

(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2013-527924

(P2013-527924A)

(43) 公表日 平成25年7月4日(2013.7.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 A	2 G O 5 2
GO 1 N 1/34 (2006.01)	GO 1 N 1/34	4 B O 6 3
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/553	4 B O 6 5
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 B	
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-506262 (P2013-506262)
 (86) (22) 出願日 平成23年4月20日 (2011.4.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年11月26日 (2012.11.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/033184
 (87) 国際公開番号 W02011/133630
 (87) 国際公開日 平成23年10月27日 (2011.10.27)
 (31) 優先権主張番号 61/326,588
 (32) 優先日 平成22年4月21日 (2010.4.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 12/850,203
 (32) 優先日 平成22年8月4日 (2010.8.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512271309
 ナノマー, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ニューメキシコ 871
 06, アルバカーキ, レナード プレ
 イス エスイー 2305, スイート
 110
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 クラリッツァ, リサーチョ アン
 アメリカ合衆国 ニューメキシコ 871
 06, アルバカーキ, ティヘラス エ
 ヌイー 1516 ナンバー31

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 体液からの標的分析物の単離

(57) 【要約】

本発明は、体液試料から標的分析物を単離するために磁気粒子および磁石を用いることに一般に関する。ある実施形態では、本発明の方法は、標的特異的結合部分を含む磁気粒子を体液試料に導入して混合物を作製することと、混合物をインキュベートして粒子を標的に結合させることと、磁場を加えて表面上に標的/磁気粒子複合体を捕捉することと、粒子凝集を低減する洗浄溶液で洗浄し、それによって標的/磁気粒子複合体を単離することを含む。

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
 体液試料から標的分析物を単離するための方法であって、
 標的特異的結合部分を含む磁気粒子を体液試料に導入して、混合物を作製する工程と、
 前記混合物をインキュベートして前記粒子を標的に結合させる工程と、
 磁場を加えて、表面上に標的 / 磁気粒子複合体を捕捉する工程と、
 粒子凝集を低減する洗浄溶液で洗浄し、それによって標的 / 磁気粒子複合体を単離する
 工程と
 を含む、方法。 10
- 【請求項 2】
 前記標的特異的結合部分が抗体である、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 3】
 前記抗体が細菌特異的である、請求項 2 に記載の方法。
- 【請求項 4】
 前記粒子が超常磁性ビーズである、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 5】
 前記インキュベーション工程が、細胞溶解を阻害するバッファー中で前記混合物をイン
 キュベートすることを含む、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 6】
 前記体液が、血液、痰 (s p u t u m)、尿、唾液、汗および脳脊髄液から選択される 20
 、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 7】
 前記バッファーが約 75 m M の濃度のトリス (ヒドロキシメチル) - アミノメタン塩酸
 塩を含む、請求項 5 に記載の方法。
- 【請求項 8】
 前記磁気粒子が少なくとも 70 重量 % の超常磁性ビーズを含む、請求項 4 に記載の方法
 。
- 【請求項 9】
 前記超常磁性ビーズの直径が約 100 nm から約 250 nm である、請求項 4 に記載の
 方法。 30
- 【請求項 10】
 前記洗浄工程の間に前記磁気粒子を磁場に保持する工程をさらに含む、請求項 1 に記載
 の方法。
- 【請求項 11】
 洗浄する工程が、
 前記磁場を除去し、それによって前記標的 / 磁気粒子複合体を再懸濁させる工程と、
 前記洗浄溶液を導入する工程と、
 再び加えられた磁場の存在下で再懸濁された標的 / 磁気粒子複合体を前記表面上に流し
 、それによって前記表面上に標的 / 磁気粒子複合体を再捕捉する工程と
 を含む、請求項 1 に記載の方法。 40
- 【請求項 12】
 前記抗体が真菌に特異的である、請求項 2 に記載の方法。
- 【請求項 13】
 前記細菌が病原性である、請求項 3 に記載の方法。
- 【請求項 14】
 前記細菌がグラム陽性細菌である、請求項 3 に記載の方法。
- 【請求項 15】
 前記細菌がグラム陰性細菌である、請求項 3 に記載の方法。
- 【請求項 16】
 前記細菌が、 E . c o l i 、 L i s t e r i a 、 C l o s t r i d i u m 、 M y c o b 50

acterium、Shigella、Borrelia、Campylobacter、Bacillus、Salmonella、Staphylococcus、Enterococcus、Pneumococcus、Streptococcusおよびそれらの組合せから選択される、請求項3に記載の方法。

【請求項17】

前記磁気粒子が鉄含有磁気粒子である、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

前記磁気粒子が酸化鉄または白金鉄を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

体液試料から標的微生物を単離するための方法であって、
 標的特異的結合部分を含む磁気粒子を体液試料に導入して、混合物を作製する工程と、
 前記混合物をインキュベートして前記粒子を標的に結合させる工程と、
 磁場を加えて、標的が結合している磁気粒子を表面上に単離する工程と、
 粒子凝集を低減する洗浄溶液で洗浄する工程と、
 捕捉された細菌を溶解して、PCR、マイクロアレイハイブリダイゼーションまたは配列決定によるさらなる分析のためにDNAを抽出する工程と
 を含む、方法。

10

【請求項20】

体液試料から標的分析物を単離するための方法であって、
 70重量%の超常磁性粒子を含み、標的特異的結合部分を有する磁気ビーズを体液試料
 に導入して、混合物を作製する工程と、
 前記混合物をインキュベートして前記粒子を標的に結合させる工程と、
 磁場を加えて、標的が結合している磁気粒子を表面上に単離する工程と、
 粒子凝集を低減する洗浄溶液で洗浄する工程と
 を含む、方法。

20

【請求項21】

体液試料から標的分析物を単離するための方法であって、
 約100nmから約250nmの直径を有し、標的特異的結合部分を含む超常磁性粒子
 を体液試料に導入して、混合物を作製する工程と、
 前記混合物をインキュベートして前記粒子を標的に結合させる工程と、
 磁場を加えて、表面上に標的/磁気粒子複合体を単離する工程と、
 粒子凝集を低減する洗浄溶液で洗浄する工程と
 を含む、方法。

30

【請求項22】

血液試料中の1CFU/mlという低い濃度の細菌を単離するための方法であって、
 約100nmから約250nmの直径を有し、細菌特異的結合部分を含む超常磁性粒子
 を体液試料に導入して、混合物を作製する工程と、
 前記混合物をインキュベートして前記粒子を細菌に結合させる工程と、
 磁場を加えて、表面上に細菌/磁気粒子複合体を単離する工程と、
 粒子凝集を低減する洗浄溶液で洗浄し、それによって前記血液試料中の1CFU/ml
 という低い濃度の細菌を単離する工程と
 を含む、方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2010年8月4日に出願された米国特許出願第12/850,203号(この米国特許出願は、2010年4月21日に出願された米国仮特許出願第61/326,588号の利益および優先権を主張する)の利益および優先権を主張し、この米国仮特許出願の全体の内容は、本明細書中に参考として援用される。

50

【 0 0 0 2 】

発明の分野

本発明は、体液試料から標的分析物を単離するための磁気粒子および磁石の使用に関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

背景

血液由来病原体は、健康管理上重要な問題である。細菌感染症の診断の遅れまたは不適切な診断は、感染への重大でしばしば致命的な炎症性応答である敗血症をもたらすことがある。敗血症は、米国で10番目の主要な死因である。血液中の細菌感染症の早期発見は、敗血症の開始の阻止での鍵である。血液由来感染症の伝統的な検出および同定の方法には、血液培養および抗生物質感受性アッセイが含まれる。それらの方法は細胞を培養することを一般に必要とし、それは費用がかかり、72時間という長い時間を要することがある。細胞培養結果が得られる前に敗血症性ショックが起こることがしばしばある。

