposing substrate 30. In exemplary embodiments, the secondary electrode structure 30 may be the same thickness and width as the primary electrode structure 22, or it may be of different size. Exemplary electrical excitation schemes are shown in FIG. 5.

Exemplary magnetic field excitation schemes are shown in FIG. 6. Arrays of permanently magnetic materials taking the forms shown in FIG. 2 or any other form may also be used to provide the magnetic field in the flow channel without the need for an external magnet (FIG. 7A). An array of magnetrodes may also be used to introduce inhomogeneity in a magnetic field derived from magnetic poles placed outside the chamber without the need for a magnetrode pathway to the array as shown in FIG. 7B.

An exemplary embodiment of a separator using the dielectric and magnetic separation principle for batch mode separation is shown in enlarged form in FIG. 8. FIG. 8 shows an enlarged view of a thin chamber I comprised of two sidewalls II and III that sandwich a gasket III into which a slot IV has been cut. When assembled, the chamber is tightly held together by clamping and/or gluing, for example, in such a manner that the gasket slot becomes the flow channel. An entry port V and exit port

WO 01/96857

PCT/US01/19484

VI allow for ingress and regress of carrier fluid and sample. In practice there may be multiple ports V and VI.

In alternate embodiments, the flow channel may be derived from a slot cut
5 directly into one or both of the side walls by etching, machining, ablation,
lithographic means, or by any other procedures known in the art. Alternately, the
flow channel may be derived from material that is applied to one or both side walls by
sputtering, spin coating, printing or thin film deposition, may be cut or formed into
the body of the device, or may be injection molded, produced by any other
10 procedures known in the art.

Arrays of electrodes VII and magnetrodes VIII are present in the flow channel.
These may be within the channel interior itself, be supported by one or more walls of
the chamber, or be outside the chamber. Electrical signals are connected from a
15 single generator IX. A magnetic field is provided from magnet X via buses XI and
XII to the electrodes and magnetrodes, respectively.

A second embodiment for continuous mode separation is shown in FIG. 9.
FIG. 9 shows an alternate embodiment wherein all elements of the diagram with the
20 exception of the outlet port VI are the same as described in FIG. 8. In FIG. 9, the
outlet port arrangement comprises multiple ports configured so as to collect bands of
fluid that travel through the flow chamber at certain defined distances from the
electrode and magnetrode elements and from the walls of the flow chamber.
Specifically, FIG. 9a shows how carrier fluid traveling through the flow channel at
25 different distances from the flow channel walls can be removed from the flow channel
through, for example, six exit ports. Analytes or labels or analyte-label complexes
carried in the carrier medium at different distances from the chamber floor, at bottom
of the diagram, are thereby caused to exit through different exit ports.

30 Description of batch-mode operation

In an exemplary separation using the batch mode, the following steps are
undertaken:

WO 01/96857

PCT/US01/19484

5 (1) A sample containing one or more analytes is mixed with labels having dielectric and magnetic properties and binding affinity to one or more types of target analyte. If desired, labels having distinguishable magnetic and dielectric properties and binding affinities for different analytes may be used in combination in this step.

(2) After an incubation period that is sufficient to ensure adequate binding between target analytes and labels, a measured aliquot of the analyte/label mixture is injected into the inlet end of the separation channel.

10 (3) Magnetic and AC electrical fields are applied to the magnetrode/electrode arrays in the separation channel. This step may precede or follow the sample injection step.

15 (4) Following a suitable relaxation time during which analytes and analyte-label complexes approach sufficiently close to positions with respect to the electrode and magnetrode arrays where the MAP and DEP forces balance, flow of carrier medium is initiated at the inlet end of the separation channel.

20 (5) The carrier medium establishes a hydrodynamic flow profile within the separation channel and carries analytes and analyte-label complexes through the separation channel at velocities depending on their positions with respect to the channel walls. This position depends upon the applied magnetic and AC electrical fields and may, in exemplary embodiments, be influenced by the hydrodynamic flow profile and by gravity.

25 (6) Different analytes and analyte-label complexes will emerge from the outlet end of the chamber at different times and may be collected in separate fractions or detected by various measurement methods. Because analyte-label complexes having similar magnetic and dielectric properties will be positioned similarly by the synergistic action of the magnetic and dielectric forces acting in the separation channel, they will be carried at similar velocities by the carrier medium and will emerge together at the channel outlet in a single elution peak. In contrast, analytes and analyte-label complexes having different properties will be differentially

WO 01/96857

PCT/US01/19484

positioned by the synergistic action of the magnetic and electric fields, will be carried at different velocities by the carrier medium, and will emerge from the channel outlet at different times. In this way, a mixture of analytes may be discriminated and separated temporally into several characteristic peaks or bands. Either of the
5 exemplary embodiments may be operated in batch mode.

Description of continuous mode operation

(1) A sample containing one or more analytes is mixed with labels having dielectric and magnetic properties and binding affinity to one or more types of target
10 analyte. If desired, labels having distinguishable magnetic and dielectric properties and binding affinities for different analytes may be used in combination in this step. The mixture is allowed to incubate for sufficient time that adequate binding between target analytes and labels occurs.

15 (2) Magnetic and AC electric fields are applied to the magnetrode and electrode arrays in the separator channel.

