

(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2010-533869

(P2010-533869A)

(43) 公表日 平成22年10月28日 (2010. 10. 28)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 35/08	(2006. 01)	GO 1 N 35/08	A	2 G O 5 8
GO 1 N 33/53	(2006. 01)	GO 1 N 33/53	M	
GO 1 N 37/00	(2006. 01)	GO 1 N 37/00	1 O 1	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁)

(21) 出願番号 特願2010-517146 (P2010-517146)
 (86) (22) 出願日 平成20年7月16日 (2008. 7. 16)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年1月15日 (2010. 1. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/070232
 (87) 国際公開番号 W02009/012340
 (87) 国際公開日 平成21年1月22日 (2009. 1. 22)
 (31) 優先権主張番号 60/959, 666
 (32) 優先日 平成19年7月16日 (2007. 7. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/998, 981
 (32) 優先日 平成19年10月15日 (2007. 10. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

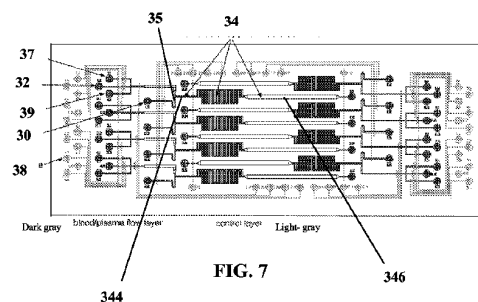
(71) 出願人 508032284
 カリフォルニア インスティテュート オ
 ブ テクノロジー
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 1
 1 2 5, パサデナ, イースト・カリフォル
 ニア・ブールヴァード 1 2 0 0, エム/
 シー 2 0 1 - 8 5
 (74) 代理人 100070150
 弁理士 伊東 忠彦
 (74) 代理人 100091214
 弁理士 大貫 進介
 (74) 代理人 100107766
 弁理士 伊東 忠重

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的分子を検出するためのマイクロ流体装置、方法及びシステム

(57) 【要約】

サンプルの流体成分における標的を検出するためのマイクロ流体装置、方法及びシステムが示される。そのような装置、方法及びシステムでは、サンプルが導入される様々なチャンネルの流れ抵抗は、そのサンプルからの流体成分の間隔及び / 又はその流体成分における標的を検出するための分析の性能を、制御可能な手段で、制御するように調整される。そのような性能は、捕捉剤での標的の結合親和性又は流体成分における標的の拡散によって制御される。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

流体サンプルの流体成分において少なくとも 1 つの標的を検出するためのマイクロ流体装置であり：

該流体サンプルを該マイクロ流体装置に導入するための注入口；

該注入口に流体的に連通し、流動チャンネル抵抗を有する流動チャンネル；及び

該流動チャンネルに流体的に連通し、分析チャンネル抵抗を有し、少なくとも 1 つの捕捉剤又はその成分を含む分析チャンネル；

を含み、該少なくとも 1 つの捕捉剤又はその成分は、前記分析チャンネルに付着され、前記標的に対して結合親和性を有し、

前記流動チャンネル抵抗及び前記分析チャンネル抵抗は、前記流動チャンネルから前記分析チャンネルまでの前記流体成分の流れを制御し、

さらに、該分析チャンネル抵抗は、検出可能な標的捕捉剤結合複合体を形成するために前記標的が前記捕捉剤へ結合することを可能にし、該結合は、前記結合親和性と前記流体成分における前記標的の拡散との間の少なくとも 1 つによって制御される、ことを特徴とするマイクロ流体装置。

10

【請求項 2】

前記流動チャンネル抵抗及び前記分析チャンネル抵抗が、前記流動チャンネルから前記分析チャンネルまでの前記流体成分の流れを最大化するようにされている、請求項 1 に記載されたマイクロ流体装置。

20

【請求項 3】

前記分析チャンネルが、前記結合が前記結合親和性によって制御される第 1 部分及び前記結合が前記流体成分における標的分子の拡散によって制御される第 2 部分を含む、請求項 1 又は 2 に記載されたマイクロ流体装置。

【請求項 4】

前記流体が血液であり、前記流体成分が血漿である、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載されたマイクロ流体装置。

【請求項 5】

前記少なくとも 1 つの捕捉剤又はその成分が、前記分析チャンネルに付着された基質ポリヌクレオチドである、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載されたマイクロ流体装置。

30

【請求項 6】

前記少なくとも 1 つの捕捉剤又はその成分がさらに、

たんぱく質及び該たんぱく質に付着されたコード化ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドでコードされたたんぱく質、を含み、該たんぱく質は、前記少なくとも 1 つの標的に特異結合し、該コード化ポリヌクレオチドは、該基質ポリヌクレオチドに特異結合されている、

ことを特徴とする、請求項 5 に記載されたマイクロ流体装置。

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つの標的は、複数の標的を含み、前記少なくとも 1 つの捕捉剤又はその成分が：

40

前記分析チャンネルに付着された複数の基質ポリヌクレオチドであり、該複数の基質ポリヌクレオチドの各ポリヌクレオチドは、配列特異的であり、互いに位置的に区別可能である、複数の基質ポリヌクレオチド；

を含むことを特徴とする、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載されたマイクロ流体装置。

【請求項 8】

前記複数の捕捉剤又はその成分は、さらに、

複数のポリヌクレオチドでコードされたたんぱく質であり、各ポリヌクレオチドでコードされたたんぱく質は、たんぱく質及び該たんぱく質に付着されたコード化ポリヌクレオチドを含み、該たんぱく質は、前記複数の標的のうち所定の標的に特異結合し、該コード化ポリヌクレオチドは、前記分析チャンネルに付着された複数のポリヌクレオチドのうち

50

配列特異的及び位置的に区別可能なポリヌクレオチドに特異結合し、各たんぱく質及びコード化ポリヌクレオチドは、互いに結合的に区別可能である、

ことを特徴とする、請求項7に記載されたマイクロ流体装置。

【請求項 9】

前記少なくとも1つの捕捉剤又はその成分は、複数の捕捉剤又はその成分を含み、

該複数の捕捉剤の各々は、結合的に区別可能であり、互いに位置的に区別可能であり、捕捉剤標的結合複合体における標的分子に特異結合しており、

さらに、該複数の捕捉剤は、捕捉剤標的結合複合体が、バーコードのパターンを形成する実質的に平行な線に沿って検出可能であるように、前記分析チャンネル上に配置されている、

10

ことを特徴とする、請求項1乃至8のいずれかに記載されたマイクロ流体装置。

【請求項 10】

流体サンプルの流体成分において少なくとも1つの標的を検出するためのシステムであり：

請求項5に記載されたマイクロ流体装置；及び

たんぱく質及び該たんぱく質に付着されたコード化ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドでコードされたたんぱく質であり、該たんぱく質は、標的に特異結合し、該コード化ポリヌクレオチドは、前記基質ポリヌクレオチドに特異結合する、ことを特徴とする、ポリヌクレオチドでコードされたたんぱく質；

を含むシステム。

20

【請求項 11】

流体サンプルの流体成分における少なくとも1つの標的を検出するためのシステムであり：

請求項7に記載されたマイクロ流体装置；及び

複数のポリヌクレオチドでコードされたたんぱく質であり、各ポリヌクレオチドでコードされたたんぱく質は、たんぱく質及び該たんぱく質に付着されたコード化ポリヌクレオチドを含み、該たんぱく質は、前記複数の標的のうち所定の標的に特異結合し、該コード化ポリヌクレオチドは、前記分析チャンネルに付着された複数のポリヌクレオチドのうち配列特異的及び位置的に区別可能なポリヌクレオチドに特異結合し、各たんぱく質及びコード化ポリヌクレオチドは、互いに結合的に区別可能である、

30

ことを特徴とする、複数のポリヌクレオチドでコードされたたんぱく質；

を含むシステム。

【請求項 12】

流体サンプルの流体成分において少なくとも1つの標的分子を検出するための方法であり：

流動マイクロ流体チャンネルにおいて流体サンプルを提供する段階；

該流動マイクロ流体チャンネルから分析マイクロ流体チャンネルまでの流体成分の選択的な流れを制御する段階であり、該分析マイクロ流体チャンネルは、少なくとも1つの捕捉剤又はその成分、該分析チャンネルに付着された少なくとも1つの捕捉剤を有し、該少なくとも1つの捕捉剤は、前記標的分子に対する結合親和性を有する、ことを特徴とする段階；

40

前記分析マイクロ流体チャンネルにおいて一時的に、検出可能な標的捕捉剤結合複合体を形成するために該少なくとも1つの標的分子の該少なくとも1つの捕捉剤への結合を可能にする条件下において、前記少なくとも1つの標的分子を前記少なくとも1つの捕捉剤で接触する段階であり、該結合は、前記結合親和性又は前記流体成分における前記標的分子の拡散によって制御される、ことを特徴とする段階；及び

該検出可能な標的捕捉剤結合複合体を検出する段階；

を含む方法。

【請求項 13】

流体サンプルの流体成分において少なくとも1つの標的を検出するためのマイクロ流体

50

装置であり：

該マイクロ流体装置において該流体サンプルを導入するための注入口；

該注入口と流体的に連通し、流動チャンネル抵抗を有する流動チャンネル；及び

該流動チャンネルに流体的に連通し、分析チャンネル抵抗を有する分析チャンネル；

を含み、該流動チャンネル抵抗及び該分析チャンネル抵抗は、前記流動チャンネルから前記分析チャンネルまでの前記流体成分の流れを制御するように設定され、

該分析チャンネル抵抗は、さらに、標的が前記分析チャンネルの表面上に付着することを可能にするように設定され、該付着された標的は、該標的に特異結合するラベル付きの分子を通して検出可能である、

ことを特徴とする、マイクロ流体装置。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2007年7月16日に提出された「An Integrated Blood Platform for Blood Separation and Protein Detection」と題する米国特許仮出願第60/959,666号明細書（整理番号第CIT4943-P号）及び2007年10月15日に提出された「High-Density Bar-code Array: A Generic Patterning Technique and Biodetection Devices Fabricated Therefrom」と題する米国特許仮出願第60/998,981号明細書（整理番号第CIT-5017号）に対する優先権を主張し、両開示を参照することにより、全体として当該明細書に組み込まれる。また、本出願は、2007年8月1日に提出された「Methods and Systems for Detecting and/or Sorting Targets」と題する米国特許出願第11/888,502号明細書（特許文献1）及び2008年7月16日に提出された「Arrays, Substrates, Devices, Methods and Systems for Detecting Target Molecules」と題する米国特許出願（特許文献2、整理番号第P262-US号）にも関連し、両開示を参照することにより、全体として当該明細書に組み込まれる。

20

【0002】

米国政府は、国立衛生研究所によって授与された助成金番号CA119347に従って、本開示において特定の権利を有する。

【0003】

本開示は、サンプルにおける1つ又はそれ以上の標的分子の検出に関する。さらに具体的に、本開示は、流体サンプルの流体成分における標的分子の検出のための装置、方法及びシステムに関する。

30

【背景技術】

【0004】

標的分子の検出、特にバイオマーカーの検出は、生体分子解析の分野における課題である。特に、バイオマーカーの定性的及び定量的な検出は、しばしば、診断から基本的な生物学的研究にわたる範囲の数個の応用において致命的な段階である。さらに具体的には、生体液の成分に含まれるバイオマーカーの検出は、そのような検出が望まれるいくつかの応用において特に難しい課題である。

【0005】

40

例えば、いくつかのヒトの病気の診断は、ヒトの血漿プロテオームに見られるバイオマーカー・セットの検出を通して実施される（非特許文献1及び非特許文献2）。

【0006】

通常、そのようなバイオマーカーの検出は、血液の抽出、抗凝固化学薬品の添加及び血漿（血清）からの細胞を分離するための血液の遠心分離を含む。その血漿（血清）が一度取得されると、96ウェルプレート上の血漿のスポッティング（spotting）などの技術を使用して、バイオマーカーが検出される。

【0007】

そのような技術は、単一のサンプルにおいて検出可能なバイオマーカーの数を限定し、その検出の信頼度に大きく影響を及ぼすことが可能なサンプル量及び処理時間、及び条件

50

を必要とする（非特許文献3）。

【0008】

信頼度の高い多数のバイオマーカーの検出が望まれる、例えば病気の段階の評価、セラピー患者の分類、患者のセラピーに対する反応の測定などのいくつかの応用において（非特許文献15及びHeath & Davis, 2008）、上記の要因は、検出の適用性、精度及び費用に大きく影響を及ぼす多数のサンプルの処理を必要とする。

【0009】

さらに、ヒトの病気のマウス・モデルにおける研究など、利用可能なサンプル量が限られた応用において、上記の要因は、多数のバイオマーカーの検出及び/又は1つのバイオマーカーの頻繁な検出又はサンプルの生化学的状態の維持が望まれる、特定の解析の実行可能性も低下させる。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】米国特許出願第11/888,502号明細書

【特許文献2】米国特許出願第2009/0036324号明細書

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Anderson, N.L. & Anderson, N.G. "The human plasma proteome - History, character, and diagnostic prospects" *Molecular & Cellular Proteomics*, 845-867(2002)

20

【非特許文献2】Lathrop, J.T., Anderson, N.G. & Hammond, D.J. "Therapeutic potential of the plasma proteome" *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 5, 250-257(2003)

【非特許文献3】Hsieh, S.Y., Chen, R.K., Pan, Y.H. & Lee, H.L. "Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low-molecular-weight serum/plasma proteome profiling" *Proteomics* 6, 2189-2198 (2006)

【非特許文献4】Fung, Y.C. "Stochastic flow in capillary blood vessels" *Microvasc. Res.* 5, 34-38 (1973)

30

【非特許文献5】Svanes, K. & Zweifach, B.W. "Variations in small blood vessel hematocrits produced in hypothermic rates by micro-occlusion" *Microvascular Research* 1, 210-220 (1968)

【非特許文献6】Yang, S., Undar, A. & Zahn, J.D. "A Microvascular device for continuous real time blood plasma separation" *Lab on a Chip* 6, 871-880 (2006)

【非特許文献7】Yang, Sung et al. "Blood Plasma Separation in Microfluidic Channels using Flow Rate Control" *ASAIO Journal* 51, 585-590 (2005)

【非特許文献8】Zimmermann, M. et al. "Modeling and Optimization of High Sensitivity, Low Volume Microfluidic-based Surface Immunoassays" *Biomedical Microdevices* 7:2, 99-110, pp100-101 (2005)

40

【非特許文献9】Hong, JW, et al. "A nanoliter-scale nucleic acid processor with parallel architecture" *Nature Biotechnology*. 22,4:435-439 (2004)

【非特許文献10】Kwong, G. "DEAL Encoded Antibody Libraries" *JACS*. 129(7): 1959-1967, (2007)

【非特許文献11】Bailey, R.C., Kwong, G.A., Radu, C.G., Witte, O.N. & Heath, J.R. "DNA-Encoded Antibody Libraries" *JACS*. 129,7:1959-1967 (2007)

50

【非特許文献 1 2】Thuillier, G. & Malek, C.K. “Developmet of a low cost hybrid Si/PDMS multi-layered pneumatic microvalve” Microsystem Technologies-Micro-and Nanosystems-Information Storage and Processing Systems 12, 180-185 (2005)

【非特許文献 1 3】Thorsen, T., Maerkl, S.J. & Quake, S.R. “Microfluidic large-scale integration” Science 298, 580-584 (2002)

【非特許文献 1 4】Hong, J.W. & Quake, S.R. “Integrated nanoliter systems” Nature Biotechnology 21, 1179-1183 (2003)

【非特許文献 1 5】Heath, J.R. & Davis, M.E. “Nanotechnology and cancer” Annual Review of Medicine 59, 405 (2007)

【非特許文献 1 6】Gorelik, E. et al. “Multiplexed immunobead-based cytokine profiling of early detection of ovarian cancer” Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 14, 981-987 (2005)

【非特許文献 1 7】Pirrung, M.C. “How to make a DNA chip” Angewandte Chemie-International Edition 41, 1277-+(2002)

【非特許文献 1 8】Dandy, D.S., Wu, P. & Grainger, D.W. “Array feature size influences nucleic acid surface capture in DNA microarrays” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 8223-8228 (2007)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

ここで提供されるのは、テストすべき物質を少量含んだ単一のサンプルに対して作動する、サンプルの流体成分における多数の標的の検出を可能にする標的検出のための装置、方法及びシステムである。特に、ここで開示される装置、方法及びシステムにおいて、サンプルからの流体成分の分離及びその流体成分における標的の検出は、処理中に、単一の測定で検出できる標的数を最大にする一方、処理されるサンプル量及びそのサンプルの修正を最小限に抑えるように設計された単一の装置において実施される。

【課題を解決するための手段】

【0013】

第1態様に従って、流体サンプルの流体成分において少なくとも1つの標的を検出するためのマイクロ流体装置が開示されている。そのマイクロ流体装置は：マイクロ流体装置において流体サンプルを導入するための注入口、その注入口と流体的に連通している流動チャンネル、及びその流動チャンネルに流体的に連通している分析チャンネル、を含む。マイクロ流体装置において、流動チャンネルは、流動チャンネル抵抗を有し、分析チャンネルは、分析チャンネル抵抗を有し、該流動チャンネル抵抗及び分析チャンネル抵抗は、流動チャンネルから分析チャンネルへの流体成分の流れを制御するようになっている。マイクロ流体装置において、分析チャンネルは、少なくとも1つの捕捉剤又はそのチャンネルに付着された成分を有し、捕捉剤は、標的分子に対して結合親和性を有する。分析チャンネル抵抗は、また、捕捉剤に標的分子を結合させることを可能にし、その結合が、該結合親和性と該流体成分における標的分子の拡散とのうち少なくとも1つによって制御されるように、検出可能な標的捕捉剤結合複合体を形成する。

【0014】

第2態様に従って、流体サンプルの流体成分における少なくとも1つの標的を検出するための方法が開示されている。その方法は：流動マイクロ流体チャンネルにおける流体サンプルの提供；該流動マイクロ流体チャンネルから分析マイクロ流体チャンネルへの流体成分の選択的な流れの制御；を含み、該分析マイクロ流体チャンネルは、少なくとも1つの捕捉剤又はその成分を有する。該少なくとも1つの捕捉剤は、分析チャンネルに付着されており、標的分子のための結合親和性を有する。当該方法はさらに：分析マイクロ流体チャンネルにおいて、一時的に、及び、検出可能な標的分子捕捉剤結合複合体を形成するよ

うに少なくとも1つの標的分子を少なくとも1つの捕捉剤に結合させることを可能にする条件下において、少なくとも1つの標的分子を少なくとも1つの捕捉剤に結合させる段階であり、該結合が、該結合親和性の間の1つ及び該流体成分における標的分子の拡散によって制御されるように、該少なくとも1つの標的分子を該少なくとも1つの捕捉剤で結合させる段階；及び検出可能な標的捕捉剤結合複合体を検出する段階；を含む。

【0015】

第3態様に従って、流体サンプルの流体成分における少なくとも1つの標的を検出するためのシステムが開示されている。そのシステムは、ここで開示されているマイクロ流体装置を含み、少なくとも1つの捕捉剤又はその成分は、分析チャンネルに付着された少なくとも1つの基質ポリヌクレオチドを含む。そのシステムはさらに、たんぱく質及びそのたんぱく質に付着されたコード・ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つのポリヌクレオチドでコードされたたんぱく質を含む。そのたんぱく質は、標的に特異結合し、そのコード・ポリヌクレオチドは、基質ポリヌクレオチドに特異結合する。

10

【0016】

第4態様に従って、マイクロ流体装置が、流体サンプルの流体成分における少なくとも1つの標的を検出するために開示されている。そのマイクロ流体装置は：マイクロ流体装置における流体サンプルを導入するための注入口、該注入口に流体的に連通し、流動チャンネル抵抗を有する流動チャンネル、該流動チャンネルと流体的に連通し、分析チャンネル抵抗を有する分析チャンネル、を含む。マイクロ流体装置において、その流動チャンネル抵抗及び分析チャンネル抵抗は、流動チャンネルから分析チャンネルまでの流体成分の流れを制御するように構成されており、分析チャンネル抵抗はさらに、該分析チャンネルの表面上における標的の付着を可能にするように構成されている。その付着された標的は、その標的に特異結合するラベル付きの分子を通して検出が可能である。

20

【0017】

本開示の装置、方法及びシステムは、従来技術における実施時間に関して、大幅に縮小された時間で、単一の少量サンプルで始まる多数の標的の検出を可能にする。特に、ある一定の実施形態において、標的検出は10分未満の時間内で完了することが可能であり、従来技術の方法は通常、数時間から2、3日も必要とする。