10

【 0 0 0 4 】

病原体、特に細菌の検出のための代替方法は、他の者によって記載されている。それらの方法には、分子検出方法、抗原検出方法および代謝産物検出方法が含まれる。ハイブリッド捕捉またはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を含むかどうかにかかわらず、分子検出方法は検出のために高濃度の精製されたDNAを必要とする。抗原検出および代謝産物検出方法の両方も比較的多量の細菌を必要として高い検出限界 (通常 $> 10^4$ CFU/mL) を有し、したがって検出の前に濃縮工程を必要とする。このインキュベーション/濃縮期間は、同定をより容易に助けるために、細菌の増殖および細菌細胞数の増加を可能にすることを目的とする。多くの場合では、標的細菌を単離するために一連の2つまたは3つの別々のインキュベーションが必要である。しかし、そのような濃縮工程はかなりの時間 (例えば、少なくとも数日から一週間) を必要とし、測定しようとする細胞のいくつかを死滅させることによって試験感度を損なう可能性がある。

20

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 5 】

追加の濃縮工程なしで、血液試料などの試料から細菌などの標的分析物を単離するための方法の必要性がある。患者処置の決定のためのデータを、臨床的に妥当な時間枠内で提供するために、速くて感度が高い標的分析物の単離方法の必要性がさらにある。

30

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 6 】

要旨

本発明は、生物試料中の病原体を単離するための方法およびデバイスを提供する。本発明は、試料中の非常に低いレベルでの病原体の急速な検出を可能にし、したがって、病原体の早期発見および正確な検出および同定を可能にする。本発明は、標的特異的結合部分を有する磁気粒子を用いて実施される。本発明の方法は、標的特異的結合部分を含む磁気粒子を体液試料に導入して混合物を作製すること、この混合物をインキュベートして上記粒子を標的に結合させること、磁場を加えて表面上に標的/磁気粒子複合体を捕捉すること、および粒子凝集を低減する洗浄溶液で洗浄し、それによって標的/磁気粒子複合体を単離することを含む。本発明の方法の特別な利点は、多くの臨床試料に存在する低い濃度 (血液試料に1CFU/mLという低い濃度の細菌) での、血液試料からの細菌および真菌の直接的な捕捉および単離についてのものである。

40

【 0 0 0 7 】

標的特異的結合部分は、捕捉する標的によって決まる。この部分は、当該分野で公知の任意の捕捉部分、例えば抗体、アプタマー、核酸、タンパク質、受容体、ファージまたはリガンドであってよい。特定の実施形態では、標的特異的結合部分は抗体である。ある実施形態では、抗体は細菌に特異的である。他の実施形態では、抗体は真菌に特異的である

50

。

【0008】

標的分析物とは、本発明の方法によって捕捉および単離される標的を指す。標的は、当該分野で公知である細菌、真菌、タンパク質、細胞、ウイルス、核酸、受容体、リガンドまたは任意の分子であってよい。ある実施形態では、標的は病原性細菌である。他の実施形態では、標的はグラム陽性細菌またはグラム陰性細菌である。本発明の方法によって捕捉および単離することができる例示的な細菌種には、E. coli、Listeria、Clostridium、Mycobacterium、Shigella、Borrelia、Campylobacter、Bacillus、Salmonella、Staphylococcus、Enterococcus、Pneumococcus、Streptococcusおよびそれらの組合せが含まれる。

10

【0009】

本発明の方法は、任意の種類磁気粒子を用いて実施することができる。磁気粒子は、2つの広いカテゴリーに一般に分類される。第一のカテゴリーには、永久に磁化可能であるか、強磁性である粒子が含まれ；第二のカテゴリーには、磁場にさらされるときだけバルク磁性挙動を示す粒子が含まれる。後者は、磁気応答粒子と呼ばれる。磁気応答挙動を示す材料は、超常磁性と時々記載される。しかし、バルク強磁性特性を示す材料、例えば磁性酸化鉄は、直径約30nm以下の結晶で提供されるとき、超常磁性と特徴づけることができる。強磁性材料のより大きな結晶は、対照的に磁場への曝露の後に永久磁石の特徴を保持し、強力な粒子間相互作用のためにその後凝集する傾向がある。ある実施形態では、粒子は超常磁性ビーズである。他の実施形態では、磁気粒子は少なくとも70重量%の超常磁性ビーズを含む。ある実施形態では、超常磁性ビーズは、直径が約100nmから約250nmである。ある実施形態では、磁気粒子は鉄含有磁気粒子である。他の実施形態では、磁気粒子は酸化鉄または白金鉄を含む。

20

【0010】

ある実施形態では、インキュベーション工程は、細胞溶解を阻害するバッファー中で混合物をインキュベートすることを含む。ある実施形態では、バッファーは、約50mMから約100mMの間、好ましくは約75mMの濃度のトリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン塩酸塩を含む。他の実施形態では、本発明の方法は、洗浄工程の間、磁気粒子を磁場に保持することをさらに含む。本発明の方法は、任意の体液で用いることができる。例示的な体液には、血液、痰(sputum)、血清、血漿、尿、唾液、汗および脳脊髄液が含まれる。

30

【0011】

本発明の別の態様は、体液試料から標的微生物を単離するための方法であって、標的特有的結合部分を有する磁気粒子を体液試料に導入して混合物を作製すること、この混合物をインキュベートして粒子を標的に結合させること、標的が結合している磁気粒子を表面上に単離するために磁場を加えること、粒子凝集を低減する洗浄溶液中で混合物を洗浄すること、および捕捉された細菌を溶解して、PCR、マイクロアレイハイブリダイゼーションまたは配列決定によるさらなる分析のためにDNAを抽出することを含む方法を提供する。

40

【0012】

本発明の別の態様は、血液試料中の1CFU/mlという低い濃度の細菌を単離するための方法であって、約100nmから約250nmの直径を有し、細菌特有的結合部分を有する超常磁性粒子を体液試料に導入して混合物を作製すること、上記混合物をインキュベートして上記粒子を細菌に結合させること、細菌/磁気粒子複合体を表面上に単離するために磁場を加えること、および粒子凝集を低減する洗浄溶液で混合物を洗浄し、それによって血液試料中の生存可能な1CFU/mlという低い濃度の細菌を単離することを含む方法を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0013】

50

詳細な説明

本発明は、体液試料中の標的病原体を捕捉する磁気粒子、および標的を単離するための磁石の使用に一般に関する。本発明の方法は、標的特異的結合部分を含む磁気粒子を体液試料に導入して混合物を作製すること、この混合物をインキュベートして上記粒子を標的に結合させること、磁場を加えて表面上に標的/磁気粒子複合体を捕捉し、それによって標的/磁気粒子複合体を単離すること、ならびに粒子凝集を低減する洗浄溶液中で上記混合物を洗浄することを含む。本発明の方法は、粒子凝集を低減する洗浄溶液中で混合物を洗浄することをさらに含むことができる。磁性材料を標的実体に結合させ、その後磁場および勾配の利用によって分離することには、特定の基盤技術および原理が関連する。そのような基盤技術および原理は当該分野で公知であり、その内容は参照により完全に本明細書に援用されるJaneway (Immunobiology、6版、Garland Science Publishing)に記載されるものなど、以前に記載されている。

10

【0014】

本発明の方法は、標的分析物を有する体液を、血液収集管(例えば、Becton、Dickinson and companyから市販されている、静脈穿刺のために特別に設計された試験管であるVACUTAINER)などの容器に収集することを含む。ある実施形態では、血液の場合ヘパリンなどの、内在性凝集因子の凝集を阻止または低減する溶液が加えられる。

【0015】

体液は、例えばヒトまたは他の哺乳動物に由来する液状物質を指す。そのような体液には、粘液、血液、血漿、血清、血清誘導体、胆汁、痰(phlegm)、唾液、汗、羊水、乳液(mammary fluid)、尿、痰(sputum)、および脳脊髄液(CSF)(例えば、腰椎または脳室のCSF)が含まれるが、これらに限定されない。体液は、針吸引液であってもよい。体液は、細胞または生物学的物質を含む媒体であってもよい。特定の実施形態では、上記体液は血液である。