(3) The analyte/label mixture from (1) is continuously injected into the inlet
20 port of the flow channel.

(4) Carrier medium is withdrawn from multiple exit ports of the separator (see FIG. 9). Different analyte fractions emerge from each port.

In this way a mixture of analytes and analyte-label complexes may be
25 continuously separated into fractions that emerge from different exit ports.

Release of magnetic particles by dielectrophoretic forces

The invention disclosed herein describes methods for analyte, label and analyte-label complex discrimination that depend upon an interaction (specifically a
30 balance) of MAP and DEP forces.

DEP forces may also be used to overcome a common problem associated with permanent magnets in magnetic labeling applications. Specifically, current magnetic

WO 01/96857

PCT/US01/19484

separation technologies depend upon the ability to remove the magnetic field in order to release the magnetic labels and analyte-label complexes after they have been collected. Magnetic separations are normally accomplished by using a separation chamber or separation column to which a magnetic field is applied by exterior means, such as a permanent magnet or an electromagnet. After collection of the magnetic labels and analyte-label complexes, the separation chamber or column must be removed from the vicinity of the permanent magnet, or the electromagnet turned off, so that the labels and label-analyte complexes are released. This requirement to remove the magnetic field in order to release the collected analytes precludes the use of permanent magnets or arrays of permanent magnets that are located within the separation chamber itself.

The present invention allows this limitation to be overcome. This is because apparatus according to the present invention allow for the magnetic labels and label-analyte complexes to be repelled from the magnetic elements in the collection chamber by DEP forces. For example, FIG. 6A shows a separation chamber having an integral array of permanent magnets.

Elsewhere in this specification, it is assumed that the DEP force is sufficient to prevent attachment of the magnetic labels and analyte-label complexes to the magnetrodes or permanent magnetic elements. However, in an alternate mode of operation, the DEP force is switched off or kept at a low level while the magnetic field is present. In the absence of a counterbalancing DEP force, the magnetic labels and analyte-label complexes are attracted to, approach, and contact the magnetic elements and become immobilized on them. In this mode of operation, the separation chamber therefore initially functions like a conventional magnetic separation chamber or column and retains the labels and analyte-label complexes from the suspending medium.

After collection, however, the DEP force is switched to a sufficiently high level to repel and dissociate the collected magnetic labels and analyte-label complexes from the magnetic elements without the need to remove the magnetic field. It should be noted that the dissociation of the magnetically collected species by the DEP force

WO 01/96857

PCT/US01/19484

by raising the voltage applied to the electrode array from a small to a high volume over a period of time, different labels and analyte-label complexes may be released at different times and may be flushed from the separation chamber and collected in different fractions.

5

This mode of operation allows permanent magnetic elements to be incorporated into separation chambers, a feature that is especially useful in microfluidic embodiments. By allowing the incorporation of permanent magnet elements, the need for more powerful external magnets is eliminated. Alternately, by eliminating the need to remove the magnetic field, fixed external magnets may be used if desired.

Exemplary applications

Using apparatus and methods according to the present invention, various matter may be magnetized. Particularly, with the present invention, discrimination, separation, identification, detection, manipulation and isolation of the following matter may be accomplished:

- (a) cell subpopulations including, for example:
- blood cells in accordance with their antibody and dielectric profiles (such as CD34+, CD8+, CD4+, CD14+, CD18+, CD5+, etc.);
 - rare cells from blood such metastatic cells (such as EGF+, CD5+, epithelial marker+, etc.);
 - target cells from needle biopsies;
 - nucleated fetal cells from maternal fluids (such as erythrocytes from maternal blood, chord blood, amniotic fluid, etc.);
 - gram negative from gram positive bacteria;
 - parasites and parasitized cells, such as malaria, from body fluids and normal cells;
 - bacteria from blood, urine, saliva, amniotic fluid, needle biopsies;
- (b) mycoplasma, fungal, and viral particles subpopulations including those from blood, urine, saliva, amniotic fluid, needle biopsies;

WO 01/96857

PCT/US01/19484

- (c) potentially pathogenic cells, viral particles, mycoplasma, fungal spores, bacterial spores from the environment for water analysis in public health maintaining food processing plants, food distribution, restaurants, homes, biowarefare, bioterrorism detection.
- 5 (d) molecular subpopulations including proteins (such as in diagnostics and prognostics, separations for biotechnology, research, pharmaceuticals);
- nucleic acids (such as in diagnostics and prognostics, biotechnology, gene therapy, research, pharmaceuticals);
 - lipids (such as in diagnostics and prognostics, biotechnology, gene therapy, research, pharmaceuticals)
- 10 (e) complex molecules (such as in diagnostics and prognostics, biotechnology, gene therapy, research, pharmaceuticals);
- (e) minerals such as for beneficiation of ores, environmental samples, diagnostic and prognostic samples (such as deposits, bone, etc.);
- 15 (f) for space medicine (gravity-, centrifuge-, large magnet-free separations);
- (g) cellular organelles and other biological structures including,
- nuclei, chromosomes, ribosomes
 - mitochondria
 - endosomes, blebs, peroxisomes, and other liposomal entities
- 20 (h) membranes associations including endoplasmic reticulum, plasma membrane, nuclear membrane, viral capsules, bacterial complexes, spore assemblies, etc.; and
- (h) cells, organelles or other particles with respect to the extent of binding to labels. (For example, different cell subpopulations characterized by different numbers of EGF receptors may be discriminated by labels modified with monoclonal antibodies for EGF).
- 25 of EGF receptors may be discriminated by labels modified with monoclonal antibodies for EGF).