【0018】

本開示の装置、方法及びシステムは、また、従来技術のモデルに従って、検出を可能にするために必要なサンプルの修正を最小限に抑える標的の検出も可能にする。本開示の装置、方法及びシステムは、また、血液凝固（サンプルが血液の場合）、酵素によるたんぱく質の劣化など、従来技術で実施された場合、サンプリングと検出との間に、2、3時間から2、3日の間起こり得る様々な化学的及び生化学的過程を最小限に抑える。

30

【0019】

本開示の装置、方法及びシステムは、さらに、単一の測定において多数の標的の検出を可能にすることから、従来技術に対してプロセスの精度を増やす一方、費用を低減する。

【0020】

一般に、本開示の装置、方法及びシステムは、さらに：サンプル・サイズの縮小；たんぱく質バイオマーカーを測定するために必要な人間による活動の低減；測定に必要な時間の縮小；与えられた活動量での側定数の増加；そのような測定の精度及び再現性の増加；のうち少なくとも1つを考慮し、従来方法に対して減少した費用での標的の検出を可能にする。

40

【0021】

本開示の装置、方法及びシステムは、癌、免疫システムの機能不全、内臓システム（例えば、心臓、肝臓、腎臓、胃腸、生殖機能、脳）の炎症などの他の病気、及び病原菌：細菌性、ウィルス、菌類、による病気のための診断分析など、いくつかの分析の実施に適用が可能である。さらに具体的には、本開示の装置、方法及びシステムは、上記の病気のスクリーニング及び早期検出の実施に使用されることが可能である。

【0022】

50

本開示の装置、方法及びシステムは、また、細菌又は病原菌からの汚水又は廃水のモニタリング及び／又は反応陽性者における大腸菌のモニタリング（例えば、組み換え型たんぱく質生産のため）などの応用において、周囲の流体から細菌成分を分離し、その分離された細菌成分におけるたんぱく質（例えば、調査又は除外されるべき細菌を含むサンプルにおいて）を検出するために使用される。

【0023】

本開示の装置、方法及びシステムは、また、例えば、細胞培養における細胞を、それらの周囲の流体から分離し（癌細胞株／PBMCなど）、その分離された周囲の流体を分析するなど、研究目的に使用することも可能である。

【0024】

本開示の1つ又はそれ以上の実施形態の詳細は、下記の付属の図表及び記載において説明されている。他の特徴、目的及び利点は、本記載、図表及び請求項から明らかになるはずである。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】本開示の実施形態に従って装置を説明する概略図である。

【図2】本開示の実施形態に従って、図1の装置の流体分離領域を説明する概略図である。

【図3】本開示の実施形態に従って、マイクロ流体装置を説明する概略図である。

【図4】本開示の実施形態に従って、マイクロ流体装置を説明する概略図である。

【図5】本開示の実施形態に従って、マイクロ流体装置を説明する概略図である。

【図6】本開示の実施形態に従って、マイクロ流体装置を説明する概略図である。

【図7】本開示の実施形態に従って、マイクロ流体装置を説明する概略図である。制御層は薄灰色で示され、サンプル層は濃い灰色で示されている。

【図8】本開示の装置の製造過程の様々な段階を説明する模範的な概略図である。

【図9】本開示の実施形態に従って、DEAL技術に統合された装置の製造過程及び使用を説明する模範的な概略図である。

【図10】本開示の装置の製造過程及び使用を説明する模範的な概略図である。

【図11】本開示に従って、希釈された羊血液で形成された模範的な流体の分離の間の装置を示す写真である。

【図12】本開示の方法及び装置で実施された2つの分析レーンを示す明視野像である。

【図13】図9において説明された分析の暗視野像である。

【図14】本開示の実施形態に従って（上）、装置の分析チャンネル領域及びその装置で実施される分析を示す画像である。

【図15】指先からの全血から得られた血液バイオマーカーのパネルの模範的な測定を示す図である。パネル(a)は、新鮮な全血からの血漿の分離を実施する間の本開示の装置の光学顕微鏡写真である。パネル(b)は、本開示の装置の2つの隣り合ったマイクロ・チャンネルにおける血液バーコードの蛍光画像を示し、健康なボランティアから採血された新鮮な全血のスパイクが見られる方及び見られない方の両方が個別に分析されている。全てのバーは、幅20 μm である。パネル(c)は、パネル(b)において説明されたスパイクが見られる全血及び見られない全血のサンプルのバーコードの蛍光輪郭線を表わした図である。距離は、パネル(b)に示された長さ全体に対応する。

【発明を実施するための形態】

【0026】

サンプルにおける標的分子を検出するための装置、方法及びシステムが、ここで開示されている。

【0027】

ここで使用される「検出をする」又は「検出」などの用語は、空間の限られた部分における標的又は信号の存在、有無又は事実の決定を示し、それらは、サンプル、反応体の混合物、分子複合体及び基質を含むが、それらに限定されていない。検出は、標的又は信号

10

20

30

40

50

の数又は量の測定に言及する、関連する、又はそれを含む場合（定量化とも呼ばれる）、
「定量的」と呼ばれる。それは、標的又は信号の量又は比率を決定するように設計された
如何なる解析も含むが、それらに限定されていない。検出は、標的又は信号の質又は種類
の、他の標的又は信号に対する相対的存在量に関して識別することに言及する、関連する
、又はそれを含む場合、「定性的」であり、それは定量化されない。

【0028】

「標的」又は「標的分子」としてここで使用される用語は、興味の対象の検体を示す。
「検体」という用語は、サンプルにおける存在又は欠乏が検出されなければいけない物質
、化合物又は成分を呼ぶ。検体は、生体分子、特にバイオマーカーを含むが、それらに限
定されない。ここで使用される「生体分子」という用語は、生物学的環境に関連した物質
、化合物又は成分を示し、糖分、アミノ酸、ペプチドたんぱく質、オリゴヌクレオチド、
ポリヌクレオチド、ポリペプチド、有機分子、エピトープ、生体細胞、生体細胞の一部分
、ビタミン、ホルモンなどを含むが、それらに限定されない。「バイオマーカー」という
用語は、生物学的環境の特定の状態に関連した生体分子を示し、細胞サイクル、健康又は
病気の状態の段階を含むが、それらに限定されない。バイオマーカーの存在、欠乏、減少
、上方調節は、ある特定の状態に関連し、それを示す。

10

【0029】

ここで使用される「サンプル」という用語は、多量を示す何かの限定された量を示し
、それは、生物学的環境、標本、培養液、組織、商用の組み換え型たんぱく質、合成化合
物又はそれらの1部分からの流体を含むが、それらに限定されない。さらに、模範的なサ
ンプルは、唾液、脳脊髄液、尿、精液、生体検査の標本、子宮頸部細胞診のサンプル又は
ヒト若しくは液体成分及び細胞成分を含む動物から取得される他のサンプルを含む。

20

【0030】

本開示の装置、方法及びシステムのさらなる説明は、サンプルが血液であり、流体成分
が血漿であり、標的がバイオマーカーである応用に関連して提供される。当業者は、他の
生物的、有機及び無機のサンプル及び標的の血液サンプル及びバイオマーカーに対して詳
しく説明されている特徴の適用性を理解するはずである。本開示の装置、方法及びシステ
ムは、血液から血漿を分離するように設計されているが、ミクロンのサイズの粒子を含む
如何なる媒体からも粒子を含まない流体を取得し、如何なる種類でもよい捕捉剤を使用し
て分子を検出するために使用することができる。

30

【0031】

いくつかの実施形態において、本開示は、全血からの血漿分離と、その血漿からの多数
のバイオマーカーの検出とを組み合わせた装置に関する。

【0032】

本開示の模範的な装置は、図1-6において示されている。マイクロ流体流動チャンネル
は、チップ上で形成されており、そのチップ(10)の1領域において、血漿が全血から分離
され、チップ(11)の第2領域において、たんぱく質又は他の検体が、分離された血漿から
測定される。図1のチップにおいて、全血が、マイクロ流体チャンネル注入口(12)に導入
され、全血から血漿のほんの1部分を引いた分が、マイクロ流体チャンネル(13)を通して
そのチップから取り除かれるか、あるいは、チップ上の廃棄物貯留層（非表示）に保管さ
れる。図1の説明において、チャンネル(13)は、領域(10)にある。貯留層は、チャンネル(
13)の端部にあってもよい。

40

【0033】

領域(10)は、また、比較的幅広い、又は流れ抵抗の低いチャンネル(15)を含み、該チャ
ンネルは、1つ又はそれ以上の比較的狭い、流れ抵抗の高いチャンネル(14)に流体を通し
て接続されており、それらのチャンネルは、その代わりに、チャンネル(16)に流体を通し
て接続されている。チャンネル(14)及び(16)は、図1に描写されているチップの領域(11)
に含まれている。チャンネル(15、14、16)の相対的な流れ抵抗は、設計によって変化して
もよい。

【0034】

50

図1-6の装置において、全血からの血漿分離は、より幅広いマイクロ流体チャンネル(15)から細いマイクロ流体チャンネル(14)の中への血漿の流れを、従来技術においてよく知られているZweifach-Fung効果（非特許文献4、5、6）を使用して制御することによって実施される。

【0035】

図1-6の装置においてZweifach-Fung効果を達成するために、全血は、チャンネル(14)との流体的な連通にあるチャンネル(15)を通して流される。流れ抵抗が同じである場合、全血は、両チャンネルの中を流れる。狭いチャンネル(14)の流れ抵抗が、チャンネル(15)の流れ抵抗よりも大きい場合、血漿は、チャンネル(15)からチャンネル(14)へ搬送される。

10

【0036】

いくつかの実施形態において、流動チャンネル(15)と分析チャンネル(14)との間の流速比は、約4:1であるほど低くてもよい。チャンネル(14)の流速とチャンネル(15)の流速との間の流速比が少なくとも20:1である、又はそれよりも大きい他の実施形態において、チャンネル(15)からチャンネル(14)への血漿の流れは、注入口ヘマトクリットに関わらず最大化される。また、約20:1の流速比では、良い分離効率が見られる（目による検査でチャンネル(14)及び(16)において検出可能な細胞が20個未満である）。いくつかの実施形態において、チャンネル(14)の流速とチャンネル(15)の流速との間の流速比は、約20:1の比から増加するため、分離効率も改善するが、血漿の生産（及びそれに応じて分析される流入流体）は、従って、減少する。

20

【0037】

いくつかの実施形態において、チャンネル(14)の流速とチャンネル(15)の流速との間の比は、約20:1の値から、約5%の分離量の維持を可能にする値に増加される。特に、いくつかの実施形態では、流動チャンネル(15)と分析チャンネル(16)との間の流動比は、約100:1よりも大きくてもよく、約60:1から約100:1、約35:1から約60:1、又は20:1から35:1になることも可能である。

【0038】

さらに具体的に、最大化された分離効率及び長い分析時間が望まれる又は許容される特定の実施形態において、流動チャンネル(15)と分析チャンネル(16)との間の流速比には、約100:1よりも大きい比が選択されてもよい。最適化された分離量及び分析時間が望まれる他の実施形態では、流動チャンネル(15)と分析チャンネル(14)との間の流速比には、約35:1から約60:1までの比が選択されてもよい。

30

【0039】

サンプルに対して望まれる流速比及び選択される実験の設計は、その選択された実験の設計に従って、分析チャンネルにおいて搬送されている流体成分から分離されなければならないサンプルにおける粒子の半径に基づいて識別することができる。具体的には、その流速比は、全体として参照することによってここに組み入れられている付録Aにおいて示されるように、分離される粒子の半径に反比例する。ここで使用される「粒子」という用語は、赤血球またはその集合体などの細胞を含む、流体の運搬及び特性に関して1つとして振舞う物質の小さい部分を識別するが、他の有機又は無機質の粒状物質又はそれらの集合体も含み得る。

40

【0040】

図1-6の装置において、チャンネル(14)が、さらに分析チャンネル(16)に流体的に接続されている。図1-6において例証されている実施形態において、チャンネル(16)は、標的検出のための分析が実施される1つの分析領域を受け入れる分析チャンネルである。

【0041】

全チャンネルの抵抗は、血漿チャンネル(14)が、より狭い場合及び/又はより長い場合、より大きい流れ抵抗を有することを考慮しながら、様々なチャンネルのチャンネル寸法を調節することによって、チャンネル(14)とチャンネル(15)との間で望まれる流速比を達成するように調節される。その代わりに、チャンネル(15)は、流れ抵抗を減少させるため

50

に、より幅広く及び／又はより短くなるように調節することができる（それは、2つのチャンネル間の抵抗比を増加させることにおいても役立つ）。さらに、いくつかの実施形態において、チャンネル(16)は、血漿チャンネル(14)の幅よりも少なくとも一桁分大きい(10x)幅を有してもよく、チャンネル(16)の抵抗及び分離効率に対する影響を最小限に抑える。しかし、チャンネル(16)の幅及び長さ、また、チャンネル(15)及びチャンネル(14)の幅及び長さ及び関連する流れ抵抗も、本開示の方法及びプログラムを使用して、望まれるチップ構成に従って変えることができる。

【0042】

特に、特定のチップに対して適切な流速比は、圧力駆動の流れにおいて、マイクロ・チャンネル内の流速 $Q(m^3/s)$ は、 $Q=\Delta P/R$ として定義され、 ΔP は、注入口と出口(Pa)との間の流れを駆動するための差圧であり、 R は、チャンネル抵抗($Pa \cdot s \cdot m^{-3}$)であることを考慮に入れる当業者によって識別されることが可能である。

10

【0043】

マイクロ流体装置の、望まれる流速比を得るためのチャンネルの適切な寸法は、チャンネル抵抗とチャンネル寸法との間の関係を考慮に入れる当業者によって識別されることが可能である。例えば、低いアスペクト比($w \sim h$)を持つ長方形のマイクロ・チャンネルに対して、以下の数式が考慮されてもよい：

【0044】

【数1】

20

$$R = \frac{12\mu L}{wh^3} \left[1 - \frac{h}{w} \left(\frac{192}{\pi^5} \sum_{n=1,3,5}^{\infty} \frac{1}{n^5} \tanh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right) \right) \right]^{-1}$$

R はチャンネル抵抗であり、 w はチャンネル幅であり、 h はチャンネルの高さであり、 L はチャンネルの長さであり、 μ は流体の粘度である。この数式は、全チャンネルの抵抗を決定するため及びその抵抗を実験設計に従って血漿分離を最適化するように制御するために使用される。

【0045】

30

ユーザーがチャンネルに対応する抵抗を得るために、各チャンネルの長さ、幅及び高さ及び流体の粘度を入力することを可能にするように、ソフトウェア・プログラムが出願人によって作成された。

【0046】

そのプログラムによると、ある一定の範囲内の全チャンネルの寸法及び望まれる入力圧力（一般的に5-10psi）は、最初にユーザーによって入力される。例えば、血漿分離に対して、入力チャンネルの深さは、約10-20 μm であってよく、チャンネル（15）の幅及び長さは、それぞれ、15-35 μm の範囲及び100-500 μm の範囲にあってよく、チャンネル（13）の幅は、60 μm と200 μm との間にあり、血漿チャンネル（14）及びチャンネル（16）の長さは、5mmと25mmとの間にあってよい（付録Aにおける追加の裏付けを参照）。

40

【0047】

そのプログラムは、次に、入力寸法に基づいて全チャンネルの抵抗を計算する。プログラムは、これらの値を、本出願の付録Aにおいて示されているように、取得された抵抗マトリクスに挿入し、そのマトリクスは、数式及び関連するマトリクスのシステムを示す。次に、抵抗マトリクスの逆行マトリクスに圧力マトリクス（付録A）を乗じ、各チャンネルの流速を含む流速マトリクスを取得する。プログラムはまた、上記の血漿チャンネルの流速の全てを加え、チャンネル（15）出力流速で分け、血漿として分離される血液の割合を決定する（これは収量を与える）。プログラムは、次に、全チャンネルの抵抗及び流速、流れ比及び血漿の収量の割合を出力する。

【0048】

50

選択された実験設計に対する出力パラメータの適性は、当業者が本開示を読んだ上で識別することができる。パラメータが実験の目的に適しない場合、それに応じて調整される。

【0049】

例えば、血液/血漿分離に対して、流速比が20:1よりも低い場合、及び全血からの血漿の適切な分離が望まれ、血漿の高収量及び短い分析時間も望まれる場合、流速比を増加させることが予測される新しいチャンネル寸法（例えば、血漿チャンネルを長くする、チャンネル（13）の幅を増やすなど）がプログラムに入力される。その過程は、次に、5%収率よりも高い収率及び100 $\mu\text{m}/\text{sec}$ よりも速い流速をチャンネル（16）においてさらに維持する間、最も大きい流れ比が可能になるまで繰り返される。望まれる設計に互換性がある流れ比を提供する入力寸法は（分析チャンネルにおける標的検出のために望まれる設定において - 以下参照）関連する装置に使用される。本出願の付録Aにも参照がされ、全体としてここに組み入れられる。

10

【0050】

いくつかの実施形態において、血漿チャンネルの幅は、一定に維持されることができ（例えば、非特許文献7に従って10 μm ）、一方、血漿チャンネル（14）の長さ及び/又は領域（13）の幅は、変えることができる。

【0051】

いくつかの実施形態において、血漿チャンネル（14）の長さ及びチャンネル（13）の幅は、望まれる流れ比を得るために増加させられる。それらの実施形態において、チャンネル（15）に関するチャンネル（14）の配置は、ここで説明されるいくつかの実施形態において、チャンネルが直交していても望まれるチップ構成に従って変えられる。

20

【0052】

いくつかの実施形態において、プログラムは、Matlabなどのソフトウェアで動作することができ、内蔵のマトリクス増加機能が既に含まれている。

【0053】

ある特定の実施形態において、ソフトウェア・プログラムが、また、上記の数式 $Q = \Delta P/R$ 及び物質移動保存の法則を使用することができ、各チャンネルに対して計算された抵抗に基づいて各チャンネルにおける容量流速を決定する。物質移動保存の法則が原因で、様々なチャンネルにおける流速は独立している。言い換えれば、流入チャンネル15が Q_{15in} として定義される場合、領域14の第1血漿チャンネルに入る流れは、 $Q_{14.1}$ であり、第1血漿チャンネルの直下の領域15における流れは、 $Q_{15.1}$ であり、 $Q_{15in} = Q_{14.1} + Q_{15.1}$ である。次に、 $Q_{15.1} = Q_{14.2} + Q_{15.2}$ であり、それに続く全ての血漿チャンネルも同様である。

30

【0054】

ここに記載されているソフトウェア・プログラムもまた、各チャンネルにおける圧力の低下を既知の抵抗及び既知の流速の関数として表わす数式のシステムを考案することを可能にし、未知の流速は、本開示に従って書くことができる。最後に、 n 個の数式及び n 個の未知の要素のシステムは、マトリクス代数を使用して解くことができ、そのマトリクス代数では、再び $Q = \Delta P/R$ となる条件を満たすように、流れマトリクス、圧力マトリクス及び抵抗マトリクスがある。Matlabなどのプログラムにおいて一度導入されたこれらの数式のマトリクスは、容易に解くことができ、入力圧力を与えられた上で各チャンネルにおける流速の識別を可能にする。プログラムは次に、例えば、 $Q_{14.1}:Q_{15.1}$ 、 $Q_{14.2}:Q_{15.2}$ などの流れ比を出力する。

40

【0055】

当業者は、本開示を読む上で、チャンネル寸法に基づいて様々な実施形態における全チャンネルの適切な抵抗を計算し、注入口の与えられた圧力で各チャンネルを通る流体の容量流速を、例えば、Matlabプログラムなどのソフトウェア・プログラムを使用して決定することができる。

【0056】

図1-6の装置において、全血からの血漿の分離は、流動チャンネル(15)から分析チャン

50

ネル(14)及び(16)に流れる血漿の制御された流れを通して実施される。

【0057】

ここで使用される「流動チャンネル」という用語は、サンプルの1つ又はそれ以上の流体成分をそのサンプルから分離する過程が実施される装置の部分を示す。例えば、本開示の実施形態において、チャンネル(15)が識別され、該チャンネルにおいて血液が流され、そこから血漿成分が分析チャンネル(14)及び(16)に搬送される。

【0058】

ここで使用される「分析チャンネル」という用語は、標的の検出が実施される装置の部分を示す。例えば、ここで開示されている実施形態において、分析チャンネル(14)及び(16)は、直下にある捕捉剤によって分析される無細胞の血漿を受取るように設定されている。

10

【0059】

特に、図1-6の装置において、チャンネル(14)及び(16)は、捕捉剤のスポット(21)が示されている図8(下参照)の概略図においても説明されているように、テストする血漿部分における標的を検出するために、チャンネルの表面に付着された捕捉剤を有することができる。