20

【0016】

本発明の方法は、任意の標的分析物を検出するために用いられ得る。標的分析物とは、本発明の方法によって捕捉および単離される試料中の物質を指す。標的は、細菌、真菌、タンパク質、細胞(例えば癌細胞、白血球、ウイルス感染細胞または母体循環中に循環する胎児細胞)、ウイルス、核酸(例えばDNAまたはRNA)、受容体、リガンド、ホルモン、薬剤、化学物質または当該分野で公知の任意の分子であってもよい。ある実施形態では、標的は病原性細菌である。他の実施形態では、標的はグラム陽性細菌またはグラム陰性細菌である。本発明の方法によって捕捉および単離することができる例示的な細菌種には、E. coli、Listeria、Clostridium、Mycobacterium、Shigella、Borrelia、Campylobacter、Bacillus、Salmonella、Staphylococcus、Enterococcus、Pneumococcus、Streptococcusおよびそれらの組合せが含まれる。

30

【0017】

次に、試料は、標的特異的結合部分を含む磁気粒子と混合されて、混合物を生成し、それは、上記粒子が血液試料中の細菌などの試料中の標的に結合するようにインキュベートされる。上記混合物は、上記粒子を標的分析物に結合させるのに十分な時間インキュベートされる。磁気粒子を標的分析物に結合させるプロセスは、磁気モーメントを標的分析物と結びつけ、このようにして、附加された磁気モーメントへの、磁場によって生み出される力を介した、標的分析物の操作を可能にする。

40

【0018】

一般に、インキュベーション時間は、標的分析物と磁気ビーズとの間の所望の結合程度(例えば、標的に所望通りに附加されるモーメントの量)、標的あたりのモーメントの量、混合時間、混合の型、結合を促進するために存在する試薬、および採用される結合化学

50

系によって決まる。インキュベーション時間は、約5秒から数日までの任意の時間であってよい。例示的なインキュベーション時間は、約10秒から約2時間までである。結合は、広範囲の温度、一般に15 から40 の間の温度で起こる。

【0019】

本発明の方法は、任意の種類磁気粒子を用いて実施され得る。本発明で使用するための磁気粒子および粒子の生産は、当該分野で公知である。例えばG i a e v e r (米国特許第3,970,518号)、S e n y i r a (米国特許第4,230,685号)、D o d i n r a (米国特許第4,677,055号)、W h i t e h e a d r a (米国特許第4,695,393号)、B e n j a m i n r a (米国特許第5,695,946号)、G i a e v e r (米国特許第4,018,886号)、R e m b a u n (米国特許第4,267,234号)、M o l d a y (米国特許第4,452,773号)、W h i t e h e a d r a (米国特許第4,554,088号)、F o r r e s t (米国特許第4,659,678号)、L i b e r t i r a (米国特許第5,186,827号)、O w n r a (米国特許第4,795,698号)およびL i b e r t i r a (国際公開第91/02811号)に示され、それぞれの内容は参照により完全に本明細書に組み込まれる。

10

【0020】

磁気粒子は、2つの広いカテゴリーに一般に分類される。第一のカテゴリーには、永久に磁化可能であるか、強磁性である粒子が含まれ；第二のカテゴリーには、磁場にさらされるときだけバルク磁性挙動を示す粒子が含まれる。後者は、磁気応答粒子と呼ばれる。磁気応答挙動を示す材料は、超常磁性と時々記載される。しかし、バルク強磁性特性を示す材料、例えば磁性酸化鉄は、直径約30nm以下の結晶で提供されるとき、超常磁性と特徴づけることができる。強磁性材料のより大きな結晶は、対照的に磁場への曝露の後に永久磁石の特徴を保持し、強力な粒子間相互作用のためにその後凝集する傾向がある。ある実施形態では、粒子は超常磁性ビーズである。ある実施形態では、磁気粒子は鉄含有磁気粒子である。他の実施形態では、磁気粒子は酸化鉄または白金鉄を含む。

20

【0021】

ある実施形態では、磁気粒子は少なくとも10重量%の超常磁性ビーズ、少なくとも約20重量%の超常磁性ビーズ、少なくとも約30重量%の超常磁性ビーズ、少なくとも約40重量%の超常磁性ビーズ、少なくとも約50重量%の超常磁性ビーズ、少なくとも約60重量%の超常磁性ビーズ、少なくとも約70重量%の超常磁性ビーズ、少なくとも約80重量%の超常磁性ビーズ、少なくとも約90重量%の超常磁性ビーズ、少なくとも約95重量%の超常磁性ビーズ、または少なくとも約99重量%の超常磁性ビーズを含む。特定の実施形態では、磁気粒子は少なくとも70重量%の超常磁性ビーズを含む。

30

【0022】

ある実施形態では、超常磁性ビーズは、直径100nm未満である。他の実施形態では、超常磁性ビーズは、直径約150nm、直径約200nm、直径約250nm、直径約300nm、直径約350nm、直径約400nm、直径約500nm、または直径約1000nmである。特定の実施形態では、超常磁性ビーズは、直径が約100nmから約250nmである。

【0023】

ある実施形態では、粒子は、磁性材料、または官能基化された磁性材料、または当該分野で公知である他の構造を組み込むビーズ(例えば、ナノ粒子)である。ある実施形態では、ナノ金属材料(複数可)などの磁性材料(複数可)を組み込む高分子物質を含むナノ粒子を用いることができる。それらのナノ金属材料(複数可)または結晶(複数可)、例えば Fe_3O_4 が超常磁性である場合、それらは外部磁場によって磁化すること、および外部磁場が除去されたときに消磁することが可能なことなどの有利な特性を提供することができる。このことは、試料が過度のビーズ凝集なしで処理される領域への、およびそこから試料の輸送を促進するために有利であるかもしれない。

40

【0024】

安定性を提供するコア-シェル構造の Fe_3O_4 、 $FePt$ もしくは Fe 、および/ま

50

たは当該分野で公知であり得る他の様々なものなど、1つまたは複数、または多くの異なるナノ金属（複数可）を使用することができる。多くの適用では、勾配に関連する力を最大にすることができ、そして/またはビーズの存在と関連するシグナルを増強することができるので、容量あたりの可能な限り高い飽和モーメントを有するナノ金属を有することが有利であり得る。同じであるかまたは類似した理由（複数可）のために、ビーズにおける容量負荷をできるだけ高くすることも有利であり得る。磁化可能なナノ金属によって提供されるモーメントを最大にするために、特定の飽和場を提供することができる。例えば、 Fe_3O_4 超常磁性粒子について、この場合は約0.3 T程度であり得る。

【0025】

ナノ金属含有ビーズのサイズは、特定の適用のために最適化することができ、例えば、標的に負荷されるモーメントを最大にすること、許容される検出性で標的上のビーズの数を最大にすること、所望の力誘導運動を最大にすること、および/または標識標的と非特異的結合標的もしくはビーズ凝集体もしくは個々のビーズとの間の、附加されるモーメントの差を最大にすることができる。最大にすることが上の例で言及されているが、条件を最小にするか、さもなければ所望通りに条件に影響を及ぼすことなどの、他の最適化または変更が企図される。

【0026】

例示的な実施形態では、80重量%の Fe_3O_4 超常磁性粒子を含むポリマービーズ、または例えば90重量%以上の超常磁性粒子が、ポリマーコーティングで超常磁性粒子を被包して約250 nmの直径を有するビーズを生成することによって生成される。

【0027】

本発明の方法で用いるための磁気粒子は、粒子が試料中の、対象とする標的に特異的に結合することを可能にする標的特異的結合部分を有する。標的特異的部分は、当該分野で公知である任意の分子であってよく、捕捉および単離される標的によって決まる。例示的な標的特異的結合部分には、核酸、タンパク質、リガンド、抗体、アプタマーおよび受容体が含まれる。