TABLE 1

- (1) $\bar{F}_{DEP} = 2\pi\epsilon_0 R^3 f_{os}(\epsilon_s^*, \epsilon_p^*, \omega_E) \bar{\nabla} F(x, y, z)^2$
- 30 (2) $\bar{F}_{MAP} = 2\pi\mu_0 R^3 k_{on}(\mu_s^*, \mu_p^*, \omega_H) \bar{\nabla} H(x, y, z)^2$
- (3) $\bar{F}_{MAP} = \mu_0 R^3 \bar{m} \bar{\nabla} \cdot \bar{H}(x, y, z)$

WO 01/96857

PCT/US01/9484

$$(4) F_{DEP} = F_{DEP0} e^{-h/h_{DEP}}$$

$$(5) F_{MAP} = F_{MAP0} e^{-h/h_{MAP}}$$

(6)

$$F_{DEP} + F_{MAP} = 2\pi\epsilon_0 R^3 f_{cm}(\epsilon_s^*, \epsilon_p^*, \omega) G_{DEP} V_o^2 e^{-h/h_{DEP}} + 2\pi\mu_0 R^3 k_{cm}(\mu_s^*, \mu_p^*, \omega) G_{MAP} B_o^2 e^{-h/h_{MAP}} = 0$$

5

$$(7) \frac{\epsilon_s f_{cm}(\epsilon_s^*, \epsilon_p^*, \omega) G_{DEP} V_o^2}{\mu_s k_{cm}(\mu_s^*, \mu_p^*, \omega) G_{MAP} B_o^2} = e^{\frac{h(h_{MAP} - h_{DEP})}{h_{DEP} h_{MAP}}}$$

$$(8) \text{ giving } h = \left(\frac{h_{DEP} h_{MAP}}{h_{DEP} - h_{MAP}} \right) \ln \left\{ \frac{\epsilon_s f_{cm}(\epsilon_s^*, \epsilon_p^*, \omega) G_{DEP} V_o^2}{\mu_s k_{cm}(\mu_s^*, \mu_p^*, \omega) G_{MAP} B_o^2} \right\}$$

(8a)

$$F_{DEP} + F_{MAP} = 2\pi\epsilon_0 R^3 f_{cm}(\epsilon_s^*, \epsilon_p^*, \omega) G_{DEP} V_o^2 e^{-h/h_{DEP}} + \mu_0 R^3 \bar{m}(\mu_s^*, \mu_p^*, \omega) G_{MAP} B_o^2 e^{-h/h_{MAP}} = 0$$

10

$$(9) \frac{2\pi\epsilon_0 f_{cm}(\epsilon_s^*, \epsilon_p^*, \omega) G_{DEP} V_o^2}{\bar{m} G_{MAP} B_o^2} = h \left(\frac{h_{DEP} - h_{MAP}}{h_{DEP} h_{MAP}} \right)$$

$$(10) \text{ giving } h = \left(\frac{h_{DEP} h_{MAP}}{h_{DEP} - h_{MAP}} \right) \ln \left\{ \frac{2\pi\epsilon_0 f_{cm}(\epsilon_s^*, \epsilon_p^*, \omega) G_{DEP} V_o^2}{\bar{m} G_{MAP} B_o^2} \right\}$$

$$(11) v(h) = \frac{1}{6} (v) \frac{h}{D} \left(1 - \frac{h}{D} \right)$$

15 All of the compositions and/or methods disclosed and claimed herein can be made and executed without undue experimentation in light of the present disclosure. While the compositions and methods of this invention have been described in terms of specific embodiments, it will be apparent to those of skill in the art that variations may be applied to the compositions and/or methods and in the steps or in the sequence

20 of steps of the method described herein without departing from the concept, spirit and scope of the invention. All such similar substitutes and modifications apparent to

WO 01/96857

PCT/US01/19484

those skilled in the art are deemed to be within the spirit, scope and concept of the invention as defined by the appended claims.

WO 01/96857

PCT/US01/19484

CLAIMS

1. A method of discriminating matter utilizing dielectrophoresis combined with magnetophoresis, comprising:
- 5 injecting a sample having one or more constituents into an inlet port of a chamber;
- initiating a carrier medium flow at the inlet port to establish a flow within the chamber;
- generating a dielectrophoretic force on the constituents;
- generating a magnetic force on the constituents;
- 10 balancing the dielectrophoretic force and magnetic forces to position the constituents within the chamber; and
- collecting the constituents at one or more outlet ports of the chamber according to the dielectric and magnetic characteristics of the constituents.
- 15 2. The method of claim 1, wherein the sample comprises one or more analytes mixed with one or more labels having distinguishable magnetic and dielectric properties.
3. The method of claim 2, wherein a first label has first dielectric and magnetic properties and has a binding affinity for a first analyte and a second label has second dielectric and magnetic properties and has a binding affinity for a second analyte.
- 20 4. The method of claim 1, wherein the carrier medium flow causes the constituents to travel at velocities dependent upon their positions within the chamber.
- 25 5. The method of claim 4, wherein collecting comprises collecting different constituents emerging at different times from the one or more outlet ports according to their dielectric and magnetic characteristics.
- 30 6. The method of claim 1, wherein collecting comprises collecting different constituents emerging at different positions from the one or more outlet ports according to their dielectric and magnetic characteristics.