【0060】

ここで使用されている「捕捉剤」という用語は、検出可能な捕捉剤標的複合体を形成するために所定の標的に特異結合することが可能な分子を示す。模範的な捕捉剤は、ポリヌクレオチド及びたんぱく質、及び、特に抗体を含むが、それらに限定されない。

20

【0061】

ここで使用される「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチド、ヌクレオシド、又はそれらの類似体を含む2つ又はそれ以上のモノマーで構成された有機ポリマーを示す。「ヌクレオチド」という用語は、プリン又はミリミジン基及びリン酸基に加わり、核酸の基本構造単位であるリボース又はデオキシリボース糖で構成される数個の化合物のうちの如何なる化合物も示す。「ヌクレオシド」という用語は、デオキシリボース又はリボースに加わったプリン又はミリミジン基で構成された化合物(グアノシン又はアデノシン)を示し、特に核酸において見られる。「ヌクレオチド類似体」又は「ヌクレオシド類似体」という用語は、それぞれ、1つ又はそれ以上の個別の原子が異なった原子又は機能グループで取り替えられたヌクレオチド又はヌクレオシドを示す。従って、ポリヌクレオチドという用語は、如何なる長さのDNA RNA類似体の核酸及びそれらの残留物も含む。3つ又はそれ以上のヌクレオチドのポリヌクレオチドは、また、ヌクレオチド状(nucleotidic)オリゴマー又はオリゴヌクレオチドと呼ばれる。

30

【0062】

ここで使用される「ポリペプチド」という用語は、2つ又はそれ以上のアミノ酸モノマー及び/又はそれらの類似体で構成された有機ポリマーを示す。「ポリペプチド」という用語は、全部の長さのたんぱく質及びペプチドを含み、その類似体及び残留物も含んだ如何なる長さのアミノ酸ポリマーも含む。3つ又はそれ以上のアミノ酸のポリペプチドは、また、たんぱく質オリゴマー又はオリゴペプチドと呼ばれる。ここで使用されるように、「アミノ酸」、「アミノ酸モノマー」又は「アミノ酸残留物」という用語は、不自然な側鎖を持つ合成アミノ酸を含む、D及びL光学異性体を含む、20個の自然発生するアミノ酸のうちどれを示す。「アミノ酸類似体」という用語は、1つ又はそれ以上の個別の原子が、異なった原子、アイソトープ、又は異なった機能グループで置き換えられ、そうでない場合は、自然のアミノ酸類似体と同一である。

40

【0063】

ここで使用される「たんぱく質」という用語は、ある特定の第2及び第3構造を持ち、他のたんぱく質、DNA、RNA、脂質、代謝物、ホルモン、ケモカイン、及び小さな分子を含む他の生分子との相互作用に参加することができるが、それらだけに限定されない、ポリペプチドを示す。

【0064】

50

ここで使用される「抗体」という用語は、抗原による刺激の後に活性化されたB細胞によって生成され、抗原に特異結合し、生体システムにおいて免疫反応を促進し、通常2つの重鎖及び2つの軽鎖を含む4つの準ユニットで構成されるたんぱく質を示す。抗体という用語は、自然又は合成の抗体を含み、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体又はそれらの残留物を含むが、それらに限定されない。模範的な抗体は、IgA、IgD、IgG1、IgG2、IgG3、IgM及び類似体を含む。模範的な残留物は、Fab、Fv、Fab'、F(ab')₂及び類似物を含む。モノクローナル抗体は、「エピトープ」と呼ばれるもう1つの生分子の単一の粒子状の空間的及び極性の組織に特異結合をすることから、それに相補的であるとして定義される抗体である。ポリクローナル抗体は、それぞれが異なった抗原性のエピトープに結合しているモノクローナル抗体の混合物を示す。抗体は、ホスト(host)の免疫化及び血清(ポリクローナル)を集めるなどの従来によく知られた技術、あるいは、連続的なハイブリドーマ細胞系を備えること及び貯蔵されたたんぱく質(モノクローナル)を集めることによって提供される。

10

【0065】

本開示において、分子の他の分子への結合に関して使用される「特異」、「特異的」又は「特異性」という用語は、その分子ともう1つの分子との間の安定した複合体の認識、接触及び形成を呼び、実質的に程度はより小さいが、各分子間及びもう1つの分子と他の分子との間の安定した複合体の認識、接触及び形成も示す。模範的な特異結合は、抗体-抗原の相互作用、細胞上の受容体-配位子の相互作用、ポリヌクレオチド雑種形成、酵素基質の相互作用などである。ここで複合体の分子成分に関して使用される「特異的」という用語は、その成分が一部分であり、ある特定の複合体との独特の関連を示す。ここで、ポリヌクレオチドの配列に関して使用される「特異的」という用語は、その配列の相補的配列である単一のポリヌクレオチドとの独特の関連を示す。

20

【0066】

ここで使用される「付着」及び「付着された」という用語は、2つ又はそれ以上の成分を結合したままに保持するための化学結合、リンク、力、又は結ぶものによる接続又は統合を示し、それは、例えば第1分子が直接第2分子又は物質に結合されるという条件を満たす直接的及び間接的な付着及び1つ又はそれ以上の中間分子が第1分子と第2分子又は物質との間に置かれている実施形態のいずれか一方を含む。

30

【0067】

いくつかの実施形態において、チャンネル(14)及び(16)の同じエリア又は異なったエリアは、各々が結合的に区別可能である異なった捕捉剤でコーティングされてもよい。いくつかの実施形態において、チャンネル(14)及び(16)は、各々が位置的に区別可能である異なった捕捉剤によってコーティングされてもよい。

【0068】

ここで分子に関して使用される「結合的に区別可能」という用語は、特異的に結合できる能力を持ち、従って、ある特異的分子に相補的として定義される分子を示す。それに応じて、第1分子が第3分子に特異的に結合することから、第3分子に相補的であると定義され、第2分子は第4分子に特異的に結合することから、第4分子に相補的であると定義され、第4分子は第3分子とはっきり異なる場合、第1分子は第2分子から結合的に区別可能である。

40

【0069】

ここで分子に関して使用される「位置的に区別可能」という用語は、その分子によって占められる位置又はエリアに基づいて区別可能な分子を示す。それに応じて、位置的に区別可能な捕捉剤は、分析チャンネル上の異なる位置又はエリアを占めることから、位置的に区別可能である基質ポリヌクレオチドのことである。

【0070】

結合的及び場合によっては位置的にも区別可能な捕捉剤が使用される実施形態において、複数のバイオマーカーの検出が、単一のチャンネル又はその部分において実施されることが出来る。

50

【0071】

他の実施形態において、図1-6の装置のチャンネル(14)及び(16)は、分析チャンネルの全ての部分又はある部分において捕捉剤を含まない。それらの実施形態では、血液が、流動チャンネル(15)を通して流れることができ、チャンネル(14)における血漿の分離の後には、検体、特に生体分子が付着され、特に、チャンネル(14)及び/又は表面に吸収される。

【0072】

いくつかの実施形態において、付着された検体及び/又は捕捉剤標的の複合体の検出は、ラベル付きの分子によって実施され、それは、検出される捕捉剤標的の複合体(例えば、抗体、アプタマー、ペプチドなど)に特異結合できる分子及びラベル信号を提供するラベルを含む。そのラベル化合物は分子に付着している。本開示、特に実施例の部分を読んだ上で当業者が識別することができる手順に従って、そのラベル付き分子は、付着している検体及び/又は捕捉剤標的の複合体に接触し、基質上に付着した検体及び/又は捕捉剤標的の複合体に結合しているラベル化合物からのラベル信号が、次に、検出されてもよい。

10

【0073】

ここで複合体又は分子の化合物の成分として使用される「ラベル」及び「ラベル付きの分子」という用語は、放射性アイソトープ、蛍光色素分子、化学発光染料、発色団、酵素、酵素基質、酵素補助因子、酵素阻害薬、染料、金属イオン、ナノ粒子、金属ゾル、リガンド(ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン又はハプテンなど)及び類似物を含むが、それらに限らない検出可能な分子を示す。「蛍光色素分子」という用語は、検出可能な画像において蛍光発光を見せることが可能な物質又はその部分を示す。結果として、「ラベル信号」という用語は、放射性、蛍光発光、化学発光、酵素反応の結果としての化合物の生産など含むが、それらに限らないラベルの検出を可能にするラベルから放射される信号を示す。

20

【0074】

いくつかの実施形態において、蛍光発光に基づいた読み出しを通して検出方法が実施されることができ、そのラベル付き抗体は、小さい分子の染料、たんぱく質発色団及び量子ドットなどを含むがそれらに限らない蛍光色素分子でラベル付けされている。他の実施形態では、オンチップ検出が、蛍光発光に基づく技術とは異なる方法で実施されることができ、模範的な適切な技術は、比色検出、異なった色又は蛍光染料の酵素触媒の生産(異なった色ははっきりと異なる検体に関連している)、電子顕微鏡法を使用したミクロ粒子/ナノ粒子に基づく検出、AFM、又は暗視野顕微鏡法、磁性ミクロ/ナノ粒子を使用した磁性検出、電子検出方法を含む。

30

【0075】

いくつかの実施形態において、検出は、金又は銀の増幅へ続く金ナノ粒子に基づく検出などの、信号増幅を使用する方法によって実施されてもよい。特に、いくつかの実施形態では、ここで開示されている方法及びシステムのいずれにおいても、検出は、金ナノ粒子でラベル付けされた2次検出システムで実施することができ、以下で詳しく説明されるように、一般的な写真現像溶液が、金ナノ粒子を増幅することができる。また、読み出しが金粒子の暗視野分散から来る場合、単一の分子デジタル・プロテオミクスが可能になる。

40

【0076】

さらなる技術は、本開示を読んだ当業者によって識別されることができ、本開示ではさらに詳しくは考察されない。

【0077】

以下においてさらに詳しく説明される1つ又はそれ以上の標的及び/又は複数の標的が検出される実施形態において、ラベル付きの分子は、複数のラベル付きの分子で形成されることができる。各ラベル付き分子は、1つ又はそれ以上の標的/複数の標的を特異的に結合する分子及びその分子に付着されたラベル化合物を含み、そのラベル化合物は、ラベル信号を提供し、各ラベル付き分子は、検出可能な程度に他の分子から区別可能である。

50

【0078】

ここでラベル付き分子に関して使用される「検出可能な程度に区別可能」という用語は、分子に付着されたラベル化合物によって提供されるラベリング信号に基づいて区別可能である分子を示す。検出可能な程度に区別可能なラベル付きの分子を提供するために使用できる模範的なラベル化合物は、放射性アイソトープ、蛍光色素分子、化学発光染料、発光団、酵素、酵素基質、酵素補助因子、酵素阻害薬、染料、金属イオン、ナノ粒子、金属ゾル、リガンド（ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、又はハプテンなど）及び当業者が本開示を読んだ上で識別することができる化合物を含むが、それらに限定されない。

【0079】

結合的に区別可能な捕捉剤が使用される実施形態において、異なる検体は、各々が個別の対象検体に特異的である、検出可能な程度に区別可能なラベル付きの分子の使用によって検出されてもよい。

【0080】

いくつかの実施形態において、捕捉剤での標的の結合は、様々なチャンネルの流れ抵抗を調整し、分析チャンネルにおいて伝達される血漿要素における標的による捕捉剤の飽和被覆を制御する。特に、図1から3において例証的に説明されている装置において、溶液における検出可能な標的の与えられた濃度、及びチャンネル(14)及び(16)の表面上の捕捉剤の与えられた被覆に対して、検出可能な標的によってチャンネルに付着された捕捉剤の飽和被覆を有するのに必要な時間の大部分は、2つの因子によって決定される。

【0081】

第1因子は、標的と捕捉剤との間の相互作用（より強い相互作用は、より速い結合時間に至り得る）の強度である結合親和性によって与えられる。第2因子は、ある一定の標的が、血管容量を通して拡散し捕捉剤に結合する（標的拡散）ために必要とする時間である。ここで開示されている装置の方法及びシステムにおいて、流動条件は、特定のチャンネル又はその一部分において、結合親和性又は標的拡散が、その標的の捕捉剤への結合を様々な程度で制御するという条件を満たすように、制御される。

【0082】

例えば、流動条件が、溶液を含む標的がチャンネルの中を流れないように設定される装置において、チャンネル表面上の標的の捕捉剤への飽和被覆に達する時間は、その溶液における標的の拡散によって限られる。チャンネルの容積に依存して、標的拡散が飽和被覆を達成するために表面に固定された捕捉剤へ達する時間は、数十分から数時間もかかり得る。標的の捕捉剤への飽和被覆に達する時間が標的拡散によって限られている分析は、ここにおいて拡散律速過程としても示される。

【0083】

標的を含む溶液が、拡散時間スケールがもはや関係しないように、十分に速い流速でチャンネルの中を流れる他の実施形態では、標的と捕捉剤との間の相互作用（親和性）の強度のみが飽和被覆への所要時間を制限する。この制限において、飽和被覆への所要時間はわずか1-5分である。標的が捕捉剤へ飽和被覆に達する時間は、標的及び捕捉剤の結合親和性によって制限される分析は、ここにおいて親和性律速過程としても示される。

【0084】

本開示のいくつかの実施形態において、親和性律速過程は、捕捉剤の上の標的の濃度が常に基本的に一定であるように、流体が検出領域の上を十分に速い速度で流れるようにすることによって達成される。さらに具体的には、ここで開示されるいくつかの実施形態において、親和性律速過程は、流れ抵抗を、約0.5mm/sの流速を得るように調節することによって実施される。他の実施形態では、チャンネル(14)及び(16)における $>0.5\text{mm/s}$ の流速は、入口圧力をこの流速に達するまで調整することによって（それらの寸法に関係なく）得ることができる。図1-6において例示されているケースにおいて、チャンネル(14)は、チャンネル(16)に比較して非常に狭いことから、チャンネル(14)における流速は、チャンネル(16)よりもずっと速い。従って、親和性律速過程は、拡散律速過程がチャンネル(16)

において実行される間、チャンネル(14)において低圧でも実行されることが可能である。

【0085】

拡散律速過程及び親和性律速過程は、完了までの時間スケールの他にも複数の方法において異なり得る。

【0086】

拡散律速過程は、親和性律速過程よりも速度が遅い一方、より感度が高い。特に、拡散律速過程では、抗体などの捕捉剤は、溶液の容量あたりで、親和性律速過程よりも多くの検体に接触する。従って、より多くの検体が、拡散律速過程の場合、1単位あたりの溶液の容量において捕捉されることができ、特にサンプル濃度及び容量が低い場合に検出の感度が上がる。

10

【0087】

対照的に、親和性律速過程は、高濃度の標的などの、サンプルにおけるある一定の標的の迅速な検出を可能にする。特に、親和性律速過程は、高濃度及び容量のサンプルに含まれる、対象の標的の検出の場合に望まれる。それは、そのような対象の標的の親和性律速過程での検出は、1容量あたりに多くの検体をサンプリングする必要無しに、効率的に実施することができるからである。

【0088】

ハイブリダイゼーション速度(L_r)と拡散速度(L_m)との比であるダムケラー数(Da)は、過程が親和性律速又は拡散律速であるか決定するために使用されることが可能である。

20

【0089】

$$Da = L_r / L_m$$

ハイブリダイゼーション速度 L_r は：

$$L_r = k_a g_{fr}$$

によって与えられ、 k_a は反応速度定数であり、 g_{fr} は表面に結合された捕捉剤の平均密度である。

【0090】

拡散物質輸送速度 L_m は：

$$L_m = \text{cube root}[(UD^2)/(lwh^2)]$$

によって与えられ、 U は流動速度であり、 D は拡散定数であり、 l 、 w 及び h は、それぞれ長さ、幅及び高さである。 $Da \gg 1$ (10)のとき、反応が拡散速度よりも速く起こっていることから、過程は拡散律速である。 $Da \ll 1$ (0.1)のとき、拡散速度は反応速度に比較して速く、過程は親和性律速である。いくつかの実施形態において、幅広いチャンネル(16)は、 $Da \approx 10$ であるように設計されることができ、狭いチャンネル(14)は、適切な長さ、幅及び高さのパラメータを上記の式に入力することによって $Da \approx 0.1$ であるように設計されることができる。圧力は、適切な流速を得るために調節されることができる。

30

【0091】

当業者は、幅広いチャンネル $Da(Da1)$ が10であり、狭いチャンネル $Da(Da2)$ が0.1であるか理解し、これらの2つのチャンネルの Da 数の比は、 $Da1:Da2 \approx 100$ であるべきである。また、 L_r 、 h 及び D (拡散定数)は、狭いチャンネル及び幅広いチャンネルの両方において等しく、

40

$$Da1:Da2 = Lm2:Lm1 = \text{cube root}(U_2 l_1 w_1 / U_1 l_2 w_2)$$

であり、 $Lm1$ =幅広いチャンネルにおける物質輸送速度であり、 $Lm2$ =狭いチャンネルにおける物質輸送速度である。

【0092】

いくつかの実施形態において、各狭いチャンネル(14)は、幅広いチャンネル(16)の流速の1/5である流速を持つことができ、従って、 $U2=1/5U1$ であり、狭いチャンネル及び幅広いチャンネルの長さはしばしば、およそ等しい。それらの実施形態では、数式は：

$$Da1:Da2 = \text{cube root}(w_1/5w_2)$$

と簡略化されることが可能である。

50

【 0 0 9 3 】

当業者は次に、1つのチャンネルにおける拡散限度及び他のチャンネルにおける親和性限度を得るのに必要な幅広いチャンネル：狭いチャンネルの比を得るため、 $w1/w2$ を解くことができる。

【 0 0 9 4 】

しかし、ダムケラー数は、結合過程による流速への依存を考慮していない。従って、流速依存性の計算が望まれる実施形態において、さらに適切なモデルは、ツインマーマン・モデル (Zimmerman model) である。

【 0 0 9 5 】

以下の段落において非特許文献 8 からの一節を述べる。

10

【 0 0 9 6 】

「時間 t における液体の流れは、速度ベクトル場 u 、圧力 p 及び密度 ρ によって特徴付けられる。層流に対して、非圧縮性及び粘性の流体速度は一定である。その流れは、ナビエ・ストークス偏微分方程式によって無次元形状において説明され

【 数 2 】

$$\frac{\partial u}{\partial t} + (u \cdot \text{grad})u + \text{grad} p = \frac{1}{Re} \Delta u + g \quad (1)$$

【 数 3 】

$$u \cdot n = 0 \quad (2)$$

20

レイノルズ数は Re であり外力は g である。重力などの外力は、そのような小型システムでは無視する。 $Re \ll 200$ の条件下では、流れは層流として考慮され、チャンネルの壁で流速がゼロになり、該チャンネルの中央で流速がピークである特性放物線流れプロファイルを有する。ここでは、 Re は、最大流速が考慮されると ~ 0.07 である。

【 0 0 9 7 】

与えられた溶液における溶質のバルク濃度は、以下の伝達 - 拡散の数式によって説明される。

【 数 4 】

$$\frac{\partial C}{\partial t} + u \cdot \text{grad} C = D \Delta C + \theta(f, x, y, C)$$

30

拡散係数は D であり、ソース項は θ であり、同一速度ベクトル場は数式 (1) において与えられた u である。ストークス・アインシュタインの関係

【 数 5 】

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

を、流体力学半径 R_h 、検体粘度 η 及びボルツマン定数 k で適用し、検体分子の拡散係数 D を、 $D=10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ として見積もり、その値は全てのさらなる計算に使用され、 $\text{TNF}\alpha$ - などの小さい分子に対する同程度の値が報告されている文献 (Metsamuronen et al., 2002) に対応する。検体粘度は、高血漿粘度 (Koenig et al., 1998) の $2 \text{mPa} \cdot \text{s}$ に設定された。

40

【 0 0 9 8 】

捕捉位置からの結合及び分離は、速度定数 k 、検体濃度 C 及びその表面上の自由結合位置 ($\theta_{\max} - \theta_t$) によって説明され、一価受容体及びリガンドに対して以下の形の常微分方程式を使用する。

【数 6】

$$\frac{d\Theta_i}{dt} = k_{on} C (\Theta_{max} - \Theta_i) - k_{off} \Theta_i$$

k_{on} は、結合に対する速度定数であり、 k_{off} は、分離に対する速度定数であり、 C は流体における自由分子の濃度であり、 Θ_i は、時間 t における表面密度であり、 Θ_{max} は、個別の捕捉分子のフィーチャー・エリアから計算される分子の最大表面密度であり、それは時間と共に一定であると推定される。このシミュレーションにおいて、我々は一般的に、 k_{on} には $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 及び k_{off} には $10^{-3} s^{-1}$ を使用した（Santora et al., 2001）、いくつかの場合においてこれらの定数は修正される。」 10

（原文 “The flow of a liquid in a region over time t is characterized by a velocity vector field u , a pressure p and a density ρ . For laminar, incompressible and viscous fluids the velocity is constant. The flow is described by the Navier-Stokes partial differential equation system

【数 7】

$$\frac{\partial}{\partial t} \vec{u} + (\vec{u} \cdot \text{grad}) \vec{u} + \text{grad } p = \frac{1}{Re} \Delta \vec{u} + \vec{g} \quad (1)$$

20

【数 8】

$$\text{div } \vec{u} = 0 \quad (2)$$

in dimensionless form with the Reynolds number Re and external forces $\vec{g}$. External forces such as gravity can be neglected in such miniaturized systems. For $Re \ll 2100$, flow is considered to be laminar and has a characteristic parabolic flow profile with zero flow velocity at the channel walls and peak flow velocity in the channel center. Here, Re is ~ 0.07 for the maximum flow rates considered.

