

(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2019-525136
(P2019-525136A)

(43) 公表日 令和1年9月5日(2019.9.5)

(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 2 1	4 B 0 2 9
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 1 5 M	4 B 0 6 3
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	GO 1 N 33/53 S	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-564267 (P2018-564267)
 (86) (22) 出願日 平成29年6月7日 (2017.6.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年2月6日 (2019.2.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/036418
 (87) 国際公開番号 W02017/214315
 (87) 国際公開日 平成29年12月14日 (2017.12.14)
 (31) 優先権主張番号 62/348,038
 (32) 優先日 平成28年6月9日 (2016.6.9)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 506115514
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94
 607-5200, オークランド, フラン
 クリン ストリート 1111, 12番
 フロア
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペーパーベースのイムノアッセイにおいて使用するためのバイオマーカー濃縮及びシグナル増幅、ならびにDNAを抽出、濃縮、及び増幅するための単一プラットフォーム

(57) 【要約】

さまざまな実施形態において、分析対象物を検出及び/または定量化するための方法及びデバイスが提供される。ある特定の実施形態では、第1の相溶液と第2の相とに分離する混合相溶液を含む水性二相系 (ATPS) であって、使用時に、上記第1の相溶液が先行相となり、上記第2の相溶液が遅行相となる、上記ATPSと、ラテラルフローアッセイ (LFA) と、プローブ及び/または増進試薬であって、使用時に、上記プローブが、上記ATPSの上記先行相における上記第1の相溶液と結び付き、及び/または上記増進試薬が、上記ATPSの上記遅行相における上記第2の相溶液と結び付き、上記プローブ及び/または増進試薬と、を含むデバイスが提供される。ある特定の実施形態では、例えば、ATPS及び等温増幅試薬を利用し、核酸を精製及び増幅する「ワンポット」系が提供される。

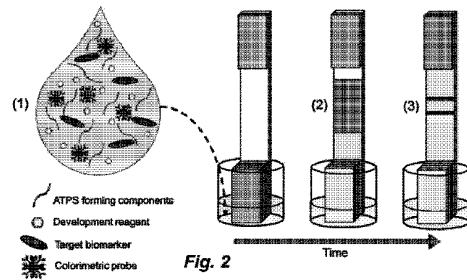


Fig. 2

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

試料における分析対象物を検出及び/または定量化するためのデバイスであって、前記デバイスが、

第 1 の相溶液と第 2 の相とに分離する混合相溶液を含む水性二相系 (A T P S) であって、使用時に、前記第 1 の相溶液が先行相となり、前記第 2 の相溶液が遅行相となる、前記 A T P S と、

ラテラルフローアッセイ (L F A) またはフロースルーアッセイと、

プローブ及び/または増進試薬であって、使用時に、前記プローブが、前記 A T P S の前記先行相における前記第 1 の相溶液と結び付き、及び/または前記増進試薬が、前記 A T P S の前記遅行相における前記第 2 の相溶液と結び付き、前記プローブ及び/または増進試薬と、

を含む、前記デバイス。

【請求項 2】

前記 L F A が、前記 A T P S もしくはその構成成分、及び/または前記プローブ、及び/または前記増進試薬を、受け入れ、及び/または含むように構成された多孔性マトリックスを含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 3】

前記 L F A が、複合パッド、前記分析対象物と結合する抗体を含む試験ライン、任意選択で、二次抗体を含む対照ライン、任意選択で吸収パッド、及び任意選択で試料パッドを含む、請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

【請求項 4】

試料における分析対象物を検出及び/または定量化するためのデバイスであって、前記デバイスが、フロースルー系を含み、

前記フロースルー系が、

混合相溶液を含む水性二相系 (A T P S) を含む濃縮コンポーネントであって、使用時に、前記第 1 の相溶液が先行相となり、前記第 2 の相溶液が遅行相となる、前記濃縮コンポーネントと、

プローブ及び/または増進試薬であって、使用時に、前記プローブが、前記 A T P S の前記先行相における前記第 1 の相溶液と結び付き、及び/または前記増進試薬が、前記 A T P S の前記遅行相における前記第 2 の相溶液と結び付き、前記プローブ及び/または増進試薬と、

前記濃縮コンポーネントの真下に配置された検出コンポーネントと、

を含む、

前記デバイス。

【請求項 5】

前記濃縮コンポーネントが、1 つまたは複数のペーパー層を含む、請求項 4 に記載のデバイス。

【請求項 6】

前記検出コンポーネントが、複合パッド、反応パッド、及び任意選択でシンクを含む、請求項 4 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

【請求項 7】

前記プローブが、前記 A T P S に含まれる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

【請求項 8】

前記プローブが、前記 A T P S の前記第 1 の相溶液と結び付き、請求項 7 に記載のデバイス。

【請求項 9】

前記増進試薬が、前記 A T P S に含まれる、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

10

20

30

40

50

- 【請求項 10】
前記増進試薬が、前記 A T P S の前記第 2 の相溶液と結び付く、請求項 9 に記載のデバイス。
- 【請求項 11】
前記試料が前記デバイスへ加えられる前に、前記 A T P S が前記試料と混合されるように、前記デバイスが構成される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のデバイス。
- 【請求項 12】
前記デバイスが前記試料と接触する前に、前記 A T P S が脱水されて、前記ラテラルフローアッセイに加えられるか、またはフロースルーアッセイの濃縮コンポーネントに含められる、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のデバイス。 10
- 【請求項 13】
前記デバイスが前記試料と接触する前に、前記プローブが脱水されて、前記ラテラルフローアッセイに加えられるか、またはフロースルーアッセイの濃縮コンポーネントに含められる、請求項 12 に記載のデバイス。
- 【請求項 14】
前記デバイスが前記試料と接触する前に、前記増進試薬が脱水されて、前記ラテラルフローアッセイに加えられるか、またはフロースルーアッセイの濃縮コンポーネントに含められる、請求項 12 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のデバイス。
- 【請求項 15】
前記デバイスが前記試料と接触した後に、前記 A T P S が、第 1 の相溶液と第 2 の相溶液とに分離する混合相溶液を含む、請求項 12 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のデバイス。 20
- 【請求項 16】
前記プローブが、前記 A T P S の親水相に極度に分配されるように選択される、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のデバイス。
- 【請求項 17】
前記プローブが、前記 A T P S の疎水相に極度に分配されるように選択される、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のデバイス。
- 【請求項 18】
前記増進試薬が、前記 A T P S の疎水相に極度に分配されるように選択される、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のデバイス。 30
- 【請求項 19】
前記増進試薬が、前記 A T P S の親水相に極度に分配されるように選択される、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のデバイス。
- 【請求項 20】
前記 A T P S が、ポリマー / 塩 A T P S、ポリマー / ポリマー A T P S、ミセル / ポリマー A T P S、及びミセル A T P S からなる群から選択される、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載のデバイス。
- 【請求項 21】
前記 A T P S の第 1 の相溶液が、表 1 に記載の構成成分 1 を含む、請求項 20 に記載のデバイス。 40
- 【請求項 22】
前記 A T P S の第 2 の相溶液が、表 1 に記載の構成成分 2 を含む、請求項 20 に記載のデバイス。
- 【請求項 23】
前記 A T P S の第 1 の相溶液が、表 1 に記載の構成成分 1 を含み、前記 A T P S の第 2 の相溶液が、表 1 に記載の構成成分 2 を含む、請求項 20 に記載のデバイス。
- 【請求項 24】
前記 A T P S が、ポリマー / 塩 A T P S である、請求項 20 に記載のデバイス。
- 【請求項 25】
前記 A T P S が、PEG / 塩 A T P S である、請求項 24 に記載のデバイス。 50

【請求項 26】

前記プローブが、前記ポリマー/塩 ATP S の塩高含有相に分配され、前記増進試薬が、前記ポリマー/塩 ATP S のポリマー高含有相に分配される、請求項 24 ~ 25 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

【請求項 27】

前記 ATP S が、ミセル ATP S である、請求項 20 に記載のデバイス。

【請求項 28】

前記プローブが、前記 ATP S のミセル低含有相に分配され、前記増進試薬が、前記 ATP S のミセル高含有相に分配される、請求項 27 に記載のデバイス。

【請求項 29】

前記プローブが、前記標的分析対象物に結合する結合部分を含む、請求項 1 ~ 28 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

10

【請求項 30】

前記標的分析対象物が、タンパク質、核酸、糖またはレクチン、及び微生物からなる群から選択される部分を含む、請求項 29 に記載のデバイス。

【請求項 31】

前記標的分析対象物が、細菌、原生動物、真菌、ウイルス、及び藻類からなる群から選択される微生物を含む、請求項 30 に記載のデバイス。

【請求項 32】

前記標的分析対象物が、微生物に対するバイオマーカーを含む、請求項 30 に記載のデバイス。

20

【請求項 33】

前記標的分析対象物が、細菌、原生動物、真菌、ウイルス、及び藻類からなる群から選択される微生物に対するバイオマーカーを含む、請求項 32 に記載のデバイス。

【請求項 34】

前記標的分析対象物が、病状に対するバイオマーカー、食品安全（もしくは危険）に対するバイオマーカー、またはバイオテロ物質に対するバイオマーカーを含む、請求項 32 に記載のデバイス。

【請求項 35】

前記結合部分が、抗体または抗体断片、レクチン、核酸、及びアプタマーからなる群から選択される、請求項 29 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 36】

前記プローブが、抗体または抗体断片を含む、請求項 35 に記載のデバイス。

【請求項 37】

前記プローブが、合成ポリマー、金属、ミネラル、ガラス、石英、セラミック、生体ポリマー、及びプラスチックからなる群から選択される材料を含む、請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

【請求項 38】

前記プローブが、ポリエチレン、ポリプロピレン、セルロース、キチン、ナイロン、ポリオキシメチレン、ポリテトラフルオロエチレン、またはポリ塩化ビニル、デキストラン、ポリプロピレン、またはポリエチレングリコールからなる群から選択される材料を含む、請求項 37 に記載のデバイス。

40

【請求項 39】

前記プローブが、金、銀、鉄、白金、パラジウム、セリウム、及びチタンからなる群から選択される金属を含む、請求項 37 に記載のデバイス。

【請求項 40】

前記プローブが、ナノ粒子を含む、請求項 1 ~ 39 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

【請求項 41】

前記プローブが、前記増進試薬と反応して検出可能なシグナルを生成することができる物質を含む、請求項 1 ~ 40 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

50

- 【請求項 4 2】
前記物質が、基質と反応して強力な可視シグナルを形成する酵素を含む、請求項 4 1 に記載のデバイス。
- 【請求項 4 3】
前記増進試薬が、前記基質を含む、請求項 4 2 に記載のデバイス。
- 【請求項 4 4】
前記増進試薬が、前記酵素と結合する抗体を含む、請求項 4 2 に記載のデバイス。
- 【請求項 4 5】
前記物質が、酵素と反応して強力な可視生成物を形成する基質を含む、請求項 4 1 に記載のデバイス。 10
- 【請求項 4 6】
前記増進試薬が、前記酵素を含む、請求項 4 5 に記載のデバイス。
- 【請求項 4 7】
前記酵素が、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビ（または他の）ペルオキシダーゼ、及びグルコースオキシダーゼからなる群から選択される、請求項 4 2 及び請求項 4 6 のいずれか 1 項に記載のデバイス。
- 【請求項 4 8】
前記プローブが、前記 A T P S の前記第 1 の相溶液または前記第 2 の相溶液に対する親和性を有するコーティングを含む、請求項 1 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載のデバイス。
- 【請求項 4 9】 20
前記コーティングが、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、デキストラン、親水性タンパク質、及び疎水性タンパク質からなる群から選択される材料を含む、請求項 4 8 に記載のデバイス。
- 【請求項 5 0】
前記デバイスが、異なる分析対象物とそれぞれが相互作用する 2 つ以上のプローブを含む、請求項 1 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載のデバイス。
- 【請求項 5 1】 30
前記デバイスが、少なくとも 2 つの異なるプローブ、または少なくとも 3 つの異なるプローブ、または少なくとも 4 つの異なるプローブ、または少なくとも 5 つの異なるプローブ、または少なくとも 7 つの異なるプローブ、または少なくとも 1 0 の異なるプローブ、または少なくとも 1 5 の異なるプローブ、または少なくとも 2 0 の異なるプローブを含む、請求項 5 0 に記載のデバイス。
- 【請求項 5 2】
前記デバイスが、サンドイッチアッセイを実施するために構成される、請求項 1 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載のデバイス。
- 【請求項 5 3】 40
第 1 の相溶液と第 2 の相とに分離する混合相溶液であって、L F A または他の多孔性媒体における使用時に、前記第 1 の相溶液が先行相になり、前記第 2 の相溶液が遅行相になる、前記混合相溶液と、
プローブ及び / または増進試薬であって、前記プローブが、前記第 1 の相溶液と結び付き、前記増進試薬が、前記第 2 の相溶液と結び付き、前記プローブ及び / または増進試薬と、
を含む、水性二相系（A T P S）。
- 【請求項 5 4】
前記 A T P S が、ポリマー / 塩 A T P S、ポリマー / ポリマー A T P S、ミセル / ポリマー A T P S、及びミセル A T P S からなる群から選択される、請求項 5 3 に記載の水性二相系。
- 【請求項 5 5】 50
前記 A T P S の第 1 の相溶液が、表 1 に記載の構成成分 1 を含み、前記 A T P S の第 2 の相溶液が、表 1 に記載の構成成分 2 を含む、請求項 5 4 に記載の水性二相系。

- 【請求項 56】
前記 A T P S が、ポリマー / 塩 A T P S である、請求項 54 に記載の水性二相系。
- 【請求項 57】
前記 A T P S が、PEG / 塩 A T P S である、請求項 56 に記載の水性二相系。
- 【請求項 58】
前記プローブが、前記ポリマー / 塩 A T P S の塩高含有相に分配され、前記増進試薬が、前記ポリマー / 塩 A T P S のポリマー高含有相に分配される、請求項 56 ~ 57 のいずれか 1 項に記載の水性二相系。
- 【請求項 59】
前記 A T P S が、ミセル A T P S である、請求項 54 に記載の水性二相系。 10
- 【請求項 60】
前記プローブが、前記 A T P S のミセル低含有相に分配され、前記増進試薬が、前記 A T P S のミセル高含有相に分配される、請求項 59 に記載の水性二相系。
- 【請求項 61】
前記プローブが、前記標的分析対象物に結合する結合部分を含む、請求項 1 ~ 60 のいずれか 1 項に記載の水性二相系。
- 【請求項 62】
前記 A T P S が、多孔性媒体に含められる、請求項 1 ~ 61 のいずれか 1 項に記載の水性二相系。 20
- 【請求項 63】
前記 A T P S が、ペーパーに含められる、請求項 1 ~ 61 のいずれか 1 項に記載の水性二相系。 20
- 【請求項 64】
前記 A T P S が、ラテラルフローアッセイ (L F A) に含められる、請求項 1 ~ 61 のいずれか 1 項に記載の水性二相系。
- 【請求項 65】
前記 A T P S が、フロースルー系に含められる、請求項 1 ~ 61 のいずれか 1 項に記載の水性二相系。
- 【請求項 66】
分析対象物の検出方法及び / または定量化方法であって、 30
前記方法が、
水性二相系 (A T P S) へ試料を加えることであって、前記加えることによって、前記分析対象物が、前記試料に存在するのであれば、前記 A T P S の 1 つの相に濃縮されて分析対象物含有相が得られる、前記加えることと、
ラテラルフローアッセイ (L F A) またはフロースルーアッセイへ前記分析対象物含有相を加えることであって、前記 L F A またはフロースルーアッセイにおいて検出プローブが前記分析対象物に結合する、前記加えることと、
前記 L F A またはフロースルーアッセイへ増進試薬を加えることであって、前記加えることによって、前記検出プローブが生成するシグナルが増強される、前記加えることと、
前記試料における前記分析対象物の存在及び / または量を示すための、前記シグナルの 40
検出及び / または定量化と、
を含む、前記方法。
- 【請求項 67】
前記ラテラルフローアッセイまたはフロースルーアッセイが、ラテラルフローアッセイである、請求項 66 に記載の方法。
- 【請求項 68】
前記ラテラルフローアッセイまたはフロースルーアッセイが、フロースルーアッセイである、請求項 66 に記載の方法。
- 【請求項 69】
前記 A T P S がペーパーに加えられ、前記 A T P S が前記ペーパーを通過するにつれて 50

相が分離することで、「流れながら濃縮する」A T P S が得られる、請求項 6 6 ~ 6 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記 A T P S がペーパーに加えられると、より疎水的な相が先行し、より親水的な相が遅行する、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記 A T P S がペーパーに加えられると、より親水的な相が先行し、より疎水的な相が遅行する、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記 L F A またはフロースルーアッセイが、結合部分が前記分析対象物を捕捉し、前記検出プローブが前記捕捉分析対象物に結合するものである、請求項 6 6 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 7 3】

前記分析対象物含有相が、手動またはロボット制御で前記 A T P S から取り出された後、前記ラテラルフローアッセイに加えられる、請求項 6 6 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記検出プローブが、前記 L F A またはフロースルーアッセイのコンポーネントとして提供される、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

次に、前記増進試薬が、前記 A T P S とは別に、前記ラテラルフローアッセイに加えられる、請求項 7 3 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7 6】

前記プローブと前記増進試薬との両方が、前記 A T P S に加えられるか、または前記 A T P S に含めて提供され、前記 A T P S の前記構成成分が、前記プローブが前記 A T P S の第 1 の相に実質的に分配され、前記増進試薬が前記 A T P S の第 2 の相に実質的に分配されるように選択される、請求項 6 6 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記 A T P S が、ペーパー基質に加えられると、先行相及び遅行相を形成し、前記先行相が、前記濃縮分析対象物及び前記プローブを L F A 試験ストリップまたはフロースルーアッセイに送達した後、前記遅行相が、前記試験ストリップまたはフロースルーアッセイに前記増進試薬を遅れて送達する、請求項 7 6 に記載の方法。

30

【請求項 7 8】

前記プローブが、前記 A T P S の親水相に極度に分配されるように選択される、請求項 7 6 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記プローブが、前記 A T P S の疎水相に極度に分配されるように選択される、請求項 7 6 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記増進試薬が、前記 A T P S の疎水相に極度に分配されるように選択される、請求項 7 6 ~ 7 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 8 1】

前記増進試薬が、前記 A T P S の親水相に極度に分配されるように選択される、請求項 7 6 ~ 7 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記 A T P S が、ポリマー / 塩 A T P S 、ポリマー / ポリマー A T P S 、ミセル / ポリマー A T P S 、及びミセル A T P S からなる群から選択される、請求項 6 6 ~ 8 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記 A T P S の前記第 1 の相溶液が、表 1 に記載の構成成分 1 を含み、前記 A T P S の

50

第 2 の相溶液が、表 1 に記載の構成成分 2 を含む、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記 A T P S が、ポリマー / 塩 A T P S である、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記 A T P S が、PEG / 塩 A T P S である、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記プローブが、前記ポリマー / 塩 A T P S の塩高含有相に分配され、前記増進試薬が、前記ポリマー / 塩 A T P S のポリマー高含有相に分配される、請求項 8 4 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記 A T P S が、ミセル A T P S である、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記プローブが、前記 A T P S のミセル低含有相に分配され、前記増進試薬が、前記 A T P S のミセル高含有相に分配される、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記プローブが、前記標的分析対象物に結合する結合部分を含む、請求項 6 6 ~ 8 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記標的分析対象物が、タンパク質、核酸、糖またはレクチン、及び微生物からなる群から選択される部分を含む、請求項 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記標的分析対象物が、細菌、原生動物、真菌、ウイルス、及び藻類からなる群から選択される微生物を含む、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記標的分析対象物が、微生物に対するバイオマーカーを含む、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記標的分析対象物が、細菌、原生動物、真菌、ウイルス、及び藻類からなる群から選択される微生物に対するバイオマーカーを含む、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記結合部分が、抗体または抗体断片、レクチン、核酸、及びアプタマーからなる群から選択される、請求項 8 9 ~ 9 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記プローブが、抗体または抗体断片を含む、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記プローブが、合成ポリマー、金属、ミネラル、ガラス、石英、セラミック、生体ポリマー、及びプラスチックからなる群から選択される材料を含む、請求項 6 6 ~ 9 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 7】