WO 01/96857

PCT/US01/19484

7. A method for batch-mode discrimination of matter utilizing dielectrophoresis combined with magnetophoresis, comprising:
- 5 injecting an aliquot of a sample having one or more constituents into an inlet port of a chamber;
- initiating a carrier medium flow at the inlet port to establish a flow within the chamber, wherein the carrier medium flow causes the constituents to travel at velocities dependent upon their positions within the chamber;
- generating a dielectrophoretic force on the constituents;
- 10 generating a magnetic force on the constituents;
- balancing the dielectrophoretic force and magnetic forces to position the constituents within the chamber; and
- collecting the constituents according to time-of-exit from an outlet port of the chamber.
- 15
8. The method of claim 7, wherein the sample comprises one or more analytes mixed with one or more labels having distinguishable magnetic and dielectric properties.
9. The method of claim 8, wherein a first label has first dielectric and magnetic
- 20 properties and has a binding affinity for a first analyte, and a second label has second dielectric and magnetic properties and has a binding affinity for a second analyte.
10. A method for continuous-mode discrimination of matter utilizing dielectrophoresis combined with magnetophoresis, comprising:
- 25 continuously injecting a sample having one or more constituents into an inlet port of a chamber;
- initiating a carrier medium flow at the inlet port to establish a flow within the chamber;
- generating a dielectrophoretic force on the constituents;
- 30 generating a magnetic force on the constituents;
- balancing the dielectrophoretic force and magnetic forces to position the constituents within the chamber; and

WO 01/96857

PCT/US01/19484

collecting the constituents from a plurality of outlet ports of the chamber according to the positions of the constituents.

11. The method of claim 10, wherein the sample comprises one or more analytes
5 mixed with one or more labels having distinguishable magnetic and dielectric properties.

12. The method of claim 11, wherein a first label has first dielectric and magnetic
10 properties and has a binding affinity for a first analyte, and a second label has second dielectric and magnetic properties and has a binding affinity for a second analyte.

13. A method of discriminating matter utilizing dielectrophoresis combined with
magnetophoresis, comprising:

15 providing a chamber comprising at least one inlet and one outlet port, an array of electrodes in operative relation with to the chamber and configured to generate a dielectrophoretic force, and one or more permanent magnets in operative relation with the chamber and configured to generate a magnetic force;

20 injecting matter into an inlet port of a chamber;
generating a magnetic force on the matter using the one or more permanent magnets to discriminate and collect matter upon the magnets;
generating a dielectrophoretic force using the electrodes to repel the collected matter from the magnets; and
collecting the matter at one or more outlet ports of the chamber.

25

14. A method of discriminating matter utilizing dielectrophoresis and magnetophoresis, comprising:

30 preparing a sample containing at least one analyte and a plurality of labels, the plurality of labels having preselected dielectrophoretic and magnetic properties, at least some of the plurality of labels combining with the at least one analyte to create analyte-label complexes;

WO 01/96857

PCT/US01/19484

injecting the sample into an inlet port of a chamber, the chamber comprising a separation channel;

providing an electrical signal to at least one electrode element adapted to the chamber at different phases to create an electric field in the chamber to cause a dielectrophoretic force on the sample;

5 providing a magnetic signal to at least one magnetic element adapted to the chamber to create a magnetic field in the chamber to cause a magnetophoretic force on the sample;

10 initiating a carrier medium flow at the inlet port to establish a hydrodynamic flow profile within the separation channel, the carrier medium causing the at least one analyte and the analyte-label complexes to travel at velocities dependent upon their positions within the separation channel;

collecting the analyte-label complexes at an outlet port of the chamber, wherein the analyte-label complexes having similar magnetic and dielectric properties arrive at the outlet port in a single elution peak.

15

15. A method of discriminating target analytes utilizing dielectrophoresis and magnetophoresis, comprising:

20 preparing a sample containing at least one analyte and a plurality of labels, the plurality of labels having preselected dielectrophoretic and magnetic properties, at least some of the plurality of labels combining with the at least one analyte to create analyte-label complexes;

providing an electrical signal to at least one electrode element adapted to a chamber comprising a separation channel at different phases to create an electric field in the chamber to cause a dielectrophoretic force on the sample;

25 providing a magnetic signal to at least one magnetic element adapted to the chamber to create a magnetic field in the chamber to cause a magnetophoretic force on the sample;

30 continuously injecting the sample into an inlet port of the chamber;

WO 01/96857

PCT/US01/19484

collecting the analyte-label complexes at a plurality of outlet ports of the chamber, wherein the analyte-label complexes having similar magnetic and dielectric properties arrive at the same one of the plurality of outlet ports.