30

The bulk concentration C of a solute in a given solution is described by the Convection-Diffusion equation of the form

【数 9】

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \vec{u} \cdot \text{grad } C = D \Delta C + \Theta(t, x, y, C)$$

With a diffusion coefficient D , a source term Θ and the identical velocity vector field u given in equation (1). We have applied the Stokes-Einstein-relation

40

【数 10】

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

with the hydrodynamic radius R_h , the analyte viscosity η and the Boltzmann constant k to estimate the diffusion coefficient D of the analyte molecule to $D=10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ which we used for all further calculations and which corresponds to the literature (Metsamuronen et al., 2002) where comparable values for small molecules such as $\text{TNF}\alpha$ are reported. The analyte viscosity was set to a high plasma viscosity (Koenig 50

et al., 1998) of 2 mPa s.

The association and the dissociation from the capture site are described by the rate coefficients k , the analyte concentration C and the density of free binding sites ($\Theta_{\max} - \Theta_t$) on the surface, using an ordinary differential equation of the form,

【数 1 1】

$$\frac{d\Theta_t}{dt} = k_{on} C (\Theta_{\max} - \Theta_t) - k_{off} \Theta_t$$

10

for monovalent receptors and ligands. k_{on} is the rate constant for association, k_{off} is the rate constant for dissociation, C is the concentration of free molecules in the fluid, Θ_t is the surface density at time t , $\Theta_{\max}$ is the maximum surface density of molecules calculated from the feature area of the individual capture molecules and is assumed to be constant over time. In this simulation we generally used $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ for k_{on} and 10^{-3}s^{-1} for k_{off} (Santora et al., 2001), but in some case these constants were modified.”)

20

(非特許文献8)

いくつかの実施形態において、ツインマーマン節からの数式は、親和性律速過程vs拡散律速過程と関係がある流速を決定するために、使用することができる。特に、ツインマーマンの数式を組み込むシミュレーション、検体濃度の1pM及び抗体結合親和性の $K \sim 10^9$ 、及びフィーチャー・サイズの 1500nm^2 を使用し、 0.5mm/s よりも速い流速は、親和性律速と考えられる一方、 0.005mm/s 付近の流速は、拡散律速と考えられる。さらに具体的には、 0.05mm/s の流速は、拡散律速過程の始まりと考えられる。結果として、10倍-100倍の流速の相違は、拡散律速型と親和性律速型との間で識別される。

【0099】

従って、同じ装置の分析チャンネルにおける拡散律速過程及び親和性律速過程が望まれる一定の実施形態において、親和性律速過程は、拡散律速領域（長さに関わらず、全ての高さは一定である）よりも約10-100倍狭く、親和性律速領域（血漿チャンネル）の特定の寸法も分離効率（場合によっては収率及び流速によって最適化される）によって影響される（上記及び付録A参照）。いくつかの実施形態において、血漿チャンネルの中の流速は、それらのチャンネルを通る流体が約 0.5mm/s の速度（親和性律速型）で移動するまで、圧力を増やすことによって簡単に調節できる。いくつかの実施形態において、幅広いチャンネル(16)が狭いチャンネル(14)の合計した幅よりも約10-100倍幅広い限り、流速は、約 0.05 - 0.005mm/s である（拡散律速型）。他の実施形態において、狭いチャンネル(14)は、 $10 \mu\text{m}$ であり、全てを含めた幅が $50 \mu\text{m}$ である場合、そのようなチャンネルは5個ある。いくつかの実施形態において、幅広いチャンネル(16)は、流速の10倍の減少を得るために幅 $500 \mu\text{m}$ であってもよい。チャンネル(16)の幅が 2 - 5mm に増加した他の実施形態では、装置の領域(16)は、いまだに拡散律速型（ 0.005mm/s ）の範囲内である。

30

40

【0100】

本開示に従って、チャンネル又はその部分、特に分析チャンネル(14)及び(16)は、チャンネル幅を変えることによって拡散律速過程又は親和性律速過程のいずれか一方を実行するように設計されてもよい。

【0101】

特に、いくつかの実施形態において、チャンネルは、捕捉剤と流体成分における標的との結合が親和性律速過程であるように、設計される。例えば、実施形態において模範となるように説明されている図1-6において、チャンネル(14)及び(16)は、連続していることから、質量保存によって等しい容積流量率を有する。従って、それらの実施形態において

50

、チャンネル(14)がチャンネル(16)よりもずっと狭い場合（例えば50-1000x）、流速は、それらの容積流量率が等しくなるように、チャンネル(14)の中においてチャンネル(16)よりも速い。この速度差は、検体使用及び2つのチャンネル間の結合効率における相違に至る。上記の数式から、チャンネルの l 、 w 及び h の変更が、 Lm の項を増やす又は減らすために使用され、従ってダムケラー数を増やす又は減らすことが明確である。 L 、 w 及び h は、親和性律速過程を得るために、ダムケラー数を1よりもはるかに下の数に減らすように増やされ、拡散律速過程を得るためには、ダムケラー数を1よりもはるかに上の数に減らすように増やされる。

【0102】

特に、図1-6において例示されている装置などにおいて、チップ上に2つの血漿分析領域(14、16)が異なった目的のために付けられる。チップが血漿を全血から分離するために操作される場合、血漿は、細いチャンネル(14)の中を速く流れるが、貯留層(16)の中はゆっくりとだけ流れる。従って、(14)が血漿タンパク質のレベルを測定するために使用される場合、そのような分析は、親和性律速過程となり、標的の表面に結合した捕捉剤への飽和被覆は、数分で完了できる。対照的に、(16)が血漿タンパク質のレベルを測定するために使用される場合、その領域の血漿の流れは遅く、過程は拡散律速であるが、比較的より感度が高い。

【0103】

特に、図1-6において模範となるような実施形態において、検出領域(11)において最も速い流速は、血漿チャンネル(14)においてであり、従って、最も良い結合効率はこの領域で起こることから、単位面積における信号はここで最も高い。速度は、入口圧力を増やすことによってこの領域において増やされる。

【0104】

図1-6の説明において、チャンネル(14)は、チャンネル(14)における速度が所定の圧力に対してしきい値の速度（例えば0.5mm/s）を超えるように、チャンネル(16)よりもはるかに狭い一方、チャンネル(16)は十分に幅広く、流速はしきい値の下である。しきい値速度は、拡散律速と親和性律速との間の遷移における流速である。

【0105】

チャンネル(14)及び(16)の実施形態は、図2においてさらに詳細に説明されている。図2において説明されている実施形態において、血漿チャンネル(14)はチャンネル(15)に関して高い抵抗を達成するために細長いことから、血漿分離を達成する。図2の5個の血漿チャンネル(14)の寸法は、幅約10 μ m、長さ約25mmである。チャンネル(16)は幅約500 μ m及び長さ約10mmである。チャンネル(15)の長さは100 μ mでもよい。

【0106】

いくつかの実施形態において、チャンネル(15)の幅は約20-40 μ mの範囲にあり、それらの実施形態では、血液などのサンプルの目詰まりはかなり減少する。

【0107】

血液が、針による採血の直後に抗凝固剤で処理され、そのサンプルが、即時に血液注入口に送られるいくつかの実施形態において、その装置は、詰まらずに何時間もの長い間作動できる。いくつかの実施形態において、選択された試験用設計に従って、特に上記の最適化された分離のための範囲においてチャンネル寸法が一度決定されると、収率及び分析のタイミング、チャンネル(15)の幅は、可能な目詰まり効果を低減するために増やされる。例えば、血液サンプルでは、チャンネル(15)の幅は15 μ mから25 μ m、35 μ mに増やすことができる。望まれる幅は、装置のチャンネルを詰まらせることがあり得る粒子の寸法を考慮して選択されてもよく、望まれる分離効率及び検出設定が考慮される。上記のチャンネル(15)の模範的な幅は、粒子及び特に0-25 μ mの範囲のサイズを持つ細胞凝集体を示す。

【0108】

いくつかの実施形態において、領域(14)におけるチャンネルは長さ約5mmである。他の実施形態において、血漿チャンネルは約15-25mmに伸ばされ、検出器の上を流れる細胞数

を最小限にし、その検出領域における生物付着又は信号干渉の可能性を低減する。

【0109】

実施形態において、全ての血漿チャンネルは、長さに関わらず幅約10 μ m及び高さ約10 μ mに設計されている。より高い高さ(例えば15-20 μ m)も装置の性能に影響せずに使用できる。それらの実施形態において、血漿分離は、チャンネルの長さが5 μ mから15 μ m、25 μ mへと増やされて改善した。

【0110】

ここで開示されている装置、方法及びシステムにおいて、チャンネルは、ここで説明されているようにチャンネル(15)からチャンネル(14)までの血漿分離を制御し、親和性律速過程又は拡散律速過程を実行するように構成された所定のチャンネル又はそれらの部分を有するように設計されることが可能である。それらの実施形態において、寸法は、装置の分析チャンネルにおいて実施される血漿分離及び反応を制御するように最適化される。

10

【0111】

いくつかの実施形態において、装置全体においてチャンネルの高さは、一定(約10 μ m)に保たれ、血漿チャンネル(14)(親和性律速領域)の幅は、約10 μ mに保たれ、チャンネル(16)の幅はチャンネル(14)の10-100倍に保たれる。

【0112】

他の実施形態は、当業者が本開示を読んだ上で識別することができ、また、計算された親和性律速の速度と拡散律速の速度との間のn倍の差(ツィンマーマン・モデルの数式に基づいて)を考慮して血液以外のサンプルに適用することも可能であり、幅広い血漿チャンネル(16)は狭いチャンネル(14)よりもn倍幅広く設計されるべきである。

20

【0113】

図3は、チャンネル(15)、(14)及び(16)が、血液注入口(12)、溶解注入口(17)、1次試薬注入口(18)、ラベル付き分子注入口(19)及び全血排出口(10)などの装置の他の部分に関連して説明されている。

【0114】

いくつかの実施形態において、血液サンプルが血液注入口(12)に導入され、流動チャンネル(15)の中へ送り込まれる。血漿は次に、分析チャンネル(14)及び(16)の中に分離され、該チャンネルの中では、バイオマーカーが検出可能な複合体において選択された捕捉剤で接触され結合されている。

30

【0115】

全血が全血排出口(10)を通して排出される。溶解緩衝剤がまた、溶解注入口(17)に含まれており、血液細胞を溶解することによって全血の目詰まりを防ぐ。ラベル付きの分子(例えば、2次抗体)が、ラベル付き分子注入口(19)の中に、分析チャンネル(14)及び(16)における検出可能な複合体を検出するために加えられてもよい。

【0116】

図3において示される注入口の各々は、主要注入口制御弁を閉鎖し、気泡が8個の装置のいずれかの中へ流れ込む前にそれらを除くために、サブ注入口の溶液が注入口(6)から流出することを可能にすることによって準備される。装置の各々は、この設計において、8ポイントまでの血清蛋白質の発現が患者又はマウス・モデルから得られるように、独立して作動してもよい。

40

【0117】

異なる数の注入口を含めた様々な実施形態を想定することができる。1つの実施形態において、全ての装置が、以前述べられたように共通の注入口によって接続され、緩衝剤及び試薬は、1つの共通注入口から全ての装置へ運搬されることができる。もう1つの実施形態において、注入口を個々に持つ完全に独立した多数の装置が、同じフレームの中に入ることができる。他の実施形態では、複数の装置が1つのフレームの中に入れられ、全ての装置が共通の緩衝剤/試薬を有し、各装置は独立した血液/サンプル注入口をそれぞれ有する(サンプルの交差汚染を防ぐため)。

【0118】

50

他の可能な実施形態において、装置は、複数の血漿分離チャンネル(14)（例えば2から>100まで）及び／又は血液分離が実施される前及び後に装置の中へ試薬を導入するための追加のチャンネルを有することができる。例えば、いくつかの実施形態において、様々な試薬（捕捉、検出、ブロッキング、洗浄剤など）が、細長い、抵抗の高い血漿チャンネル(14)を通して試薬を流されるよりもむしろ、チャンネル(16)に直接流体的に連通しているチャンネルの中へ導入される。それらの実施形態において、血漿チャンネルの領域(16)における試験／分析時間及び領域(14)における詰まりを低減することができる。

【0119】

他の実施形態において、捕捉剤、検出剤、及び他の当業者によって識別され得る試薬を含む試薬は、各流体を連続的に個別に流すよりもむしろ、装置の中へ導入される前にサンプルと混合される。

10

【0120】

いくつかの実施形態において想定できる追加のチャンネルは、図3の溶解チャンネル(17)などの溶解緩衝剤チャンネルを含む。該チャンネルは領域(13)に入り、排出口（及び／又はポスト13貯留層）の細胞による目詰まりを防ぐために細胞を溶解し、作動時間を増やすように援助する。排出口に近い溶解している細胞は、結果的に装置の故障につながる、時間とともに増加する排出口の抵抗を最小限に抑え、その装置の寿命を伸ばす。

【0121】

他の実施形態は、分離領域チャンネルの前、特にチャンネル(15)の前にオンチップ・チャンネル及び反応体を含んでもよく、血液を、分離領域に入る前に前処理してもよい。これらのチャンネルは、全血が入るときに希釈するための希釈緩衝剤；他の緩衝剤；抗凝固剤；生体溶液及び流体；たんぱく質、DNA、RNA又は他の生体分子の溶液；及び化学試薬、オイルなどを収納してもよい。これらの試薬が - 混合又は混合無しで - 血液へ追加されるため又は - 混合又は混合無しで - 他の免疫測定段階への追加のためにチャンネル及びチップ上の貯留層に収納されてもよい。全血、分離された血漿又は免疫測定試薬の、お互い又は上記で述べられた若しくは述べられていない如何なる添加剤のいずれか一方とのオンチップ混合には、微小機械的に制御される蠕動ポンプによって駆動されるオンチップ回転式混合器が使用されてもよく（例えば、非特許文献9に記載されている装置を参照）、そのポンプは、領域(15)、(13)、(14)又は(16)に近接している。あるいは、他の如何なる最先端のマイクロ流体混合要素が使用されてもよい：ニシンの骨；交差している／ジグザグのチャンネル；拡散に基づく混合のための細いチャンネルなどである。

20

30

【0122】

他の実施形態は、装置におけるサンプル又は試薬の導入及び循環を可能にする又は改善する特定の要素を含むことができ、それらは：サンプル及び／又は試薬に外的圧力を加えるためのポンプ、装置における1つ又はそれ以上の流体に機械的なプッシング（pushing）を加えるための装置の注入口にプラグを持つピストン、チップ上の蠕動ポンプ、チップ出口に真空を加える装置、電動学的輸送及び／又はチャンネルの中へ流体を送るために力を加える他の器具を提供する装置、を含む。

【0123】

他の実施形態は、ポリヌクレオチド（例えばDNA又はRNA）の拡大のためにオンチップ（ポスト14又はポスト16）の追加の分析チャンネル／モジュール又は血液、血漿又は血清の信号検出の改善のためにポリペプチド（例えばたんぱく質）を含むことができる。これらは、PCR、RI-PCR、免疫学的PCR、RCA、ナノ粒子に基づく生体バーコード検出などを実施するオンチップ・モジュールを含んでもよい。それらの実施形態において、検出及び／又は特定の標的の量子化は、PCR及びRT-PCR単位複製配列、ナノ粒子検出におけるバーコードDNA及び又はたんぱく質、RNA、DNA、及び／又はそれ以外の他の代理／交代の生体分子であり、既存の捕捉剤によって捕捉可能であり、それ以外の生体分子の存在を示唆する生体分子、のモジュールにおける捕捉を通して実施されることが可能である。分析チャンネルを含む模範的な装置が図4に示されており、チャンネル(171)は、PCR、RT-PCR又は免疫学的PCRが実施されることが可能なチップの流動層の領域を示す。図3Aの模範的な実施形

40

50

態において、DNA生成物は、次に、領域(16)におけるDNA捕捉鎖によって検出されることができる。

【0124】

いくつかの実施形態において、1つの装置における分析段階が、他の装置よりも早く完了するように、複数の装置が同じフレームの中に含まれ、特に、多数の分析を実施するようになっている。それらに実施形態において、制御弁が領域(13)及び/又は(16)の端部の装置に含まれ、分析チャンネルの逆流及び汚染を最小限に抑える。さらに具体的に、いくつかの実施形態では、分析段階の最後に弁がオンになり、装置が次の段階の準備をする間に流体の動きを停止するように、分析段階の間の流体の動きを制御するための機構が含まれてもよい。それらの実施形態のいくつかでは、領域(13)の端部の弁が、領域(13)を通る試薬の流れを最小化するように、試薬が分析チャンネル(14)及び(16)だけを通して輸送されることを可能にする機能を持つことを可能にし、分析チャンネル(14)及び(16)の中への試薬の輸送を最大にする。模範的な制御弁が図5において示され、制御弁(113)及び(116)が概略的に説明されている。

10

【0125】

領域(15)の上流側の制御弁がまた、同じフレームに含まれる複数の装置の各々に含まれてもよい。それらの実施形態では、制御弁は、サンプル及び試薬が制御された方法でのみ装置に入ることができるように開放されてよく、そのフレームにおけるサンプルの共通注入口領域又は他の分析装置の中への逆流を最小にするために閉鎖されてもよい。この弁の模範的な概略図が図6において示され、弁(112)及び(115)が表わされている。

20

【0126】

複数の装置が同じフレームに含まれる実施形態において、その装置の多数の注入口(例えば6個)によって供給される共通のチャンネルを作動させる追加の制御弁が、また、含まれることができる。この弁は、サンプル及び緩衝剤を装置の中へ流す前にそれらを準備することを可能にするため及び気泡を最小限に抑えるために閉鎖されることが可能である(図6参照)。

【0127】

いくつかの実施形態において、捕捉剤が1つ又はそれ以上の成分を含む。特に、いくつかの実施形態において、捕捉剤は、ここで全体として組み入れられる米国特許出願番号11/888,502号(特許文献1)に記載された技術(ここでDEALとしても識別される)の適用においては、基質ポリヌクレオチド及びポリヌクレオチドでコードされたたんぱく質で形成されてもよい。

30

【0128】

それに応じて、ここで使用されている「基質ポリヌクレオチド」という用語は、その相補的ポリヌクレオチドに結合する能力を維持するように基質に付着されたポリヌクレオチドを指す。基質ポリヌクレオチドは、特に、特異的に結合することから、ポリヌクレオチドでコードされたたんぱく質のコード・ポリヌクレオチドで相補的であるとして定義される配列を含む。

【0129】

「ポリヌクレオチドでコードされたたんぱく質」という用語は、特異結合をすることから、そのたんぱく質成分に付着されている標的及びコード・ポリヌクレオチドに相補的として定義されるたんぱく質成分を含むポリヌクレオチド-たんぱく質複合体を示す。いくつかの実施形態において、たんぱく質に付着されたコード・ポリヌクレオチドは、たんぱく質特異的である。それらの実施形態は、他のたんぱく質、サイトカイン、ケモカイン、小さい分子、DNA、RNA、脂質などを検出するためにたんぱく質特異的な相互作用を使用する分析を実施するために、標的が知られている場合はいつでも使用され、その標的の高感度な検出が必要とされる。ここで使用される「ポリヌクレオチドでコードされた抗体」という用語は、たんぱく質成分が抗体である、ポリヌクレオチドでコードされたたんぱく質を示す。

40

【0130】

50

ここで開示されているポリヌクレオチドでコードされたたんぱく質において、各たんぱく質は、所定の標的に特異結合することから、それに相補的であるとして定義され、各コード・ポリヌクレオチドは所定の基質ポリヌクレオチドに特異結合をすることから、それに相補的であるとして定義される。