前記プローブが、ポリエチレン、ポリプロピレン、セルロース、キチン、ナイロン、ポリオキシメチレン、ポリテトラフルオロエチレン、またはポリ塩化ビニル、デキストラン、ポリプロピレン、またはポリエチレングリコールからなる群から選択される材料を含む、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記プローブが、金、銀、鉄、白金、パラジウム、セリウム、及びチタンからなる群から選択される金属を含む、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記プローブが、ナノ粒子を含む、請求項 6 6 ~ 9 8 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

【請求項 1 0 0】

10

20

30

40

50

前記プローブが、前記増進試薬と反応して検出可能なシグナルを生成することができる物質を含む、請求項 66 ~ 99 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 101】

前記物質が、基質と反応して強力な可視シグナルを形成する酵素を含む、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 102】

前記増進試薬が、前記基質を含む、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 103】

前記増進試薬が、前記酵素と結合する抗体を含む、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 104】

前記物質が、酵素と反応して強力な可視生成物を形成する基質を含む、請求項 100 に記載の方法。

10

【請求項 105】

前記増進試薬が、前記酵素を含む、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 106】

前記酵素が、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビ（または他の）ペルオキシダーゼ、及びグルコースオキシダーゼからなる群から選択される、請求項 101 及び請求項 105 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 107】

前記プローブが、前記 ATPS の前記第 1 の相溶液または前記第 2 の相溶液に対する親和性を有するコーティングを含む、請求項 66 ~ 106 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

20

【請求項 108】

前記コーティングが、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、デキストラン、親水性タンパク質、及び疎水性タンパク質からなる群から選択される材料を含む、請求項 107 に記載のデバイス。

【請求項 109】

前記方法が、請求項 1 ~ 52 のいずれか 1 項に記載のデバイスを使用して実施される、請求項 66 ~ 108 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 110】

分析対象物を検出及び / または定量化するためのキットであって、前記キットが、

30

請求項 1 ~ 52 のいずれか 1 項に記載のデバイスと、

試料を採取するための採取デバイスと、

を含む、前記キット。

【請求項 111】

前記採取デバイスが、口腔液を採取するためのデバイスを含む、請求項 110 に記載のキット。

【請求項 112】

前記採取デバイスが、血液を採取するためのデバイスを含む、請求項 110 に記載のキット。

40

【請求項 113】

前記採取デバイスが、尿採取デバイスを含む、請求項 110 に記載のキット。

【請求項 114】

前記採取デバイスが、腔液を採取するためのデバイス、または子宮頸管内スワブから採取するためのデバイスを含む、請求項 110 に記載のキット。

【請求項 115】

前記採取デバイスが、環境試料のためのデバイスを含む、請求項 110 に記載のキット。

【請求項 116】

50

核酸を精製及び増幅する方法であって、
前記方法が、

第1の相溶液及び第2の相溶液に分離する混合相溶液を含む水性二相系（ATPS）を提供することであって、前記ATPSが、核酸が前記第1の相溶液もしくは前記第2の相溶液のいずれかに分配されることになるものであるか、または前記ATPSが、核酸が前記第1の相溶液と前記第2の相溶液との間の界面に局在化することになるものである、前記提供することと、

前記ATPSへ核酸を含む試料を導入することであって、前記核酸が、前記第1の相溶液もしくは前記第2の相溶液、または前記第1の相溶液と前記第2の相溶液との間の前記界面に分配されることで濃縮核酸が得られる、前記導入することと、

増幅核酸を得るために核酸増幅反応において前記濃縮核酸を増幅することと、
を含む、前記方法。

【請求項117】

前記核酸が、DNAである、請求項116に記載の方法。

【請求項118】

前記核酸が、RNAである、請求項116に記載の方法。

【請求項119】

前記核酸が、RNAから逆転写されたDNAである、請求項116に記載の方法。

【請求項120】

前記ATPSが、ポリマー/塩ATPS、ポリマー/ポリマーATPS、ミセル/ポリマーATPS、及びミセルATPSからなる群から選択される、請求項116～119のいずれか1項に記載の方法。

【請求項121】

前記ATPSの第1の相溶液が、表1に記載の構成成分1を含み、前記ATPSの第2の相溶液が、表1に記載の構成成分2を含む、請求項120に記載の方法。

【請求項122】

前記増幅することが、

前記第1の相から前記濃縮核酸を回収することであって、その方法が、回収濃縮核酸を得るために、前記第1の相溶液もしくは前記第2の溶液、または前記第1の相溶液と前記第2の相溶液との前記界面から前記核酸を回収することを含む、前記回収することと、

前記核酸を増幅するために核酸増幅反応への前記回収濃縮核酸を導入することと、
を含む、請求項116～121のいずれか1項に記載の方法。

【請求項123】

前記核酸増幅反応が、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）反応系を含む、請求項122に記載の方法。

【請求項124】

前記核酸増幅反応が、等温増幅系を含む、請求項122に記載の方法。

【請求項125】

前記核酸増幅反応が、自己持続性シーケンス反応（3SR）、核酸ベースの転写アッセイ（NASBA）、転写増幅（TMA）、鎖置換増幅（SDA）、ヘリカーゼ依存性増幅（HDA）、ループ介在等温増幅（LAMP）、ステムループ増幅、シグナル介在RNA増幅技術（SMART）、等温多置換増幅（IMDA）、単一プライマー等温増幅（SPIA）、環状ヘリカーゼ依存性増幅（cHDA）、及びリコンビナーゼポリメラーゼ増幅（RPA）からなる群から選択される増幅系を含む、請求項124に記載の方法。

【請求項126】

前記増幅することが、等温核酸増幅のために試薬と前記ATPSを混合することを含む、請求項116～121のいずれか1項に記載の方法。

【請求項127】

前記核酸増幅反応が、等温増幅系を含む、請求項126に記載の方法。

【請求項128】

10

20

30

40

50

前記核酸増幅反応が、自己持続性シーケンス反応（3SR）、核酸ベースの転写アッセイ（NASBA）、転写増幅（TMA）、鎖置換増幅（SDA）、ヘリカーゼ依存性増幅（HDA）、ループ介在等温増幅（LAMP）、ステムループ増幅、シグナル介在RNA増幅技術（SMART）、等温多置換増幅（IMDA）、単一プライマー等温増幅（SPIA）、環状ヘリカーゼ依存性増幅（cHDA）、及びリコンビナーゼポリメラーゼ増幅（RPA）からなる群から選択される増幅系を含む、請求項127に記載の方法。

【請求項129】

前記方法が、室温または室温未満の温度で前記等温増幅を実施することを含む、請求項127～128のいずれか1項に記載の方法。

【請求項130】

前記方法が、等温増幅のための試薬を含む前記ATPSを実質的に一定な温度まで加熱することを含む、請求項127～128のいずれか1項に記載の方法。

【請求項131】

前記増幅が、ヘリカーゼ依存性増幅を含み、約65の一定温度で実施される、請求項127～130のいずれか1項に記載の方法。

【請求項132】

前記方法が、単一の容器で実施される、請求項126～131のいずれか1項に記載の方法。

【請求項133】

前記方法が、マルチウェルプレートのウェルに異なる試料をそれぞれ含めて複数の核酸試料で実施される、請求項126～131のいずれか1項に記載の方法。

【請求項134】

前記複数の試料が、少なくとも2つの試料、または少なくとも4つの試料、または少なくとも8つの試料、または少なくとも16の試料、または少なくとも32の試料、または少なくとも64の試料、または少なくとも128の試料を含む、請求項133に記載の方法。

【請求項135】

前記方法が、マイクロ流体系（例えば、ラボ・オン・チップ）のチャンバーまたはチャンネルにおいて実施される、請求項126～131のいずれか1項に記載の方法。

【請求項136】

前記試料が、細胞溶解物である、請求項116～135のいずれか1項に記載の方法。

【請求項137】

前記試料が、核酸である、請求項116～135のいずれか1項に記載の方法。

【請求項138】

前記試料が、インタクトな細胞を含み、前記ATPSが、細胞を溶解するATPSである、請求項116～135のいずれか1項に記載の方法。

【請求項139】

前記ATPSが、ミセルATPSである、請求項116～138のいずれか1項に記載の方法。

【請求項140】

前記試料が、血液または濾紙血を含み、前記ATPSが、濾紙血を再溶解するものである、請求項116～138のいずれか1項に記載の方法。

【請求項141】

前記ATPSが、PEG/デキストランATPSを含む、請求項140に記載の方法。

【請求項142】

前記ATPSが、UCON/デキストランATPSを含む、請求項140に記載の方法。

【請求項143】

核酸を精製及び増幅するためのキットであって、前記キットが、

10

20

30

40

50

水性二相系（A T P S）の構成成分を含む容器と、
等温核酸増幅系の1つまたは複数の構成成分を含む容器と、
を含む、前記キット。

【請求項144】

A T P Sの構成成分を含む前記容器と、等温核酸増幅系の構成成分を含む前記容器と、
が同一の容器である、請求項143に記載のキット。

【請求項145】

A T P Sの構成成分を含む前記容器と、等温核酸増幅系の構成成分を含む前記容器と、
が異なる容器である、請求項143に記載のキット。

【請求項146】

等温核酸増幅系の1つまたは複数の構成成分を含む前記容器が、自己持続性シーケンス
反応（3 S R）、核酸ベースの転写アッセイ（N A S B A）、転写増幅（T M A）、鎖置
換増幅（S D A）、ヘリカーゼ依存性増幅（H D A）、ループ介在等温増幅（L A M P）
、ステムループ増幅、シグナル介在RNA増幅技術（S M A R T）、等温多置換増幅（I
M D A）、単一プライマー等温増幅（S P I A）、環状ヘリカーゼ依存性増幅（c H D A
）、及びリコンビナーゼポリメラーゼ増幅（R P A）からなる群から選択される反応系の
1つまたは複数の構成成分を含む、請求項143～145のいずれか1項に記載のキット
。

10

【請求項147】

前記1つまたは複数の構成成分が、前記核酸増幅反応を実行する酵素を含む、請求項1
46に記載のキット。

20

【請求項148】

前記1つまたは複数の構成成分が、ヘリカーゼを含む、請求項146に記載のキット。

【請求項149】

前記A T P Sが、ポリマー/塩A T P S、ポリマー/ポリマーA T P S、ミセル/ポリ
マーA T P S、及びミセルA T P Sからなる群から選択される、請求項143～148の
いずれか1項に記載のキット。

【請求項150】

前記A T P Sの第1の相溶液が、表1に記載の構成成分1を含み、前記A T P Sの第2
の相溶液が、表1に記載の構成成分2を含む、請求項149に記載のキット。

30

【請求項151】

前記A T P Sが、ミセルA T P Sを含む、請求項143～149のいずれか1項に記載
のキット。

【請求項152】

前記A T P Sが、P E G / デキストランA T P Sを含む、請求項143～149のい
ずれか1項に記載のキット。

【請求項153】

前記A T P Sが、U C O N / デキストランA T P Sを含む、請求項143～149のい
ずれか1項に記載のキット。

【請求項154】

前記キットが、請求項126～142のいずれか1項に記載の方法を実施するためのプ
ロトコールを提供する説明資料を含む、請求項143～153のいずれか1項に記載のキ
ット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2016年6月9日出願のU S S N 6 2 / 3 4 8 , 0 3 8の利益及び優先権
を主張し、当該出願は、すべての目的のために参照によってその全体が本明細書に組み込
まれる。

50

政府による支援の記載

【該当なし】

【背景技術】

【0002】

アッセイは、生体液におけるさまざまな物質または病原体の存在または濃度を検出するために使用されている。固相イムノアッセイでは、受容体（典型的には、検出されることになるリガンドに特異的な抗体）が固相支持体に固定化される。検出すべき分析対象物を含み得る試験流体が固相支持体と接触し、標的分析対象物が存在すると、受容体と分析対象物との対が形成される。受容体とリガンドとの対を可視化するために、受容体とリガンドとの対に結合する標識抗体が使用され、その後、受容体とリガンドとの対に結合した標識抗体が視覚的に検出され得る。

10

【0003】

最も商業化されたポイント・オブ・ケア診断デバイスは、ラテラルフローイムノアッセイ（LFA）であり、これは、その低コスト性及び単純性によるものである。典型的な、いわゆるラテラルフローアッセイでは、検出すべき分析対象物を含む可能性のある流体が、多孔性膜層の一端に加えられ、毛細管力の作用下で膜を介して横方向に流れて、検出すべき分析対象物と結合することができる固定化「受容体」によって捕捉される。LFAには、いわゆるサンドイッチイムノアッセイが組み込まれていることが多く、サンドイッチイムノアッセイでは、分析対象物は、標識抗体と、固相支持体に固定化された抗体と、の間に挟み込まれる。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】米国特許第5,644,048号

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Beaucage et al. (1993) Tetrahedron 49(10): 1925

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0006】

しかしながら、LFAは、実験室ベースのアッセイ（ELISAなど）と比較すると感度が劣るという問題を抱えている。LFAの感度改善に相当な労力が払われてきたが、こうした取り組みの多くは、高価な電子読み取り装置の使用に頼るものであるが、または使用者による複数段階の実行が必要なものであり、LFAのポイント・オブ・ケアという性質を損なうものである。

【0007】

同様に、ポイント・オブ・ケアにふさわしい、DNA検出のための核酸増幅検査（NAAT）を設計することに労力が払われてきたが、こうしたものは、過度の単純化によって感度が不足するか、または検査精度を確保するために使いやすさを犠牲にするものであることが多い。さらに、現在のポイント・オブ・ケア（POC）NAATは、典型的には、試料を分析及び処理するに依然として機器が必要になるものである。したがって、完全に独立型または携帯型のPOC NAATで商業化されたものは存在しない。

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

本明細で企図されるさまざまな実施形態には、限定される必要はないが、下記のもののうちの1つまたは複数が含まれ得る：

【0009】

実施形態1：

試料における分析対象物を検出及び/または定量化するためのデバイスであって、

50

前記デバイスが、

第1の相溶液と第2の相とに分離する混合相溶液を含む水性二相系（ATPS）であって、使用時に、前記第1の相溶液が先行相となり、前記第2の相溶液が遅行相となる、前記ATPSと、

ラテラルフローアッセイ（LFA）またはフロースルーアッセイと、

プローブ及び/または増進試薬（development reagent）であって、使用時に、前記プローブが、前記ATPSの前記先行相における前記第1の相溶液と結び付き、及び/または前記増進試薬が、前記ATPSの前記遅行相における前記第2の相溶液と結び付き、前記プローブ及び/または増進試薬と、を含む、前記デバイス。

10

【0010】

実施形態2：

前記LFAが、前記ATPSもしくはその構成成分、及び/または前記プローブ、及び/または前記増進試薬を、受け入れ、及び/または含むように構成された多孔性マトリックスを含む、実施形態1に記載のデバイス。

【0011】

実施形態3：

前記LFAが、複合パッド、前記分析対象物と結合する抗体を含む試験ライン、任意選択で、二次抗体を含む対照ライン、任意選択で吸収パッド、及び任意選択で試料パッドを含む、実施形態1～2のいずれか1つに記載のデバイス。

20

【0012】

実施形態4：

試料における分析対象物を検出及び/または定量化するためのデバイスであって、前記デバイスが、フロースルー系を含み、前記フロースルー系が、

混合相溶液を含む水性二相系（ATPS）を含む濃縮コンポーネントであって、使用時に、前記第1の相溶液が先行相となり、前記第2の相溶液が遅行相となる、前記濃縮コンポーネントと、

プローブ及び/または増進試薬であって、使用時に、前記プローブが、前記ATPSの前記先行相における前記第1の相溶液と結び付き、及び/または前記増進試薬が、前記ATPSの前記遅行相における前記第2の相溶液と結び付き、前記プローブ及び/または増進試薬と、

30

前記濃縮コンポーネントの真下に配置された検出コンポーネントと、

を含む、

前記デバイス。

【0013】

実施形態5：

前記濃縮コンポーネントが、1つまたは複数のペーパー層を含む、実施形態4に記載のデバイス。

【0014】

実施形態6：

前記検出コンポーネントが、複合パッド、反応パッド、及び任意選択でシンクを含む、実施形態4～5のいずれか1つに記載のデバイス。

40

【0015】

実施形態7：

前記プローブが、前記ATPSに含められる、実施形態1～6のいずれか1つに記載のデバイス。

【0016】

実施形態8：

前記プローブが、前記ATPSの前記第1の相溶液と結び付き、実施形態7に記載のデ

50

バイス。

【 0 0 1 7 】

実施形態 9 :

前記増進試薬が、前記 A T P S に含まれる、実施形態 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【 0 0 1 8 】

実施形態 1 0 :

前記増進試薬が、前記 A T P S の前記第 2 の相溶液と結び付く、実施形態 9 に記載のデバイス。

【 0 0 1 9 】

実施形態 1 1 :

前記試料が前記デバイスに加えられる前に、前記 A T P S が前記試料と混合されるように、前記デバイスが構成される、実施形態 1 ~ 1 0 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【 0 0 2 0 】

実施形態 1 2 :

前記デバイスが前記試料と接触する前に、前記 A T P S が脱水されて、前記ラテラルフローアッセイに加えられるか、またはフロースルーアッセイの濃縮コンポーネントに含まれる、実施形態 1 ~ 1 1 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【 0 0 2 1 】

実施形態 1 3 :

前記デバイスが前記試料と接触する前に、前記プローブが脱水されて、前記ラテラルフローアッセイに加えられるか、またはフロースルーアッセイの濃縮コンポーネントに含まれる、実施形態 1 2 に記載のデバイス。

【 0 0 2 2 】

実施形態 1 4 :

前記デバイスが前記試料と接触する前に、前記増進試薬が脱水されて、前記ラテラルフローアッセイに加えられるか、またはフロースルーアッセイの濃縮コンポーネントに含まれる、実施形態 1 2 ~ 1 3 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【 0 0 2 3 】

実施形態 1 5 :

前記デバイスが前記試料と接触した後に、前記 A T P S が、第 1 の相溶液と第 2 の相溶液とに分離する混合相溶液を含む、実施形態 1 2 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【 0 0 2 4 】

実施形態 1 6 :

前記プローブが、前記 A T P S の親水相に極度に分配されるように選択される、実施形態 1 ~ 1 5 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【 0 0 2 5 】

実施形態 1 7 :

前記プローブが、前記 A T P S の疎水相に極度に分配されるように選択される、実施形態 1 ~ 1 5 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【 0 0 2 6 】

実施形態 1 8 :

前記増進試薬が、前記 A T P S の疎水相に極度に分配されるように選択される、実施形態 1 ~ 1 7 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【 0 0 2 7 】

実施形態 1 9 :

前記増進試薬が、前記 A T P S の親水相に極度に分配されるように選択される、実施形態 1 ~ 1 7 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【 0 0 2 8 】

10

20

30

40

50

実施形態 20 :

前記 A T P S が、ポリマー / 塩 A T P S、ポリマー / ポリマー A T P S、ミセル / ポリマー A T P S、及びミセル A T P S からなる群から選択される、実施形態 1 ~ 19 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【 0 0 2 9 】

実施形態 21 :

前記 A T P S の第 1 の相溶液が、表 1 に記載の構成成分 1 を含む、実施形態 20 に記載のデバイス。

【 0 0 3 0 】

実施形態 22 :

前記 A T P S の第 2 の相溶液が、表 1 に記載の構成成分 2 を含む、実施形態 20 に記載のデバイス。

【 0 0 3 1 】

実施形態 23 :