5

16. An apparatus for discrimination of a sample utilizing dielectrophoresis, magnetophoresis, and field flow fractionation, comprising:

a chamber having at least one inlet and one outlet port;

an array of electrodes in operative relation with the chamber and configured to generate a dielectrophoretic force upon constituents of sample within the chamber;

an array of magnetrodes in operative relation with the chamber and configured to generate a magnetic force upon constituents of the sample within the chamber; and

wherein the electrodes and magnetrodes are configured to generate forces that balance one another to displace constituents within the sample to positions within the chamber characteristic of their magnetic and dielectric properties.

17. The apparatus of claim 16, wherein the array of magnetrodes comprises one or more permanent magnets.

18. The apparatus of claim 16, wherein the outlet port comprises multiple ports configured to collect bands of fluid that travel through the chamber at defined positions.

25

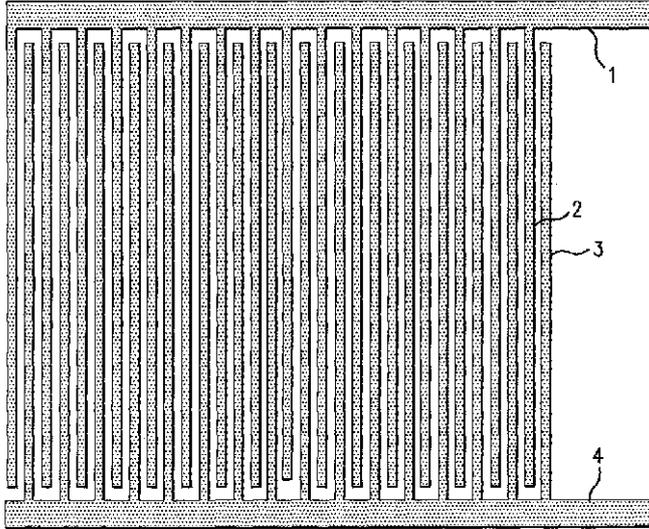


FIG. 1

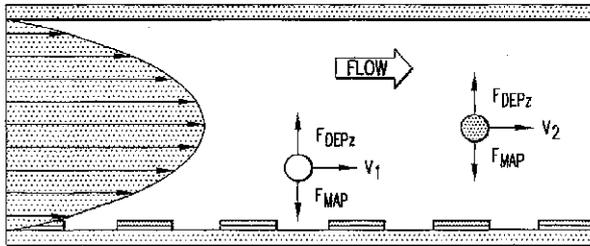


FIG. 2A

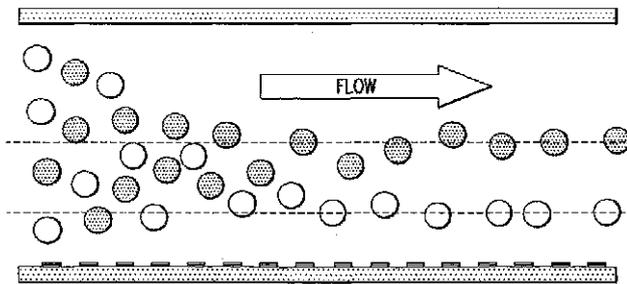


FIG. 2B

WO 01/96857

PCT/US01/19484

3/9

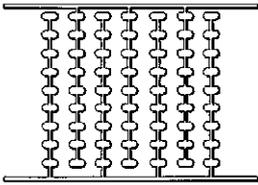


FIG. 3A

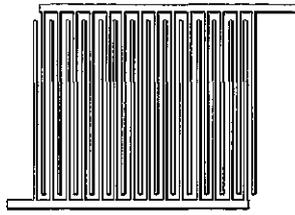


FIG. 3B

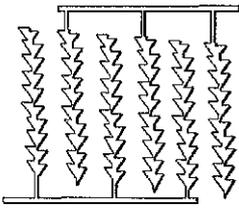


FIG. 3C

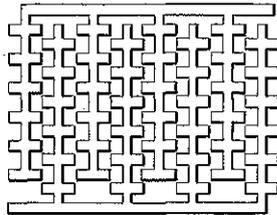


FIG. 3D

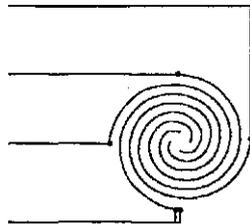


FIG. 3E

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96857

PCT/US01/19484

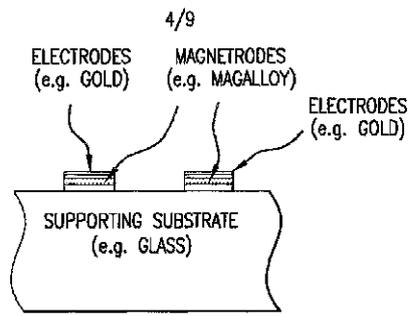


FIG. 4A

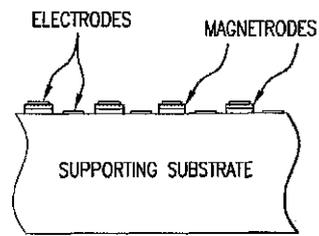


FIG. 4B

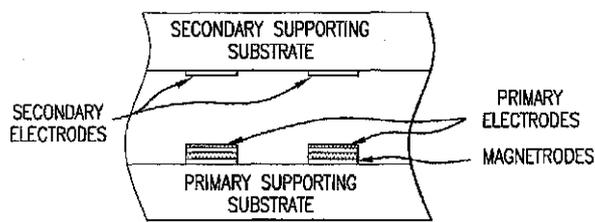


FIG. 4C

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

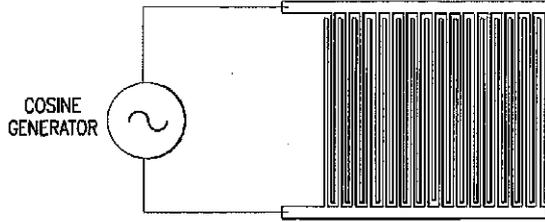


FIG. 5A

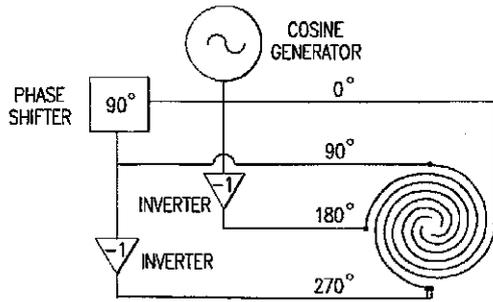


FIG. 5B

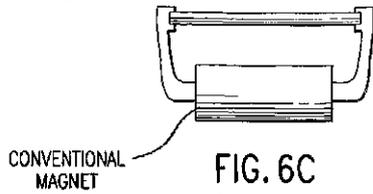
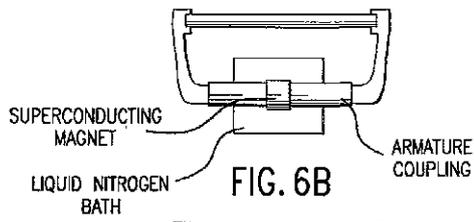
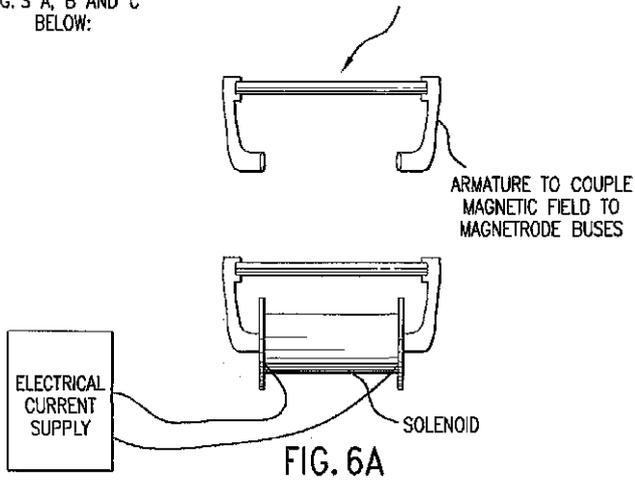
WO 01/96857

PCT/US01/19484

6/9

COMMON
ELEMENTS IN
FIG.'S A, B AND C
BELOW:

SEPARATION CHAMBER ASSEMBLY
INCORPORATING ELECTRODES,
MAGNETRODES AND FLUID FLOW PATH



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96857

PCT/US01/19484

7/9

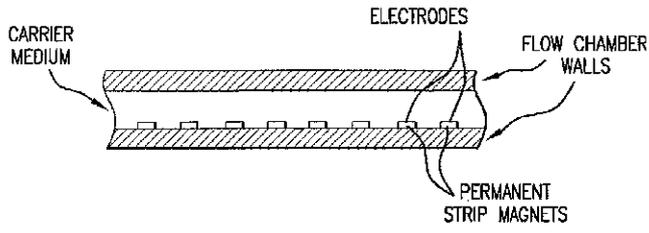


FIG. 7A

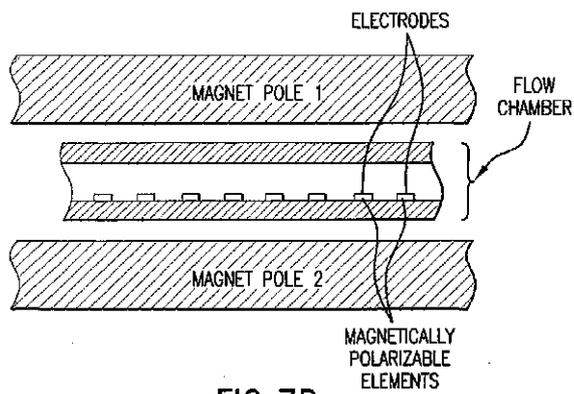


FIG. 7B

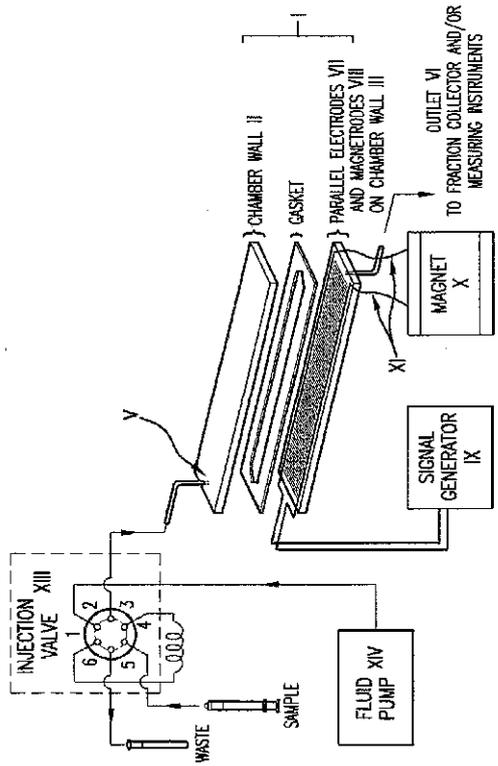


FIG. 8

WO 01/96857

PCT/US01/19484

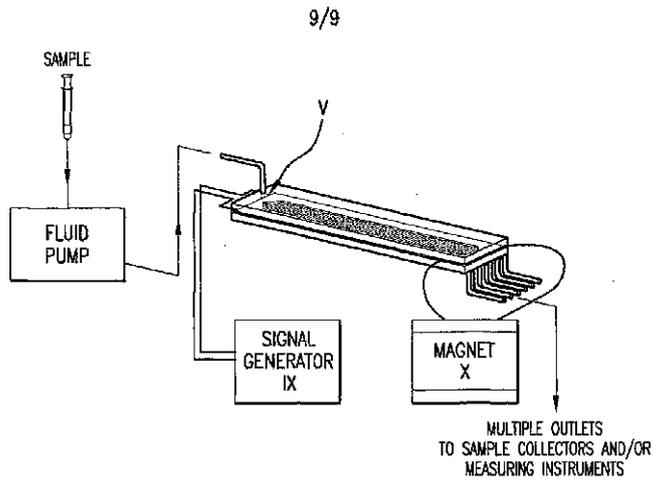
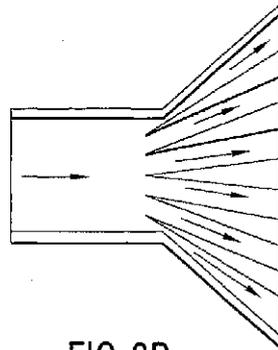


FIG. 9A



【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

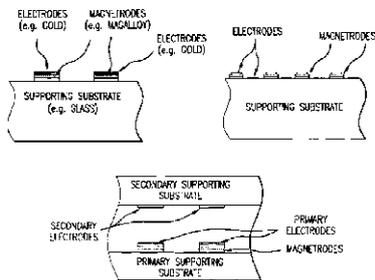
PCT

(10) International Publication Number
WO 01/096857 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 30/00, B01C 5/02
- (21) International Application Number: PCT/US01/19484
- (22) International Filing Date: 14 June 2000 (14.06.2000)
- (23) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/211,757 14 June 2000 (14.06.2000) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: 60/211,757 (CON) Filed on 14 June 2000 (14.06.2000)
- (71) Applicant for all designated States except US: BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (US/US): 201 West 7th Street, Austin, TX 78701 (US).
- (72) Inventors and (75) Inventors/Applicants for US only: GASCOWNE, Peter, R., C. (US/US); 5313 Huitsche, Bellair, TX 77401 (US); BUCKER, Frederick, E. (US/US); 8 Hunters Branch, Houston, TX 77024 (US); VYKOUKAL, Jody (US/US); 1997 Daylen No. 2, Houston, TX 77030 (US).
- (74) Agent: BARRETT, Michael, C.; Fulbright & Jaworski, L.L.P., Suite 2400, 600 Congress Avenue, Austin, TX 78701 (US).
- (81) Designated States (national): 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, ES, FI, FR, GB, GR, GU, HK, HN, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TH, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, ...)

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD AND APPARATUS FOR COMBINED MAGNETOPHORETIC AND DIELECTROPHORETIC MANIPULATION OF ANALYTE MIXTURES



(57) Abstract: Methods and apparatuses for discriminating matter utilizing dielectrophoresis combined with magnetophoresis. A sample having one or more constituents is injected into an inlet port of a chamber. A carrier medium flow is initiated at the inlet port to establish flow within the chamber. A dielectrophoretic force is generated to act on the constituents of the sample. A magnetophoretic force is generated to act on the constituents of the sample. The dielectrophoretic force and magnetophoretic forces are balanced to position the constituents within the chamber. The constituents are then collected at one or more outlet ports of the chamber according to the dielectric and magnetic characteristics of the constituents. The constituents may be collected as a function of time-of-exit from the chamber and/or position within the chamber.



WO 01/096857 A3

WO 01/096857 A3



IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR, OAPI patent (BE, BL, CL, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, UG).