【0028】

特定の実施形態では、標的特異的結合部分は、特定の細菌に結合する抗体などの抗体である。抗血清の産生のための、動物を選択するときを考慮すべき基準を含む、抗体生成のための一般方法は、Harlowら（Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory, 93~117頁、1988年）に記載される。例えば、ヤギ、イヌ、ヒツジ、マウスまたはラクダなどの適したサイズの動物が、免疫応答をもたらすのに有効な免疫原（例えば、標的細菌）の量の投与によって免疫化される。例示的なプロトコルは以下の通りである。動物は、動物のサイズに依存して、アジュバント（例えばフロイド完全アジュバント）に再懸濁させた100ミリグラムの抗原を注射され、続いて3週後に、動物のサイズに依存して、アジュバント（例えばフロイド不完全アジュバント）とともに100マイクログラムから100ミリグラムの免疫原を皮下注射される。動物血液中の抗体の適する力価が達成されるまで、二週間ごとのアジュバント（例えばフロイド不完全アジュバント）とともにさらなる皮下または腹腔内注射が投与される。例示的な力価としては、少なくとも約1:5000の力価または1:100,000以上の力価（すなわち検出可能な活性を有する希釈率）があげられる。抗体は、例えば、タンパク質G樹脂または標的特異的親和性樹脂を含むカラムで親和性精製によって精製される。

【0029】

モノクローナル抗体を生成するために、ヒトリンパ球の *in vitro* 免疫化技術が用いられる。ヒトリンパ球の *in vitro* 免疫化技術は、当業者に周知である。例えば、Inaiら、Histochemistry, 99巻(5号): 335~362頁、1993年5月; Mulderら、Hum. Immunol., 36巻(3号): 186~192頁、1993年; Haradaら、J. Oral Pathol. Med., 22巻(4号): 145~152頁、1993年; Stauberら、J. Imm

10

20

30

40

50

unol. Methods、161巻(2号):157~168頁、1993年;およびVenkateswaranら、Hybridoma、11巻(6号):729~739頁、1992年を参照。これらの技術は、抗原特異的IgGおよびIgMモノクローナル抗体を含む、抗原反応性モノクローナル抗体を生成するために用いることができる。

【0030】

対象とする細菌に対して親和性および特異性を有する任意の抗体またはその断片は、本明細書で提供される本発明の範囲内である。Salmonellaに対する免疫磁気ビーズが、Vermuntら(J. Appl. Bact. 72巻:112頁、1992年)で提供される。Staphylococcus aureusに対する免疫磁気ビーズが、Johnesら(J. Clin. Microbiol. 27巻:1631頁、1989年)で提供される。Listeriaに対する免疫磁気ビーズが、Skjerveら(Appl. Env. Microbiol. 56巻:3478頁、1990年)で提供される。Escherichia coliに対する免疫磁気ビーズが、Lundら(J. Clin. Microbiol. 29巻:2259頁、1991年)で提供される。

10

【0031】

標的特異的結合部分を磁気粒子に付着させる方法は、当該分野で公知である。磁気粒子を抗体でコーティングすることは当該分野で周知であり、例えばHarlowら(Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988年)、Hunterら(Immunoassays for Clinical Chemistry, 147~162頁、eds, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1983年)およびStanley(Essentials in Immunology and Serology, Delmar, 152~153頁、2002年)を参照。他のタイプの標的特異的結合部分を磁気粒子に結合するために、当業者はそのような方法を容易に改変することができる。機能的部分でコーティングされたある種類の磁気粒子が、Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)から市販されている。

20

【0032】

ある実施形態では、磁気ビーズとともにバッファー溶液が試料に加えられる。例示的なバッファーは、約75mMの濃度のトリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン塩酸塩を含む。バッファー組成、混合パラメータ(速度、混合形式(例えば回転、振盪など)、および温度)が結合に影響を与えることが分かっている。高い標識効率を維持するために、最終溶液(例えば、血液+バッファー)のオスモル濃度を維持することが重要である。ある実施形態では、本発明の方法で用いられるバッファーは、血液細胞の溶解を防止し、標的と磁気ビーズとの効率的な結合を促進し、ビーズ凝集体の形成を低減するように設計される。300mMのNaCl、75mMのTris-HCl pH8.0および0.1% Tween 20を含むバッファー溶液がこれらの設計目標を満たすことが分かっている。

30

【0033】

いかなる特定の理論または作用機構によっても限定されることなく、イオン相互作用を通して塩化ナトリウムが溶液のオスモル濃度の維持および磁気ビーズの非特異的結合の低減を主に担うと考えられている。

40

【0034】

トリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン塩酸塩は、溶液のpHを維持するために生物学で多用される十分に確立されたバッファー化合物である。75mM濃度が有益であり、これは高い結合効率のために十分であることが分かっている。同様に、疎水性相互作用によって非特異的付着を低減する穏やかな界面活性剤として、Tween 20が広く使われている。様々なアッセイは、0.01%から1%の濃度でTween 20を用いる。血液細胞をそのままの状態に保ちながらの細菌の効率的な標識のために、0.1%濃度が最適のようである。

50

【0035】

結合工程のために必要とされる時間を短縮しつつ、高い結合効率を達成する代替手法は、スタティックミキサー、または例えば5 mL / 分前後の高い流動速度で粘性試料の効率的混合を提供する他の混合デバイスを用いることである。一実施形態では、試料は、混合インタフェースコネクタを用いて、1 : 1 前後の比で結合バッファーと混合される。希釈された試料は次に混合インタフェースコネクタを通して流れ、そこで、それは標的特異的なノ粒子と混合される。結合効率を向上させるために、試料と抗原特異的なノ粒子との混合を提供するさらなる混合インタフェースコネクタを下流に付けることができる。標識試料の合わせた流速は、下流の処理に適合するように選択される。

【0036】

標的 / 磁気粒子複合体を形成するために混合物中で磁気粒子を標的分析物に結合させた後、表面上に複合体を捕捉するために磁場が混合物に加えらる。磁気粒子に結合しない混合物の成分は、磁場に影響を受けず、混合物中に遊離のままである。標的 / 磁気粒子複合体を混合物の他の成分から分離するための方法および装置は、当該分野で公知である。例えば、スチールメッシュを磁石と組み合わせること、線形チャンネル（複数可）を隣接する磁石を用いて構成すること、または環状流動を有する四極磁石を用いることができる。標的 / 磁気粒子複合体を混合物の他の成分から分離するための他の方法および装置は、Ra oら（米国特許第6, 551, 843号）、Libertiら（米国特許第5, 622, 831号）、Hatchら（米国特許第6, 514, 415号）、Benjaminら（米国特許第5, 695, 946号）、Libertiら（米国特許第5, 186, 827号）、Wangら（米国特許第5, 541, 072号）、Libertiら（米国特許第5, 466, 574号）およびTerstappenら（米国特許第6, 623, 983号）で示され、それぞれの内容は参照により完全に本明細書に組み込まれる。

【0037】

ある実施形態では、磁気による捕捉は、試料の流れに直角に置かれた多数の強力な希土類の棒磁石を有するフロールー捕捉セルを利用することによって、高効率で達成される。流路断面0.5 mm x 20 mm (h x w) および7個のNdFeB棒磁石を有する流動チャンパーを用いる場合、100%近くの捕捉効率を達成しながら、流速は5 mL / 分以上という速さであり得た。

【0038】

上記の形式の磁気分離は、標的分析物の効率的な捕捉および試料混合物の残りの成分の過半数の除去をもたらす。しかし、そのようなプロセスは、標的分析物に結合しない非常に高いパーセントの磁気粒子（これは、磁気粒子が代表的に過剰に加えらるためである）、ならびに非特異的標的実体を含む試料を生成することがある。非特異的標的実体は、例えば大幅に低下した効率、例えば表面積の1%で結合してもよいが、対象とする標的は利用できる表面積または利用できる抗原部位の50%またはほぼ100%で負荷することができる。しかし、磁気勾配流セルまたは試料チャンパー内で捕獲するのに必要な力を付与するために、1%の負荷でさえ十分かもしれない。

【0039】

例えば、血液試料中の細菌または真菌の免疫磁気結合の場合、試料は以下を含むことができる：約1 / mLの濃度または約 10^6 / mL未満の濃度の結合標的；約 10^7 / mLから約 10^{10} / mLの濃度のバックグラウンド粒子；および約10 / mLから約 10^5 / mLの濃度の非特異的標的。