前記 A T P S の第 1 の相溶液が、表 1 に記載の構成成分 1 を含み、前記 A T P S の第 2 の相溶液が、表 1 に記載の構成成分 2 を含む、実施形態 20 に記載のデバイス。

【 0 0 3 2 】

実施形態 24 :

前記 A T P S が、ポリマー / 塩 A T P S である、実施形態 20 に記載のデバイス。

【 0 0 3 3 】

実施形態 25 :

前記 A T P S が、PEG / 塩 A T P S である、実施形態 24 に記載のデバイス。

【 0 0 3 4 】

実施形態 26 :

前記プローブが、前記ポリマー / 塩 A T P S の塩高含有相に分配され、前記増進試薬が、前記ポリマー / 塩 A T P S のポリマー高含有相に分配される、実施形態 24 ~ 25 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【 0 0 3 5 】

実施形態 27 :

前記 A T P S が、ミセル A T P S である、実施形態 20 に記載のデバイス。

【 0 0 3 6 】

実施形態 28 :

前記プローブが、前記 A T P S のミセル低含有相に分配され、前記増進試薬が、前記 A T P S のミセル高含有相に分配される、実施形態 27 に記載のデバイス。

【 0 0 3 7 】

実施形態 29 :

前記プローブが、前記標的分析対象物に結合する結合部分を含む、実施形態 1 ~ 28 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【 0 0 3 8 】

実施形態 30 :

前記標的分析対象物が、タンパク質、核酸、糖またはレクチン、及び微生物からなる群から選択される部分を含む、実施形態 29 に記載のデバイス。

【 0 0 3 9 】

実施形態 31 :

前記標的分析対象物が、細菌、原生動物、真菌、ウイルス、及び藻類からなる群から選択される微生物を含む、実施形態 30 に記載のデバイス。

【 0 0 4 0 】

実施形態 32 :

前記標的分析対象物が、微生物に対するバイオマーカーを含む、実施形態 30 に記載のデバイス。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 1 】

実施形態 3 3 :

前記標的分析対象物が、細菌、原生動物、真菌、ウイルス、及び藻類からなる群から選択される微生物に対するバイオマーカーを含む、実施形態 3 2 に記載のデバイス。

【 0 0 4 2 】

実施形態 3 4 :

前記標的分析対象物が、病状に対するバイオマーカー、食品安全（もしくは危険）に対するバイオマーカー、またはバイオテロ物質に対するバイオマーカーを含む、実施形態 3 2 に記載のデバイス。

【 0 0 4 3 】

実施形態 3 5 :

前記結合部分が、抗体または抗体断片、レクチン、核酸、及びアプタマーからなる群から選択される、実施形態 2 9 ~ 3 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 0 4 4 】

実施形態 3 6 :

前記プローブが、抗体または抗体断片を含む、実施形態 3 5 に記載のデバイス。

【 0 0 4 5 】

実施形態 3 7 :

前記プローブが、合成ポリマー、金属、ミネラル、ガラス、石英、セラミック、生体ポリマー、及びプラスチックからなる群から選択される材料を含む、実施形態 1 ~ 3 6 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【 0 0 4 6 】

実施形態 3 8 :

前記プローブが、ポリエチレン、ポリプロピレン、セルロース、キチン、ナイロン、ポリオキシメチレン、ポリテトラフルオロエチレン、またはポリ塩化ビニル、デキストラン、ポリプロピレン、またはポリエチレングリコールからなる群から選択される材料を含む、実施形態 3 7 に記載のデバイス。

【 0 0 4 7 】

実施形態 3 9 :

前記プローブが、金、銀、鉄、白金、パラジウム、セリウム、及びチタンからなる群から選択される金属を含む、実施形態 3 7 に記載のデバイス。

【 0 0 4 8 】

実施形態 4 0 :

前記プローブが、ナノ粒子を含む、実施形態 1 ~ 3 9 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【 0 0 4 9 】

実施形態 4 1 :

前記プローブが、前記増進試薬と反応して検出可能なシグナルを生成することができる物質を含む、実施形態 1 ~ 4 0 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【 0 0 5 0 】

実施形態 4 2 :

前記物質が、基質と反応して強力な可視シグナルを形成する酵素を含む、実施形態 4 1 に記載のデバイス。

【 0 0 5 1 】

実施形態 4 3 :

前記増進試薬が、前記基質を含む、実施形態 4 2 に記載のデバイス。

【 0 0 5 2 】

実施形態 4 4 :

前記増進試薬が、前記酵素と結合する抗体を含む、実施形態 4 2 に記載のデバイス。

【 0 0 5 3 】

10

20

30

40

50

実施形態 45 :

前記物質が、酵素と反応して強力な可視生成物を形成する基質を含む、実施形態 41 に記載のデバイス。

【0054】

実施形態 46 :

前記増進試薬が、前記酵素を含む、実施形態 45 に記載のデバイス。

【0055】

実施形態 47 :

前記酵素が、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビ(または他の)ペルオキシダーゼ、及びグルコースオキシダーゼからなる群から選択される、実施形態 42 及び実施形態 46 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

10

【0056】

実施形態 48 :

前記プローブが、前記 ATPS の前記第 1 の相溶液または前記第 2 の相溶液に対する親和性を有するコーティングを含む、実施形態 1 ~ 47 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【0057】

実施形態 49 :

前記コーティングが、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、デキストラン、親水性タンパク質、及び疎水性タンパク質からなる群から選択される材料を含む、実施形態 48 に記載のデバイス。

20

【0058】

実施形態 50 :

前記デバイスが、異なる分析対象物とそれぞれが相互作用する 2 つ以上のプローブを含む、実施形態 1 ~ 49 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【0059】

実施形態 51 :

前記デバイスが、少なくとも 2 つの異なるプローブ、または少なくとも 3 つの異なるプローブ、または少なくとも 4 つの異なるプローブ、または少なくとも 5 つの異なるプローブ、または少なくとも 7 つの異なるプローブ、または少なくとも 10 の異なるプローブ、または少なくとも 15 の異なるプローブ、または少なくとも 20 の異なるプローブを含む、実施形態 50 に記載のデバイス。

30

【0060】

実施形態 52 :

前記デバイスが、サンドイッチアッセイを実施するために構成される、実施形態 1 ~ 51 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【0061】

実施形態 53 :

第 1 の相溶液と第 2 の相とに分離する混合相溶液であって、LFA または他の多孔性媒体における使用時に、前記第 1 の相溶液が先行相になり、前記第 2 の相溶液が遅行相になる、前記混合相溶液と、

40

プローブ及び/または増進試薬であって、前記プローブが、前記第 1 の相溶液と結び付き、前記増進試薬が、前記第 2 の相溶液と結び付き、前記プローブ及び/または増進試薬と、

を含む、水性二相系(ATPS)。

【0062】

実施形態 54 :

前記 ATPS が、ポリマー/塩 ATPS、ポリマー/ポリマー ATPS、ミセル/ポリマー ATPS、及びミセル ATPS からなる群から選択される、実施形態 53 に記載の水性二相系。

【0063】

50

実施形態 55 :

前記 A T P S の第 1 の相溶液が、表 1 に記載の構成成分 1 を含み、前記 A T P S の第 2 の相溶液が、表 1 に記載の構成成分 2 を含む、実施形態 54 に記載の水性二相系。

【 0 0 6 4 】

実施形態 56 :

前記 A T P S が、ポリマー / 塩 A T P S である、実施形態 54 に記載の水性二相系。

【 0 0 6 5 】

実施形態 57 :

前記 A T P S が、PEG / 塩 A T P S である、実施形態 56 に記載の水性二相系。

【 0 0 6 6 】

実施形態 58 :

前記プローブが、前記ポリマー / 塩 A T P S の塩高含有相に分配され、前記増進試薬が、前記ポリマー / 塩 A T P S のポリマー高含有相に分配される、実施形態 56 ~ 57 のいずれか 1 つに記載の水性二相系。

【 0 0 6 7 】

実施形態 59 :

前記 A T P S が、ミセル A T P S である、実施形態 54 に記載の水性二相系。

【 0 0 6 8 】

実施形態 60 :

前記プローブが、前記 A T P S のミセル低含有相に分配され、前記増進試薬が、前記 A T P S のミセル高含有相に分配される、実施形態 59 に記載の水性二相系。

【 0 0 6 9 】

実施形態 61 :

前記プローブが、前記標的分析対象物に結合する結合部分を含む、実施形態 1 ~ 60 のいずれか 1 つに記載の水性二相系。

【 0 0 7 0 】

実施形態 62 :

前記 A T P S が、多孔性媒体に含められる、実施形態 1 ~ 61 のいずれか 1 つに記載の水性二相系。

【 0 0 7 1 】

実施形態 63 :

前記 A T P S が、ペーパーに含められる、実施形態 1 ~ 61 のいずれか 1 つに記載の水性二相系。

【 0 0 7 2 】

実施形態 64 :

前記 A T P S が、ラテラルフローアッセイ (L F A) に含められる、実施形態 1 ~ 61 のいずれか 1 つに記載の水性二相系。

【 0 0 7 3 】

実施形態 65 :

前記 A T P S が、フロースルー系に含められる、実施形態 1 ~ 61 のいずれか 1 つに記載の水性二相系。

【 0 0 7 4 】

実施形態 66 :

分析対象物の検出方法及び / または定量化方法であって、前記方法が、

水性二相系 (A T P S) へ試料を加えることであって、前記加えることによって、前記分析対象物が、前記試料に存在するのであれば、前記 A T P S の 1 つの相に濃縮されて分析対象物含有相が得られる、前記加えることと、

ラテラルフローアッセイ (L F A) またはフロースルーアッセイへ前記分析対象物含有相を加えることであって、前記 L F A またはフロースルーアッセイにおいて検出プロ-

10

20

30

40

50

ブが前記分析対象物に結合する、前記加えることと、

前記 L F A または フロースルーアッセイへ増進試薬を加えることであって、前記加えることによって、前記検出プローブが生成するシグナルが増強される、前記加えることと、

前記試料における前記分析対象物の存在及び/または量を示すための、前記シグナルの検出及び/または定量化と、

を含む、前記方法。

【 0 0 7 5 】

実施形態 6 7 :

前記ラテラルフローアッセイまたはフロースルーアッセイが、ラテラルフローアッセイである、実施形態 6 6 に記載の方法。

10

【 0 0 7 6 】

実施形態 6 8 :

前記ラテラルフローアッセイまたはフロースルーアッセイが、フロースルーアッセイである、実施形態 6 6 に記載の方法。

【 0 0 7 7 】

実施形態 6 9 :

前記 A T P S がペーパーに加えられ、前記 A T P S が前記ペーパーを通過するにつれて相が分離することで、「流れながら濃縮する」A T P S が得られる、実施形態 6 6 ~ 6 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【 0 0 7 8 】

実施形態 7 0 :

前記 A T P S がペーパーに加えられると、より疎水的な相が先行し、より親水的な相が遅行する、実施形態 6 9 に記載の方法。

【 0 0 7 9 】

実施形態 7 1 :

前記 A T P S がペーパーに加えられると、より親水的な相が先行し、より疎水的な相が遅行する、実施形態 6 9 に記載の方法。

【 0 0 8 0 】

実施形態 7 2 :

前記 L F A または フロースルーアッセイが、結合部分が前記分析対象物を捕捉し、前記検出プローブが前記捕捉分析対象物に結合するものである、実施形態 6 6 ~ 7 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【 0 0 8 1 】

実施形態 7 3 :

前記分析対象物含有相が、手動またはロボット制御で前記 A T P S から取り出された後、前記ラテラルフローアッセイに加えられる、実施形態 6 6 ~ 7 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 0 8 2 】

実施形態 7 4 :

前記検出プローブが、前記 L F A または フロースルーアッセイのコンポーネントとして提供される、実施形態 7 3 に記載の方法。

40

【 0 0 8 3 】

実施形態 7 5 :

次に、前記増進試薬が、前記 A T P S とは別に、前記ラテラルフローアッセイに加えられる、実施形態 7 3 ~ 7 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 0 8 4 】

実施形態 7 6 :

前記プローブと前記増進試薬との両方が、前記 A T P S に加えられるか、または前記 A T P S に含めて提供され、前記 A T P S の前記構成成分が、前記プローブが前記 A T P S

50

の第1の相に実質的に分配され、前記増進試薬が前記ATPSの第2の相に実質的に分配されるように選択される、実施形態66~72のいずれか1つに記載の方法。

【0085】

実施形態77：

前記ATPSが、ペーパー基質に加えられると、先行相及び遅行相を形成し、前記先行相が、前記濃縮分析対象物及び前記プローブをLFA試験ストリップまたはフロースルーアッセイに送達した後、前記遅行相が、前記試験ストリップまたはフロースルーアッセイに前記増進試薬を遅れて送達する、実施形態76に記載の方法。

【0086】

実施形態78：

前記プローブが、前記ATPSの親水相に極度に分配されるように選択される、実施形態76~77のいずれか1つに記載の方法。

【0087】

実施形態79：

前記プローブが、前記ATPSの疎水相に極度に分配されるように選択される、実施形態76~77のいずれか1つに記載の方法。

【0088】

実施形態80：

前記増進試薬が、前記ATPSの疎水相に極度に分配されるように選択される、実施形態76~79のいずれか1つに記載の方法。

【0089】

実施形態81：

前記増進試薬が、前記ATPSの親水相に極度に分配されるように選択される、実施形態76~79のいずれか1つに記載の方法。

【0090】

実施形態82：

前記ATPSが、ポリマー/塩ATPS、ポリマー/ポリマーATPS、ミセル/ポリマーATPS、及びミセルATPSからなる群から選択される、実施形態66~81のいずれか1つに記載の方法。

【0091】

実施形態83：

前記ATPSの前記第1の相溶液が、表1に記載の構成成分1を含み、前記ATPSの第2の相溶液が、表1に記載の構成成分2を含む、実施形態82に記載の方法。

【0092】

実施形態84：

前記ATPSが、ポリマー/塩ATPSである、実施形態82に記載の方法。

【0093】

実施形態85：

前記ATPSが、PEG/塩ATPSである、実施形態84に記載の方法。

【0094】

実施形態86：

前記プローブが、前記ポリマー/塩ATPSの塩高含有相に分配され、前記増進試薬が、前記ポリマー/塩ATPSのポリマー高含有相に分配される、実施形態84~85のいずれか1つに記載の方法。

【0095】

実施形態87：

前記ATPSが、ミセルATPSである、実施形態82に記載の方法。

【0096】

実施形態88：

前記プローブが、前記ATPSのミセル低含有相に分配され、前記増進試薬が、前記A

10

20

30

40

50

T P S のミセル高含有相に分配される、実施形態 8 7 に記載の方法。

【 0 0 9 7 】

実施形態 8 9 :

前記プローブが、前記標的分析対象物に結合する結合部分を含む、実施形態 6 6 ~ 8 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 0 9 8 】

実施形態 9 0 :

前記標的分析対象物が、タンパク質、核酸、糖またはレクチン、及び微生物からなる群から選択される部分を含む、実施形態 8 9 に記載の方法。

【 0 0 9 9 】

実施形態 9 1 :

前記標的分析対象物が、細菌、原生動物、真菌、ウイルス、及び藻類からなる群から選択される微生物を含む、実施形態 9 0 に記載の方法。

【 0 1 0 0 】

実施形態 9 2 :

前記標的分析対象物が、微生物に対するバイオマーカを含む、実施形態 9 0 に記載の方法。

【 0 1 0 1 】

実施形態 9 3 :

前記標的分析対象物が、細菌、原生動物、真菌、ウイルス、及び藻類からなる群から選択される微生物に対するバイオマーカを含む、実施形態 9 2 に記載の方法。

【 0 1 0 2 】

実施形態 9 4 :

前記結合部分が、抗体または抗体断片、レクチン、核酸、及びアプタマーからなる群から選択される、実施形態 8 9 ~ 9 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 1 0 3 】

実施形態 9 5 :

前記プローブが、抗体または抗体断片を含む、実施形態 9 4 に記載の方法。

【 0 1 0 4 】

実施形態 9 6 :

前記プローブが、合成ポリマー、金属、ミネラル、ガラス、石英、セラミック、生体ポリマー、及びプラスチックからなる群から選択される材料を含む、実施形態 6 6 ~ 9 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 1 0 5 】

実施形態 9 7 :

前記プローブが、ポリエチレン、ポリプロピレン、セルロース、キチン、ナイロン、ポリオキシメチレン、ポリテトラフルオロエチレン、またはポリ塩化ビニル、デキストラン、ポリプロピレン、またはポリエチレングリコールからなる群から選択される材料を含む、実施形態 9 6 に記載の方法。

【 0 1 0 6 】

実施形態 9 8 :

前記プローブが、金、銀、鉄、白金、パラジウム、セリウム、及びチタンからなる群から選択される金属を含む、実施形態 9 6 に記載の方法。

【 0 1 0 7 】

実施形態 9 9 :

前記プローブが、ナノ粒子を含む、実施形態 6 6 ~ 9 8 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【 0 1 0 8 】

実施形態 1 0 0 :

前記プローブが、前記増進試薬と反応して検出可能なシグナルを生成することができる

10

20

30

40

50

物質を含む、実施形態 66 ~ 99 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0109】

実施形態 101 :

前記物質が、基質と反応して強力な可視シグナルを形成する酵素を含む、実施形態 100 に記載の方法。

【0110】

実施形態 102 :

前記増進試薬が、前記基質を含む、実施形態 101 に記載の方法。

【0111】

実施形態 103 :

前記増進試薬が、前記酵素と結合する抗体を含む、実施形態 101 に記載の方法。

【0112】

実施形態 104 :

前記物質が、酵素と反応して強力な可視生成物を形成する基質を含む、実施形態 100 に記載の方法。

【0113】

実施形態 105 :

前記増進試薬が、前記酵素を含む、実施形態 104 に記載の方法。

【0114】

実施形態 106 :

前記酵素が、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビ（または他の）ペルオキシダーゼ、及びグルコースオキシダーゼからなる群から選択される、実施形態 101 及び実施形態 105 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0115】

実施形態 107 :

前記プローブが、前記 ATP S の前記第 1 の相溶液または前記第 2 の相溶液に対する親和性を有するコーティングを含む、実施形態 66 ~ 106 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【0116】

実施形態 108 :

前記コーティングが、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、デキストラン、親水性タンパク質、及び疎水性タンパク質からなる群から選択される材料を含む、実施形態 107 に記載のデバイス。

【0117】

実施形態 109 :

前記方法が、実施形態 1 ~ 52 のいずれか 1 つに記載のデバイスを使用して実施される、実施形態 66 ~ 108 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0118】

実施形態 110 :

分析対象物を検出及び/または定量化するためのキットであって、前記キットが、実施形態 1 ~ 52 のいずれか 1 つに記載のデバイスと、試料を採取するための採取デバイスと、を含む、前記キット。

【0119】

実施形態 111 :

前記採取デバイスが、口腔液を採取するためのデバイスを含む、実施形態 110 に記載のキット。

【0120】

実施形態 112 :

前記採取デバイスが、血液を採取するためのデバイスを含む、実施形態 110 に記載のキット。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 1 】

実施形態 1 1 3 :

前記採取デバイスが、尿採取デバイスを含む、実施形態 1 1 0 に記載のキット。

【 0 1 2 2 】

実施形態 1 1 4 :

前記採取デバイスが、膿液を採取するためのデバイス、または子宮頸管内スワブから採取するためのデバイスを含む、実施形態 1 1 0 に記載のキット。

【 0 1 2 3 】

実施形態 1 1 5 :

前記採取デバイスが、環境試料のためのデバイスを含む、実施形態 1 1 0 に記載のキット。

10

【 0 1 2 4 】

実施形態 1 1 6 :