【0131】

たんぱく質が抗体である実施形態において、たんぱく質 - 標的の相互作用は、抗体 - 抗原相互作用である。たんぱく質が抗体でない場合、その相互作用は、当業者が本開示を読んだ上で識別することが可能な受容体 - リガンド、酵素 - 基質及び追加のたんぱく質 - たんぱく質相互作用である。例えば、たんぱく質がストレプトタビジンである実施形態において、たんぱく質 - 標的相互作用は、受容体 - リガンド相互作用であり、その受容体は、自由な又は生体分子のいずれかに付着されたストレプトタビジンであり、そのリガンドは自由な又は生体分子のいずれかに付着されたビオチンである。

10

【0132】

ここで開示されているDEALのチップへの適用に関連する利点は多種多様である。第1に、ポリヌクレオチド・ハイブリダイゼーションが、組み立て法として使用されるという事実は、複数のたんぱく質が同じマイクロ環境内で検出されることを可能にする。それは、はっきりと異なるたんぱく質用の捕捉剤の各々は、異なったポリヌクレオチド・オリゴマーの1本鎖でラベル付けされることが可能だからである。第2に、抗体は、比較的狭い塩濃度(pH)及び温度の範囲内において安定しており、それは、抗体が付着される表面は、乾燥及び加熱に面した場合、頑丈でないことを意味する。従って、抗体は一般的に使用の直前に表面に付着されなければならない。抗体の不安定性は、また、その抗体がマイクロ流体製造過程で生き残ることができないため、たんぱく質分析をマイクロ流体環境内で実行することを困難にする。ポリヌクレオチド・ハイブリダイゼーションを組み立て法として使用することは、ポリヌクレオチドが製造条件下において安定していることから、これらの問題を回避し、ポリヌクレオチド模様の表面は、より早く備えられ、乾燥され、加熱され、必要な場合は送り出される。本開示において、血清テストにおいて使用される13たんぱく質のパネルは以下のように設計された。

20

【0133】

抗体がポリヌクレオチドに結合されているいくつかの実施形態において、SANH及び抗体の化学量論的割合は、各抗体 - ポリヌクレオチド結合反応に対して修正 / 最適化されることができる。同じSANH：抗体の比が、全ての結合反応においてわずか数個の結合が使用されているパネルにおいて使用された場合（非特許文献10）、いくつかの抗体には、ごく少数のポリヌクレオチドが残るか又は何も残らなく、他は過剰になる。それらの実施形態において、SANH：抗体の比は、従って、SANH濃度の範囲を示し、次にゲル電気泳動によって各抗体に付着されたポリヌクレオチドの数を決定することによって、各抗体に対して最適化されることができる。

30

【0134】

分析チャンネル上の異なるスポット / 縞の間でのクロストークを最小限に抑えるために、複数の基質ポリヌクレオチドがその分析チャンネルに付着された、いくつかの実施形態において、基質ポリヌクレオチドのうちの1つだけに相補的である配列を有するDNAなどの、染料で結合されたポリヌクレオチドが、試験用設計を考慮して事前に決定されたしきい値よりも高い信号を提供する配列を除くために、その装置を通して実行されてもよい。例えば、いくつかの実施形態において、相補的な配列の4%よりも高い信号を与える非相補的な配列は、除外されている。それらの実施形態において、基質ポリヌクレオチドの選択は、試験用設計に従って交差活性を最小限に抑えるように最適化されている。

40

【0135】

いくつかの実施形態において、分析チャンネル上の異なるスポット / 縞の間でのクロストークをさらに最小限に抑えるために、ポリヌクレオチドで結合された抗体が、結合の後にそれらの特異性を維持することを確認することは重要であった。従って、ポリヌクレオチドで結合された、特異性を維持する抗体を最大にするために、制御分析が実行された。

50

特に、制御分析において、緩衝剤において希釈された単一の組み換え型基準が、オンチップDEAL検出アレイにおいて実行されることが可能である。組み換え型に対して特異的な1つとは異なるスポット/縞が検出可能な信号を示す場合、関連する抗体/DEAL複合体は、将来的な使用から除外される。

【0136】

いくつかの実施形態において、同じ検出領域内において検出可能なダイナミックレンジを増やすためには、スライド・パターン形成の間のDNA負荷を変化させることができる。特に、フェムト・モル - ピコ・モルの範囲における濃度で観測されるサイトカインなどの低濃度の検体に結びついているポリヌクレオチドは、非常に高い負荷濃度でパターン形成がされることが可能な一方、ミリ・モルの範囲で生じるアルブミンなどの高濃度の検体に

10

【0137】

いくつかの実施形態において、DEAL捕捉剤は、類似した血液濃度の検体へ同じレーンにおいて付着されており、複数の装置が同じフレームに含まれ、各装置は、類似した濃度範囲内において検体を測定する。例えば、1つの装置はサイトカインのみを測定し、一方、もう1つの装置は、存在量の高いたんぱく質（アルブミン及びフェブリノゲンなど）のみを測定する。それらの実施形態において、全ての装置は、共通の注入口によって接続されることができることから、同じ血液サンプルがそれらの検出領域において同じ表面ポリヌクレオチド・パターンを維持することができるが、異なる抗体は、相補的なポリヌクレオチドに結合される。

20

【0138】

いくつかの実施形態において、DEAL法に従った捕捉剤を含むがそれだけに限らない捕捉剤、アレイが、マイクロアレイ・パターン形成器を使用して個別のスポットとして、又は個別のマイクロ流体モールドを使用して捕捉剤バーコードとしてのいずれか一方でパターン形成されることができ。バーコードのパターン形成に関する追加の詳細は、2008年7月16日に出願された“Arrays, Substrates, Devices, Methods and Systems for Detecting Target Molecules”と題する米国特許出願において説明されており、出願番号はこの時点では割り当てられておらず、ここに全体として組み入れられる。

30

【0139】

従来のスポットティングに比較して、バーコード法は、より小さいフィーチャー・サイズ及びより高いフィーチャー密度、より高い情報密度及びより高い分析感度に移行する機能、を可能にする。

【0140】

バーコードされたパターンの模範的な説明が、図2におけるチャンネル(16)の設計によって提供されている。特に、図2の実施形態において、チャンネル(16)は、その下のガラス上にパターン形成されたバーコードの4回の繰り返しに対応するには十分に長い（図11及び以下の関連する記載を参照）。

【0141】

バーコードされた分析チャンネルを含むさらに模範的なチップが、図7の概略的説明において表わされている。その略図において、全血が、注入口(32)から全血排出口(30)への下流側へ流れる一方、個別の血漿が流動チャンネル(35)において、図1-3の装置のチャンネル(14)及び(16)にそれぞれ対応する親和性分析チャンネル(344)及び拡散分析チャンネル(346)を含む狭い分析チャンネル(34)の中へ右に流れる。血漿は、結果的に、コードされたDNAアレイ、試薬の入口(37)、試薬の排出口(39)及び制御弁(38)の範囲にわたる、より幅広いチャンネルの中へ出る。

40

【0142】

図7の説明において、マイクロ流体ネットワークが、無細胞の血漿チャンネル領域が捕捉剤のアレイに重なるように整列されている。上記の設計において、6個のサブ注入口が、6個まである個別の流体の1つが、1つずつ装置の中へ注がれるように、適切なサブ注入

50

口制御弁を作動させることによって、主要注入口へと注ぐ。これは本開示に必要ではないが、操作のし易さ及びチップ操作の柔軟性の両方を追加する。

【0143】

ここで開示される装置は、開示されている様々な手順に従って製造される。図8は、スポッティング（パネルA）、パターン形成（パネルB）及びマイクロ流体チップのシーリング（パネルC）を含む図1-6の装置を製造するための模範的な過程を示す。図8の説明において、チップの基板は支柱又は基盤層(20)である。いくつかの実施形態では、基盤層(20)は、当業者によって知られている技術で基質に成形されたガラス又は滑らかなプラスチックなどの透明で滑らかな物質で形成されている。たんぱく質捕捉剤のアレイは、次に、多数の既知の方法のいずれかを使用して基質の表面上にスポッティングされる（パネルA参

10

【0144】

いくつかの実施形態において、捕捉剤が1度堆積されると、血漿を全血から分離するためのマイクロ流体設計を含むチャンネル層(22)は、基盤層(20)の上に堆積される（パネルB参照）。そのチャンネル層は、基質(20)の基盤部分として、チャンネルの壁を形成するように設計される。チャンネル層(22)は、支柱(29)とチャンネル層(22)との間の流体の漏洩が最小限に抑えられ、流体がチャンネル(15、14、16)の中だけを流れるように支柱(20)に固定される。

20

【0145】

いくつかの実施形態において、整列マーカは、捕捉剤スポット(21)に沿って共に溶着されることが可能である。整列マーカは、支柱(20)（例えばガラス・スライド）の上に置かれた／堆積されたフィーチャー(feature)であり、装置を支柱(20)上で選択された位置に正確にそろえるために、その装置に相補的な位置で堆積される。それらの実施形態において、たんぱく質捕捉剤スポットの個々のセット(21)は、基盤層(20)の表面上に任意にパターン形成される。そのパターン形成過程が、独立して、望まれる検出領域が少なくとも1つのはっきりと異なるスポットのセットを、基盤層(20)の上の装置の位置を個別に覆うように、捕捉剤スポットの密度を生成する限り、チャンネル層(22)上のチャンネルと捕捉剤スポット(21)との整列は、任意的である。これは、図8の例において、各分析チャンネル

30

【0146】

チャンネル層(22)及び基盤層(20)はまた、エッチング加工されたガラスのウエハー又は成形ポリマー物質などの同じ物質から製造されてもよい。たんぱく質捕捉剤のアレイは、次にチャンネル上にスポッティングされる。しかし、そのような方法は、細いマイクロ流体チャンネル(14)は通常、ほとんどの捕捉剤スポッティング法の解像度よりも小さい（幅10から20 μm ）ことから、実施するのが難しいと予測されている。上部層(23)は次に、チャンネル領域を除いて、流体が層の間の間隔において流れることができないように(22)の上に密閉される(パネルC)。

40

【0147】

他の実施形態において、チャンネル層(22)及び上部層(23)は同じフィルムから形成されてもよく、その上部層は次に、基盤層(20)上に結合されてもよい。しかし、上部層(23)は、チャンネル層(22)と共に位置し、同じ物質から形成されている又は異なる物質で形成されてあろうとなかろうと、上部層(23)は、全血及び血液老廃物用及び(16)の上の穴用に圧

50

力の上昇無しに血漿が流れることを可能にするために、入口穴及び出口穴が備えられてもよい。

【0148】

いくつかの実施形態において、表面(14、15、16、22、23)の捕捉剤で覆われていなく、血液又は血清のいずれか一方にさらされているチャンネルの1部分は、ウシ血清アルブミン、ポリエチレン・グリコール物質又はその他の無特定たんぱく質吸収に抵抗する物質などの抗汚物質で覆われている。

【0149】

いくつかの実施形態において、分析チャンネルは捕捉剤でスポットティングされている。他の実施形態において、それらはパターン形成され、特にバーコードでコードされている。特に、いくつかの実施形態では、チップは(相補的な)DNAのラベルが付けられた抗体又は他の捕捉剤を結集するためのパターン形成されたDNAアレイを含む。チップが一度完全に結集されると、DNAのラベル付きの捕捉剤は、捕捉剤をマイクロ流体チャンネルの中へ流し、DNAハイブリダイゼーションを通して特定の位置に結集させることによって、DNAアレイに結集される。

10

【0150】

図9の概略的説明において示され、例2、4及び5において例示されている過程は、ここで開示されている装置において使用されるたんぱく質アレイの簡単な前処理を可能にする。抗体は、昇温又は脱水状態では安定していない。それらの条件の両方が、マイクロ流体チップが製造され組み合わせられるときに適用できる。DNAは対照的に、緩やかな昇温(〜100-150)及び脱水状態において安定している。

20

【0151】

いくつかの実施形態において、チップは、ガラス又はプラスチックなどの一般的で安価な物質を使用してパッチ製造される。

【0152】

いくつかの実施形態において、チップは、動作部分及び電気入力及び出力を有していなく、そのチップは、全体的に流体力学的流動設計に依存し、血漿を血液から分離し、その血漿からのたんぱく質レベルの測定を利用する。

【0153】

いくつかの実施形態において、非DEAL捕捉剤(例えば捕捉剤溶液において)が、血液分離マイクロ流体装置を支柱に結合させる前にその支柱にパターン形成されることができ。データ裏づけの無い実施例において、少なくとも2つのはっきりと異なる抗体又は他のたんぱく質捕捉剤が(例えば抗原)、図5の基盤層(20)などのスライドの上に、空間的に別個又は非空間的に別個の様式でパターン形成されている場合、PDMS装置は熱処理無しでパターン形成されたスライドの上に場合によっては置かれることが期待される。その装置は、まだ機能的であるが、非常に低圧(例えば1-2psi)でのみ操作されることが期待され、それは迅速な分析時間に影響することが期待される。もう1つのデータ裏づけの無い実施例において、ペプチド又はアプタマーは、スライド上にあらかじめパターン形成され、PDMS装置のスライドへの強い結合に関連したさらに高熱の処理に耐えることが期待される。

30

40

【0154】

いくつかの実施形態において、PDMSをあらかじめパターン形成されていないガラス・スライドに結合させた後に、少なくとも2つのはっきりと異なる捕捉剤を装置入口の中へ導入し、壁を捕捉剤で覆うために溶液を領域(15)、(14)及び(16)の中、そして出口へ流す。サンプルが次に流され、蛍光色素分子によって結合された検出剤(検出抗体、たんぱく質、DNA、RNA、アプタマーなど)が流し込まれることができる。各検体は、そして、検出可能及び区別可能なラベルによって検出される。

【0155】

他の実施形態は、スライド表面に限定されるよりもむしろ、チャンネル壁に吸収されている捕捉剤を含む。

50

【0156】

いくつかの実施形態において、チップ設計は、非常に小さいアリコート（～2-3ミクロリットル）の全血から測定される複数の血液ベースのたんぱく質バイオマーカーを可能にする。それらの実施形態において、測定されたバイオマーカーの数は、2つの要因によって限定される。第1の要因は、たんぱく質捕捉剤の交差反応である - 捕捉剤が、それらの類似したたんぱく質に対して十分に選択性が高くない場合、交差反応は、分析感度及び同時に測定できるたんぱく質の数を限定する。もう1つの要因は、スポッティングされた捕捉剤のスポットのサイズ及び間隔である。

【0157】

いくつかの実施形態において、チップ設計が、細い血漿チャンネル(14)の各々が複数の捕捉剤スポットのセットを含むことから、複数のチャンネルが複数の測定となるため、各血液たんぱく質バイオマーカーの複数の測定を可能にする。これは、必要な血液の量を増やさずに測定の正確性を増加させる。

10

【0158】

いくつかの実施形態において、チップ設計が、血液たんぱく質バイオマーカーの測定を数分以内で可能にする。この時間スケールは、血液における分子を劣化させるほぼすべての化学的過程よりも速い。

【0159】

いくつかの実施形態において、血液サンプルの導入からたんぱく質レベルの測定までの全ての過程が自動化されてもよい。これは、人間による介入、関係するエラーなどを最小限に抑え、コストを低減する。

20

【0160】

いくつかの実施形態において、図8に示されているものなどの複数の設計が単一のチップ上で複製されてもよく、さらに同じチップ上で複数の血液サンプルを可能にすることによる測定のコストを、チップ製造における困難性を増やさずに減少させる。

【0161】

ここで開示されているシステムは、アレイ又は部品のキットの形で提供される。時折「マイクロアレイ」として呼ばれるアレイは、関連する特定の分子を有するアドレス可能な領域の1、2又は3次元の配置を含む。通常、特徴的なフィーチャーサイズは、マイクロメートルの単位である。図13及び14は、模範的なマイクロアレイを提供する。

30

【0162】

部品のキットにおいて、捕捉剤及び装置が独立してそのキットに含まれている。その捕捉剤（例えば、DEAL技術のためのポリヌクレオチドでコードされたたんぱく質）が1つ又はそれ以上の合成物に含まれ、各捕捉剤は、適切な溶体担体又は助剤と一緒に合成物において存在する。

【0163】

そのシステムにおいて提供される装置は、ここに付着された基質ポリヌクレオチドを有することができる。いくつかの実施形態において、基質ポリヌクレオチドはさらに、キットの追加の要素として提供される。その追加の要素は、ラベル付きのポリヌクレオチド、ラベル付きの抗体、ラベル、マイクロ流体チップ、参考基準、及び当業者が本開示を読み識別することができる追加の要素を含む。特に、そのキットの要素は、ここで開示される方法を実施するために、適切なインストラクション及び他の必要な試薬で提供される。そのキットは、通常は、別々の容器に合成物を含む。例えば紙又はテープ若しくはCD-ROMなどの電子的サポートシステム上の文書又は音声などによる分析を実施するためのインストラクションは、通常、そのキットに含まれている。そのキットはまた、使用される特定の方法に依存して、他のパッケージ化された試薬及び物質（すなわち、洗浄緩衝液など）を含む。

40

【0164】

さらに、適切な合成物の担体剤又は助剤の識別に関する詳細、及びそのキットの一般的な製造及びパッケージングは、本開示を読んだ当業者によって識別されることが可能であ

50

る。

【0165】

ここで開示されている方法及びシステムは、以下の例においてさらに説明され、図解の方法によって提供されており、本開示の範囲を限定することを目的としてはいない。

【実施例1】

【0166】

[全血サンプルからの血漿分離及び解析用のチップの加工]

血漿分離のための装置が本開示に従って以下のように製造される。制御弁及び流体チャンネルは、PDMSにおいて加工される。装置は次に、DNAマイクロアレイ・ガラス・スライドに接着される。

10

【0167】

統合された分離分析チップの設計が、図3において示されている。流体チャンネルがPDMSから加工され、次に、DEALアレイが印刷されているガラス・スライド上に接着される。そのマイクロ流体ネットワークは、無細胞血漿チャンネル領域が、アレイに重なるように整列されている。

【実施例2】

【0168】

[血液分離及び解析DEAL装置の加工及び使用]

統合分離DEAL装置が製造され、図9の概略図において示されるように使用される。

【0169】

ssDNAオリゴマーの細長い破片が、ポリ・リジンで覆われたガラス基盤の上にマイクロ流体チャンネルが成形されているPDMSの層を使用して沈着される（パネルa）。PDMSは取り除かれ、ssDNAの細長い破片が残される（パネルb）。抗体アレイが、ssDNAのラベルが付けられた抗体を適切な空間的位置に結集するために、DNAハイブリダイゼーションを使用して形成される（パネルc）。次に、標的たんぱく質の検出が、標準のELISAに続いて実施され、サンドウィッチ状のたんぱく質分析が実施される（パネルdからf）。例外は、たんぱく質検出のために設計された全ての抗体が、たんぱく質の読み出しのために赤い蛍光染料（Cy5）によってラベル付けされていることである。1つのssDNAの細長い破片は、付随する抗体を持っていない - これが整列マーカーであり、緑の蛍光色素分子（Cy-3）でラベル付けされたssDNAとのハイブリダイゼーションは、抗体アレイのための参考位置を提供する。

20

30

【実施例3】

【0170】

[DEAL技術を含むチップの製造及び使用]

血液の処理及び低容量の血液における迅速な血漿分離；及びDEAL技術を使用したたんぱく質の検出及び量子化を実施する統合マイクロ流体チップが、製造され使用された。

【0171】

第1シリーズの実験に従って、マイクロ流体ネットワークがDNAアレイに接触して置かれた。次に、特徴的cDNA配列で標識されたはっきりと異なる抗体が、それらのssDNA標識とスライド上の相補的なssDNAスポットとのハイブリダイゼーションによってDNAスポットに局在化されているDNAアレイの上を流され、DNAでコードされた抗体ライブラリ（又はDEAL）アレイを形成する。血液サンプル（ $<10\mu\text{L}$ ）が、装置の血漿分離領域に伝達される。分離された血液血漿は、DEALアレイを含むチップの領域上に流され、その地点で標的とされる検体が、アレイ上の所定位置にある捕捉抗体によって結合される。ビオチンで結合された検出抗体の溶液が次に、DEALアレイ領域に伝達され、検体及び捕捉抗体でELISA状のサンドウィッチを形成する。金ナノ粒子で接合されたストレプトアビジンは、次に、結果として生じるサンプルのたんぱく質発現プロファイルがスライドから直接読み出されるように、アレイ領域に方向付けられ、そのアレイは、次に、金の増幅によって作成された。代替として、CyDyeで接合されたストレプトアビジンが使用でき、DEALアレイのスポット又はバーを、蛍光発光を使用して測定することが可能である。