【0040】

標的 / 磁気粒子複合体を含む表面に、標的分析物に結合していない磁気粒子および非特異的標的実体が存在していると、対象とする標的を首尾よく検出する能力を妨害する。生じた混合物の磁気捕捉、ならびに磁気粒子の相互の近接接触および磁気粒子の結合標的との近接接触は、分配するのが困難であり、以降の処理または分析工程に抵抗性または不適切であるかもしれない凝集体の形成をもたらす。標的分析物に結合していない磁気粒子および非特異的標的実体を除去するために、本発明の方法は、粒子凝集を低減する洗浄溶液

10

20

30

40

50

で表面を洗浄し、それによって、標的分析物に結合していない磁気粒子および非特異的標的実体から標的/磁気粒子複合体を単離することを含む。洗浄溶液は、凝集体の形成を最小にする。

【0041】

本発明の方法は、磁気粒子に、磁気粒子の標的特異的部分と標的分析物の間の相互作用を破壊するのに十分でない正味の負電荷を付与する、任意の洗浄溶液を用いることができる。いかなる特定の理論または作用機構によっても限定されることなく、洗浄溶液中の負電荷分子の磁気粒子への付着は、粒子へ正味の負電荷を提供して、非特異的凝集粒子の分散を促進すると考えられている。同時に、正味の負電荷は、磁気粒子の標的特異的部分と標的分析物との間の強力な相互作用（例えば、抗体抗原相互作用）を破壊するのに十分でない。例示的な溶液には、ヘパリン、Tris-HCl、Tris-ボレート-EDTA (TBE)、Tris-アセテート-EDTA (TAE)、Tris-カゴジレート、HEPES (4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸)、PBS (リン酸緩衝食塩水)、PIPES (ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸))、MES (2-N-モルホリノエタンスルホン酸)、トリシン(N-(トリ(ヒドロキシメチル)メチル)グリシン)および類似した緩衝剤が含まれる。ある実施形態では、一度の洗浄サイクルだけが実施される。他の実施形態では、複数の洗浄サイクルが実施される。

10

【0042】

特定の実施形態では、洗浄溶液はヘパリンを含む。体液試料が血液である実施形態については、ヘパリンは磁気捕捉の後の血液成分の凝固の可能性も低減する。血液成分を除去し、そして凝集体の形成を低減するために、結合した標的はヘパリン含有バッファーで1~3回洗浄される。

20

【0043】

標的/磁気粒子複合体が単離されると、標的は、多数の既存の技術、例えば小規模NMR (miniature NMR)、ポリマーゼ連鎖反応(PCR)、質量分析、蛍光標識および顕鏡観察を用いる可視化、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)、増殖に基づく抗生物質感受性試験(growth-based antibiotic sensitivity test)、ならびに他の試料成分からのかなりの汚染なしで精製された標的で行うことができる他の様々な方法によって分析することができる。一実施形態では、単離された細菌はカオトロピック溶液で溶解し、DNAをDNA抽出樹脂へ結合させる。樹脂の洗浄後に、細菌の特定の種、および/またはサブクラスの存在を検出するために、細菌性DNAを溶出して定量的RT-PCRで用いる。

30

【0044】

別の実施形態では、捕捉された細菌はそれらが結合している磁気粒子から除去され、処理された試料は細菌に特異的な蛍光標識抗体または蛍光グラム染色物と混合される。インキュベーションの後、反応混合液を0.2 μmから1.0 μmのフィルターで濾過して標識細菌を捕捉しながら、大半の遊離ビーズおよび蛍光標識にフィルターを通過させる。顕微鏡技術、例えば直接顕鏡観察、レーザー走査または画像捕捉の他の自動化方法を用いて、細菌をフィルターの上で可視化する。細菌の存在は、画像分析を通して検出される。視覚的技術による陽性検出の後、PCRまたはゲノム方法を用いて細菌をさらに特徴づけることができる。

40

【0045】

対象とする細菌の検出は、当該分野で公知である手法に従って、核酸プローブの使用によって実施することができる。核酸プローブを用いる細菌の検出に適する手法は、例えばStackebrandtら(米国特許第5,089,386号)、Kingら(国際公開第90/08841号)、Fosterら(国際公開第92/15883号)およびCossartら(国際公開第89/06699号)に記載され、それぞれは参照により本明細書に組み込まれる。

【0046】

50

適する核酸プローブアッセイは、試料の処理および溶解、選択されたプローブ（複数可）とのハイブリダイゼーション、ハイブリッド捕捉ならびに検出を一般に含む。細菌の溶解は、プローブのための核酸を放出するために必要である。核酸標的分子は、アルカリ（NaOHなど）、グアニジン塩（チオシアン酸グアニジンなど）、酵素（リゾチーム、ムタノリシンおよびプロテイナーゼKなど）および界面活性剤を含むいくつかの溶解剤のいずれかによる処理によって放出される。したがって細菌の溶解は、DNAおよびRNAの両方、特にリボソームRNAおよび染色体DNAを放出し、その両方は、適するプローブの適当な選択により標的分子として利用することができる。rRNAは細胞質量のかなりの成分を構成し、それによって豊富な標的分子を提供するので、標的分子（複数可）としてのrRNAの使用は有利となり得る。rRNAプローブの使用は、対象とする細菌への特異性、すなわち、偽陽性または偽検出につながる可能性がある望ましくない交差反応性のない陽性検出も増進する。

10

20

30

40

50

【0047】

ハイブリダイゼーションは、特異的な核酸プローブの付加を含む。一般に、ハイブリダイゼーションは、特定のおよび安定した水素結合を形成するのと逆平行様式で、既定の反応条件下で2つの部分的または完全に相補的な核酸が合わされる手法である。ハイブリダイゼーション/反応条件の選択またはストリンジェンシーは、プローブ/標的鎖の長さおよび塩基組成によって、ならびに2つの核酸鎖間の誤対合のレベルおよび幾何構造によって定義される。ストリンジェンシーは、温度、ハイブリダイゼーション溶液に存在する変性剤の種類および濃度、ならびにハイブリダイゼーション溶液に存在するイオン種の種類および濃度などの反応パラメータによっても支配される。

【0048】

核酸プローブアッセイのハイブリダイゼーション相は、単一の選択されたプローブを用いて、または2つ、3つもしくはそれ以上のプローブの組合せを用いて実施される。標的生物体の特異な核酸配列に相通的である配列を有するプローブが選択される。一般に、第一の捕捉プローブは、形成されたハイブリッド分子を捕捉するために利用される。ハイブリッド分子は、次に抗体反応の使用によって、または、放射性同位体（リン32など）もしくは蛍光標識（フルオレセインなど）もしくは化学発光標識で標識されてもよい第二の検出プローブの使用によって検出される。

【0049】

対象とする細菌の検出は、PCR技術の使用によっても実施することができる。適するPCR技術は、例えばVerhoefら（国際公開第92/08805号）に記載される。そのようなプロトコルは、磁気ビーズの上で捕捉される細菌へ直接に適用することができる。細菌は溶解バッファーと合わされ、収集された核酸標的分子はPCR反応のための鋳型として次に利用される。

【0050】

抗体の使用により選択される細菌の検出のために、単離された細菌を、対象とする細菌に特異的な抗体と接触させる。上記したように、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかを利用することができるが、いずれの場合にも検出される特定の細菌に親和性を有する。これらの抗体は、特異的な標的細菌に由来する物質に接着/結合する。抗体の標識化に関して、これらは、他の公知のイムノアッセイで用いられる標識で直接または間接に標識される。直接的な標識には、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、放射性標識、金属標識、ピオチンまたは酵素分子を含めることができる。これらの標識を抗体または他の巨大分子と合わせる方法は、当業者に周知である。例としては、フルオレセインイソチオシアネートについてはHijmans, W.ら（1969年）、Clin. Exp. Immunol. 4巻、457～頁の方法、テトラメチルローダミンイソチオシアネートについてはGoding, J. W.（1976年）、J. Immunol. Meth. 13巻、215～頁の方法、酵素についてはIngrall, E.（1980年）、Meth. in Enzymol. 70巻、419～439頁の方法が挙げられる。