核酸を精製及び増幅する方法であって、前記方法が、第 1 の相溶液及び第 2 の相溶液に分離する混合相溶液を含む水性二相系 (A T P S) を提供することであって、前記 A T P S が、核酸が前記第 1 の相溶液もしくは前記第 2 の相溶液のいずれかに分配されることになるものであるか、または前記 A T P S が、核酸が前記第 1 の相溶液と前記第 2 の相溶液との間の界面に局在化することになるものである、前記提供することと、前記 A T P S へ核酸を含む試料を導入することであって、前記核酸が、前記第 1 の相溶液もしくは前記第 2 の相溶液、または前記第 1 の相溶液と前記第 2 の相溶液との間の前記界面に分配されることで濃縮核酸が得られる、前記導入することと、増幅核酸を得るために核酸増幅反応において前記濃縮核酸を増幅することと、を含む、前記方法。

20

【 0 1 2 5 】

実施形態 1 1 7 :

前記核酸が、DNA である、実施形態 1 1 6 に記載の方法。

【 0 1 2 6 】

実施形態 1 1 8 :

前記核酸が、RNA である、実施形態 1 1 6 に記載の方法。

【 0 1 2 7 】

実施形態 1 1 9 :

前記核酸が、RNA から逆転写された DNA である、実施形態 1 1 6 に記載の方法。

30

【 0 1 2 8 】

実施形態 1 2 0 :

前記 A T P S が、ポリマー / 塩 A T P S 、ポリマー / ポリマー A T P S 、ミセル / ポリマー A T P S 、及びミセル A T P S からなる群から選択される、実施形態 1 1 6 ~ 1 1 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 1 2 9 】

実施形態 1 2 1 :

前記 A T P S の第 1 の相溶液が、表 1 に記載の構成成分 1 を含み、前記 A T P S の第 2 の相溶液が、表 1 に記載の構成成分 2 を含む、実施形態 1 2 0 に記載の方法。

40

【 0 1 3 0 】

実施形態 1 2 2 :

前記増幅することが、前記第 1 の相から前記濃縮核酸を回収することであって、その方法が、回収濃縮核酸を得るために、前記第 1 の相溶液もしくは前記第 2 の溶液、または前記第 1 の相溶液と前記第 2 の相溶液との前記界面から前記核酸を回収することを含む、前記回収することと、前記核酸を増幅するために核酸増幅反応へ前記回収濃縮核酸を導入することと、を含む、実施形態 1 1 6 ~ 1 2 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 1 3 1 】

実施形態 1 2 3 :

前記核酸増幅反応が、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 反応系を含む、実施形態 1 2 2

50

に記載の方法。

【0132】

実施形態124：

前記核酸増幅反応が、等温増幅系を含む、実施形態122に記載の方法。

【0133】

実施形態125：

前記核酸増幅反応が、自己持続性シーケンス反応(3SR)、核酸ベースの転写アッセイ(NASBA)、転写増幅(TMA)、鎖置換増幅(SDA)、ヘリカーゼ依存性増幅(HDA)、ループ介在等温増幅(LAMP)、ステムループ増幅、シグナル介在RNA増幅技術(SMART)、等温多置換増幅(IMDA)、単一プライマー等温増幅(SPIA)、環状ヘリカーゼ依存性増幅(cHDA)、及びリコンビナーゼポリメラーゼ増幅(RPA)からなる群から選択される増幅系を含む、実施形態124に記載の方法。

10

【0134】

実施形態126：

前記増幅することが、等温核酸増幅のために試薬と前記ATPSを混合することを含む、実施形態116~121のいずれか1つに記載の方法。

【0135】

実施形態127：

前記核酸増幅反応が、等温増幅系を含む、実施形態126に記載の方法。

【0136】

実施形態128：

前記核酸増幅反応が、自己持続性シーケンス反応(3SR)、核酸ベースの転写アッセイ(NASBA)、転写増幅(TMA)、鎖置換増幅(SDA)、ヘリカーゼ依存性増幅(HDA)、ループ介在等温増幅(LAMP)、ステムループ増幅、シグナル介在RNA増幅技術(SMART)、等温多置換増幅(IMDA)、単一プライマー等温増幅(SPIA)、環状ヘリカーゼ依存性増幅(cHDA)、及びリコンビナーゼポリメラーゼ増幅(RPA)からなる群から選択される増幅系を含む、実施形態127に記載の方法。

20

【0137】

実施形態129：

前記方法が、室温または室温未満の温度で前記等温増幅を実施することを含む、実施形態127~128のいずれか1つに記載の方法。

30

【0138】

実施形態130：

前記方法が、等温増幅のための試薬を含む前記ATPSを実質的に一定な温度まで加熱することを含む、実施形態127~128のいずれか1つに記載の方法。

【0139】

実施形態131：

前記増幅が、ヘリカーゼ依存性増幅を含み、約65の一定温度で実施される、実施形態127~130のいずれか1つに記載の方法。

40

【0140】

実施形態132：

前記方法が、単一の容器で実施される、実施形態126~131のいずれか1つに記載の方法。

【0141】

実施形態133：

前記方法が、マルチウェルプレートのウェルに異なる試料をそれぞれ含めて複数の核酸試料で実施される、実施形態126~131のいずれか1つに記載の方法。

【0142】

実施形態134：

前記複数の試料が、少なくとも2つの試料、または少なくとも4つの試料、または少な

50

くとも 8 つの試料、または少なくとも 16 の試料、または少なくとも 32 の試料、または少なくとも 64 の試料、または少なくとも 128 の試料を含む、実施形態 133 に記載の方法。

【0143】

実施形態 135 :

前記方法が、マイクロ流体系（例えば、ラボ・オン・チップ）のチャンバーまたはチャンネルにおいて実施される、実施形態 126 ~ 131 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0144】

実施形態 136 :

前記試料が、細胞溶解物である、実施形態 116 ~ 135 のいずれか 1 つに記載の方法

10

【0145】

実施形態 137 :

前記試料が、核酸である、実施形態 116 ~ 135 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0146】

実施形態 138 :

前記試料が、インタクトな細胞を含み、前記 ATP S が、細胞を溶解する ATP S である、実施形態 116 ~ 135 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0147】

実施形態 139 :

前記 ATP S が、ミセル ATP S である、実施形態 116 ~ 138 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0148】

実施形態 140 :

前記試料が、血液または濾紙血を含み、前記 ATP S が、濾紙血を再溶解するものである、実施形態 116 ~ 138 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0149】

実施形態 141 :

前記 ATP S が、PEG / デキストラン ATP S を含む、実施形態 140 に記載の方法

30

【0150】

実施形態 142 :

前記 ATP S が、UCON / デキストラン ATP S を含む、実施形態 140 に記載の方法。

【0151】

実施形態 143 :

核酸を精製及び増幅するためのキットであって、

前記キットが、

水性二相系 (ATP S) の構成成分を含む容器と、

等温核酸増幅系の 1 つまたは複数の構成成分を含む容器と、

を含む、前記キット。

40

【0152】

実施形態 144 :

ATP S の構成成分を含む前記容器と、等温核酸増幅系の構成成分を含む前記容器と、が同一の容器である、実施形態 143 に記載のキット。

【0153】

実施形態 145 :

ATP S の構成成分を含む前記容器と、等温核酸増幅系の構成成分を含む前記容器と、が異なる容器である、実施形態 143 に記載のキット。

【0154】

50

実施形態 146 :

等温核酸増幅系の1つまたは複数の構成成分を含む前記容器が、自己持続性シーケンス反応(3SR)、核酸ベースの転写アッセイ(NASBA)、転写増幅(TMA)、鎖置換増幅(SDA)、ヘリカーゼ依存性増幅(HDA)、ループ介在等温増幅(LAMP)、ステムループ増幅、シグナル介在RNA増幅技術(SMART)、等温多置換増幅(IMDA)、単一プライマー等温増幅(SPIA)、環状ヘリカーゼ依存性増幅(cHDA)、及びリコンビナーゼポリメラーゼ増幅(RPA)からなる群から選択される反応系の1つまたは複数の構成成分を含む、実施形態143~145のいずれか1つに記載のキット。

【0155】

10

実施形態 147 :

前記1つまたは複数の構成成分が、前記核酸増幅反応を実行する酵素を含む、実施形態146に記載のキット。

【0156】

実施形態 148 :

前記1つまたは複数の構成成分が、ヘリカーゼを含む、実施形態146に記載のキット。

【0157】

実施形態 149 :

前記ATPSが、ポリマー/塩ATPS、ポリマー/ポリマーATPS、ミセル/ポリマーATPS、及びミセルATPSからなる群から選択される、実施形態143~148のいずれか1つに記載のキット。

20

【0158】

実施形態 150 :

前記ATPSの第1の相溶液が、表1に記載の構成成分1を含み、前記ATPSの第2の相溶液が、表1に記載の構成成分2を含む、実施形態149に記載のキット。

【0159】

実施形態 151 :

前記ATPSが、ミセルATPSを含む、実施形態143~149のいずれか1つに記載のキット。

30

【0160】

実施形態 152 :

前記ATPSが、PEG/デキストランATPSを含む、実施形態143~149のいずれか1つに記載のキット。

【0161】

実施形態 153 :

前記ATPSが、UCON/デキストランATPSを含む、実施形態143~149のいずれか1つに記載のキット。

【0162】

実施形態 154 :

前記キットが、実施形態126~142のいずれか1つに記載の方法を実施するためのプロトコルを提供する説明資料を含む、実施形態143~153のいずれか1つに記載のキット。

40

【0163】

定義

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために本明細書で互換的に使用される。これらの用語は、天然起源のアミノ酸ポリマーだけでなく、1つまたは複数のアミノ酸残基が、対応する天然起源のアミノ酸の人工的な化学的類似体であるアミノ酸ポリマーにも適用される。

【0164】

50

本明細書の「核酸」もしくは「オリゴヌクレオチド」という用語または文法的同等形態は、共に共有結合で連結された少なくとも2つのヌクレオチドを指す。本発明の核酸は、好ましくは、一本鎖または二本鎖であり、一般に、ホスホジエステル結合を含むことになるが、場合によっては、以下に概要が示されるように、代替骨格を有し得る核酸類似体が含まれ、こうした核酸類似体は、例えば、ホスホラミド (Beaucage et al. (1993) *Tetrahedron* 49 (10) : 1925) 及びそこに含まれる参考文献、Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35 : 3800、Sprinzl et al. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81 : 579、Letsinger et al. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14 : 3487、Sawai et al. (1984) *Chem. Lett.* 805、Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110 : 4470、ならびに Pauwels et al. (1986) *Chemica Scripta* 26 : 1419)、ホスホロチオエート (Mag et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19 : 1437、及び米国特許第5,644,048号)、ホスホロジチオエート (Briu et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111 : 2321)、O-メチルホスホロアミダイト結合 (Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press を参照のこと)、ならびにペプチド核酸の骨格及び結合 (Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114 : 1895、Meier et al. (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31 : 1008、Nielsen (1993) *Nature*, 365 : 566、Carlsson et al. (1996) *Nature* 380 : 207 を参照のこと) を含む。他の類似核酸には、陽性骨格を有するもの (Denpcy et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 6097)、非イオン性骨格を有するもの (米国特許第5,386,023号、第5,637,684号、第5,602,240号、第5,216,141号、及び第4,469,863号、Angew. (1991) *Chem. Intl. Ed. English* 30 : 423、Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110 : 4470、Letsinger et al. (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13 : 1597、*Chapters 2 and 3*, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook、Mesmaeker et al. (1994), *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4 : 395、Jeffs et al. (1994) *J. Biomolecular NMR* 34 : 17、*Tetrahedron Lett.* 37 : 743 (1996))、ならびに非リボース骨格を有するもの (米国特許第5,235,033号及び第5,034,506号、ならびに *Chapters 6 and 7*, ASC Symposium Series 580, *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook に記載のものを含む) が含まれる。1つまたは複数の炭素環式糖を含む核酸もまた、核酸の定義に含まれる (Jenkins et al. (1995), *Chem. Soc. Rev.* pp 169 - 176 を参照のこと)。いくつかの核酸類似体は、Rawls, C & E News June 2, 1997 page 35 に記載されている。リボース-ホスフェート骨格のこうした改変は、標識などの追加の部分の付加が容易になるように実施されるか、または生理学的環境下でのそのような分子の安定性及び半減期が向上するように実施され得る。さらに、本発明の核酸は、代替的に、三本鎖であり得ることが可能である。

【0165】

本明細書で使用される「抗体」は、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子

の断片によって実質的にコードされる1つまたは複数のポリペプチドからなるタンパク質を指す。認知されている免疫グロブリン遺伝子には、カップー、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン、及びミューという定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。軽鎖は、カップーまたはラムダのいずれかとして分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンとして分類され、これらは、次に、それぞれI g G、I g M、I g A、I g D、及びI g Eという免疫グロブリンクラスを定義するものである。

【0166】

典型的な免疫グロブリン(抗体)構造単位は、四量体を含むことが知られている。それぞれの四量体は、ポリペプチド鎖の2つの同一対から構成され、それぞれの対が、1つの「軽」鎖(約25 kD)及び1つの「重」鎖(約50~70 kD)を有する。それぞれの鎖のN末端は、主に抗原認識を担う約100~110以上のアミノ酸の可変領域を定義する。可変軽鎖(V_L)及び可変重鎖(V_H)という用語は、それぞれこうした軽鎖及び重鎖を指す。

10

【0167】

抗体は、インタクトな免疫グロブリンとして存在するか、またはさまざまなペプチダーゼで消化することによって生成する多くのよく特徴付けられた断片として存在する。したがって、例えば、ペプシンは、ヒンジ領域のジスルフィド結合の下で抗体を消化することで、Fabの二量体である $F(ab)'_2$ を生成し、Fab自体は、ジスルフィド結合によって軽鎖が V_H-C_H1 に連結されたものである。 $F(ab)'_2$ は、穏和な条件下での還元によってヒンジ領域のジスルフィド結合が切断され、それによって $(Fab)'$ 二量体がFab'単量体に変換され得る。Fab'単量体は、本質的には、Fabにヒンジ領域部分が加わったものである(他の抗体断片のより詳細な説明については、Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N. Y. (1993)を参照のこと)。さまざまな抗体断片が、インタクトな抗体の消化という観点から定義される一方で、そのようなFab'断片は、化学的にデノボ合成されるか、または組換えDNA手法を利用することによってデノボ合成され得ることを当業者であれば理解するであろう。したがって、本明細書で使用される抗体という用語は、全抗体の改変によって生成する抗体断片、または組換えDNA手法を使用してデノボ合成される抗体断片も含む。好ましい抗体には、一本鎖抗体(単一のポリペプチド鎖として存在する抗体)、より好ましくは、可変重鎖と可変軽鎖とが共に連結(直接的なもの、またはペプチドリンカーを介するもの)されることで連続ポリペプチドが形成される一本鎖Fv抗体(sFvまたはscFv)が含まれる。一本鎖Fv抗体は、共有結合で連結された V_H-V_L ヘテロ二量体であり、この二量体は、 V_H をコードする配列と、 V_L をコードする配列と、が直接的に連結されるか、またはペプチドをコードするリンカーによって連結されて含まれる核酸から発現し得る。Huston, et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883。 V_H と V_L とは、単一のポリペプチド鎖として互いに連結される一方で、 V_H ドメインと V_L ドメインとは、非共有結合で結合する。繊維状ファージの表面に発現される最初の機能性抗体分子は一本鎖Fv's(scFv)であったが、代替の発現方針も達成されている。例えば、Fab分子は、鎖(重鎖または軽鎖)の1つがg3カプシドタンパク質に融合され、相補鎖が可溶性分子としてペリプラズムに輸送されるのであれば、ファージにディスプレイされ得る。2つの鎖は、同一または異なるレプリコンにコードされ得る。重要な点は、それぞれのFab分子における2つの抗体鎖が翻訳後に会合し、この二量体が、例えばg3pに鎖の1つが結合されることを介してファージ粒子に組み込まれるということである(例えば、米国特許第5733743号を参照のこと)。scFv抗体に加えて、抗体のV領域に由来し、天然には集合するものだが、化学的には別々の軽ポリペプチド鎖及び重ポリペプチド鎖を、抗原結合部位の構造と実質的に同様の三次元構造に折り畳まれる分子へと変換する他の構造が当業者には多く知られている(例えば、米国特許第5,091,513号、第5,132,405号、及び第4,956,778号を参照のこと)。特に好まし

20

30

40

50

い抗体となれば、ファージにディスプレイされるもののすべてが含まれることになる（例えば、s c F v、F v、F a b、及びジスルフィドで連結されたF v (R e i t e r e t a l . (1 9 9 5) P r o t e i n E n g . 8 : 1 3 2 3 - 1 3 3 1) 。

【0168】

アプタマーは、核酸から形成される抗体類似体である。アプタザイムは、核酸から形成される酵素類似体である。具体的には、アプタザイムは、第2の特定の分析対象物が存在するときのみ、立体配置が変わることで特定の分子を捕捉するように機能することができる。アプタマーは、いくつかのアッセイ（ナノ-CHEM-FETなど）では、検出されることになる一次標識の結合さえ必要としない場合があり、立体配置の再配置が直接的に検出されることになる。

10

【0169】

「結合部分」という用語、または「結合対」のメンバーは、他の分子、細胞、微生物、及び同様のものに特異的に結合することで、抗体-抗原、レクチン-糖質、核酸-核酸、ビオチン-アビジンなどの結合複合体を形成する分子を指す。そのような結合部分には、限定はされないが、単量体または多量体の核酸、アプタマー、アプタザイム、タンパク質、多糖、糖、レクチン、及び同様のもの（例えば、Haugland, "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals" (Sixth Edition) を参照のこと）、ならびに上記の結合対を形成することができる分子のすべてが含まれる。

20

【0170】

「特異的に結合する」という語句は、分子が、目的の標的に優先的に結合するか、または他の分子と比較して高い親和性で標的（分析対象物）に結合することを示す。例えば、抗体は、抗原を標的として産生し、その抗原に選択的に結合することになる。DNA分子は、実質的に相補的な配列に結合することになり、厳密条件下では、無関係の配列には結合しない。特異的な結合は、分子（例えば、タンパク質及び他の生物製剤）の異種性集団に標的が存在することを決定付ける結合反応を指し得る。したがって、指定条件下（例えば、抗体の場合は、イムノアッセイ条件、または核酸の場合は、厳密なハイブリダイゼーション条件）では、特定のリガンドまたは抗体は、その特定の「標的」分子に結合し、試料に存在する他の分子には顕著な量で結合しない。

30

【0171】

小有機分子という用語は、医薬品において一般に使用される有機分子と同等サイズの分子を指す。生体巨大分子（例えば、タンパク質、核酸など）は、この用語から除外される。小有機分子の好ましいサイズ範囲は、最大で約5000Daであり、より好ましくは、最大で2000Daであり、最も好ましくは、最大で約1000Daである。

【0172】

分析対象物という用語は、検出すべき任意の部分を指す。分析対象物には、限定はされないが、特定の生体分子（タンパク質、抗体、核酸）、細菌またはその構成成分、ウイルスまたはその構成成分（例えば、コートタンパク質）、真菌またはその構成成分、原生動物またはその構成成分、薬物、毒素、食品病原体、及び同様のものが含まれる。

40

【0173】

本明細書で使用される「ペーパー」という用語は、木材のパルプまたは他の線維性植物物質に由来する薄いシートに限定されるものではなく、ある特定の実施形態では、本明細書に記載のデバイスにおいてそのようなペーパーを使用することが企図される。ペーパーは、より一般には、多孔性材料を指し、こうした多孔性材料は、シート形状であることが多いが、それに限定はされず、流体が通過可能なものである。

【0174】

いくつかの実施形態では、多孔性マトリックスは、水性二相系（ATPS）の混合相溶液、第1の相溶液、及び/または第2の相溶液、及び/または標的分析対象物がLFAを通過可能なほど十分に多孔性である。いくつかの実施形態では、多孔性マトリックスは、混合相溶液、第1の相溶液、及び/または第2の相溶液、及び/または標的分析対象物が