40

50

【 0 1 7 2 】

DEALを使用したたんぱく質検出の第2シリーズの実験に従って、該方法は以下のように実施された：対象のたんぱく質に対する捕捉抗体（CA s）は、化学的に単鎖のDNA(ssDNA)オリゴマーでラベル付けされ、ssDNA-CAの複合体を産出した。その結合反応は、SFB/SANHベースの共役化学を使用して達成され、DNAオリゴマー上のアミン・テルミニをたんぱく質のアミン側グループにリンクする。サイズ交換列が、過剰な未処理のDNA分子を除去することによって生産物を浄化する。個別には、相補的なssDNAオリゴマーが、ポリ・エル・リジンで被覆されたガラス・スライド上に、マイクロ・チャンネルでガイドされるパターン形成を使用してバーコードのパターンで堆積される。DEALたんぱく質アレイの最初の段階において、ssDNA-CA複合体の相補的なssDNAアレイでのインキュベーションは、DNAハイブリダイゼーションを通して捕捉剤をそれらの特定の場所で結集させる。

10

【 0 1 7 3 】

この段階は、DNAマイクロアレイをたんぱく質サンドウィッチ分析が簡単にできる抗体マイクロアレイに変換する。この時点では、サンプル（すなわちヒトの全血から分離された血漿）がCAマイクロアレイに適用されることが可能であり、抗原が捕捉される。最後に、検出抗体及び／又は蛍光の読み出し深針が、連続して導入され、免疫サンドウィッチ分析が完了する。DNAオリゴ配列は、クロス・ハイブリダイゼーションを最小限に抑える一方、室内温度の相補鎖へのハイブリダイゼーションを最適化するように適切な融解温度で選択される（蛍光信号において<5%）。

20

【 0 1 7 4 】

特に、血液たんぱく質バイオマーカーのパネルがヒトの採血から検出された。使用されたたんぱく質パネルは、対応するDNAコード及びそれらの配列と一緒に、表1及び2において要約されている。これらのDNAオリゴマーは、Integrated DNA Technologies (IDT) 社によって合成され、高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）によって浄化された。その質は、質量分析（MS）によって確認された。

【 0 1 7 5 】

【 表 1 】

表 1. たんぱく質パネル及び対応する DNA コード

30

バイオマーカー・パネル

AA/AA'	インターロイキン - 1 ベータ	IL-1 β
BB/BB'	インターロイキン - 6	IL-6
CC/CC'	インターロイキン - 10	IL-10
DD/DD'	腫瘍壊死因子アルファ	TNF- α
EE/EE'	補体成分 3	C3
FF/FF'	C-反応性たんぱく質	CRP
GG/GG'	プラスミノゲン	Plasminogen
HH/HH'	前立腺特異抗原(合計)	PSA

40

【 0 1 7 6 】

【表 2】

表 2. 抗体の空間的コードに使用されるDNA配列

配列名	配列	配列ID番号	Tm (50mM NaCl) °C
AA'	5' NH3-AAAAAAAAAAGTCACAGACTAGCCACGAAG-3'	1	58
BB	5'-AAAAAAAAAAGCGTGTGTGGACTCTCTCTA-3'	2	58.7
BB'	5' NH3-AAAAAAAAAATAGAGAGAGTCCACACACGC-3'	3	57.9
CC	5'-AAAAAAAAAATCTTCTAGTTGTCGAGCAGG-3'	4	56.5
CC'	5' NH3-AAAAAAAAAACCTGCTCGACAACCTAGAAGA-3'	5	57.5
DD	5'-AAAAAAAAAAGATCGTATGGTCCGCTCTCA-3'	6	58.8
DD'	5' NH3-AAAAAAAAAATGAGAGCGGACCATACGATC-3'	7	58
EE	5'-AAAAAAAAAAGCACTAACTGGTCTGGGTCA-3'	8	59.2
EE'	5' NH3-AAAAAAAAAATGACCCAGACAGTTAGTGC-3'	9	58.4
FF	5'-AAAAAAAAAATGCCCTATTGTTGCGTCGGA-3'	10	60.1
FF'	5' NH3-AAAAAAAAAATCCGACGCAACAATAGGGCA-3'	11	60.1
GG	5'-AAAAAAAAAATCTGTGAACCTGTCATCGGT-3'	12	57.8
GG'	5' NH3-AAAAAAAAAATCCGATGACAGTTACAGAG-3'	13	57
HH	5'-AAAAAAAAAAGAGTAGCCTTCCCGAGCATT-3'	14	59.3
HH'	5' NH3-AAAAAAAAAATGCTCGGGAAGGCTACTC-3'	15	58.6

10

*全てのアミン末端鎖は、抗体にリンクされ、R.Bailey et al.に記載されているように SFB/SANH結合化学を使用してDNA抗体複合体を形成する。コードAA-HHは、健康なボランティアからの新鮮な全血を検査した実験に使用された。コードA-Mは、がん患者の血清サンプルの分子解析に使用された。

20

【実施例 4】

【0177】

[単一の全血サンプルからの標的検出]

模範的な分離分析手順は、以下のように実施された。DNAアレイでスポッティングされたガラス・スライドを含む血液分離マイクロ流体チップが、最初に3つの異なるヒトのサイトカイン捕捉抗体でコードされ、オンチップDEALアレイを形成する。ヒトのサイトカインでスパイクされた(spiked)羊の血液サンプルが、次に、装置に送り込まれた。アレイ上に流された分離された血漿、及びかくサイトカイン標的が、異なるアレイ・スポット上で捕捉された。

30

【0178】

アレイは次に、ビオチンで官能基化された抗体を、表面に固定された標的に最初に選択的に結合させることによって、読み出し用に作成された。検体を含むスポットは、次に、ストレプトタビジン - 金ナノ粒子での処理によって可視化されることが可能であり、金増幅は、図12及び13において説明されている。

【0179】

図12及び13は、3つのサイトカイン標的の同時検出を示している代表的なマイクロアレイ・スライドを示す。分析領域は、チップ上の2つの分析レーンに対して示されている。

40

【0180】

特に、図13は、図12のアレイの金増幅の後の2つの分析レーンの明視野及び暗視野画像を表わす。6個のDNA配列(AF) がスライド上に印刷されているが、3つだけが、捕捉抗体(A-C)によってコードされている。血液におけるIFN- γ 、TNF- α 、IL-2の濃度は、それぞれ、500pM、1nM及び6nMであった。通常、下にあるアレイは0.5-1時間、検体にさらされた。

【0181】

類似した分離及び分析が、マイクロ流体でパターン形成されたDEALバーコード・アレイを使用して実施された。従来のスポットとは対照的に、高密度のバーコード・パターンが、図11において使用された。印刷された6個のDNA配列が、幅20umの縞模様として、スライ

50

ド上に存在する。矢印は、実行中の流れ方向を示す。血液におけるIFN- η 及びTNF- α の濃度は、それぞれ、500pM及び1nMであった。図11は、金増幅によって作成されたスライドの典型的な結果を表わす。両サイトカイン標的は、明視野及び暗視野画像の両方において明確に存在している。

【実施例 5】

【0182】

[DEAL技術を含む血液分離 / たんぱく質分析チップを使用した血液分離及び複数のパラメータでのたんぱく質分析]

DEAL技術と統合マイクロ流体工学との互換性は、迅速な血液分離及び信頼度の高いたんぱく質パネルの測定を産出した。実験手順は、以下に詳しく述べられている。

10

【0183】

a. ブロッキング：BS/PAチップを使用する前に、全てのマイクロ流体チャンネルは、分析緩衝溶液（98%純ウシ血清アルブミン、フラクシオンV(シグマ)を150mM 1xPBSにカルシウム / マグネシウム塩無しで (Irvine Scientific) 加えることによって備えられる 1% w/v BSA/PBS溶液）で30-60分間ブロックされる。

【0184】

b. DEAL形成（複合体の導入）：全てのDNA抗体複合体を含む溶液が、BS/PAチップの分析チャンネルの中に~30-45分間流されたことから、DNAバーコード・マイクロアレイを抗体マイクロアレイに変換し、それに続く表面に固定された免疫測定法を可能にした。固定されていない複合体は、分析緩衝溶液を10分間流することによって取り除かれた。DEAL結合溶液は、最終濃度が5 μ g/mLである1% PSA/PBSにおける全ての合成された複合体を混合することによって備えられた。DNAコード・オリゴマーは、直交性に関して事前にテストされ、非相補的オリゴマー鎖の間におけるクロス・ハイブリダイゼーションが、相補的な対の信号強度の5%を超過しない蛍光強度を産出することを確認する。

20

【0185】

c. 採血の収集：採血が、BD Microtainer Contact-Activated Lancets（紫色のランセット - 低容積、単一の血液ドロップ）を使用して実施された。血液は、SAFE-T-FILL 毛細血管の血液の収集チューブ（RAM Scientific）で収集され、そのチューブは、以下で述べられるように、25mM EDTA溶液で事前に充填されていた。2つのサンプルが、全血のドロップから準備された。

30

【0186】

(i) スパイクが見られない血液サンプル：採血管は80 μ Lの25mM EDTA溶液で事前に充填され、次に10 μ Lのヒトの鮮血がそのEDTA被覆の毛細血管において集められ、チューブに流し込まれ、数回反転させることによって素早く混合された。

【0187】

(ii) スパイクが見られた血液サンプル：採血管は、40 μ Lの25mM EDTA溶液で事前に充填された。全てのたんぱく質スタンダード (protein standards) を含む40マイクロリットルの組み換えたんぱく質溶液が、加えられた。そして、2 μ Lの0.5mM EDTAが、EDTAの合計濃度を25mMまで上げるために加えられた。最後に、10 μ Lのヒトの鮮血が、EDTA被覆された毛細血管において集められ、管に加えられ、数回反転させることによって素早く混合された。全てのたんぱく質スタンダードの最終濃度は10nMの単位であった。しかし、これらの「スタンダード」及び捕捉抗体の親和性は、実質的に変化する。たんぱく質スタンダードにおけるスパイク形成の目的は、高たんぱく質濃度の信号を新鮮な全血から収集された信号に対比することだけであった。

40

【0188】

d. 血液サンプル分析：これらの2つの血液サンプルは、収集の1分以内にBS/PAチップの中へ流し込まれる。血漿は、チップ内の血液細胞から素早く分離され、対象のたんぱく質が、DEALバーコード・アレイを含む下流側の分析ゾーンにおいて捕捉される。採血から血漿タンパク質捕捉の完了までの全過程は、前段階が手動で実行されたとしても非常に速い (<10分)。分析に対する短い時間スケールが、流動マイクロ流体環境における減少し

50

た拡散壁に大きく起因している。従来の免疫測定は、1-2時間又はそれ以上かかり - それらは、血液細胞が最初に遠心分離によって分離されることを必要とする。

【0189】

e. 検出抗体の適用：ビオチンラベル付きの検出抗体の混合物が、マイクロ流体装置の中へ30分間流され、DEAL分析が完了した。検出抗体溶液は、1%BSA/PBSにおいて備えられている~5uMのビオチン化検出抗体を含む。

【0190】

f. 蛍光深針：Cy5蛍光染料ラベル付きのストレプトタビジン及び標準である、Cy3ラベル付きの相補的なssDNA (DNAコードM/M') が、共に混合され、BA/PAチップの中へ30分間流された。最後に、分析緩衝液が、結合していないストレプトタビジン - Cy5を除去するために流された。

10

【0191】

g. リンス：PDMS血液チップ装置が、DNAパターン形成されたガラス・スライドから取り除かれた。スライドは、すぐに、以下の溶液の順番に6回さらっと浸された：1%BSA/PBS溶液、1xPBS溶液、1/2xPBS溶液、脱イオン化されたMillipore H₂O。スライドは、Millipore H₂Oストリーム下で数秒間リンスされ、次に窒素銃で乾燥された。

【0192】

h. 光学読み出し：そのスライドは、Axon Instruments Genepix Scannerによって走査された。最も質の良い解像度(5µm)が選択された。2つのカラー・チャンネル(緑のCy3チャンネル及び赤のCy5チャンネル)が、蛍光信号を集めるためにオンにされた。

20

【実施例6】

【0193】

[血漿分離用の及び全血からのバーコード・チップの加工]

IBBCの加工は、2層のソフトリソグラフィーの方法で達成された。代表的なチップ設計は、図7に示されている。制御層(赤)のシリコンマスターは、スピコート(spin-coated)のSU8 2010ネガ型フォトレジスト・フィルム(厚さ~20マイクロメートル)を露出することによって加工される。成形の前に、そのマスターは、トリメチルクロロシラン(TMCS)蒸気ボックスにおいて20分間シラン化された。GE RTV 615 PDMSプレポリマーのA部分及びB部分(5:1)が準備され、均質化され、そして制御層マスターに加えられた。15分間ガス抜きをした後、PDMSは80℃で50分間保存された。次に、凝固したPDMSチップは、マスターから切り取られ、アクセス穴は23ゲージのステンレス・スチール穴で開けられた。

30

【0194】

図7は、IBBCの特にAutoCADの設計を表わす：赤で流動層；緑で制御層。PDMSマイクロ流体チップの直下には大規模なDNAバーコード・アレイがある。

【0195】

流動層マスター(青)はSPR220ポジ型フォトレジスト状を使用して加工された。露出及び現像の後に、フォトレジスト・パターンが、流動チャンネルを丸くするように対流式オープンにおいて120℃で焼かれた。その結果として生じる流動層は、通常、15-20umの厚さである。TMCSを使用したシラン化処理は、流体のPDMSプレポリマーを加える直前に実施された。次に、GE RTV 615 PDMSのA部分及びB部分(20:1)の混合物が準備され、均質化され、脱ガスされ、そして流動層マスターの上で1分間2000-3000rpmで回転された。それは、80℃で30分間保存され、PDMS制御層が慎重に整列され流動層の上に置かれた。最後に、80℃で60分間の追加の熱処理が、2つのPDMS層を接着するために実施された。その二重層チップは、次に、注意深く流動層マスターから剥がされ、アクセス穴がドリルで開けられた。

40

【0196】

最後に、PDMSチップは、DEALバーコード・スライドに4時間の80℃での熱処理を通して接着され、完全な統合血液分離/たんぱく質分析(BS/PA)チップを産出する。そのBS/PAは、マイクロ流体生液処理モジュール、特に全血分離ユニット及び高度に多重化されたたんぱく質測定のためのDEALバーコード・アレイを特徴とする。典型的な設計において、8-

50

12個の同一の血液分離及び検出ユニットが、単一の2.5cm x 7cmチップ上で統合された。

【実施例7】

【0197】

[バーコード・アレイのパターン形成]

マイクロ・チャンネルでガイドされる流れパターン形成の方法を使用して、DEALバーコード・アレイが加工された。伝統的なインクジェット・スポッティング物質がまた、DNAオリゴマーをスポッティングするために利用され、そのマイクロ・チャンネルでガイドされた流れパターン形成の方法は、少なくとも従来のマイクロアレイよりも少なくともさらに1桁分濃厚なアレイの形成を可能にする。

【0198】

これは、複数の平行なマイクロ流体チャンネルを含むポリジメチルシロキサン (PDMS) 型を生成することによって達成され、各チャンネルは異なる生体分子捕捉剤 (図10) を伝達する。チャンネル数は、100個又はそれ以上の異なる捕捉剤を含むように容易に拡大される。ポリ・アミンが、従来型のアミン化された表面よりも際立って高いDNA荷重 (関連したより高い最終分析感度) を可能にすることから、ポリ・アミンで被覆されたガラス表面が使用された。20マイクロメートル (20 μm) チャンネル幅のDNA「バー」は、それらが、分析読み出しのための蛍光マイクロアレイ・スキャナーと互換性があるように、選択された。そのスキャナーは、5 μm の解像度を有した。加工の詳細は以下のである。

【0199】

a. 成形加工。マイクロ流体パターン形成チップは、PDMSエラストマーをマスター・テンプレートから成形することによって作成され、それは、フォトリソグラフィーを使用して備えられ、シリコン・ウェハー上にフォトレジスト・パターン形成を作成する。そのような方法は、標準のプラクティスである。

【0200】

b. PDMSパターン形成チップ加工。段階3aにおいて成形されたポリジメチルシロキサン (PDMS) エラストマーが、次に、ガラス表面上に接着され、チャンネルのフロアとしての役割をする。接着の前に、ガラス表面は、ポリアミン・ポリマー、ポリ・エル・リジン (Sigma-Aldrich) で事前に被覆され、DNA荷重を増やす。その被覆過程は、他の箇所において説明されている。マイクロ流体チャンネルの数は、バーコード・アレイのサイズを決定する。本発明において、図S2aに示されているようにPDMSチップは、大きい面積 (3cm x 2cm) を覆うために巻いたり巻き戻したりする13から20までの平行なマイクロ・チャンネルを含む。

【0201】

c. DEALバーコードのパターン形成。1 x PBS緩衝液に備えられる主要DNAオリゴマーの異なる鎖を含む各溶液は、各マイクロ流体チャンネルに流される。溶液で充填されたチップが、次にデシケーターにおいて置かれ、溶媒 (水) が完全にガス浸透性のPDMSを通して蒸発することを可能にし、DNA分子をそこに残す。チップが実際に使用される何日若しくは何ヶ月も前に可能になるこの過程は、完了するまで数時間もの時間を使用し得る。最後に、PDMSエラストマーは、ガラス・スライドから除去され、バーコード形成されたDNAは、そのガラス表面に4時間の間、80 °Cの熱処理又はUVクロスリンク (cross-linking) によって固定される。注目すべきは、リン酸カリウムの結晶が溶液の蒸発の間に沈殿するが、DNAバーコード・アレイの質には影響しなかったことである。これらの塩分は、スライドを脱イオン化された水に、血液分析チップをスライドに接着する前に、素早く浸すことによって簡単に除去された。

【0202】

その過程は、さらに、図10の概略図において示されている。(a) ssDNAバーコード・アレイのマイクロ・チャンネルでガイドされているパターン形成の概略的な描写。個々のssDNAバーは、幅20 μm であるようにパターン形成され、ガラス基盤の完全な寸法に及ぶ。(b) 複数の血液たんぱく質を検出することを可能にするためのDEALバーコードでパターン形成されたガラス・スライドと血液分離チップとの統合。血液分離チップからの血漿チャンネ

10

20

30

40

50

ルが、複数のバーコードが、全ての狭い血漿チャンネルの中に組み入れられるように、長いDEALバーコード・パターンに直交して整列される。追加の位置合わせは必要でない。(c)13チャンネルのパターン形成チップのマスク設計。A-Mは、異なるssDNAオリゴマーを流すためのチャンネルを示す。(d)オリゴマーAの蛍光の相補鎖A'への特異的なハイブリダイゼーションによって成功するDNA分子のパターン形成の評価。主要鎖B及びCは、参考として赤及び緑で事前に標識された。

【実施例 8】

【0203】

[バーコード・チップにおける分離された血漿からのたんぱく質分析]

DEAL技術を含むバーコードのチップは、採血された全血からの血清バイオマーカーのパネルの迅速な測定に使用された。特に、2つの例の全血の採血からの血液バイオマーカーの迅速な測定がされた - たんぱく質でスパイクがされた新鮮な全血、新鮮な全血。実際の採血から始まるたんぱく質分析における全ての致命的な段階が、10分未満で達成された。

【0204】

結果は図15に示されている。パネルa.において、新鮮な全血からの効果的な血漿分離を表わす光学顕微鏡が表わされている。数個の赤い血液細胞が、既存の血漿チャンネルにおいて検出されることもあるが、細胞からの自由な血漿は>99.99%であり、存在する数個の細胞は、たんぱく質分析に影響しなかった。パネル(b)において、健康なボランティアから収集されたスパイク無しの及びスパイクのある新鮮な全血の両方が個別に分析された、IBBCの2つの隣り合うマイクロ・チャンネルにおける血液バーコードの蛍光画像が示されている。8個の血漿タンパク質が示されている。バーは、全て幅20µmである。パネル(c)は、スパイクのある及びスパイクの無い全血サンプルの両方に対するバーコードの蛍光ラインプロファイルを示す。その距離は、bに示されている実物大に対応する。

[例9：抗体で覆われたチャンネルにおいて分離された血漿からのたんぱく質解析（机上の例）]

PDMS装置の血液分離が直接的に平面のガラス・スライド又はポリ・エル・リジン処理されたガラス・スライドに接着されている（事前パターン形成されていない）。IL2捕捉抗体（ポリヌクレオチドに結合されていない）の0.02mg/mLの溶液が、単一の装置の中へ流され、その装置の容積を完全に充填する。

【0205】

その溶液は、1時間、室内温度のその装置においてインキュベートする。1×PBS洗浄溶液は次に、固定されていない抗体を取り除くために、流入される。1%BSA/PBSはそして、RTで1時間ブロックするための装置全体に流される。30nMの組み換え型IL2でスパイクされた血液は、次に、RTで1時間その装置の中へ流入され、スパイクされたIL2を含む血漿は、全血から分離され、幅広いチャンネル領域上に送られる。1×PBS洗浄溶液は、付着されていない生体分子を取り除くために10分間流入される。