(88) Date of publication of the international search report:
31 July 2003

Published:
with international search report

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

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inventor	Application No.
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N30/00 B03C5/02		PCT/US 01/19484	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SEARCHED			
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N B03C			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim No.	
X	US 5 039 426 A (GIDDINGS JOHN C) 13 August 1991 (1991-08-13) column 13, line 6,7	1,10 7,13-16	
A	YANG J ET AL: "CELL SEPARATION ON MICROFABRICATED ELECTRODES USING DIELECTROPHORETIC/GRAVITATIONAL FIELD-FLOW FRACTIONATION" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, US, vol. 71, no. 5, 1 March 1999 (1999-03-01), pages 911-918, XP000825768 ISSN: 0003-2700 the whole document	13-16	
A	US 5 465 849 A (WADA YUKIO ET AL) 14 November 1995 (1995-11-14) , sentence A	1,7,10, 13-16	
--- -/-			
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex	
* Special categories of cited documents:			
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document(s) published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone ** 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. *A* document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 8 November 2002		Date of mailing of the international search report 14/11/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office P. B. 6816 Patentaan 2 NL - 2230 HW Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Zinngrebe, U	

Form PCT/ISA/210 (patent sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inten Application No PCT/US 01/19484
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 47390 A (UNIV WASHINGTON) 18 December 1997 (1997-12-18) abstract ----	1,7,10, 13-16
A	WO 98 10267 A (BLANKENSTEIN GERT ; TECHNICAL UNIVERSITY OF DENMAR (DK)) 12 March 1998 (1998-03-12) abstract ----	1,7,10, 13-16
A	US 4 874 507 A (WHITLOCK DAVID R) 17 October 1989 (1989-10-17) column 9, line 5 -column 10, line 3; figure 5 ----	1,7,10, 13-16
A	US 3 449 938 A (GIDDINGS JOHN C) 17 June 1969 (1969-06-17) column 6, line 13-21; figure 6 ----	7
A	WO 94 16821 A (SCIENT GENERICS LTD ;PARTON ADRIAN.(GB); PETHIG RONALD (GB); MACER) 4 August 1994 (1994-08-04) abstract ----	1,7,10, 13-16
A	GB 2 122 369 A (INT REMOTE IMAGING SYSTEMS INC) 11 January 1984 (1984-01-11) abstract -----	1,7,10, 13-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Info Application No	
Information on parent family members				PCT/US 01/19484	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
US 5039426	A	13-08-1991	NONE		
US 5465849	A	14-11-1995	JP	7232097 A	05-09-1995
WO 9747390	A	18-12-1997	AU	3570797 A	07-01-1998
			EP	0910474 A1	28-04-1999
			JP	2000512541 T	26-09-2000
			WO	9747390 A1	18-12-1997
			US	5971158 A	26-10-1999
WO 9810267	A	12-03-1998	AT	211258 T	15-01-2002
			AU	4113297 A	26-03-1998
			DE	69709377 D1	31-01-2002
			DE	69709377 T2	14-08-2002
			WO	9810267 A1	12-03-1998
			DK	925494 T3	01-07-2002
			EP	0925494 A1	30-06-1999
			JP	2002503334 T	29-01-2002
			NO	991051 A	27-04-1999
			US	6432630 B1	13-08-2002
US 4874507	A	17-10-1989	US	4839032 A	13-06-1989
			AT	159868 T	15-11-1997
			AU	621103 B2	05-03-1992
			AU	3356589 A	16-10-1989
			BR	8907339 A	19-03-1991
			CA	1332819 A1	01-11-1994
			DE	68928431 D1	11-12-1997
			EP	0417114 A1	20-03-1991
			EP	0613724 A2	07-09-1994
			JP	8017962 B	28-02-1996
			JP	4501526 T	19-03-1992
			WO	8909092 A1	05-10-1989
			AT	95445 T	15-10-1993
			AU	606602 B2	14-02-1991
			AU	7515187 A	11-01-1988
			CA	1321980 A1	07-09-1993
			DE	3787728 D1	11-11-1993
			DE	3787728 T2	10-03-1994
			EP	0311617 A1	19-04-1989
			JP	6094012 B	24-11-1994
			JP	1503283 T	09-11-1989
			WO	8707532 A1	17-12-1987
US 3449938	A	17-06-1969	NONE		
WO 9416821	A	04-08-1994	AT	165255 T	15-05-1998
			AT	204211 T	15-09-2001
			DE	69409788 D1	28-05-1998
			DE	69409788 T2	12-11-1998
			DE	69428000 D1	20-09-2001
			DE	69428000 T2	04-04-2002
			DK	680380 T3	22-02-1999
			DK	815942 T3	12-11-2001
			EP	1092477 A1	18-04-2001
			EP	0680380 A1	08-11-1995
			EP	0815942 A1	07-01-1998
			WO	9416821 A1	04-08-1994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No.	
Information on patent family members				PCT/US 01/19484	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
WO 9416821	A	JP	8506179 T	02-07-1996	
		US	5653859 A	05-08-1997	
		US	5993631 A	30-11-1999	
GB 2122369	A	11-01-1984	AU	1411483 A	03-11-1983
			DE	3315194 A1	03-11-1983
			FR	2525915 A1	04-11-1983

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/483	G 0 1 N 33/561	
G 0 1 N 33/561	G 0 1 N 27/26	3 0 1 B
	G 0 1 N 27/26	3 3 1 Z

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

(72) 発明者 ガスコイン, ピーター アール. シー.
 アメリカ合衆国 テキサス 77401, ベライアー, ヒューサック 5313

(72) 発明者 ベッカー, フレデリック エフ.
 アメリカ合衆国 テキサス 77024, ヒューストン, ハンターズ ブランチ 8

(72) 発明者 ヴィコーカル, ジョディ
 アメリカ合衆国 テキサス 77030, ヒューストン, ドライデン 1937 ナンバー
 2

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 FA36
 2G053 AA21 BA04 BA05 BA08 BB02 BB11
 4D054 FA10