50

LFAまたはスポットアッセイデバイスを垂直方向及び/または水平方向に通過するのに十分なほど十分な長さ及び/または深さを有する。いくつかの実施形態では、第1の相溶液は、第1の速度で多孔性マトリックスを通過し、第2の相溶液は、第2の速度で多孔性マトリックスを通過し、第1の速度と第2の速度とは異なる。LFAまたはスポットアッセイの実施形態のいくつかでは、多孔性マトリックスは、数ある中でも特に、焼結ガラスセラミック、ミネラル、セルロース、ガラス繊維、ニトロセルロース、フッ化ポリビニリデン、ナイロン、電荷変更ナイロン、ポリエーテルスルホン、それらの組み合わせ、及び同様のものなどの材料を含む。

【図面の簡単な説明】

【0175】

【図1】典型的なラテラルフローイムノアッセイ試験ストリップの模式図(上)及びラテラルフローイムノアッセイのサンドイッチ形式(下)を示す。

【図2】ペーパーでの水性二相系(ATPS)分離をラテラルフローアッセイ(LFA)と併用する実施形態の1つを模式的に示すものであり、これによって標的分析対象物(例えば、バイオマーカー)が濃縮され、増進試薬が送達されることでシグナルが増強される。示されるように、LFAストリップがATPS溶液(1)に浸漬され、このATPS溶液は、標的分析対象物(例えば、バイオマーカー)、プローブ(例えば、比色プローブ)、及び1つまたは複数の増進試薬を含む。ATPSは、先行相と遅行相とに相分離することになる。最初に、先行相(2)が、濃縮された標的分析対象物(複数可)(例えば、バイオマーカー)及び比色プローブを検出領域に送達する。この次に、遅行相(3)が流れて検出ゾーンを横断通過し、これによって増進試薬が送達されることでLFAシグナルが増強される。ピンク色は比色プローブに相当し、黄色は増進試薬に相当する。

【図3】PEG-塩ATPSの塩高含有相である下相にALP-GNPが極度に分配される(左)、PEG-塩ATPSのPEG高含有相である上相にNBT/BCIPが極度に分配される(右)ことを示す。

【図4】LFAのみ(左)と、LFA+ATPS+NBT/BCIPという新たな設計と、で低濃度のモデルタンパク質(トランスフェリン)を検出して比較したものを示し、使用者による追加の段階を全く伴うことなく、シグナルが良好に増強されたことが示される。

【図5】PEG-デキストランATPSにおける血液の分配を視覚的に実証したものを示す。

【図6】PEG/デキストランATPSにおいて乾燥濾紙血から溶出したDNAの濃度を示す。Quant-iT(商標)蛍光アッセイを使用してDNA濃度を測定したところ、PEG/デキストランATPSの上相と比較して下相のDNA濃度が有意に高いことが示された($p < 0.01$, $n = 3$)。こうした結果は、トレハロース及びウシ血清アルブミン(BSA)で処理したガラス繊維ペーパー上で調製された乾燥濾紙血(DBS)からDNAが溶出することを示している。

【図7】PEG/デキストランATPSのデキストラン高含有相である下相、及びUCON/デキストランATPSの両方の相におけるDNA濃度を増幅前後で比較したものを示す。試験した相組成のすべてにおいて増幅が達成された。9:1及び1:9の比は、上相と下相との体積比を示す。

【図8】ATPSポリマーの存在下及び非存在下でのDNAの平均qPCR増幅サイクル数を示す。水におけるDNA、及びPEG/デキストランATPSのデキストラン高含有相である下相におけるDNAについて、レポーター色素の蛍光強度から増幅プロット(紫色で示される)を作成した。プロット上の緑色線は、レポーター色素の閾値蛍光強度を示す。紫色の増幅曲線と蛍光閾値とが交わる点におけるサイクル数は、閾値サイクルとしても知られており、qPCR反応における標的DNAの濃度を示す。水におけるDNAの増幅、及びPEG/デキストランATPSのデキストラン高含有相におけるDNAの増幅に要する平均閾値サイクル数は、それぞれ32及び31である。サイクル数は、スチューデントt検定を使用して比較し($p < 0.01$, $n = 3$)、2つ方法の間に統計学的差異が

10

20

30

40

50

存在しないことが示された。

【図 9】A T P S 及び t H D A を含めたワンポット反応を使用する D N A 増幅の実施形態の 1 つの模式図を示す。

【図 10】A T P S 及び t H D A を含めたワンポット反応と t H D A のみの反応とを比較したものを示す。レーン 1 は、t H D A のみでは 7.7×10^4 個の細胞から増幅が生じなかったことを示す。レーン 2 ~ 4 は、それぞれ 7.7×10^4 個の細胞、 1.6×10^4 個の細胞、及び 1.7×10^3 個の細胞を含む試料で当該ワンポット反応を実施することで、100 bp の標的産物が良好に増幅されたことを示す。レーン 5 及びレーン 6 では、102 個の細胞で当該ワンポット反応が実施され、レーン 6 が 100 bp の標的バンドの存在を正確に示している。レーン 5 及びレーン 6 に見える第 2 のバンドは、閾値を下回る細胞数で増幅を実施すると生じる非特異的なアーティファクト副産物である。

【図 11】標的解析対象物（例えば、生体分子）を検出するためのオールインワンスポット試験の実施形態の 1 つの模式図を示す。A T P S 構成成分及び比色（または他の）指示薬は、それぞれ濃縮コンポーネント及び複合パッドに脱水吸着される。使用者は、単に試料溶液をデバイスに加えるだけでよく、その後、構成成分は再水和し、標的生体分子は濃縮コンポーネント内で濃縮される。その後、分析対象物は、複合パッド上の比色指示薬に結合することになると共に、得られる指示薬 - 標的複合体が反応パッドで捕捉されることになり、このことが可視スポットによって示される。

【図 12】ワンポット系における 3 つの D N A 型の分配係数を示す。ゲノム D N A 及び 100 bp の D N A 断片は、上相に優先的に分配された一方で、より小さな 25 bp の D N A 断片は、2 つの相に均等に分配された。

【図 13】t H D A のみでの D N A 増幅の結果（左）、及びワンポットプラットフォームでの D N A 増幅の結果（右）を示す。t H D A のみの反応では、 10^6 cfu/mL の E . c o l i を含む試料から D N A が良好に増幅された一方で、ワンポットプラットフォームでは、 10^6 cfu/mL 及び 10^5 cfu/mL の E . c o l i を含む試料から D N A が良好に増幅された。「L」は、D N A ラダーを含むレーンを示す。

【図 14】自動化され、かつシグナルが増強された L F A を 3.2 ng / μ L の C T で実施したときの画像を時系列で示すものである。バックグラウンドシグナルが最小限に抑制されつつ、試験ライン及び対照ラインが経時的に黒くなっており、このことは、A T P S がシグナル増強反応の自動化に使用可能なことを示している。

【図 15】A T P S 及びシグナル増強を含めた L F A において、C T の検出限界が 30 倍改善したことを示す。従来 L F A では、 10 ng / μ L の C T が検出された一方で、増強 L F A では、 0.32 ng / μ L の C T が検出された。

【発明を実施するための形態】

【0176】

ある特定の実施形態では、ラテラルフローアッセイの感度を顕著に向上させる方法及びデバイスが提供される。さまざまな実施形態において、水性二相系（A T P S）とシグナル増強反応とを統合することによって L F A（またはフロースルーアッセイ）の感度が顕著に向上する。ある特定の実施形態では、A T P S は、標的バイオマーカーを濃縮し、これに加えて、L F A（またはフロースルーアッセイ）の検出ゾーンを横断してシグナル増強試薬を連続的に送達するという 2 つの役割を担う。この新規の技術統合によって、使用者によって加える段階を 1 つにとどめ、デバイスのコストを低く維持しつつ L F A（またはフロースルーアッセイ）の感度を改善することが可能になる。

【0177】

ある特定の実施形態では、単純かつ有効な核酸増幅検査（N A A T）のための方法及びデバイスも提供される。ある特定の実施形態では、方法によって、水性二相系（A T P S）が D N A 増幅と組み合わせることで段階が顕著に減少し、その結果、携帯型の N A A T が実現する。最終製品は、試料の調製と D N A 増幅とが組み合わせられて 1 段階にまとまる単一プラットフォームである。こうした試験は、単純化されているものの、複数の複雑な段階、機器、同一の結果を達成するための熟練人員を必要とする現在の N A A T と比較す

ると、その感度及び精度が向上している。さらに、この1段階プラットフォームを用いると、パラメーターを調整することでさまざまな感染性疾患の検出にその用途を広げることが容易にでき、このことによって、この1段階プラットフォームが開発途上国において使用するための真に独立型のN A A T診断提供物となっている。

【0178】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の方法及びデバイスは、臨床用途のための、分析対象物の採取、抽出、濃縮、及び検出向けに提供され得る。ある特定の実施形態では、方法及びデバイスによって、生体試料（例えば、口腔液または組織試料、尿、血液または血液分画物、脳脊髄液、リンパ液、組織生検物、腔試料、及び同様のもの）、食品試料、環境試料、ならびに同様のものにおける細菌、真菌、及びウイルスを迅速に検出及び/または定量化することが可能になる。

10

【0179】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるアッセイ及びデバイスは、フィールド環境試験、フィールド食品試験、及び同様のものを行う上で、正確、高感度、携帯型、使い捨て、かつポイント・オブ・ケアでの使用に十分に適したものであり、伴う訓練または機器は最小限のものである。

【0180】

L F A（またはフロースルーアッセイ）の感度を向上させる方法及びデバイス

さまざまな実施形態において、A T P Sの濃縮能力をL F A（またはフロースルーアッセイ）と併用し、これによってL F A（またはフロースルーアッセイ）の検出限界を顕著に（例えば、10～100倍以上）改善することで、実験室ベースのアッセイの感度に近づけることができる。こうした実験室ベースのアッセイは、酵素結合免疫吸着測定法（E L I S A）（例えば、P C T出願第W O 2 0 1 5 / 1 3 4 9 3 8号（P C T / U S 2 0 1 5 / 0 1 9 2 9 7）、及び2015年9月4日出願の同時係属出願U S S N 6 2 / 2 1 4 , 8 0 1を参照のこと）（これらの文献は両方共、そこに開示される方法及びデバイスを対象として参照によって本明細書に組み込まれる）などである。分析対象物の濃縮にA T P Sを使用するために、目的の試料は、典型的には、A T P Sに加えられ、添加された分析対象物は、そこでサイズ及び親水性などのさまざまな物理的特性及び化学的特性に基づいて2つの水性相に分布または分配される。2つの相のうちの1つに極度に分配される分析対象物は、その相の体積を著しく減らすことによってその相に濃縮することができる。系の水性性質は、生体分子にとって穏和な環境を提供することにもなり得、これによってその構造及び生物学的活性が安定する。

20

30

【0181】

多くのタンパク質は、むしろA T P Sの2つの相に均等に分配されることが通常であり、結果的に得られる濃縮能力は不十分なものとなる。A T P Sがタンパク質（または他の分析対象物）を濃縮する能力を増強するために、標的タンパク質（または他の分析対象物）を捕捉し、それを濃縮するために所望の相に誘導することができ、任意選択で、L F Aのための比色指示薬として働くことができるさまざまなプローブ（例えば、目的の標的に特異的な抗体でコートされた金ナノプローブ（G N P））を利用することができる。さらに、ペーパーでのA T P S分離は、相分離プロセスを大いに強化及び促進し得る方法を提供するものである。よく混合されたA T P S溶液が多孔性ペーパーに加えられると、それがペーパーを通過するにつれてそのそれぞれの相へと分離し、粘性が低い相が先行相となり、粘性が高い相が遅行相となり得る。これは、P E G - 塩A T P S系については、塩高含有相が先行し、P E G高含有相が遅行するということである。さらに、3 - Dペーパー芯を使用することで、ペーパーでのA T P S分離がさらに強化される。3 - D芯の下流にL F Aストリップを配置することによって、我々は、濃縮段階と検出段階とを途切れることなく1つのデバイスに統合した。

40

【0182】

典型的なL F Aは、試料が試験ストリップに加えられる場所である試料パッド、結合が生じ、結果が観測され得る場所である検出ゾーン、及び過剰な試料のシンクとして働く場

50

所である吸収パッド（図1、上）という少なくとも3つのコンポーネントからなる。サンドイッチアッセイ形式では、結合分子（抗体、アプタマー、一本鎖DNAなどであることが多い）で修飾されたLFA指示薬（比色性、蛍光性、及び放射性などであり得る）が最初に試料に添加される。標的分析対象物が存在するのであれば、抗体で修飾された指示薬にその標的分析対象物が結合することになる。こうした複合体は、例えば試料パッドを介して、LFA試験ストリップに加えられ、そのストリップを通過して吸収パッドに向かう。標的分析対象物が存在するのであれば、試験ラインに固定化された結合分子にその分析対象物が結合し、指示薬と膜との間に挟まれた状態となる。指示薬が比色性であるならば、その比色指示薬が強い色を示すことになり、分析対象物-指示薬複合体が試験ラインに蓄積するにつれて可視バンドが形成されることで、結果が陽性であることが示される。あるいは、分析対象物が存在しないのであれば、指示薬は試験ラインに付着せず、試験ラインが存在しないことで、結果が陰性であることが示される。分析対象物の存在の有無にかかわらず、指示薬に存在する修飾結合分子は、対照ライン（存在する場合）に結合及び蓄積し得る。対照ラインのバンドは、試料がストリップを通過したことを知らせており、これによって、試験が妥当であることが示される。したがって、結果が陽性であることは、バンドが2つ（1つは試験ラインのものであり、1つは対照ラインのものである）生じることによって示され、一方、結果が陰性であることは、対照ラインの単一のバンドによって示される。

10

【0183】

本明細書に記載されるように、LFA及びATPSが統合された我々の前述のデバイスの検出限界は、使用者による追加の段階を全く必要としないシグナル増強方策を加えることで改良されている。LFAシグナルを増強するための典型的なプロトコルでは、試料溶液を比色プローブと共にLFAストリップに加えることが最初に必要であり、これに10～20分を要する。次に、プローブによって生成するシグナルを増強するためにLFA試験ストリップに増進試薬が加えられる。ある特定の実施形態では、この増強によって、LFAのみの場合の検出限界と比較して検出限界が10～50倍改善され得る。

20

【0184】

ある特定の実施形態では、手動のATPS抽出を多段階のシグナル増強と組み合わせるための方法及びデバイスが本明細書で提供される。ATPSのバルク相の1つに分析対象物を添加及び濃縮すると、その相を手動（またはロボット制御）で抽出し、検出のためにLFAに加えることができる。例えば、10～20分後に、使用者（またはロボット）が増進試薬を加えることでLFAシグナルが増強され得る。ATPSによる濃縮及びシグナル増強に起因して検出限界が複合的に改善するため、この多段階手法では、LFAの検出限界が100～1000倍改善し得る。比色プローブと増進試薬溶液とは、互いに別々のままであることが重要であり、混合すると、増進が早発する結果としてバックグラウンドシグナルが高くなり得る。上記の手法は、試薬を別々の状態で良好に保つ一方で、複数の時限段階が必要であることから、試験のばらつきが増加し、使用者にとっての使いやすさは低下する。

30

【0185】

比色プローブと増進試薬とを依然として別々の状態に保ちつつ、使用者が複数段階を実行する手間をなくすために、ある特定の実施形態では、さまざまなATPSにおいてプローブと増進試薬とが逆に分配される挙動が利用され、これに加えて、ある特定の実施形態では、ペーパーでATPSが分離する現象が利用される。この手法では、プローブ（例えば、比色プローブ）は、そのサイズ及び/または親水性を増加させることによって、ATPSにおいて、より親水性であり、混雑度の低い相に極度に分配されるように操作することができる。これは、ポリマー-塩ATPSでは塩高含有相に相当し、またはミセルATPSではミセル低含有相に相当する。逆に、サイズ小さく、相対的に疎水性の増進試薬（複数）は、ATPSにおいて、より疎水性であり、より混雑した相に分配される。これは、ポリマー-塩ATPSのポリマー高含有相に相当し、またはミセルATPSのミセル高含有相に相当する。ペーパー基質にATPSが加えられると、相分離が促進され、より親

40

50

水性の先行相及びより疎水の遅行相が形成されることになる。これは、ポリマー - 塩 A T P S については、塩高含有相が先行し、ポリマー高含有相が遅行するということであり、ミセル A T P S については、ミセル低含有相が先行し、ミセル高含有相が遅行する。先行相は、濃縮されたバイオマーカー及び比色プローブを L F A の検出ゾーンに送達することになる。この後に、遅行相が増進試薬を送達することでシグナル増強が始まることになる（図 2）。

【 0 1 8 6 】

我々は、この手法の実現可能性を、モデルタンパク質であるトランスフェリン（T f）を検出するために、アルカリホスファターゼ（A L P）酵素によるニトロ - ブルーテトラゾリウム / 5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - イノジリンドリルホスフェート（N B T / B C I P）の発色に基づく酵素系を使用して実証した。A L P 及び抗 T f 抗体を金ナノ粒子に複合化することでアルカリホスファターゼ - 金ナノプローブ（A L P - G N P）を形成した。こうした A L P - G N P は、溶液中の T f を捕捉し、濃縮するために所望の A T P S 相に T f を誘導することができる。A L P - G N P は、L F A のための比色指示薬として働くだけでなく、N B T / B C I P 基質溶液と反応して紫色の沈殿物を生成できるという能力を追加で有する。A L P - G N P は、P E G - 塩 A T P S に添加されると、塩高含有相である下相に分配される一方で、N B T / B C I P 基質は、P E G 高含有相である上相に分配される（図 3）。A T P S は、L F A 試験ストリップを下流に有する我々の 3 - D ペーパーウェルに加えられると、A L P - G N P が、目的のバイオマーカーを伴って、先行する塩高含有相に濃縮され、検出ゾーンに送達されることになる。この後に、P E G 高含有相が検出ゾーンを横断して流れることで、N B T / B C I P 基質が送達されることになる。基質は、検出ゾーンに結合したすべての A L P - G N P によって紫色の沈殿物へと変換されることになり、それによってシグナルが増強される（図 4）。我々は、この手法の実現可能性を、A L P による N B T / B C I P との酵素反応と組み合わせて P E G - 塩 A T P S を使用することで実証してきたが、この技術は、他の A T P S 系（例えば、P P G - 塩、P E G - デキストラン、T r i t o n X - 1 1 4、C₁₀E₄ など）ならびにシグナル増強系（セイヨウワサビペルオキシダーゼ及びペルオキシダーゼ様ナノ粒子と T M B または D A B との組み合わせ、金及び銀による増強など）に適用することができる。この手法は、使用者によって加える段階が 1 回のみであり、伝統的な L F A を上回って検出限界を 1 0 0 ~ 1 0 0 0 倍改善できると考えられる。

【 0 1 8 7 】

前述の方法は、L F A に関して記載されているが、こうした方法は、フロースルーアッセイ（例えば、図 1 1 に示されるものなどのアッセイ）にも容易に適用できることを認識されよう。

【 0 1 8 8 】

ある特定の実施形態では、A T P S、プローブ、及び増進試薬（複数可）は、プローブが先行相に含まれ、増進試薬（複数可）が遅行相に含まれて提供されるように選択されるが、2 つの相の間の界面にプローブ（複数可）が局在化し、増進試薬（複数可）が遅行相に含まれて提供される実施形態もまた企図される。

【 0 1 8 9 】

核酸の増幅と、核酸の濃縮及び予備濃縮との組み合わせ

ある特定の実施形態では、D N A 増幅技術と、D N A の抽出段階及び予備濃縮段階と、を組み合わせ、すべてを 1 つの統合プラットフォームに組み込む方法及びデバイスが提供される。ある特定の実施形態では、このプラットフォームは、水性二相系（A T P S）からなり、これによって、所与の構成成分濃度及び温度で、A T P S 混合物が 2 つの異なる相に分離することが可能となる。両方の相が水性であり、生体分子にとって安定な環境を提供する。