【0206】

1%BSA/PBSにおけるビオチニンIL-2検出抗体（0.02mg/mL）は次に、RTで1時間流入され、続いて1×PBS洗浄溶液が流入される。Cy-5結合ストレプトアビジン(0.02mg/mL)は、次に、RTで1時間流入され、続いて1×PBS洗浄溶液が10分間流入される。PDMS装置は除去され、スライドは、PBS、そしてDI-H2Oでリンスされる。スライドは蛍光スキャナー(genepix)で走査され、強度は量子化される。

[例10：捕捉剤を有さないチャンネルにおいて分離された血漿からのたんぱく質解析（机上の例）]

血液分離PDMS装置は、平面のガラス・スライド又はポリ・エル・リジン処理されたガラス・スライド（事前にパターン形成されている）に直接的に接着される。その装置は、1×PBSでその全体の容積を完全に充填することによって備えられる。30nM組み換え型IL2でスパイクされた血液が、次に、RTで1時間その装置の中へ流され、スパイクされたIL2を含む血漿は、全血から分離され幅広いチャンネル領域に送られる。

【0207】

1×PBS洗浄溶液は10分間流入され、付着されていない生体分子を取り除く。1%BSA/PBSは、次に、RTで1時間その装置の全体にブロッキングのために流される。1%BSA/PBSにおけるビオチン化されたIL-2検出抗体(0.02mg/mL)は、次に、RTで1時間流入され、1×PBS溶液がそれに続く。Cy-5結合ストレプトアビジン(0.02mg/mL)は、次に、RTで1時間流入され、それに続いて1×PBS洗浄溶液が10分間流入される。PDMS装置は取り除かれ、スライドはPBS、そしてDI-H₂Oでリンスされる。スライドは蛍光スキャナー(genepix)において走査され、強度が量子化される。

【0208】

上記の例は、当業者が本開示の装置、システム及び方法の実施形態を作成及び使用する方法の完全な開示及び説明を提供し、発明者が開示として考える範囲を限定することを目的としていない。

10

【0209】

要約において、本開示のいくつかの実施形態に従って、サンプルの流体成分における標的を検出するためのマイクロ流体装置、方法及びシステムが示されている。そのような装置、方法及びシステムにおいて、サンプルが導入される様々なチャンネルの流れ抵抗が調整され、そのサンプルからの流体成分の分離及び/又は流体環境における標的の検出のための分析の性能を制御する様式において制御する。そのような性能は、捕捉剤を持つ標的の親和性又は流体環境における標的の拡散によって制御される。

【0210】

当業者にとって明確な開示を実施するための上記のモードの修正は、以下の請求項の範囲内にあると意図される。本明細書において述べられる全ての特許及び出版物は、本開示に係る当業者のスキルの程度を示す。本開示において引用される全ての参考文献は、各文献が全体として個別に参考として組み入れられるように、同じ程度で本開示に組み入れられている。

20

【0211】

背景技術、発明を実施するための形態及び実施例における各文献(特許、特許出願、ジャーナル記事、アブストラクト、実験マニュアル、本又は他の開示を含む)は、参考としてここで取り入れられている。さらに、ここに提出された配列の表のハードコピー及び対応するコンピュータ読み込み可能な形状は、両方とも全体的にここに参考として取り入れられている。

30

【0212】

当然のことながら、本開示は、変化し得るある特定の構成又は生体システムを限定していない。さらに、当然のことながら、ここで使用された用語は、特定の実施形態を説明することだけを目的とし、限定することを目的としていない。本明細書及び請求項に使用されるように、「複数の」という用語は、内容が、他の内容を明確に決定していない場合は2つ又はそれ以上の指示対象を含む。特に定義されていない場合は、ここで使用された全ての技術的及び科学的用語は、本開示に関連する当業者が一般的に理解する意味と同じ意味を有する。ここで説明される方法及び物質に類似した又は等しい方法及び物質はどれも、ここで説明された適切な物質及び方法の具体例をテストするための練習において使用されることができる。

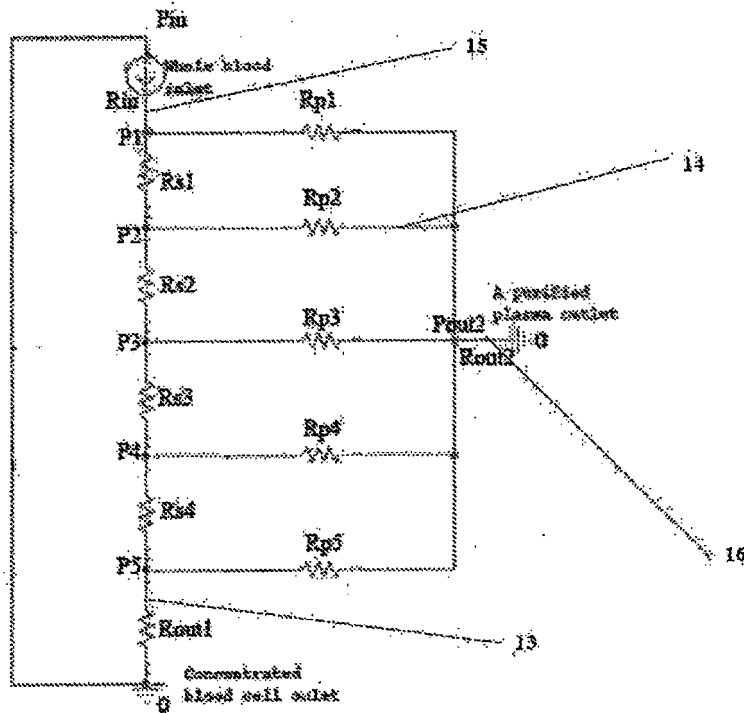
40

【0213】

本開示の多数の実施形態が説明されている。それにもかかわらず、様々な修正が本開示の範囲及び要旨から外れずに作成されることが可能である。従って、他の実施形態は、以下の請求項の範囲内である。

[付録A]

血液チップの血漿分離部分は抵抗器ネットワークとして成形されることができる(図1-15、特に図1-6において示された要素を引用する図A1参照)。



図A1

注入口圧力は、 P_{in} として与えられている。チャンネル(15)は5部分に分割され、各部分に抵抗が与えられている。チャンネル(15)の5個の部分の境界は以下である：

セグメント「in」：注入口と第1の狭いチャンネルとの間の部分は、抵抗 R_{in} を有し、流速 Q_{in} に関連する。このセグメントの端部の圧力は P_1 として与えられる。

【0214】

セグメントS1：第1の狭いチャンネルと第2の狭いチャンネルとの間の部分は、抵抗 R_{s1} 及び流速 Q_{s1} を有する。このセグメントの端部の圧力は、 P_2 として与えられる。

【0215】

セグメントS2：第2の狭いチャンネルと第3の狭いチャンネルとの間の部分は、抵抗 R_{s2} 及び流速 Q_{s2} を有する。このセグメントの端部の圧力は、 P_2 として与えられる。

【0216】

セグメントS3：第3の狭いチャンネルと第4の狭いチャンネルとの間の部分は、抵抗 R_{s3} 及び流速 Q_{s3} を有する。このセグメントの端部の圧力は、 P_3 として与えられる。

【0217】

セグメントS4：第4の狭いチャンネルと第5の狭いチャンネルとの間の部分は、抵抗 R_{s4} 及び流速 Q_{s4} を有する。このセグメントの端部の圧力は、 P_4 として与えられる。

【0218】

チャンネル(13)は、抵抗 R_{out1} 及び流速 Q_{out1} を有する。

【0219】

狭い血漿チャンネル(領域14)抵抗及び流速は、以下として与えられる：

狭いチャンネル1： R_{p1} 、 Q_{p1}

狭いチャンネル2： R_{p2} 、 Q_{p2}

狭いチャンネル3： R_{p3} 、 Q_{p3}

狭いチャンネル4： R_{p4} 、 Q_{p4}

狭いチャンネル5： R_{p5} 、 Q_{p5}

幅広い血漿チャンネル(領域16)抵抗及び流速は、 R_{out2} であり流速は Q_{out2} である。狭い血漿チャンネルと幅広い血漿チャンネルとの間の交差点(領域14と16との間の交差点)での圧力は、 P_{out} として与えられる。

【 0 2 2 0 】

物質の保存によって、回路における分岐の後の流速の和は、その分岐から出てくる流速和に等しくなければいけない。例えば、注入口流速 Q_{in} は、第1の狭いチャンネルにおける流速(Q_{p1})及びチャンネル(15)のセクション1における流速(Q_{s1})の和に等しくなければいけない。同様に、セクション1における流速(Q_{s1})は、 Q_{p2} と R_{s2} 及びその他の和に等しくなければいけない。この様式において引き続き、出願人は以下の6個の数式を取得する。

【 0 2 2 1 】

$$1. Q_{in} = Q_{p1} + Q_{s1}$$

$$2. Q_{s1} = Q_{p2} + Q_{s2}$$

$$3. Q_{s2} = Q_{p3} + Q_{s3}$$

$$4. Q_{s3} = Q_{p4} + Q_{s4}$$

$$5. Q_{s4} = Q_{p5} + Q_{out1}$$

$$6. Q_{out2} = Q_{p1} + Q_{p2} + Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5}$$

次に、出願人は、セグメントs1、s2、s3及びs4の全てが同じ寸法を有し、従って、同じ抵抗を有することに注目する。

【 0 2 2 2 】

$$7a. R_{s1} = R_{s2} = R_{s3} = R_{s4} = R_s$$

さらに、5個の狭い血漿チャンネルは、また、同じ寸法を有し、従って同じ抵抗を有する。

【 0 2 2 3 】

$$7b. R_{p1} = R_{p2} = R_{p3} = R_{p4} = R_p$$

流れは抵抗器ネットワークによって成形されていることから、出願人は、オームの法則の電気に関するバージョンを代入することができる - $\Delta V = IR$ (V = 電圧、 I = 電流、 R = 抵抗) - 流体流動のバージョンでは: $\Delta P = QR$ (P = 圧力、 Q = 流速、 R = 流れ抵抗)である。出願人は、概略図における全てのチャンネル及びセグメントにこの数式を適用する。従って、例えば、抵抗器 R_{in} における圧力の低下は、 $P_{in} - P_1 = Q_{in} R_{in}$ などとして表現されることが可能である。出願人は以下の12個の数式を記す。

【 0 2 2 4 】

$$8. P_{in} - P_1 = Q_{in} R_{in}$$

$$9. P_1 - P_2 = Q_{s1} R_s$$

$$10. P_2 - P_3 = Q_{s2} R_s$$

$$11. P_{in} - P_1 = Q_{s3} R_s$$

$$12. P_{in} - P_1 = Q_{s4} R_s$$

$$13. P_1 - P_{out2} = Q_{p1} R_p$$

$$14. P_2 - P_{out2} = Q_{p2} R_p$$

$$15. P_3 - P_{out2} = Q_{p3} R_p$$

$$16. P_4 - P_{out2} = Q_{p4} R_p$$

$$17. P_5 - P_{out2} = Q_{p5} R_p$$

$$18. P_5 = I_{out1} R_{out1}$$

$$19. P_{out2} = Q_{out2} R_{out2}$$

出願人は次に、数式8-19を以下のように記しなおす:

$$20. P_{in} = P_1 + Q_{in} R_{in}$$

$$21. P_1 = P_2 + Q_{s1} R_s$$

$$22. P_2 = P_3 + Q_{s2} R_s$$

$$23. P_3 = P_4 + Q_{s3} R_s$$

$$24. P_4 = P_5 + Q_{s4} R_s$$

$$25. P_1 = P_{out2} + Q_{p1} R_p$$

$$26. P_2 = P_{out2} + Q_{p2} R_p$$

$$27. P_3 = P_{out2} + Q_{p3} R_p$$

$$28. P_4 = P_{out2} + Q_{p4}R_p$$

$$29. P_5 = P_{out2} + Q_{p5}R_p$$

数式29の数式24への代入は、数式31を与える。数式31は、次に、数式23に代入され数式32を取得する。この方式で数式22、21及び20への連続的な代入を続け、以下の数式の列が得られる：

$$30. P_5 = P_{out2} + Q_{p5}R_p$$

$$31. P_4 = P_{out2} + Q_{p5}R_p + Q_{s4}R_s$$

$$32. P_3 = P_{out2} + Q_{p5}R_p + Q_{s4}R_s + Q_{s3}R_s$$

$$33. P_2 = P_{out2} + Q_{p5}R_p + Q_{s4}R_s + Q_{s3}R_s + Q_{s2}R_s$$

$$34. P_1 = P_{out2} + Q_{p5}R_p + Q_{s4}R_s + Q_{s3}R_s + Q_{s2}R_s + Q_{s1}R_s$$

10

$$35. P_{in} = P_{out2} + Q_{p5}R_p + Q_{s4}R_s + Q_{s3}R_s + Q_{s2}R_s + Q_{s1}R_s + Q_{in}R_{in}$$

似た方法において、数式42を得るために数式5を数式4に代入することができる。数式42は、次に、数式43を得るために数式3に代入することができ、また、数式44及び45を得るためにも似た代入がされる。

【 0 2 2 5 】

$$36. Q_{s4} = Q_{p5} + Q_{out1}$$

$$37. Q_{s3} = Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1}$$

$$38. Q_{s2} = Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1}$$

$$39. Q_{s1} = Q_{p2} + Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1}$$

$$40. Q_{in} = Q_{p1} + Q_{p2} + Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1}$$

20

数式6を数式45に代入し、以下の関係が得られる：

$$41. Q_{in} = Q_{out2} + Q_{out1}$$

以下の代入が、次にできる。数式36は、数式31-35における Q_{s4} に代入できる。数式37は、数式32-35における Q_{s3} に代入できる。数式37は、数式32-35における Q_{s3} に代入できる。代入：38を33-35；39を34-35；40を35；にできる。そうすることにおいて、以下の数式が得られる。

【 0 2 2 6 】

$$42. P_5 = P_{out2} + Q_{p5}R_p$$

$$43. P_4 = P_{out2} + Q_{p5}R_p + (Q_{p5} + Q_{out1})R_s$$

$$44. P_3 = P_{out2} + Q_{p5}R_p + (Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s$$

30

$$45. P_2 = P_{out2} + Q_{p5}R_p + (Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s$$

$$46. P_1 = P_{out2} + Q_{p5}R_p + (Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p2} + Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s$$

$$47. P_{in} = P_{out2} + Q_{p5}R_p + (Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p2} + Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + Q_{in}R_{in}$$

数式18を42に P_5 の値で代入し、数式28を P_4 の値で43に代入し、 P_3 、 P_2 、 P_1 についても同様にし、以下の数式が得られる：

40

$$48. Q_{out1}R_{out1} = P_{out2} + Q_{p5}R_p$$

$$49. P_{out2} + Q_{p4}R_p = P_{out2} + Q_{p5}R_p + (Q_{p5} + Q_{out1})R_s$$

$$50. P_{out2} + Q_{p3}R_p = P_{out2} + Q_{p5}R_p + (Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p4} + Q_{out1})R_s + (Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s$$

$$51. P_{out2} + Q_{p3}R_p = P_{out2} + Q_{p5}R_p + (Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p4} + Q_{out1})R_s + (Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s$$

$$52. P_{out2} + Q_{p3}R_p = P_{out2} + Q_{p5}R_p + (Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p4} + Q_{out1})R_s + (Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p2} + Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s$$

$$53. P_{in} = P_{out2} + Q_{p5}R_p + (Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p4} + Q_{out1})R_s + (Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p2} + Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + Q_{in}R_{in}$$

50

$$p_4 + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p2} + Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_{in}$$

変数 P_{out2} が数式49-52の両側をキャンセルし、以下数式55-58を与える。さらに、数式19を数式48及び53に代入し、簡略化した後に以下の数式が得られる：

$$\begin{aligned} 54. Q_{out1}R_{out1} &= Q_{out2}R_{out2} + Q_{p5}R_p \\ 55. Q_{p4}R_p &= Q_{p5}R_p + (Q_{p5} + Q_{out1})R_s \\ 56. Q_{p3}R_p &= R_{p5}R_p + (Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s \\ 57. Q_{p2}R_p &= R_{p5}R_p + (Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s \\ 58. Q_{p1}R_p &= R_{p5}R_p + (Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p2} + Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s \\ 59. P_{in} &= Q_{out2}R_{out2} + R_{p5}R_p + (Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p2} + Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_s + (Q_{p1} + Q_{p2} + Q_{p3} + Q_{p4} + Q_{p5} + Q_{out1})R_{in} \end{aligned}$$

数式6を数式48及び53に Q_{out2} で代入し、簡略化及び再配置した後に以下の数式60及び65が得られる。さらに、数式55-58を再配置し、以下の数式61-64が得られる。

【0227】

$$\begin{aligned} 60. 0 &= Q_{out1}R_{out1} - Q_{p5}(R_p + R_{out2}) - Q_{p4}R_{out2} - Q_{p3}R_{out2} - Q_{p2}R_{out2} - Q_{p1}R_{out2} \\ 61. 0 &= Q_{out1}(R_s) + Q_{p5}(R_p + R_s) - Q_{p4}(R_p) \\ 62. 0 &= Q_{out1}(2R_s) + Q_{p5}(R_p + 2R_s) + Q_{p4}(R_s) - Q_{p3}(R_p) \\ 63. 0 &= Q_{out1}(3R_s) + Q_{p5}(R_p + 3R_s) + Q_{p4}(2R_p) + Q_{p3}(R_s) - Q_{p2}(R_p) \\ 64. 0 &= Q_{out1}(4R_s) + Q_{p5}(R_p + 4R_s) + Q_{p4}(3R_p) + Q_{p3}(2R_s) + Q_{p2}(R_s) - Q_{p1}(R_p) \\ 65. P_{in} &= R_{p5}(R_p + 4R_s + R_{in} + R_{out2}) + Q_{out1}(4R_s + R_{in}) + Q_{p4}(3R_s + R_{in} + R_{out2}) + Q_{p3}(2R_s + R_{in} + R_{out2}) + R_{p2}(R_s + R_{in} + R_{out2}) + Q_{p1}(R_{in} + R_{out2}) \end{aligned}$$

数式60-65は、マトリクス表記法の形式で再表記できる。

【0228】

71. $P = RQ$ であり、 P 、 R 及び Q は以下のように、それぞれ圧力、流れ抵抗、及び流速のマトリクスである：

$$R = \begin{bmatrix} R_{out1} & -R_p - R_{out2} & -R_{out2} & -R_{out2} & -R_{out2} & -R_{out2} \\ R_s & R_p + R_s & -R_p & 0 & 0 & 0 \\ 2R_s & R_p + 2R_s & R_s & -R_p & 0 & 0 \\ 3R_s & R_p + 3R_s & 2R_s & R_s & -R_p & 0 \\ 4R_s & R_p + 4R_s & 3R_s & 2R_s & R_s & -R_p \\ 4R_s + R_{in} & R_p + 4R_s + R_{in} + R_{out2} & 3R_s + R_{in} + R_{out2} & 2R_s + R_{in} + R_{out2} & R_s + R_{in} + R_{out2} & R_{in} + R_{out2} \end{bmatrix}$$

$$Q = \begin{bmatrix} Q_{out1} \\ Q_{p5} \\ Q_{p4} \\ Q_{p3} \\ Q_{p2} \\ Q_{p1} \end{bmatrix} \quad P = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$

上記のマトリクス R における各抵抗の値 R は、関連するチャンネルの寸法によって、以下の数式に従って決定され：

【0229】

【数 18】

$$R = \frac{12\mu L}{wh^3} \left[1 - \frac{h}{w} \left(\frac{192}{\pi^5} \sum_{n=1,3,5}^{\infty} \frac{1}{n^5} \tanh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right) \right) \right]^{-1}$$

Rはチャンネル抵抗であり；L、w及びhは、それぞれチャンネルの長さ、幅及び高さであり； μ は流速であり；nはその値が約4つの小数位で収束する前に必要な項の数である。ユーザーは、各チャンネル（L、w、h）の寸法及び流体（この場合血液）の速度を入力し、プログラムは、上記の抵抗マトリクスの中へ、全チャンネルの抵抗を出力する。

10

【0230】

流速マトリクスQは、逆抵抗マトリクス R^{-1} と圧力マトリクスPとのマトリクス乗算（Matlabを使用して）によって解くことができる。ユーザーは、望まれる圧力 P_{in} を入力する。

【0231】

72. $Q = R^{-1}P$

これは、流速 Q_{out1} 、 Q_{p5} 、 Q_{p4} 、 Q_{p3} 、 Q_{p2} 、 Q_{p1} を与える。これらの値は、数式1-6に代入でき、 Q_{s1} 、 Q_{s2} 、 Q_{s3} 、 Q_{s4} 、及び Q_{out2} が得られる。プログラムは、次に、狭い血漿チャンネルの各々とその下流側のチャンネル15セグメントとの比を求め、以下のようになる：