【 0 0 5 1 】

これらの検出抗体は、間接的に標識することもできる。この場合には、実際の検出分子は、抗細菌細胞表面抗体への結合親和性を有する二次抗体または他の分子に付着される。二次抗体が用いられる場合、それは好ましくは、抗細菌細胞表面抗体を惹起するために用いられる動物種に由来する抗体のクラス (I g G および I g M) に対する一般抗体である。例えば、二次抗体をアルカリ性ホスファターゼまたはペルオキシダーゼのいずれかの酵素とコンジュゲートさせることができる。標識を検出するために、対象とする細菌を二次抗体と接触させ、洗浄した後、単離された試料成分を、アルカリ性ホスファターゼまたはペルオキシダーゼのいずれかに対する発色性基質を含む溶液に浸す。発色性基質は、酵素によって切断されて、基質が基礎分子から切断されるときだけ出現するなんらかの種類の検出可能なシグナルの生成をもたらすことができる化合物である。酵素と反応し、濃色生成物が形成されるまで、発色性基質は無色である。したがって、膜シートに接着した細菌コロニーからの物質は、強い青 / 紫 / 黒色または茶色 / 赤色になり、他のコロニーからの物質は無色のままである。検出分子の例には、蛍光物質、例えば 4 - メチルウンベリフェリルホスフェート、ならびに発色性物質、例えば 4 - ニトロフェニルホスフェート、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジンおよび 2, 2' - アジノ - ジ - [3 - エチルベンゾ - チアゾリアンスルホネート (3 - e t h e l b e n z - t h i a z o l i a n e s u l f o n a t e) (6)] が含まれる。アルカリ性ホスファターゼおよびペルオキシダーゼに加えて、他の有用な酵素には、
 - ガラクトシダーゼ、
 - グルクロニダーゼ、
 - グルコシダーゼ、
 - マンノシダーゼ、
 - ガラクトースオキシダーゼ、
 - グルコースオキシダーゼおよびヘキソキナーゼが含まれる。

10

20

【 0 0 5 2 】

NMR を用いた、対象とする細菌の検出は、以下の通りに達成することができる。試料が磁石の中心の検出コイルに送達される検出方法としての NMR の使用では、磁気標識細菌などの対象とする標的は、実質的に水で構成される流体などの流体媒体によって送達することができる。この場合には、磁気標識標的は、非常に低い磁場の領域から高い磁場の領域、例えば約 1 から約 2 テスラの磁石によって生成される場に行くことができる。このように、試料は、磁石に向かっておよび磁石から遠ざかって、磁気勾配を横断することができる。下の方程式 1 および 2 から分かるように、標的は、磁石に向かう試料流の方向の磁石に引っ張る力、および磁石から遠ざかる反対の流れの方向の磁石への力を経験することができる。流れが勾配力に打ち勝つのに十分でない場合、標的は、標的を磁石に捕獲する保持力を経験することができる。

30

【 0 0 5 3 】

【 化 1 】

$$m \dot{\theta} = F B \quad \text{式 1}$$

$$v_t = -F / (6 \pi \eta n r) \quad \text{式 2}$$

式中、 η は粘度であり、 r はビーズ直径であり、 F はビーズのベクトル力であり、 B はベクトル場であり、 m はベクトルモーメントである。

40

【 0 0 5 4 】

磁石への経路の上の磁場は、磁石への流動に関して横方向に一様でなくてよい。このように、磁石への試料流動を提供する容器または導管の側へ標的を引っ張る横方向の力があってよい。一般に、標的が導管の壁に到達するのにかかる時間は、終端速度と関連し、粘度の増加に伴い低下する。終端速度は抵抗力と関連し、それはある場合にはクリーブ流れを示すことがある。一般に、標的が磁石に、または導管壁に対して捕獲されることなく磁石を通して流体流で運ばれやすいように、より高い抵抗力を提供するために、高い粘度を有することは有利であり得る。

【 0 0 5 5 】

ニュートン流体は、例えば円形パイプなどの導管内で放物線状の流動特性を有し、した

50

がって流速は壁の所でゼロであり、中心部で最大であり、半径に対して放物線状の特性を有する。速度は壁に向かう方向で低下し、導管壁へ向かう標的に対する横の勾配力で、または任意の位置でパイプ内の標的流動を阻止するのに十分な縦勾配のいずれかで、壁の近くの標的を磁気によって捕獲することがより容易である。良好な流体抵抗力を提供して試料が導管内で捕獲されないようにするために、流体速度が導管内での半径方向の位置の関数として実質的に均一であるプラグフロー状態を有することが有利であり得る。

【0056】

流動試料に関連してNMR検出が使用される場合、検出は、磁気標識標的に起因するNMR水シグナルの摂動に基づることができる(Sillerudら、JMR(Journal of Magnetic Resonance)、第181巻、2006年)。この場合には、試料を0時刻に励起させることができ、多少の遅れの後、例えば約50ミリ秒または約100ミリ秒遅れて、(検出されるNMRシグナルに基づいて)許容される測定を生成することができる。あるいは、そのような測定を励起直後に生成することができ、検出はある時間、例えば約50ミリ秒または約100ミリ秒の間続く。励起後の実質的により長い時間、NMRシグナルを検出することが有利かもしれない。

10

【0057】

例示として、高分解能でスペクトル情報を記録するために、NMRシグナルの検出を約2秒間続けることができる。放物線状またはニュートンの流動の場合、導管内の半径方向の位置に依存して摂動源周囲の水は異なる速度で移動するので、0時刻に励起させた摂動は一般的に不鮮明である。さらに、シグナル検出の間、試料流体の差示的動作の不鮮明化効果または混合効果のために、スペクトル情報が失われることがある。流動流体試料を含むNMR検出適用を実行する場合、望ましいNMRコントラストおよび/または望ましいNMRシグナルの検出を促進するために、プラグ様試料流動を提供することが有利なことがある。

20

【0058】

流動ニュートン流体の中の差示的な動作は、磁気共鳴画像化の場合のように、空間的に局在化されたNMR検出が所望である状況などの特定の状況では有害作用を有することがある。一例において、磁気標識細菌などの磁気物体は、NMR検出器を通して流され、その存在および場所はMRI技術を用いて検出される。磁気物体の磁場が磁気物体の近くの流体の磁場を不安定化するので、この磁気物体の磁場のために検出が可能になることがある。磁気物体の検出は、物体の近くの流体が物体の近くにとどまる場合には向上する。これらの条件下では、磁気摂動は流体の任意の所与の体積要素により長く作用させることができ、そのように影響を受ける流体の体積要素は空間的に近接したままである。そのようなより強力な、より局在化した磁気摂動は、NMRまたはMRI技術を用いてより容易に検出される。

30

【0059】

検出器を通して磁気物体を運ぶためにニュートン流体が用いられる場合、流体体積要素の速度は流体導管内の半径方向の位置に依存する。この場合には、物体は検出器を通して流動するので、磁気物体の近くの流体は磁気物体の近くにとどまらない。周囲の流体に及ぼす物体の磁気摂動の効果は空間で不鮮明になることがあり、任意の1つの流体体積要素上の摂動の強度は、その要素が摂動の範囲内にとどまらないので、低減されることがある。試料流体中のより弱く、より局在化していない摂動は、NMRまたはMRI技術を用いても検出不能であるかもしれない。

40

【0060】

ある液体、または液体の混合物は、円形導管内では非放物線状の流動プロファイルを示す。そのような流体は、他の導管形状では非ニュートン流動プロファイルを示すことができる。そのような流体の使用は、NMRに基づく検出デバイスを使用する適用で検出流体として有利であると判明するかもしれない。いかなるそのような有利な効果も、流体の高い粘度、流体と関連するプラグ様流動プロファイル、および/または検出を促進する流体に帰される他の特徴(複数可)に帰することができる。例えば、高粘度のずり減粘性流体は、

50

導管断面の中心領域にわたってかなり均一である流速プロフィールを示すことができる。そのような流体の速度プロファイルは、導管の壁の箇所またはその近くではゼロまたは非常に低い値へ移行することができ、この移行領域は壁の近くの非常に薄い層に限定されることがある。