【 0 1 9 0 】

A T P S は、さまざまな特性を有し、さまざまな生物学的目的に適合するものであり、こうした目的は、試料の精製及び細胞の溶解、ならびに生体分子の分離、選別、及び濃縮

10

20

30

40

50

などである。例えば、T r i t o n界面活性剤を含めて調製されたミセルA T P Sでは、D N Aのような生体分子が1つの相に極度に分配され得る。さらに、T r i t o n界面活性剤は、固有の細胞溶解ことができることも知られている。あるいは、ポリエチレングリコール(P E G)及びデキストランから調製されたA T P Sは、乾燥濾紙血を再溶解し、1つの相に血液細胞を分配させるために使用することができる(例えば、図5を参照のこと)。その後、再溶解した血液細胞に由来するD N Aは、デキストラン高含有相である下相に濃縮され得る(図6)。増幅するための複雑な生体試料からのD N Aの調製及び抽出では、こうした細胞溶解段階、D N A精製段階、及び濃縮段階が必要になることが多い。A T P Sを用いればこうした結果を達成することが可能であるため、このことによって、A T P SがD N A増幅及び/または他のプロトコルを統合するための適切な生体試料操作プラットフォームとなっている。

10

【0191】

A T P SによるD N A抽出/予備濃縮と、核酸(例えば、D N A)増幅と、を統合するための例示的な手法の1つでは、濃縮された核酸を含む、A T P Sの相の1つまたは界面を抽出し、緩衝試薬、塩溶液、ヌクレオチド塩基、酵素、及び標的核酸(例えば、D N Aテンプレート)を特異的に増幅するプライマーを含む核酸増幅反応に直接的に供することができる。1つの例では、血液適合性のポリメラーゼを使用することで、デキストラン高含有相及びU C O N高含有相から直接的にD N Aが良好に増幅された。増幅に際して、D N A濃度を2~7倍に増加させることが可能であり、このことは、試験したA T P S系にポリメラーゼが適合することを示している(図7)。デキストラン高含有相に含まれるD N Aに対して従来の定量的ポリメラーゼ連鎖反応(q P C R)も直接的に実施し、純水に含まれるD N Aからの増幅と同じくらい良好に当該反応を進行させることが可能であった(図8)。

20

【0192】

例示的であるが非限定的な別の手法では、A T P Sと核酸(例えば、D N A)増幅とに必要な構成成分のすべてが1つの混合物に統合される。注目すべきは、この方法では、典型的には、核酸(例えば、D N A増幅)を等温で利用できるということである。一般に使用されるポリメラーゼ連鎖反応(P C R)による増幅方法は、D N A増幅プロセスのそれぞれの段階について異なる温度を周期的に繰り返すものであるが、等温増幅では、D N A増幅プロセス全体を1つの設定温度で実施することが可能である。この一例は、好熱性ヘリカーゼ依存性増幅(t H D A)であり、これは、二本鎖D N Aを分離するために熱サイクリングではなくヘリカーゼを使用するものであり、これによって、等温的(例えば、65)に増幅を実施することが可能になる。この温度でも相分離が生じるミセルA T P Sが存在するため、こうしたミセルA T P Sをt H D A反応の構成成分と組み合わせることでD N Aの濃縮及び増幅を同時に促進することができる。

30

【0193】

これを実施するために、全細胞試料を統合溶液に添加することができ、その際、次に全溶液を混合することでミセルA T P Sを形成することができる。その後、この混合物を例えば、65で1時間加熱することで、相分離とD N A増幅とを両方生じさせることが可能である(図9)。核酸(例えば、D N A)は、2つの相のうちの1つに分配され、その後、そこから増幅D N Aを抽出することができる。このワンポットプラットフォームには、核酸の濃縮と増幅とを両方同時に行う能力が存在し、この能力によって、現在のt H D A技術単独で可能なものと比較して、細胞数が少ない試料から増幅を行うことが可能になる。現在のt H D A技術では、試料に含まれる細胞数が10,000個超であれば、試料からD N Aが良好に増幅される。対照的に、T r i t o n X - 100 A T P Sとt H D Aとが統合されたワンポット系を使用すると、僅か100個の細胞しか含まない試料からD N Aを良好に増幅できることが我々の予備結果によって示されている(図10)。一方、細胞試料が別に溶解され、商用のキット及び他の実験機器を介してD N Aが精製及び濃縮されると、t H D A系自体は、単に、この同一の低い検出限界を達成し得るにすぎない。したがって、我々のワンポットプラットフォームが感度及び単純性を改善したことが、こ

40

50

のプラットフォームをポイント・オブ・ケア核酸増幅検査（N A A T）に基づく疾患検出のための、競争力のある候補としている。我々の発明は、使用することができる可能な A T P S 及び等温増幅試薬が多く存在するため、非常に汎用的でもある。

【 0 1 9 4 】

標的生体分子の濃縮

本明細書に記載のアッセイのさまざまな実施形態において、分析対象物（例えば、標的生体分子）は、水性二相系（A T P S）を使用して濃縮することができる。さまざまな実施形態において、A T P S は、バルクの液体形態（例えば、容器）において実施するか、またはラテラルフローアッセイもしくはフロースルーアッセイ（例えば、ペーパー膜）において試料溶液を流しながら実施することができる。

10

【 0 1 9 5 】

液体 A T P S における濃縮

採取した試料（例えば、組織試料、生体液（尿、唾液、及び血液、痰、膿液、精液、脳脊髄液、リンパ液など）、子宮頸管内スワブ、歯に由来するプラーク、食品試料、ならびに環境試料、ならびに同様のもの）は、任意選択で、懸濁液（例えば、緩衝液）と混合されるか、もしくは A T P S 溶液と直接的に混合されるか、もしくはペーパーに直接的に加えられるか、または試料を含む懸濁液がペーパーに加えられることで、事前にペーパーに乾燥吸着した A T P S 構成成分が再水和し得る。場合によっては、よく混合された均一溶液を得るために、使用者による混合が必要であり得る。例示的であるが非限定的なさまざまな実施形態において、ポリマー/塩、ポリマー/ポリマー、ミセル/ポリマー、またはミセル A T P S が使用され得る。

20

【 0 1 9 6 】

ペーパーでの流体が流れながらの濃縮

さまざまな実施形態において、濃縮段階は、ペーパーを用いても促進され得る。例えば、採取した検体を A T P S 構成成分と混合し、相分離を推進、強化、及び促進することができるペーパーデバイスに導入にすることができる。標的生体分子は、ペーパー膜での流れの先行前部において濃縮することができ、次の検出コンポーネントへと途切れることなく導入することができる。

【 0 1 9 7 】

あるいは、A T P S 構成成分は、ペーパー膜に事前に脱水吸着させることができる。この場合、採取した検体は、A T P S 構成成分と事前に混合することなく、ペーパー膜に直接的に加えることができる。

30

【 0 1 9 8 】

水性二相系（A T P S）

ある特定の実施形態では、本明細書に記載のデバイスは、例えば、シリンジまたは他の容器における水性二相系（A T P S）と併せて働くように構成されるか、または水性二相系（A T P S）を支持するように構成される。いくつかの実施形態では、A T P S は、相溶液を含む。「相溶液」という用語は、一般に、A T P S の第 1 の相溶液または第 2 の相溶液を指す。いくつかの実施形態では、相溶液は、混合溶液（例えば、第 1 の相溶液 / 第 2 の相溶液との混合溶液）に存在する。いくつかの実施形態では、相溶液は、A T P S の混合溶液からそれが分配された後の第 1 の相溶液 / 第 2 の相溶液である。いくつかの実施形態では、相溶液は、L F A またはフロースルーアッセイにおいて混合溶液からそれが分配された後の第 1 の相溶液 / 第 2 の相溶液である。ある特定の実施形態では、相溶液は、それが混合状態（例えば、第 1 の相溶液との混合状態）にある間、第 2 の相溶液と称され得る。いくつかの実施形態では、相溶液は、L F A またはフロースルーアッセイにおける先行流体である。いくつかの実施形態では、相溶液は、L F A またはフロースルーアッセイにおける遅行流体である。

40

【 0 1 9 9 】

いくつかの実施形態では、A T P S は、第 1 の相溶液と第 2 の相溶液とが最初は混ざった状態のもの（例えば、混合相溶液）である 2 つの水性溶液を含む。いくつかの実施形態

50

では、混合相溶液は、均一溶液であるが、ある特定の他の実施形態では、第1の相溶液と第2の相溶液とは、非混和性である。いくつかの実施形態では、第1の相溶液と第2の相溶液とは、非混和性であるが、第1の相溶液のドメインは、第2の相溶液のドメインと混ざる。いくつかの実施形態では、非混和性は、温度変化及び/または塩などの異なる構成成分の濃度変化によって促進される。いくつかの実施形態では、第1の相溶液/第2の相溶液は、ミセル、塩、及び/またはポリマーなどの構成成分を含む。いくつかの実施形態では、ATPSと接触する標的分析対象物（例えば、生体分子、細菌（もしくはその断片）、真菌（もしくはその断片）、またはウイルス、及び同様のもの）は、その物理的特性及び化学的特性（サイズ、形、疎水性、及び電荷など）に基づいて、第2の相溶液を上回って第1の相溶液に（またはその逆に）優先的に分布、分配、及び/または濃縮される。いくつかの実施形態では、標的分析対象物（例えば、細菌、真菌、ウイルスなど）は、ATPSの第1の相溶液または第2の相溶液に主に（または極度に）分配され、それ故に、ATPSにおいて濃縮される。いくつかの実施形態では、標的分析対象物は、第1の相溶液と第2の相溶液との体積比を調整することによって濃縮される。いくつかの実施形態では、標的分析対象物は、分析対象物が分配される相の体積を減らすことによって濃縮される。例として、いくつかの実施形態では、標的分析対象物は、例えば、第1の相溶液と第2の相溶液との体積比を1:9にすることによって第1の相溶液に10倍濃縮され、この濃縮は、分析対象物が極度に分配される相の体積が総体積の1/10であるために生じる。

【0200】

いくつかの実施形態では、他の濃縮が、他の比を使用することによって得られる。したがって、いくつかの実施形態では、第1の相溶液と第2の相溶液との比は、約1:1、約1:2、約1:3、約1:4、約1:5、約1:6、約1:7、約1:8、約1:9、または約1:10の比を含む。いくつかの実施形態では、第1の相溶液と第2の相溶液との比は、約1:20、約1:30、約1:40、約1:50、約1:60、約1:70、約1:80、約1:90、または約1:100の比を含む。いくつかの実施形態では、第1の相溶液と第2の相溶液との比は、約1:200、約1:300、約1:400、約1:500、約1:600、約1:700、約1:800、約1:900、または約1:1000の比を含む。

【0201】

いくつかの実施形態では、第2の相溶液と第1の相溶液との比は、約1:1、約1:2、約1:3、約1:4、約1:5、約1:6、約1:7、約1:8、約1:9、または約1:10の比を含む。いくつかの実施形態では、第2の相溶液と第1の相溶液との比は、約1:20、約1:30、約1:40、約1:50、約1:60、約1:70、約1:80、約1:90、または約1:100の比を含む。いくつかの実施形態では、第2の相溶液と第1の相溶液との比は、約1:200、約1:300、約1:400、約1:500、約1:600、約1:700、約1:800、約1:900、または約1:1000の比を含む。

【0202】

いくつかの実施形態では、分析対象物は、第1の相溶液と第2の相溶液とに実質的に均等に分配されることで、分析対象物の濃縮が阻止される。そのような系では、標的分析対象物の濃縮は、標的分析対象物を捕捉するプローブなどの、追加の構成成分を導入することによって達成され、プローブは、1つの相に主に分配され、それによって、標的分析対象物の濃縮を可能にする分配挙動が強化される。いくつかの実施形態では、濃縮された分析対象物を含む第1の相溶液/第2の相溶液が採取され、LFAまたはフロースルーアッセイデバイスに加えらる。

【0203】

いくつかの実施形態では、第1の相溶液/第2の相溶液は、ミセル溶液を含む。いくつかの実施形態では、ミセル溶液は、非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、ミセル溶液は、界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、ミセル溶液は、Tri

ton - Xを含む。いくつかの実施形態では、ミセル溶液は、Triton - Xと同様のポリマー（例えば、Igepal CA - 630及びNonidet P - 40、ならびに同様のものなどであるが、これらに限定はされない）を含む。いくつかの実施形態では、ミセル溶液は、Triton - Xから本質的になる。

【0204】

いくつかの実施形態では、ミセル溶液は、室温（約25℃）で、約0.01センチポアズ～約5000センチポアズ、約0.01センチポアズ～約4500センチポアズ、約0.01センチポアズ～約4000センチポアズ、約0.01センチポアズ～約3500センチポアズ、約0.01センチポアズ～約3000センチポアズ、約0.01センチポアズ～約2500センチポアズ、約0.01センチポアズ～約2000センチポアズ、約0.01センチポアズ～約1500センチポアズ、約0.01センチポアズ～約1000センチポアズ、または約0.01センチポアズ～約500センチポアズの粘度を有する。いくつかの実施形態では、ミセル溶液は、室温で、約0.01センチポアズ～約450センチポアズ、約0.01センチポアズ～約400センチポアズ、約0.01センチポアズ～約350センチポアズ、約0.01センチポアズ～約300センチポアズ、約0.01センチポアズ～約250センチポアズ、約0.01センチポアズ～約200センチポアズ、約0.01センチポアズ～約150センチポアズ、または約0.01センチポアズ～約100センチポアズの粘度を有する。

10

【0205】

いくつかの実施形態では、再水和した第1の相溶液/第2の相溶液は、ポリマー（例えば、ポリマー溶液）を含む。ある特定の実施形態では、ポリマーは、ポリエチレングリコール（PEG）、エチレン/プロピレンコポリマー（例えば、UCON（商標）ポリマー）、プロピレングリコール（PPG）、メトキシポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、及び同様のものからなる群から選択される1つまたは複数のポリマーを含む。ある特定の実施形態では、ポリマーは、ポリエチレングリコール（PEG）である。さまざまな実施形態において、PEGは、1000～100,000の分子量を有し得る。ある特定の実施形態では、PEGは、PEG - 4600、PEG - 8000、またはPEG - 20,000を含む。ある特定の実施形態では、ポリマーは、ポリプロピレングリコール（PPG）である。さまざまな実施形態において、PPGは、100～10,000の分子量を有し得る。ある特定の実施形態では、PPGは、PPG 425を含む。ある特定の実施形態では、ポリマーは、デキストランである。さまざまな実施形態において、デキストランは、1000～1,000,000の分子量を有し得る。ある特定の実施形態では、デキストランは、デキストラン6000、デキストラン9000、デキストラン - 35,000、またはデキストラン - 200,000を含む。ある特定の実施形態では、ポリマーは、エチレン/プロピレンコポリマー（例えば、UCON（商標）ポリマー）を含む。例示的であるが非限定的なエチレン/プロピレンコポリマーには、限定はされないが、UCON（商標）50 - HB - 5100、UCON（商標）50 - HB - 3520、UCON（商標）50 - HB - 2000、UCON（商標）50 - HB - 660、UCON（商標）50 - HB - 400、UCON（商標）50 - HB - 260、UCON（商標）50 - HB - 170、UCON（商標）50 - HB - 100、UCON（商標）60 - H - 5300、UCON（商標）60 - H2300、UCON（商標）60 - H - 1600、UCON（商標）60 - H - 1100、UCON（商標）60 - H - 760、UCON（商標）60 - H - 340、UCON（商標）75 - H - 9500、UCON（商標）75 - H - 1400、UCON（商標）75 - H - 450、及び同様のものが含まれる。

20

30

40

【0206】

いくつかの実施形態では、再水和したポリマー溶液は、ポリマー含量が約0.01% w/wのポリマー溶液、またはポリマー含量が約0.05% w/wのポリマー溶液、またはポリマー含量が約0.1% w/wのポリマー溶液、またはポリマー含量が約0.15% w/wのポリマー溶液、またはポリマー含量が約0.2% w/wのポリマー溶液、またはポリマー含量が約0.25% w/wのポリマー溶液、またはポリマー含量が約0.3% w/w

50

25% w/w、または約10% w/w ~ 約25% w/w、または約10% w/w ~ 約20% w/wのポリマー溶液を含む。

【0207】

いくつかの実施形態では、再水和した第1の相溶液及び/または第2の相溶液は、塩を含み、それによって塩溶液を形成する。いくつかの実施形態では、標的分析対象物（例えば、細菌、真菌、ウイルスなど）及び/またはプローブ-分析対象物複合体は、塩溶液に分配される。ある特定の実施形態では、塩溶液は、コスモトロピック塩を含む。いくつかの実施形態では、塩溶液は、カオトロピック塩を含む。いくつかの実施形態では、塩は、マグネシウム塩、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩、セシウム塩、亜鉛塩、及びアルミニウム塩のうちの一つまたは複数を含む。いくつかの実施形態では、塩は、臭化物塩、ヨウ化物塩、フッ化物塩、炭酸塩、硫酸塩、クエン酸塩、カルボン酸塩、ホウ酸塩、またはリン酸塩を含む。いくつかの実施形態では、塩は、リン酸カリウムである。いくつかの実施形態では、塩は、硫酸アンモニウムである。

10

【0208】

いくつかの実施形態では、再水和した塩溶液は、約0.01% w/wの塩を含む塩溶液、または約0.05% w/wの塩を含む塩溶液、約0.1% w/wの塩を含む塩溶液、または約0.15% w/wの塩を含む塩溶液、または約0.2% w/wの塩を含む塩溶液、または約0.25% w/wの塩を含む塩溶液、または約0.3% w/wの塩を含む塩溶液、または約0.35% w/wの塩を含む塩溶液、または約0.4% w/wの塩を含む塩溶液、または約0.45% w/wの塩を含む塩溶液、または約0.5% w/wの塩を含む塩溶液、または約0.55% w/wの塩を含む塩溶液、または約0.6% w/wの塩を含む塩溶液、または約0.65% w/wの塩を含む塩溶液、または約0.7% w/wの塩を含む塩溶液、または約0.75% w/wの塩を含む塩溶液、または約0.8% w/wの塩を含む塩溶液、または約0.85% w/wの塩を含む塩溶液、または約0.9% w/wの塩を含む塩溶液、または約0.95% w/wの塩を含む塩溶液、または約もしくは約1% w/wの塩を含む塩溶液を含む。いくつかの実施形態では、再水和した塩溶液は、塩含量が約1% w/wの塩溶液、または塩含量が約2% w/wの塩溶液、または塩含量が約3% w/wの塩溶液、または塩含量が約4% w/wの塩溶液、または塩含量が約5% w/wの塩溶液、または塩含量が約6% w/wの塩溶液、または塩含量が約7% w/wの塩溶液、または塩含量が約8% w/wの塩溶液、または塩含量が約9% w/wの塩溶液、または塩含量が約10% w/wの塩溶液、または塩含量が約11% w/wの塩溶液、または塩含量が約12% w/wの塩溶液、または塩含量が約13% w/wの塩溶液、または塩含量が約14% w/wの塩溶液、または塩含量が約15% w/wの塩溶液、または塩含量が約16% w/wの塩溶液、または塩含量が約17% w/wの塩溶液、または塩含量が約18% w/wの塩溶液、または塩含量が約19% w/wの塩溶液、または塩含量が約20% w/wの塩溶液、または塩含量が約21% w/wの塩溶液、または塩含量が約22% w/wの塩溶液、または塩含量が約23% w/wの塩溶液、または塩含量が約24% w/wの塩溶液、または塩含量が約25% w/wの塩溶液、または塩含量が約26% w/wの塩溶液、または塩含量が約27% w/wの塩溶液、または塩含量が約28% w/wの塩溶液、または塩含量が約29% w/wの塩溶液、または塩含量が約30% w/wの塩溶液、または塩含量が約31% w/wの塩溶液、または塩含量が約32% w/wの塩溶液、または塩含量が約33% w/wの塩溶液、または塩含量が約34% w/wの塩溶液、または塩含量が約35% w/wの塩溶液、または塩含量が約36% w/wの塩溶液、または塩含量が約37% w/wの塩溶液、または塩含量が約38% w/wの塩溶液、または塩含量が約39% w/wの塩溶液、または塩含量が約40% w/wの塩溶液、または塩含量が約41% w/wの塩溶液、または塩含量が約42% w/wの塩溶液、または塩含量が約43% w/wの塩溶液、または塩含量が約44% w/wの塩溶液、または塩含量が約45% w/wの塩溶液、または塩含量が約46% w/wの塩溶液、または塩含量が約47% w/wの塩溶液、または塩含量が約48% w/wの塩溶液、または塩含量が約49% w/wの塩溶液、または及び塩含量が約50% w/wの塩溶液を含む。いくつかの実施形態では、再水和した塩溶液は