20

73. $Q_{p1} : Q_{s1}$ 74. $Q_{p2} : Q_{s2}$ 75. $Q_{p3} : Q_{s3}$ 76. $Q_{p4} : Q_{s4}$ 77. $Q_{p5} : Q_{out1}$

プログラムは、全血からの血漿の収率を、幅広い血漿チャンネルの流速 Q_{out2} をチャンネル13から出て行く全血の流速で割り、その値を100で掛けることによって以下のように計算できる：

78. % 収率 = $(Q_{out2} / Q_{out1}) \times 100$

30

プログラムは、また、如何なるチャンネルの中を移動する流体の速度(v)も、そのチャンネルの流速(Q)をそのチャンネルの断面積(A)で割ることによって、以下のように得られる：

78. $V = Q/A$

狭い血漿チャンネル（領域14）によって分離された血漿は、73-77における流れ比が、>20:1である場合、細胞をほとんど有さない。

【0232】

さらに、5%よりも多い収率が選択され、血漿チャンネルにおける流速は、速い分析で少なくとも0.5mm/sec（親和性流速の領域）である。ユーザーは、数式78において望まれる流速(>0.5mm/sec)が得られるまで、圧力 P_{in} を修正できる。 P_{in} の上限は、通常、ガラスに固定されたPDMSでは25-30psiである。

40

【0233】

出願人は、チャンネルの各々に対して、寸法をMatlabプログラムに入力し、流れ比、収率及び速度を識別するためにプログラムを実行する。一般に好まれる実験の設計によって、選択された寸法は以下のものである。

【0234】

全チャンネルの高さは通常、定数 $h=10\mu m$ で維持される（しかし、 $20\mu m$ まで調整できる）。

【0235】

狭い血漿チャンネルの幅は、通常、定数 $w=10\mu m$ で維持されるが、5-20 μm の範囲で変更

50

できる。

【0236】

狭い血漿チャンネルの長さは、1mmから100mmの間で変更できるが、通常約10-25mmの範囲内である。

【0237】

チャンネル(15)の長さは、50 μm から1000 μm まで変更できる。

【0238】

チャンネル(15)の幅は、10 μm から45 μm まで変更できる。25-35 μm が、分離効率を維持する一方、詰まりを低減するためには理想的である。

【0239】

チャンネル(13)の長さは、0.5mm-20mmの範囲であってよい。一般的に出願人は、およそ5-10mmの範囲に留まっている。

【0240】

チャンネル(13)の幅は、40 μm -500 μm の範囲で変更できる。一般的に出願人は、およそ80-150 μm の範囲の値を選択している。

【0241】

チャンネル(16)は、およそ1-30mmの長さを持つように意図されているが、一般的に5-10mmの範囲にある。

【0242】

チャンネル(16)は、およそ10-100mm、領域(14)における幅の合計よりも幅広い。もう1つの結果は、このチャンネルの中の流速は10-100倍遅い。従って、入力圧力又はチャンネル(14)の寸法は、約0.5mm/sec (親和性律速)の速度を得るように調整され、チャンネル(16)における速度は、およそ0.05-0.005mm/sec (拡散律速)である。

【0243】

適切な分離を得るために必要な流れ比(数式73-77)は、粒子の半径に逆比例して変化する。例えば、典型的な赤血球の半径は、約5-10 μm であり、適切な分離のための流れ比のしきい値は $>20:1$ である。流体における分離されている粒子は $>10:1$ となる。反対に、粒子が直径の半分(2.5-5 μm)を有する場合、適切な分離のためのしきい値は、 $>40:1$ となる。

【0244】

全チャンネルは、同じ高さを有し、狭い血漿チャンネルは、同じ幅を有し、チャンネル(15)の幅は、通常、およそ25-35 μm である。普通は、狭い血漿チャンネルの長さ及びチャンネル(13)の幅だけが、チャンネル寸法を選択するための過程を簡略化するために変更される。プログラムが実行され、流れ比の値、収率、及び狭いチャンネルの速度が得られる。例えば、そのプログラムが以下を出力するとする：

流れ比 - 20 : 1 (流れ比しきい値)

収率 - 20% ($>5\%$)

流速 - 0.2mm/sec (親和性律速過程では $>0.5\text{mm/sec}$ が必要である)

流れ比は、所定しきい値の20 : 1を満たすが、収率が20%であるという事実は、その流れ比の割当量が、所定限度の5%収率よりも低くならず、より適切な分離を得るように増やすことができる。流れ比を増やすために、ユーザーは、狭い血漿チャンネルの長さを増やすことができ、あるいはチャンネル(13)の幅を増やすことができる。領域(14)の長さを増やすことは、それらの抵抗を増やし、流動率及び流速(既にしきい値よりも低い)を減少させる。しかし、ユーザーは、プログラムにおいて注入口圧力 P_{in} の値を増やすだけで、それらのチャンネルの流速をより速くすることができる。

【0245】

ユーザーは、チャンネル(14)の長さ及びチャンネル(13)の幅(及びしばしば他のチャンネルの寸法)及び注入口圧力 P_{in} を、流れ比 $>20:1$ 、収率 $>5\%$ 、及び狭いチャンネルの流速 $>0.5\text{mm/sec}$ が得られるまで変更する過程を繰り返す。

【0246】

10

20

30

40

50

出願人は次に、該システムにおける拡散律速の流れに必要とされる流速が $<0.05\text{mm/sec}$ になるように、チャンネル(16)の幅を設定する。例えば、考えられる状況は、異なるチャンネル寸法でのそのプログラムの実行の繰り返しを通して、出願人は、狭い血漿チャンネルにおいて流速が正確に 0.5mm/sec （親和性律速型）である最適な状態を見つけることである。この状況において、出願人がチャンネル(16)の流速が 0.05mm/sec （拡散律速型の最初に）であることを望み、狭い血漿チャンネル(領域14)の合計幅の10倍であるようにチャンネル(16)を設計する必要がある。これは、同じ流動率を与えられた上で（領域は連続して接続されているため）、速度は、チャンネルの幅に反比例しているからである。それどころか、チャンネル幅にこえる100倍の増加(チャンネル16)が装置設定を拡散律速型（ $<0.005\text{mm/sec}$ ）においてさらにしっかりと定着させる。ここで説明される模範的な実施形態において、狭い血漿チャンネルは、それぞれ幅 $10\mu\text{m}$ であり、そのうちの5個は、合計幅が $50\mu\text{m}$ である。幅広いチャンネルにおいて10倍遅い流速を得るためには、出願人は、幅を10倍広く設定している（ $500\mu\text{m}$ ）。

10

【0247】

異なる抗体結合定数及び濃度を持つ異なったシステムにおいて、異なる速度が、親和性律速及び拡散律速流動（ツィンマーマンの論文から以前しめされた4つの数式に従って）において得られる。これらの速度は、チャンネル(14)の幅とチャンネル(16)の幅との関連する比が決定できるように、事前に計算される。計算された親和性律速と拡散律速との間の n 倍の相違（ツィンマーマン・モデルに基づいて）に対して、幅広い血漿チャンネルは、狭い血漿チャンネルよりも n 倍幅広く設計されるべきである。

20

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY
 VERMESH, Ophir
 YEN, Brian K.H.
 HEATH, James R.

<120> Microfluidic Devices, Methods and Systems for Detecting Target
 Molecules

10

<130> P235-PCT

<140> To be assigned

<141> 2008-07-16

<150> 60/959,666

<151> 2007-07-16

<150> 60/998,981

<151> 2007-10-15

<160> 15

20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Synthetic polynucleotide

<400> 1

aaaaaaaaa gtcacagact agccacgaag

30

30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 2

aaaaaaaaa gcgtgtgtgg actctctcta

30

40

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

50

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 3

aaaaaaaaa tagagagagt ccacacacgc

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

10

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 4

aaaaaaaaa tcttctagtt gtcgagcagg

30

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

20

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 5

aaaaaaaaa cctgctcgac aactagaaga

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

30

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 6

aaaaaaaaa gatcgtatgg tccgctctca

30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

40

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 7

aaaaaaaaa tgagagcgga ccatacgatc

30

<210> 8

<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	artificial sequence		
<220>			
<223>	Synthetic Oligonucleotide		
<400>	8		
aaaaaaaaa	gcactaactg gtctgggtca	30	10
<210>	9		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	artificial sequence		
<220>			
<223>	Synthetic Oligonucleotide		
<400>	9		
aaaaaaaaa	tgaccagac cagttagtgc	30	20
<210>	10		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	artificial sequence		
<220>			
<223>	Synthetic Oligonucleotide		
<400>	10		
aaaaaaaaa	tgccctattg ttgcgtcgga	30	30
<210>	11		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	artificial sequence		
<220>			
<223>	Synthetic Oligonucleotide		
<400>	11		
aaaaaaaaa	tccgacgcaa caatagggca	30	40
<210>	12		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	artificial sequence		
<220>			
<223>	Synthetic Oligonucleotide		

<400> 12
aaaaaaaaa ctctgtgaac tgtcatcggt

30

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

10

<400> 13
aaaaaaaaa accgatgaca gttcacagag

30

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

20

<400> 14
aaaaaaaaa gagtagcctt cccgagcatt

30

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

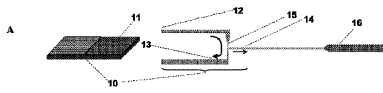
30

<400> 15
aaaaaaaaa aatgctcggg aaggctactc

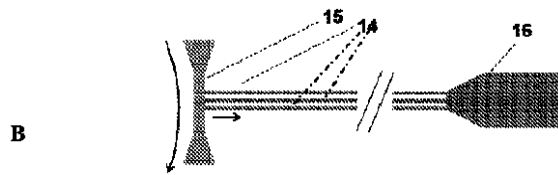
30

40

【図 1 A】



【図 1 B】



【図 2】

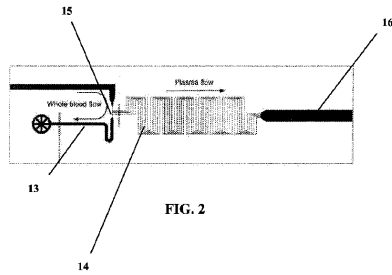


FIG. 2

【図 3】

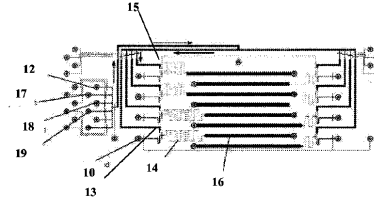


FIG. 3

【図 4】

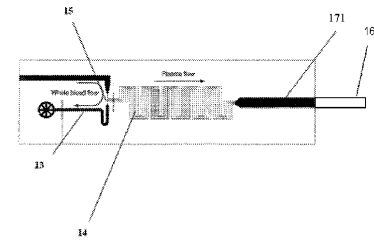


FIG. 4

【図 5】

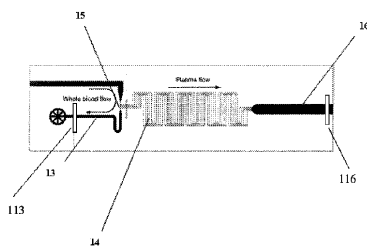


FIG. 5

【図 6】

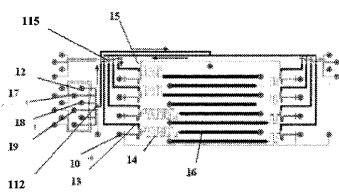


FIG. 6

【図 7】

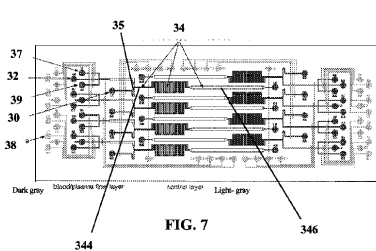


FIG. 7

【図 8】

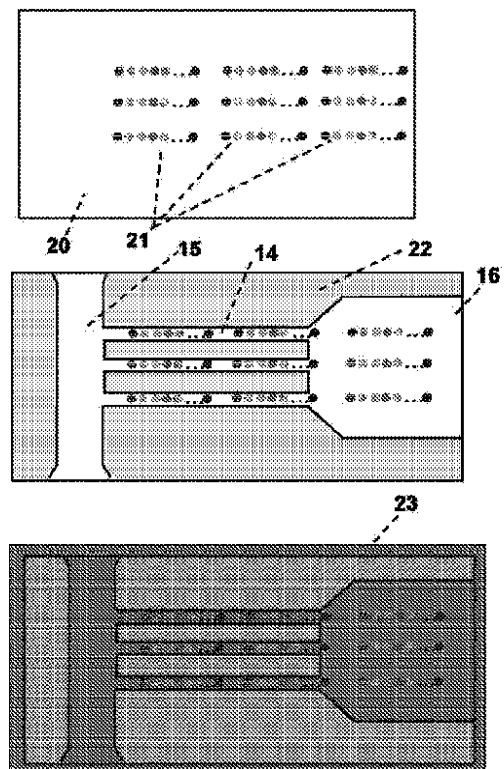


FIG. 8

【 図 9 】

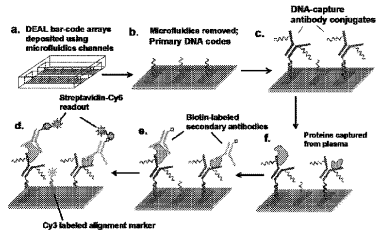


FIG. 9

【 図 10 】

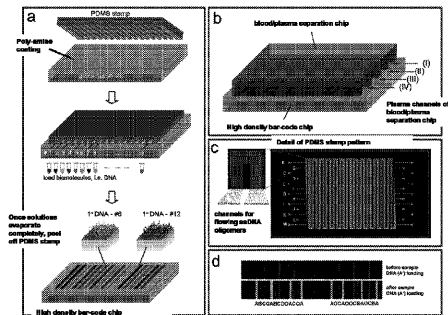


FIG. 10

【 図 13 】

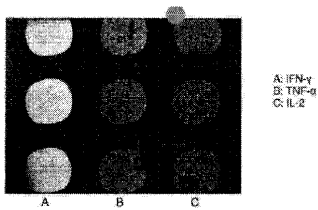


FIG. 13

【 図 14 】

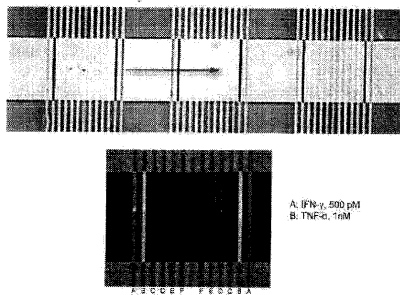


FIG. 14

【 図 11 】

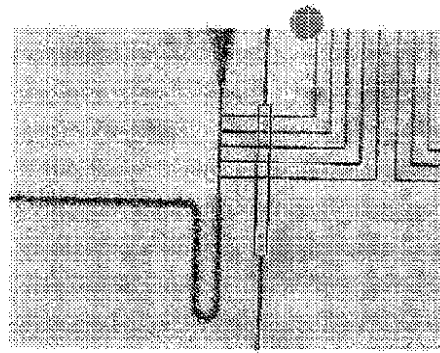


FIG. 11

【 図 12 】

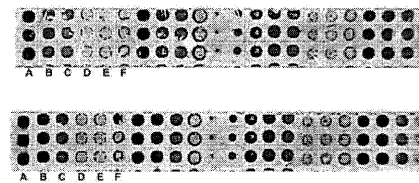
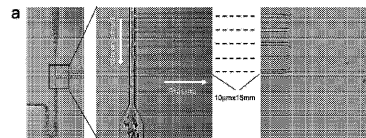
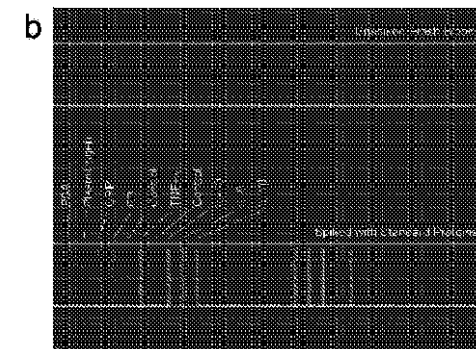


FIG. 12

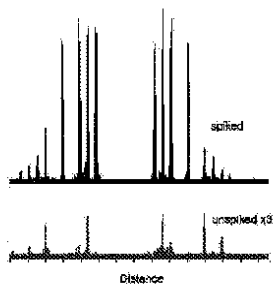
【 図 15 a 】



【 図 15 b 】



【図 15 c】

c

【配列表】

2010533869000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2008/070232
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12M 1/34(2006.01)i, G01N 33/553(2006.01)i, B01L 3/00(2006.01)i</i>		
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 8: C12M 1/34, C12M 3/00, C112Q 1/68, C07K 1/26, G01N 33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKIPASS(KIPO internal) (microfluidic, assay, resistance, flow, control, affinity, diffusion and similar terms)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 20070122819 A1 (INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE) 31 May 2007 See Abstract; Figures 2, 5b, 5c, 6a, 7-9; Claims 1, 16.	1-3, 12, 13
A	US 20060263818 A1 (SCHERER, A. et al.) 23 Nov. 2006 See Abstract; Figures 3b, 4; Claims 1, 7, 10, 16.	1-3, 12, 13
A	US 20070074972 A2 (FLUIDIGM CORPORATION) 05 Apr. 2007 See Abstract; Figures 3a, 8.	1-3, 12, 13
A	US 6524790 B1 (CALIPER TECHNOLOGIES CORP.) 25 Feb. 2003 See Abstract; Figures 1, 4A.	1-3, 12, 13
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 DECEMBER 2008 (18.12.2008)		Date of mailing of the international search report 18 DECEMBER 2008 (18.12.2008)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer JEONG, JAE CHEOL Telephone No. 82-42-481-8385 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2008/070232**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 6, 8, 10, 11
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The subject matter of claims 6, 8, 10, and 11 is not considered to be clear, since said claims 6, 8, 10, and 11 are referring to one of the claims 4, 5, 7, and 9, respectively, which are not drafted in accordance with the second and the third sentence of Rule 6.4(a).

3. ☒ Claims Nos.: 4, 5, 7, 9
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2008/070232

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 20070122819 A1	31.05.2007	None	
US 20060263818 A1	23.11.2006	None	
US 20070074972 A2	05.04.2007	EP 1938101 A2 WO 2007033385 A2	02.07.2008 22.03.2007
US 6524790 B1	25.02.2003	CA 2291854 A1 EP 1021566 A1 US 6703205 B2 WO 9856956 A1	17.12.1998 26.07.2000 09.03.2004 17.12.1998

フロントページの続き

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

(72)発明者 ヴァーメシュ, オファー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 0 0 7 7 , ロサンゼルス, ウェザーバイ・レーン 1 1 7
5 9

(72)発明者 エン, ブライアン ケイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 1 2 5 , パサデナ, イー・デル・マー・ブルヴァード
1 0 5 2 9 号

(72)発明者 ヒース, ジェームズ アール

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 0 3 0 , サウスパサデナ, オルタ・ヴィスタ・アヴェニ
ュー 3 3 0

Fターム(参考) 2G058 DA09

专利名称(译)	用于检测靶分子的微流体装置，方法和系统		
公开(公告)号	JP2010533869A5	公开(公告)日	2011-09-01
申请号	JP2010517146	申请日	2008-07-16
[标]申请(专利权)人(译)	加州理工学院		
申请(专利权)人(译)	加州理工学院		
[标]发明人	ヴァーメシユオファー エンブライアンケイ ヒースジェームズアール		
发明人	ヴァーメシユ,オファー エン,ブライアン ケイ ヒース,ジェームズ アール		
IPC分类号	G01N35/08 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	B01J19/0046 B01J2219/00547 B01J2219/00596 B01J2219/00605 B01J2219/00621 B01J2219/00722 B01J2219/00725 B01J2219/0074 B01L3/5025 B01L3/502715 B01L3/502746 B01L3/502753 B01L2300 /0636 B01L2300/0864 B01L2300/0867 B01L2400/0487 B01L2400/084 G01N33/54366 G01N33/54393 G01N33/582 G01N2458/10		
FI分类号	G01N35/08.A G01N33/53.M G01N37/00.101		
F-TERM分类号	2G058/DA09		
代理人(译)	伊藤忠彦		
优先权	60/959666 2007-07-16 US 60/998981 2007-10-15 US		
其他公开文献	JP2010533869A		

摘要(译)

示出了用于检测样品的流体组分中的靶的微流体装置方法和系统。在这样的装置，方法和系统中，调节引入样品的各种通道的流动阻力以控制流体组分与样品的分离和/或用于检测受控流体组分中的靶的测定的性能。时尚。通过靶与捕获剂的结合亲和力或靶在流体组分中的扩散来控制这种性能。