【0061】

全ての流体、または全ての流体混合物がNMR検出方法に適合するわけではない。一例において、グリセロールと水との混合物は高い粘度を提供することができるが、混合物を構成する水およびグリセロール分子から別々のNMRシグナルが検出されるので、NMR測定は劣化する。このことは、NMR検出器の感度を徐々に低下させ得る。別の例では、流体混合物の水以外の成分は、NMRシグナルを有さないように選択することができ、それは、例えば過重水素化流体成分を用いるか、過フッ素化流体成分を用いることによって達成することができる。検出コイル中の流体の一部はシグナルを発生しないので、この手法はシグナル強度の減損をこうむることがある。

10

【0062】

別の手法は、全体の流体混合物の小画分のみを構成する二次的流体成分を用いることである。そのような低濃度二次的流体成分は、水であってよい流体の主成分からのシグナルと比較して無視できる強度のNMRシグナルを生成することができる。検出器でNMRシグナルを生成しない低濃度二次的流体成分を用いることが有利であろう。例えば、過フッ素化または過重水素化された二次的流体成分を用いることができる。NMR検出器で用いられる流体混合物は、主な流体成分に加えて1つ、2つまたは3つ以上の二次的成分を含むことができる。採用される流体成分は、高粘度および/またはプラグフローなどの所望の流体流動特性を生むために、協力して作用することができる。この流体成分は、例えばより速い動作またはより高いシグナル強度を可能にするNMR休止時間を提供することによって、NMR検出器の性能のために有利である流体特性を提供するために有用であろう。

20

【0063】

非ニュートン流体は、NMRまたはMRI技術による物体の検出のために、さらなる利点を提供することができる。一例として、検出される物体の全ては、検出コイルを通過するとき、実質的に同じ速度を有することができる。この特徴的速度は、検出データの分析のために、より単純であるかより堅牢なアルゴリズムを可能にすることができる。別の例としては、検出される物体は、一定の、既知の、かつ均一な速度を有することができる。このことは、後の検出される物体の位置が必要とされるデバイスで、例えば、NMRまたはMRI検出コイルの下流に隔離チャンバーまたは二次的検出チャンバーを有するデバイスなどで有利であることが判明するかもしれない。

30

【0064】

例示的な実施形態では、水に0.1%から0.5%のキサンタンガムを含む流体送達媒体を用いる1.7Tの円筒形磁石への、およびそこから試料送達は、首尾よく達成された。実質的にプラグ様の流れ、高い粘度(例えば約10cPから約3000cP)、および水に関して良好なNMRコントラストを提供するために、そのような送達は適する。キサンタンガムは、当該分野で周知である非ニュートン流体の特徴を有する非ニュートン流体として作用し、望ましい操作様式での良好な検出にとって望ましいNMRシグナル特性を損なわない。

40

【0065】

ある実施形態では、本発明の方法は、血液から細菌を直接に検出するために有用である。そのようなプロセスは、本明細書中で記載される。試料は静脈穿刺によってナトリウムヘパリン管に収集され、許容される試料容量は約1mLから10mLである。試料は結合バッファで希釈され、標的特異的結合部分を有する超常磁性粒子が試料に加えられ、その後37の振盪インキュベーターでの約30分から120分間のインキュベーションが続く。代替の混合法を用いることもできる。特定の実施形態では、試料が混合機を通してポンプ輸送されるときに反応バッファおよび磁気ビーズが試料に加えられるように

50

、試料は静的ミキサを通してポンプ輸送される。このプロセスは、単一の流体部分への全ての成分の効率的な統合を可能にし、可動部および別個のインキュベーション容器を回避し、インキュベーション時間を短縮する。

【0066】

標識標的の捕捉は、血液成分の除去および30 mLから5 mLへの試料容量の低減を可能にする。捕捉は、様々な磁石/流動構成で実施される。ある実施形態では、方法は、振盪プラットフォームの上の試料管中での捕捉、または5 mL/分の流速でのフロースルーデバイスでの捕捉（これは合計6分の捕捉時間をもたらす）を含む。

【0067】

捕捉の後、試料は、血液成分および遊離ビーズを除去するためのヘパリンを含む洗浄パフューで洗浄される。洗浄パフューの組成は、遊離ビーズの凝集を低減し、その一方でビーズ/標的複合体の完全性を維持するように最適化される。

10

【0068】

検出方法は、水の磁気共鳴のため調整されたミニチュアNMR検出器に基づく。試料が磁氣的に均一である（結合した標的がない）場合、水からのNMRシグナルは明らかに検出可能であり、強力である。検出器コイル中の磁気材料の存在は磁場を乱し、水シグナルの減少をもたらす。この検出方法の主な有益性の1つは、試料処理のストリンジェンシーの要件を有意に低減する磁気バックグラウンドが生体試料中になくということである。さらに、検出されるシグナルは、水によって生み出されるので、単一の標識細菌の検出を可能にするビルトインシグナル増幅がある。

20

【0069】

この方法は、血液試料中の1 CFU/mLという低い濃度、またはさらに低い濃度の細菌の単離および検出を可能にする。

【0070】

本発明の方法はまた、当該分野で公知の他の分離および単離プロトコールと組み合わせられ得る。特に、本発明の方法は、同時係属中であり、かつ同一人に係る、米国特許出願第12/855,147号（2010年4月12日に出願され、代理人整理番号がNANO-002/00US 28864/4である）に示される方法と組み合わせられ得る。この米国特許出願の内容は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【0071】

30

参照による組込み

この開示全体で、特許、特許出願、特許公報、雑誌、本、論文、ウェブコンテンツなどの他の文書が参照および引用されている。全てのそのような文書は、全ての目的のためにここに参照により完全に本明細書に組み込まれる。

【0072】

同等物

本明細書で示され、記載されるものに加えて、本発明およびその多くのさらなる実施形態の様々な変更は、本明細書で引用される科学文献および特許文献への参照を含むこの文書の全内容から、当業者に明らかになる。本明細書の対象物は、その様々な実施形態および同等物での本発明の実施へ適合させることができる、重要な情報、例証および指針を含む。

40

【実施例】

【0073】

（実施例1）：試料

健康なボランティアからの血液試料に、血流感染症で最も頻繁に見出される細菌種の研究所株および臨床分離物の両方を含む細菌の臨床上的適切な濃度（1~10 CFU/mL）を混入させた。

【0074】

（実施例2）：抗体調製

ポリクローナルの汎グラム陽性細菌特異的IgGを生み出すために、最初に完全フロイ

50

ントアジュバントに懸濁させた細菌抗原をリンパ節内に投与し、続いて不完全フロイントアジュバント中の細菌抗原の皮下注射を2週間隔で行うことによってヤギを免疫化した。細菌を指数増殖期 ($OD_{600} = 0.4 \sim 0.8$) まで増殖させることによって、抗原を抗体産生のために調製した。遠心による細菌の集菌の後、37 で4時間の4%ホルムアルデヒドでのホルマリン固定を用いて、細菌を不活性化した。PBSで細菌を3回洗浄した後(15分間洗浄、4000rpmで20分間の遠心)、BCAアッセイを用いて抗原濃度を測定し、免疫化のために抗原を1mg/mLで用いた。グラム陽性細菌特異的IgGを生み出すために、接種のためにいくつかの細菌種を用いた: *Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Enterococcus faecium*および*Enterococcus fecalis*。

10

【0075】

親和性クロマトグラフィーを用いてプロテインGセファロースカラム (GE Health care) で免疫血清を精製し、反応性はELISAを用いて判定した。グラム陰性細菌および真菌と交差反応する抗体は、ホルマリン固定グラム陰性細菌および真菌による精製IgGの吸収によって除去した。ホルマリン固定生物体は前記と同様に調製し、IgGと混合した。室温で2時間のインキュベーションの後、細菌を除去するために調製物を遠心分離した。最終抗体調製物を遠心によって透明にし、抗原特異的磁気ビーズの調製のために用いた。