20

30

40

50

、約 0.1% w/w ~ 約 40% w/w、または約 1% w/w ~ 約 30% w/w、または約 5% w/w ~ 約 25% w/w、または約 10% w/w ~ 約 20% w/w の範囲の塩溶液を含む。いくつかの実施形態では、再水和した塩溶液は、約 0.1% w/w ~ 約 10% の塩溶液を含む。いくつかの実施形態では、塩溶液は、約 1% w/w ~ 約 10% である。

【0209】

いくつかの実施形態では、第 1 の相溶液 / 第 2 の相溶液は、水と非混和性の溶媒を含む。いくつかの実施形態では、溶媒は、非極性の有機溶媒を含む。いくつかの実施形態では、溶媒は、油を含む。いくつかの実施形態では、溶媒は、ペンタン、シクロペンタン、ベンゼン、1,4-ジオキサン、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、クロロホルム、トルエン、またはヘキサンを含む。

10

【0210】

いくつかの実施形態では、第 1 の相溶液は、ミセル溶液を含み、第 2 の相溶液は、ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、第 2 の相溶液は、ミセル溶液を含み、第 1 の相溶液は、ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、第 1 の相溶液は、ミセル溶液を含み、第 2 の相溶液は、塩を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の相溶液は、ミセル溶液を含み、第 1 の相溶液は、塩を含む。いくつかの実施形態では、ミセル溶液は、Triton-X 溶液である。いくつかの実施形態では、第 1 の相溶液は、第 1 のポリマーを含み、第 2 の相溶液は、第 2 のポリマーを含む。いくつかの実施形態では、第 1 のポリマー / 第 2 のポリマーは、ポリエチレングリコール及び / またはデキストランを含む。いくつかの実施形態では、第 1 の相溶液は、ポリマーを含み、第 2 の相溶液は、塩を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の相溶液は、ポリマーを含み、第 1 の相溶液は、塩を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の相溶液は、ポリエチレングリコールを含み、第 2 の相溶液は、リン酸カリウムを含む。いくつかの実施形態では、第 2 の相溶液は、ポリエチレングリコールを含み、第 1 の相溶液は、リン酸カリウムを含む。いくつかの実施形態では、第 1 の相溶液は、塩を含み、第 2 の相溶液は、塩を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の相溶液は、コスモトロピック塩を含み、第 2 の相溶液は、カオトロピック塩を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の相溶液は、コスモトロピック塩を含み、第 1 の相溶液は、カオトロピック塩を含む。

20

【0211】

いくつかの実施形態では、第 1 の相溶液は、表 1 に記載の構成成分 1 を含み、第 2 の相溶液は、表 1 に記載の構成成分 2 を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の相溶液は、表 1 に記載の構成成分 1 を含み、第 2 の相溶液は、表 1 に記載の構成成分 2 を含む。

30

【0212】

いくつかの実施形態では、表 1 に記載の構成成分は、緩衝液に懸濁または溶解される。いくつかの実施形態では、表 1 に記載の構成成分は、試料の起源である生体系に適合する緩衝液に懸濁 / 溶解される。いくつかの実施形態では、表 1 に記載の構成成分は、生理食塩水に懸濁 / 溶解される。いくつかの実施形態では、表 1 に記載の構成成分は、PBS に懸濁 / 溶解される。いくつかの実施形態では、表 1 に記載の構成成分は、水に懸濁 / 溶解される。いくつかの実施形態では、表 1 に記載の構成成分は、生体液に懸濁 / 溶解される。

40

【0213】

【表 1 - 1】

表 1. 水性二相抽出／濃縮系の例.

構成成分 1	構成成分 2
ポリマー／ポリマー系	
ポリエチレングリコール	下記のものの中の 1 つまたは複数： デキストラン フィコール ポリビニルピロリドン ポリビニルアルコール ヒドロキシプロピルデンプン
ポリプロピレングリコール	下記のものの中の 1 つまたは複数： デキストラン ヒドロキシプロピルデキストラン ポリビニルピロリドン
ポリビニルアルコール	下記のものの中の 1 つまたは複数： デキストラン ヒドロキシプロピルデキストラン
ポリビニルピロリドン	下記のものの中の 1 つまたは複数 デキストラン マルトデキストリン
メチルセルロース	下記のものの中の 1 つまたは複数： デキストラン ヒドロキシプロピルデキストラン
エチルヒドロキシエチルセルロース	デキストラン

10

20

30

【表 1 - 2】

ポリマー／塩系	
<p>下記のものの中の1つまたは複数：</p> <p>ポリエチレングリコール (PEG) エチレン/プロピレンコポリマー (例えば、UCON(商標)) プロピレングリコール (PPG) メトキシポリエチレングリコール ポリビニルピロリドン</p>	<p>下記のものの中の1つまたは複数：</p> <p>リン酸カリウム 硫酸ナトリウム 硫酸マグネシウム 硫酸アンモニウム クエン酸ナトリウム 塩化マグネシウム クエン酸マグネシウム リン酸マグネシウム 塩化ナトリウム クエン酸カリウム 炭酸カリウム</p>
<p>ポリエチレングリコール</p>	<p>下記のものの中の1つまたは複数：</p> <p>リン酸カリウム 硫酸ナトリウム 硫酸マグネシウム 硫酸アンモニウム クエン酸ナトリウム 塩化マグネシウム クエン酸マグネシウム リン酸マグネシウム 塩化ナトリウム クエン酸カリウム 炭酸カリウム</p>
<p>ポリエチレングリコール (PEG)</p>	<p>リン酸カリウム</p>
<p>プロピレングリコール (PPG)</p>	<p>リン酸カリウム</p>
<p>メトキシポリエチレングリコール</p>	<p>リン酸カリウム</p>
<p>ポリビニルピロリドン</p>	<p>リン酸カリウム</p>

10

20

30

【表 1 - 3】

<p>エチレン/プロピレンコポリマー(例えば、 UCON(商標)50-HB-5100, UCON(商標)50-HB-3520, UCON(商標)50-HB-2000, UCON(商標)50-HB-660, UCON(商標)50-HB-400, UCON(商標)50-HB-260, UCON(商標)50-HB-170, UCON(商標)50-HB-100, UCON(商標)60-H-5300, UCON(商標)60-H2300, UCON(商標)60-H-1600, UCON(商標)60-H-1100, UCON(商標)60-H-760, UCON(商標)60-H-340, UCON(商標)75-H-9500, UCON(商標)75-H-1400, UCON(商標)75-H-450など)</p>	<p>リン酸カリウム</p>
--	----------------

10

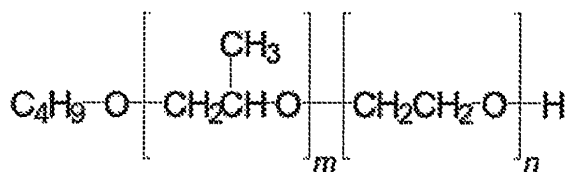
20

【0214】

UCON(商標)ポリマーは、約100～約150の温度で、アルカリ触媒を使用し、等重量のエチレンオキシド及びプロピレンオキシドをブチルアルコールと反応させることによって生成するエチレン/プロピレンコポリマーを含むことに留意されたい。得られるUCON(商標)50-HBは、以下の一般構造を有するランダムコポリマーである：

【0215】

【化1】



30

【0216】

上記のATPS系及び構成成分は、例示的かつ非限定的であることを認識されよう。本明細書で提供される教示内容を使用することで、当業者であれば多数の他のATPS系及び構成成分を利用可能であろう。

40

【0217】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のデバイス(例えば、LFAまたはフロースルーアッセイデバイス)は、ATPSと接触するように配置構成されるコレクターをさらに含み得、標的分析対象物は、コレクターと第1の相溶液及び/または第2の相溶液との界面に分配される。いくつかの実施形態では、コレクターは、プラスチック、メソ多孔性材料、シリカ、ポリプロピレン、磁石、磁性粒子、常磁性粒子、孔を有する材料、溝を有する材料、及び/またはそれらの任意の組み合わせである材料を含む。いくつかの実施形

50

態では、コレクターは、ポリプロピレンを含む。いくつかの実施形態では、コレクターは、標的分析対象物の採取量が増えるように最適化される。いくつかの実施形態では、コレクターは、表面積を最大化するための孔を含む。いくつかの実施形態では、孔の幅は、約 1 μm、約 5 μm、約 10 μm、約 15 μm、約 20 μm、約 25 μm、約 30 μm、約 35 μm、約 40 μm、約 45 μm、約 50 μm、約 55 μm、約 60 μm、約 65 μm、約 70 μm、約 75 μm、約 80 μm、約 85 μm、約 90 μm、約 95 μm、または約 100 μm である。いくつかの実施形態では、孔の幅は、約 100 μm、約 200 μm、約 300 μm、約 400 μm、約 500 μm、約 600 μm、約 700 μm、約 800 μm、約 900 μm、または約 1 mm である。いくつかの実施形態では、孔の深さは、約 1 μm、約 5 μm、約 10 μm、約 15 μm、約 20 μm、約 25 μm、約 30 μm、約 35 μm、約 40 μm、約 45 μm、約 50 μm、約 55 μm、約 60 μm、約 65 μm、約 70 μm、約 75 μm、約 80 μm、約 85 μm、約 90 μm、約 95 μm、または約 100 μm である。いくつかの実施形態では、孔の深さは、約 100 μm、約 200 μm、約 300 μm、約 400 μm、約 500 μm、約 600 μm、約 700 μm、約 800 μm、約 900 μm、または約 1 mm である。

10

20

30

40

50

【0218】

標的分析対象物（例えば、生体分子）の検出

さまざまな実施形態において、ペーパーベースの検出コンポーネントは、ラテラルフロー試験ストリップ（例えば、図1を参照のこと）またはフロースルーデバイス（スポット試験）（例えば、図11を参照のこと）の形態であり得る。さまざまな実施形態において、両方の形態要素は、下記のコンポーネントのうちの1つまたは複数を含み得る：

【0219】

試料パッド

ある特定の実施形態では、試料パッドは、存在するとき、濃縮コンポーネントを検出コンポーネントに連結することができる。試料パッドは、採取した流体に由来するデブリ、混入物、及び粘液を除去することができるフィルターとして働くことができる。試料パッドは、乾燥試薬を保持することもでき、再水和時に、こうした試薬は、(i) 検出条件（pH、イオン強度など）が最適となるように溶液を調整し、(ii) 採取した検体に含まれ、検出に影響し得る粘液、糖タンパク質、及び他の粘性材料を分解することができる。試料パッドのための材料の例には、限定はされないが、セルロース、ニトロセルロース、ガラス繊維、綿、織紙、または不織紙などが含まれる。パッドに加える試薬には、限定はされないが、界面活性剤（Triton X-100、Tween 20、またはドデシル硫酸ナトリウムなど）、ポリマー（ポリエチレングリコール、ポロキサマー、ポリビニルピロリドン（PVP）など）、緩衝剤（リン酸緩衝生理食塩水、4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジンエタンスルホン酸（HEPES）、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（トリス）、ホウ酸ナトリウム、TRICINEなど）、タンパク質（アルブミンなど）、酵素（プロテアーゼなど）、塩（塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム、コール酸ナトリウム、リン酸カリウムなど）が含まれ得る。さまざまな実施形態において、こうした試薬は、(i) 試薬溶液へのペーパー材料の浸漬、または(ii) 毛細管流動を介する膜の浸潤によって試料パッドに加えることができる。処理した試料パッドは、(i) 風乾（室温に放置）、(ii) ベーキング（オープンもしくは加温デバイス使用し、高温下に置く）、(iii) 減圧、または(iv) 凍結乾燥によって乾燥させることができる。

【0220】

複合パッド

さまざまな実施形態において、複合パッドは、存在するとき、標的分析対象物（複数可）と結合する結合部分で修飾され、かつ脱水された比色指示薬を含み得る。ある特定の実施形態では、結合部分は、標的分析対象物（複数可）（例えば、細菌、真菌、ウイルス、タンパク質、DNAなど）に対して高親和性を有する特異的な結合部分である。試料溶液が複合パッドに到達すると、比色指示薬は再水和する。その後、比色指示薬に存在する結

合部分は、標的分析対象物（複数可）に結合することができ、得られる複合体は、反応パッドへと流れることができる。ある特定の実施形態では、比色指示薬は、金属粒子（金粒子、銀粒子など）、多量体粒子（ラテックスビーズなど）、及び可視色素または蛍光色素を封入するポリスチレン粒子を含み得る。複合パッドのための材料の例には、限定はされないが、セルロース、ニトロセルロース、ガラス繊維、綿、織紙、または不織紙などが含まれる。ある特定の実施形態では、比色指示薬は、上記のパッドに加え、脱水吸着させることができる。

【0221】

反応パッド

ある特定の実施形態では、反応パッドは、存在するとき、固定化された試薬を含み得、固定化された試薬は、試料溶液と反応すると、シグナル（例えば、視覚的シグナル）を生成することで標的分析対象物（複数可）の存在の有無またはその量を示し得る。反応パッドのための材料の例には、限定はされないが、セルロース、ニトロセルロース、ガラス繊維、綿、織紙、または不織紙などが含まれる。

10

【0222】

ラテラルフロー形式

ある特定の実施形態では、ラテラルフロー試験ストリップについては、反応パッドに加える試薬は、流れの方向に対して垂直のラインの形態で固定化されることで、すべての試料が固定化試薬と確実に相互作用し得ることになる。試薬の濃度は、シグナル強度を制御し、したがって、アッセイの感度を制御するために最適化することができる。例えば、半定量的アッセイを、さまざまな濃度で同一の試薬を複数のラインとして固定化することによって設計できる。したがって、それぞれのラインは、特定濃度の標的生体分子が到達したときにのみ、シグナルを生成することになる。その後、視認可能なラインの数を数えることによって標的生体分子の濃度を解釈することができる（例えば、図2を参照のこと）。

20

【0223】

さらに、同一のストリップに異なる試薬を複数のラインとして固定化することで、複数の標的分析対象物（複数可）を検出することができる。これによって、マルチプレックスアッセイを開発することが可能になる。

【0224】

フロースルー形式

ある特定の実施形態では、フロースルー試験については、試薬は、ラインの代わりに、反応パッド全体に固定化することができる。標的分析対象物は、存在するのであれば、複合パッドに存在する比色指示薬に結合し、指示薬-標的複合体が固定化試薬に結合するにつれて反応パッドに捕捉されることになる。したがって、標的生体分子が存在するのであれば、可視スポットが出現することになる。この試験は、ラテラルフロー試験ストリップで吸い上げるには試料体積が小さすぎる場合に使用することができる。可視スポットの色の強度は、標的生体分子の濃度と相関し、スポットのサイズは、試料体積と相関する。ある特定の実施形態では、フロースルー試験の真上に濃縮コンポーネントを配置することで、抽出し、濃縮した試料を検出コンポーネントに加えるという手間を省くことができる。

40

【0225】

さまざまな実施形態において、固定化された試薬は、標的分析対象物に対する特異的な抗体（一次抗体）、一次抗体に対する抗体（二次抗体）、抗原、タンパク質、または抗原-タンパク質複合体を含み得る。反応パッドのための材料の例には、限定はされないが、セルロース、ニトロセルロース、ガラス繊維、綿、織紙、及び不織紙などが含まれる。さまざまな実施形態において、試薬を上記のパッドに加え、脱水吸着させることができる。

【0226】

シンク

ある特定の実施形態では、シンクは、存在するとき、過剰な流体を回収し、試験性能に影響し得る逆流を防ぐ吸収パッドを含み得る。シンクのための材料の例には、限定はされ

50

ないが、セルロース、ニトロセルロース、ガラス繊維、綿、織紙、及び不織紙などが含まれる。

【0227】

シグナル増強

上記のように、さまざまな実施形態において、可視シグナル強度を増強することによって検出アッセイの感度及び/または精度を改善することができる。これは、最初の検出アッセイ（分析対象物の結合）の後に、追加の増進（シグナル増強）試薬を反応パッドに導入することによって実施できる。上に説明されるように、プローブ及びATPSは、プローブが検出ゾーンに最初に送達され（例えば、ATPSの先行相または界面に含まれて送達される）、その後、増進試薬が遅れて送達される（例えば、ATPSの遅行相に含まれて送達される）ように設計することができる。

10

【0228】

ある特定の実施形態では、シグナル増強試薬は、例えば、比色指示薬の表面に修飾された酵素と反応する基質を含めることで強力な可視生成物を形成することができる。例として、比色指示薬が金プローブを含むのであれば、シグナル増強は、銀による増強標識化によって達成することができ、この場合、金プローブが固定化ライン/スポットに結合する場所である反応パッドに銀イオン含有増強試薬を加えることができる。このシナリオでは、金プローブは核形成部位として働くことができ、その結果、当該粒子に銀が沈着することでシグナル強度を増加させることができる。こうした例では、シグナル増強試薬は、最初の検出アッセイの後に別に添加するか、またはペーパーデバイスに保持/脱水吸着させることで自動/手動で放出させることができる。

20

【0229】

例示的であるが非限定的な他の実施形態では、増進試薬は、プローブ（複数可）と結合またはそれに付加された対応する酵素と反応することで検出可能なシグナルを増強する酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビ（または他の）ペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなど）の基質であり得る。あるいは、増進試薬が酵素を含み得、基質はプローブ（複数可）に付加または結合される。

【0230】

前述のコンポーネント及びアッセイ形式は、例示的かつ非限定的である。本明細書で提供される教示内容及び例を使用することで、当業者であれば多数の他のアッセイデバイス及び構成が利用可能であろう。設計考慮事項及びコンポーネントのいくつかは以下にさらに記載される。

30

【0231】

ラテラルフローアッセイ（LFA）またはフロースルー（スポット）アッセイ

上に説明されるように、ある特定の実施形態では、本明細書に記載のデバイス及び系は、試料における標的分析対象物を検出するためのラテラルフローアッセイ（LFA）またはフロースルー（スポット）アッセイを提供するように構成され、LFAまたはスポットアッセイは、単独で使用されるか、または水性二相系（ATPS）と併せて使用される。いくつかの実施形態では、LFAまたはスポットアッセイは、ATPSまたはその構成成分が流れ込む多孔性マトリックスを含み、多孔性マトリックスは、ATPSまたはその構成成分が流体相に含まれるとき、ATPSまたはその構成成分が多孔性マトリックスを通過することが可能なように構成されると共に、それを可能にする十分な多孔度を有する。そのような多孔性のLFAまたはスポットアッセイデバイスは、本明細書でペーパーデバイスまたはペーパー流動性デバイスと称され、これらの用語は、互換的に使用される。

40

【0232】

本明細書で使用される「ペーパー」という用語は、木材のパルプまたは他の線維性植物物質に由来する薄いシートに限定されるものではないが、ある特定の実施形態では、本明細書に記載のデバイスにおいてそのようなペーパーを使用することが企図される。ペーパーは、より一般には、多孔性材料を指し、こうした多孔性材料は、シート形状であることが多いが、それに限定はされず、流体が通過可能なものである。