【0076】

20

(実施例3) : 抗原特異的磁気ビーズの調製

超常磁性ビーズは、酸化鉄ナノ粒子(直径5~15nm)をラテックスコアに封入し、ヤギIgGで標識することによって合成された。有機溶媒にナノ粒子を含む強磁性流体をエタノールで沈殿させ、スチレンおよび界面活性剤Hitenol BC-10の水溶液にナノ粒子を再懸濁させ、超音波処理を用いて乳化した。混合液を攪拌させながら一晩平衡させ、1.2および0.45μmフィルターによって濾過して、均一なミセルサイズを達成した。スチレン、アクリル酸およびジビニルベンゼンを、pH9.6の炭酸バッファーに加えた。K₂S₂O₈の添加により70の混合液で重合を開始させ、反応は一晩完了させた。合成された粒子は、磁気捕捉を用いて0.1%SDSで3回洗浄し、1.2、0.8および0.45μmフィルターによって濾過し、抗体コンジュゲーションのために用いた。

30

【0077】

ビーズの生成は、平均サイズおよび標準偏差で特徴づけることができるサイズの分布をもたらした。血液からの細菌の標識化および抽出の場合、最適性能のための平均サイズは、100から350nmの間、例えば200nmから250nmの間であることが見出された。

【0078】

精製されたIgGは、標準化学を用いて調製されたビーズとコンジュゲートさせた。コンジュゲーションの後、ビーズ上の非特異的結合部位をブロックし、ビーズ調製物の安定性を増加させるために用いられる0.1%BSAにビーズを再懸濁させた。

40

【0079】

(実施例4) : 過量の磁気ナノ粒子を用いる希少細胞の標識

血流感染の間に血液に存在する細菌を、上の実施例3で調製される超常磁性ビーズを用いて磁気標識した。実施例1に記載の混入された試料をトリスベースの結合バッファーおよび標的特異的ビーズで3倍に希釈し、その後37の振盪プラットフォーム上で最大2時間インキュベートした。インキュベーションの後、標識標的を磁気によって分離し、その後血液生成物を除去するように設計された洗浄工程を行った。下の実施例5を参照されたい。

【0080】

(実施例5) : 結合した細菌の磁気捕捉

50

磁気標識標的細菌および過量の遊離ビーズを含む血液を、試料の流れに直角に置かれたいくつかの強力な希土類棒磁石を有するフロースルー捕捉セルに注入した。流路断面0.5 mm × 20 mm (h × w) および7個のNdFeB棒磁石を有するフローチャンバーを用いて、5 mL / 分という速さの流速が達成された。磁石の存在下で混合液をチャンネル内に流した後に、ヘパリンを含む洗浄溶液をチャンネル内に流した。血液成分を除去して磁気粒子の凝集体の形成を低減するために、結合した標的をヘパリン含有バッファーで1回洗浄した。結合した標的を効果的に洗浄するために、磁石を取り出し、捕捉された磁性材料を洗浄バッファーに再懸濁させ、その後磁場を再び加え、同じフロースルー捕捉セルで磁性材料を捕捉した。

【0081】

捕捉された標識標的の除去は、磁石を捕捉チャンバーから遠ざけ、バッファー溶液流により溶出した後に可能であった。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 11/33184
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/553 (2011.01) USPC - 436/526; 210/222 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) - G01N 33/553 (2011.01) USPC - 436/526; 210/222 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 436/526; 210/222, 435/4, 210/695 (Text Search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB); Google Scholar and PubMed. Search Terms: target, analyte, magnetic particle, immunomagne\$, antibody, bacter\$, aggregat\$, wash, wash\$, rins\$, reduc\$, decreas\$, pathogen, virus, body fluid, blood, sputum, urine, saliva, sweat, cerebral spinal fluid, immunomagnetic, particle, microparticle, lump,		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DRANCOURT et al., Diagnosis of Mediterranean Spotted Fever by Indirect Immunofluorescence of Rickettsia conorii in Circulating Endothelial Cells Isolated with Monoclonal Antibody-Coated Immunomagnetic Beads. The Journal of Infectious Diseases. September 1992, Vol 166, No 3, pages 660-663: abstract; pg 661, col 1, para 3.	1-22
Y	FU et al., Rapid detection of Escherichia coli O157:H7 by Immunomagnetic Separation and Real-time PCR. International Journal of Food Microbiology. 1 March 2005, Vol 99, No 1, pages 47-57; fig 1; abstract; pg 47, col 1, para 1 to col 2, para 2; pg 48, col 1, para 4, col 2, para 3 to pg 49, col 1, para 3; pg 50, col 1, para 2 to pg 51, col 2, para 1.	1-22
Y	US 5,466,574 A (LIBERTI et al.) 14 November 1995 (14.11.1995) col 2, ln 49-63; col 8, ln 25-36, ln 66 to col 9, ln 20; col 13, ln 45 to col 14, ln 28; col 18, ln 30-48.	4, 8-10, 17-18 and 20-22
Y	US 2002/0012669 A1 (PRESNELL et al.) 31 January 2002 (31.01.2002) para [0451].	5 and 7
Y	US 5,770,461 A (SAKAZUME et al.) 23 June 1998 (23.06.1998) claim 1; col 3, ln 16-22.	11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 11 July 2011 (11.07.2011)		Date of mailing of the international search report 25 JUL 2011
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT CBP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I		テーマコード (参考)	
G 0 1 N 1/28 (2006.01)	G 0 1 N	1/28		J
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68		A
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q	1/04		
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N	1/20		A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 アダムス, エディ ダブリュー.

アメリカ合衆国 ニューメキシコ 87108, アルバカーキ, モーニングサイド ドライブ
エヌイー 412

(72) 発明者 ドリガ, セルゲイ エー.

アメリカ合衆国 ニューメキシコ 87144, リオ ランチョ, スカッグウェイ ドライブ
エヌイー 7317

F ターム(参考) 2G052 AA29 AA36 AB20 AD29 AD49 CA03 CA04 ED05 ED07 ED16
FC02 FC15 FD09 FD20 GA11 GA25 GA30
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ03 QQ06 QQ42 QR32 QR56 QR62 QS15
QS25 QS33 QS34 QX02 QX07
4B065 AA01X BD14 CA46

专利名称(译)	从体液中分离目标分析物		
公开(公告)号	JP2013527924A	公开(公告)日	2013-07-04
申请号	JP2013506262	申请日	2011-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	纳米聚公司		
申请(专利权)人(译)	九聚公司		
[标]发明人	クラリツアリスジョアン アダムスエディダブリュー ドリガセルゲイエー		
发明人	クラリツア, リサ-ジョ アン アダムス, エディ ダブリュー, ドリガ, セルゲイ エー.		
IPC分类号	G01N33/543 G01N1/34 G01N33/553 G01N33/569 G01N33/531 G01N1/28 C12Q1/68 C12Q1/04 C12N1/20		
CPC分类号	C07K1/22 C07K16/1267 C12N13/00 C12Q1/6806 G01N33/54333 Y10T428/2982 C12Q2565/629 C12Q2563/143 A61B5/055 B01L3/502761 B01L2200/0647 B01L2400/043 C12N15/1013 C12Q1/689 C12Q2565/633 G01N24/08 G01N33/54326 G01N33/56911 G01N2333/195 G01N2446/20 G01R33/465		
FI分类号	G01N33/543.581.A G01N1/34 G01N33/553 G01N33/569.B G01N33/531.B G01N1/28.J C12Q1/68.A C12Q1/04 C12N1/20.A		
F-TERM分类号	2G052/AA29 2G052/AA36 2G052/AB20 2G052/AD29 2G052/AD49 2G052/CA03 2G052/CA04 2G052 /ED05 2G052/ED07 2G052/ED16 2G052/FC02 2G052/FC15 2G052/FD09 2G052/FD20 2G052/GA11 2G052/GA25 2G052/GA30 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ06 4B063 /QQ42 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS15 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4B063/QX07 4B065/AA01X 4B065/BD14 4B065/CA46		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/326588 2010-04-21 US 12/850203 2010-08-04 US		
其他公开文献	JP2013527924A5 JP5814344B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明一般涉及使用磁性颗粒和磁体将目标分析物与体液样品分离。在某些实施方案中，本发明的方法涉及将包含靶特异性结合部分的磁性颗粒引入体液样品以产生混合物，孵育混合物以允许颗粒结合靶，施加磁场以捕获靶/磁性颗粒在表面上复合，并用洗涤溶液洗涤，洗涤溶液减少颗粒聚集，从而分离靶/磁性颗粒复合物。