50

【0233】

いくつかの実施形態では、多孔性マトリックスは、A T P S の混合相溶液、第 1 の相溶液、及び/または第 2 の相溶液、及び/または標的分析対象物が L F A を通過可能なほど十分に多孔性である。いくつかの実施形態では、多孔性マトリックスは、混合相溶液、第 1 の相溶液、及び/または第 2 の相溶液、及び/または標的分析対象物が L F A またはスポットアッセイデバイスを垂直方向及び/または水平方向に通過するのに十分なほど十分な長さ及び/または深さを有する。いくつかの実施形態では、第 1 の相溶液は、第 1 の速度で多孔性マトリックスを通過し、第 2 の相溶液は、第 2 の速度で多孔性マトリックスを通過し、第 1 の速度と第 2 の速度とは異なる。L F A またはスポットアッセイの実施形態のいくつかでは、多孔性マトリックスは、数ある中でも特に、焼結ガラスセラミック、ミネラル、セルロース、ガラス繊維、ニトロセルロース、フッ化ポリビニリデン、ナイロン、電荷変更ナイロン、ポリエーテルスルホン、それらの組み合わせ、及び同様のものなどの材料を含む。

10

【0234】

流れながら濃縮

A T P S は、当該溶液が多孔性基質（例えば、ペーパー）を通過するにつれて相分離し得ることが発見され、このことを我々は「流れながら濃縮」と命名した。さらに、ペーパーを通過することによって濃縮プロセスが顕著に迅速化することも発見された。この現象に基づくと、本明細書に記載のラテラルフローアッセイデバイス及びフロースルーアッセイデバイスは、A T P S による濃縮を L F A またはフロースルーによる検出と組み合わせるために必要なコンポーネントを完全に統合するペーパー流動性コンポーネントを含み得る。混合された A T P S 溶液が、ある特定のペーパー材料に加えられると、当該溶液が流れるにつれて、相分離及び分析対象物の濃縮が生じることが発見された。我々は、A T P S にさまざまな体積比（例えば、上相の体積を下相の体積で割ったもの）を持たせたときでさえ、この現象が維持されることも実証した。

20

【0235】

いくつかの実施形態では、L F A またはスポットアッセイ（例えば、スポットアッセイの濃縮コンポーネント）は、ペーパーを含む。いくつかの実施形態では、ペーパーは、流体がそれを通過することが可能な多孔性材料のシートを含む。いくつかの実施形態では、ペーパーは、流体がそれらを通することが可能な多孔性材料の複数のシートを含む。いくつかの実施形態では、ペーパーは、セルロース、ガラス繊維、ニトロセルロース、フッ化ポリビニリデン、電荷変更ナイロン、ポリエーテルスルホン、及び同様のものなどの、1 つまたは複数の材料を含む。いくつかの実施形態では、ペーパーは、H I - F L O W P L U S（登録商標）膜である。

30

【0236】

いくつかの実施形態では、ペーパーは、織紙である。いくつかの実施形態では、ペーパーは、Whatman ペーパーである。いくつかの実施形態では、Whatman ペーパーは、Whatman S 17、Whatman M F 1、Whatman V F 1、Whatman Fusion 5、Whatman G F / D V A、Whatman L F 1、Whatman C F 1、及び/またはWhatman C F 4を含む。

40

【0237】

いくつかの実施形態では、標的分析対象物が、L F A を通過するか、またはフロースルーアッセイの濃縮コンポーネント（例えば、「流れながら濃縮」ベースのデバイス）を通過するにつれて、ペーパーにおいて標的分析対象物が濃縮される。いくつかの実施形態では、標的分析対象物が L F A を水平方向に通過するにつれて、ペーパーにおいて標的分析対象物が濃縮される。いくつかの実施形態では、標的分析対象物が L F A またはフロースルーアッセイを垂直方向に通過するにつれて、ペーパーにおいて標的分析対象物が濃縮される。

【0238】

いくつかの実施形態では、ペーパーは、どちらの相溶液が「先行流体」になるかという

50

ことに影響を与える特性を有する。非限定的な例として、PEG-塩ATPSが使用されるとき、ガラス繊維ペーパーに当該溶液を添加すると、塩相が先行溶液となる一方で、セルロースペーパーを使用すると、PEG相が先行溶液となる。いくつかの実施形態では、ペーパー内で相分離すると、相分離が促進される。追加の非限定的な例として、ミセルATPSは、典型的には、流れの無いATPSでは相分離に数時間を要するが、ペーパーストリップに加えられると、この相分離は数分で生じる。このことによって、従来はこのプロセスにおける律速段階であったATPSが、我々の迅速ペーパー診断アッセイのための選択肢として、より実行可能なものになり、これによって診断プロセスが迅速化する。いくつかの実施形態では、「その流れながら濃縮」デバイスは、PEG-塩ATPS（例えば、実施例に示されるもの）を含む。いくつかの実施形態では、「流れながら濃縮」デバイス

10

【0239】

ある特定の実施形態では、LFAまたはフロースルーアッセイデバイスは、デブリ（例えば、血液細胞または他の粒子）を除去するフィルター、標的分析対象物を含む試料がデバイスに加えられる場所である試料パッド、標的分析対象物が結合し、検出される場所である検出ゾーン（例えば、試験ライン及び対照ライン）、ならびにLFAまたはフロースルーデバイスに加えられる過剰な試料及び/または溶液を吸収することができる吸収パッド（例えば、乾燥した受入ペーパー）を含む（例えば、図1及び図11を参照のこと）。いくつかの実施形態では、対照ライン及び/または試験ラインは、本質的にはラインではなく、領域またはスポットである。

20

【0240】

いくつかの実施形態では、LFAは、LFAストリップを含む。「LFA」及び「LFAストリップ」という用語は、本明細書で互換的に使用される。いくつかの実施形態では、LFAストリップの長さは、その幅及び深さと比較して長い。いくつかの実施形態では、LFAは、矩形である。いくつかの実施形態では、LFAは、円形、卵形、方形、多角形、または不規則形の形状を有する。いくつかの実施形態では、LFAは、複数の経路及び/または接合部を含む。いくつかの実施形態では、LFAストリップは、試料パッド、検出ゾーン、及び吸収パッドを含む。いくつかの実施形態では、検出ゾーンは、試料パッドと吸収パッドとの間に位置し、吸収パッドは、標的分析対象物を含む試料を吸って試料パッドから引き出し、検出ゾーンに向かわせる。

30

【0241】

サンドイッチアッセイ

いくつかの実施形態では、LFAまたはフロースルー（スポット）アッセイデバイスは、サンドイッチアッセイが提供または実施されるように構成される（例えば、本明細書の図1、及び2015年3月6日に出版された同時係属中のPCT出願第PCT/US2015/019297号（当該文献は、そこに記載のLFA構成を対象として参照によって本明細書に組み込まれる）の図1の左下を参照のこと）。いくつかの実施形態では、サンドイッチアッセイは、標的分析対象物と結合する捕捉部分を含む。いくつかの実施形態では、デバイスは、プローブを含む。いくつかの実施形態では、プローブは、検出可能な特性（比色性、蛍光性、放射性など）を含む。いくつかの実施形態では、プローブは、標的分析対象物と相互作用する結合部分（例えば、抗体）を含む。いくつかの実施形態では、プローブは、試料に添加され、標的分析対象物と結合することでプローブ-分析対象物複合体を形成する。

40

【0242】

競合アッセイ

いくつかの実施形態では、LFAは、競合アッセイを含む。いくつかの実施形態では、プローブは、試料に添加され、標的分析対象物と結合することでプローブ-分析対象物複合体を形成する。いくつかの実施形態では、LFAは、試験ラインに固定化された標的分

50

析対象物を含む。いくつかの実施形態では、プローブは、試料における標的分析対象物によって飽和し、そのプローブは、試験ラインに固定化された標的分析対象物に結合しないことになる。いくつかの実施形態では、試験ラインに検出可能なシグナルが存在しないことによって結果が陽性であることが示される。いくつかの実施形態では、標的分析対象物が試料に存在せず、試験ラインに存在する標的分析対象物にプローブが結合することによって結果が陰性であることが示される。いくつかの実施形態では、LFAは、対照ラインにプローブ捕捉部分を含み、このプローブ捕捉部分は、プローブと直接的に相互作用するものであり、標的分析対象物が試料に存在するか否かを問わず、プローブは、プローブ捕捉部分に結合し、対照ラインに蓄積することができる。いくつかの実施形態では、プローブが対照ラインで捕捉固定化及び検出されることによって、試験が有効であることが示される。いくつかの実施形態では、結果が陽性であること（例えば、試料に標的分析対象物が存在すること）は、試験ライン及び対照ラインにおける検出可能なシグナルによって示される。いくつかの実施形態では、結果が陰性であることは、対照ラインにおける検出可能なシグナルによって示される。

10

20

30

40

50

【0243】

いくつかの実施形態では、プローブ-分析対象物複合体が試料パッドに加えられ、LFAまたはフロースルーデバイスを通り、吸収パッドに向かう。いくつかの実施形態では、プローブ-分析対象物複合体に含まれる標的分析対象物が捕捉部分に結合する。いくつかの実施形態では、捕捉部分は、試験ラインまたは試験領域（例えば、フロースルーデバイスにおける試験層）に固定化され、プローブ-分析対象物複合体は、試験ラインまたは試験領域に捕捉固定化される。いくつかの実施形態では、プローブは、比色性であり、プローブ-分析対象物複合体が試験ラインまたは試験領域に蓄積するにつれて、試験ラインまたは試験領域が強い色（例えば、検出可能なシグナル）を呈することになり、これによって結果が陽性であることが示される。いくつかの実施形態では、標的分析対象物が試料に存在せず、プローブ-分析対象物複合体に含まれるプローブは捕捉部分と相互作用せず、試験ラインが存在しないか、または試験領域にシグナルが存在しないことによって結果が陰性であることが示される。いくつかの実施形態では、LFAは、対照ライン（または例えば、フロースルーアッセイデバイスの対照領域）にプローブ捕捉部分を含み、このプローブ捕捉部分は、プローブ及び/または結合部分と直接的に相互作用するものであり、したがって、標的分析対象物が試料に存在するか否かを問わず、プローブ/結合部分は、プローブ捕捉部分に結合し、対照ラインまたは対照領域に蓄積する。いくつかの実施形態では、プローブ捕捉部分は、結合部分に結合する二次抗体であり、結合部分は、標的分析対象物に結合する一次抗体である。いくつかの実施形態では、プローブが対照ラインまたは対照領域で捕捉固定化及び検出されることによって、試験が有効であることが示される。いくつかの実施形態では、結果が陽性であること（例えば、試料に標的分析対象物が存在すること）は、試験ライン（または試験領域）及び対照ライン（または対照領域）における検出可能なシグナルによって示される。いくつかの実施形態では、結果が陰性であることは、対照ラインまたは対照領域における検出可能なシグナルによって示される。

【0244】

LFAまたはフロースルー（スポット）アッセイデバイス中の脱水ATPS

いくつかの実施形態では、ATPSもしくはその構成成分及び/またはプローブ及び/または増進試薬は脱水されて、LFAを構成する多孔性マトリックスの少なくとも第1の部分に加えられ、及び/または含められるか、あるいはフロースルーアッセイデバイスの濃縮コンポーネントに含められる。いくつかの実施形態では、デバイスに試料が加えられると、ATPS、及び/またはプローブ及び/または増進試薬（複数可）が水和し、それによってATPSもしくはその構成成分及び/またはプローブ及び/または増進試薬（複数可）が流体相に変換される。使用者に必要なことは、デバイスに試料（例えば、唾液、血液、尿、膿液、精液、痰、脳脊髄液、リンパ液、または同様の流体）を添加することのみになるため、脱水しておくことは、使用者にとってのデバイスの使い勝手を向上させることになり得る。いくつかの実施形態では、使用者に必要なことは、標的分析対象物の存

在 / 非存在を検出ために、または分析対象物を定量化するために、ストリップに試料の溶液を加えることのみである。いくつかの実施形態では、試料の溶液が L F A またはフロースルーデバイスを通し、A T P S が再溶解することで、L F A またはフロースルーデバイスの中で相分離が誘発され、その結果、標的分析対象物が濃縮される。

【 0 2 4 5 】

いくつかの実施形態では、所与の A T P S に必要な構成成分はすべて、混合されることで混合溶液を形成し、デバイス（例えば、L F A またはフロースルー（スポット）アッセイ）を構成するペーパーに加えられ、その後脱水される。試料溶液が脱水ペーパーに添加されると、試料が流れるにつれて A T P S 構成成分が再水和し、その結果、相分離が生じる。濃縮された分析対象物を含む相の粘性が低い A T P S のいくつかでは、その相は、より速く流れることになり、濃縮分析対象物は、先行流体に生じることになり、L F A またはフロースルーアッセイの検出ゾーンに到達することで検出が始まることになる。さらに、脱水された A T P S 構成成分のセグメント長（または厚さ）及び濃度は、異なる用途ごとに調整することができる。

【 0 2 4 6 】

いくつかの実施形態では、A T P S の構成成分は両方共（すべて）脱水されて、L F A に加えられるか、またはフロースルーアッセイ（例えば、分離コンポーネント）に含まれる。いくつかの実施形態では、第 1 の A T P S 構成成分が脱水されて、L F A に加えられるか（もしくは含まれるか）、またはフロースルーアッセイに含まれる。いくつかの実施形態では、第 2 の A T P S 構成成分が脱水されて、L F A またはフロースルーアッセイに加えられるか、または含まれる。いくつかの実施形態では、第 1 の相溶液構成成分及び / または第 1 の A T P S 構成成分が脱水されて、L F A の第 1 の部分に加えられるか、またはフロースルーアッセイの第 1 の層（分離コンポーネント）に含まれる。いくつかの実施形態では、第 2 の相溶液構成成分及び / または第 2 の A T P S 構成成分が、脱水されて、L F A の第 2 の部分に加えられるか上、またはフロースルーアッセイ（分離コンポーネント）の第 2 の層に含まれる内で脱水されて含まれる脱水される。いくつかの実施形態では、第 1 の部分と第 2 の部分とは同一である。いくつかの実施形態では、第 1 の部分と第 2 の部分とは異なる。非限定的な例として、P E G - 塩 A T P S では、P E G 溶液と塩溶液とを別々に脱水し、異なるペーパー部分もしくはセグメントに含めるか（例えば、2015年3月6日に出願された同時係属中の P C T 出願第 P C T / U S 2 0 1 5 / 0 1 9 2 9 7 号（当該文献は、そこに記載の L F A 構成を対象として参照によって本明細書に組み込まれる）の図 1 6 を参照のこと）、または例えば、フロースルーアッセイの分離コンポーネントを構成する別々の層に含めることができる（例えば、図 1 1 を参照のこと）。いくつかの実施形態では、第 1 の相溶液 / 第 2 の相溶液及び / または A T P S 構成成分が脱水されて、L F A の異なる部分に加えられるか、またはフロースルーアッセイの異なる層に含まれると、第 1 の相溶液 / 第 2 の相溶液の構成成分または A T P S 構成成分の濃度の均一性が向上する。いくつかの実施形態では、第 1 の相溶液 / 第 2 の相溶液の構成成分及び / または A T P S 構成成分を、脱水して異なる部分に加えることで、第 1 の相溶液または A T P S 構成成分が水和後に第 1 の方向に流れ、第 2 の相溶液及び / または A T P S 構成成分が水和後に第 2 の方向に流れるようになり、第 1 の方向と第 2 の方向とは、異なるものである。いくつかの実施形態では、標的分析対象物は、第 1 の方向に濃縮されるが、第 2 の方向には濃縮されない。いくつかの実施形態では、標的分析対象物は、第 2 の方向に濃縮されるが、第 1 の方向には濃縮されない。いくつかの実施形態では、第 1 の相 / 第 2 の相の構成成分及び / または A T P S 構成成分が脱水されて、異なる部分に加えられると、第 1 の方向 / 第 2 の方向に試料を流す必要がなくなり、第 1 の方向 / 第 2 の方向に標的分析対象物が流れるようになる。いくつかの実施形態では、第 1 の相 / 第 2 の相の構成成分及び / または A T P S 構成成分が脱水されて、異なる部分に加えられると、標的分析対象物がより速く流れるようになることで、検出が早まる。いくつかの実施形態では、第 1 の相 / 第 2 の相の構成成分及び / または A T P S 構成成分が脱水されて、異なる部分に加えられると、結果の信頼性が向上する。いくつかの実施形態では、第

10

20

30

40

50

1の相/第2の相の構成成分及び/またはA T P S構成成分が脱水されて、異なる部分に加えられると、第1の相溶液/第2の相溶液の構成成分及び/またはA T P S構成成分(例えば、P E G - 塩A T P S)の凝集が阻止される。いくつかの実施形態では、第1の相/第2の相の構成成分及び/またはA T P S構成成分は脱水されて、複数のセグメントに含められる。いくつかの実施形態では、第1の相/第2の相の構成成分及び/またはA T P S構成成分は脱水されて、複数のセグメントに含められ、第1の相/第2の相の構成成分及び/またはA T P S構成成分は、塩溶液を構成する。いくつかの実施形態では、第1の相/第2の相の構成成分及び/またはA T P S構成成分は脱水されて、複数のセグメントに含められ、第1の相/第2の相の構成成分及び/またはA T P S構成成分は、ポリマー(例えば、P E G)を含まない。いくつかの実施形態では、脱水されたP E Gは、検出ゾーン付近には位置せず、この理由は、P E G高含有相が検出膜内の流れを遅延させ得るためである。いくつかの実施形態では、L F Aストリップまたはフロースルーアッセイは、P E Gまたは塩を含まないブランクのスペーサーを検出ゾーン付近に含み得る。

10

【0247】

いくつかの実施形態では、プローブ(例えば、分析対象物結合部分であり、検出試薬/材料と結合される)は、プローブ緩衝液に含めて提供される。いくつかの実施形態では、プローブ緩衝液は脱水されて、L F Aに加えられるか、またはフロースルーアッセイに含められる。

【0248】

いくつかの実施形態では、A T P S構成成分が脱水されると、A T P S構成成分が液体形態で添加されるデバイスと比較して、検出限界が改善する。いくつかの実施形態では、液体形態のA T P S構成成分が添加されると、対象に由来する試料溶液が希釈される。いくつかの実施形態では、A T P S構成成分が脱水されると、流れの過程で、異なる第1の相溶液及び/または異なる第2の相溶液が生じるようになることで、試験ラインもしくは対照ラインまたはフロースルーアッセイの検出コンポーネントに到達することになる先行流体の前部に位置する小さな体積部に標的分析対象物またはプローブ-分析対象物複合体が濃縮される。いくつかの実施形態では、標的分析対象物及びまたはプローブ-分析対象物複合体が先行流体の前部に濃縮されると、検出に必要な時間が短縮されることになる。

20

【0249】

プローブ

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の系及び/またはデバイス、及び/または本明細書に記載の方法では、プローブが利用され、プローブは、標的分析対象物に結合することでプローブ-分析対象物複合体を形成する結合部分を含む。

30

【0250】

いくつかの実施形態では、標的分析対象物は、単独で第1の相溶液もしくは第2の相溶液、または第1の相溶液と第2の相溶液との界面に優先的に分配される。いくつかの実施形態では、標的分析対象物は、単独で第1の相溶液もしくは第2の相溶液、または第1の相溶液と第2の相溶液との界面に極度に分配される。

【0251】

いくつかの実施形態では、標的分析対象物は、単独で第1の相溶液もしくは第2の相溶液、または第1の相溶液と第2の相溶液との界面に優先的に分配されない。いくつかの実施形態では、標的分析対象物は、単独で第1の相溶液もしくは第2の相溶液、または第1の相溶液と第2の相溶液との界面に極度に分配されない。

40

【0252】

いくつかの実施形態では、プローブ-分析対象物複合体は、第1の相溶液もしくは第2の相溶液、または第1の相溶液と第2の相溶液との界面に優先的に分配され、それによって(プローブ-分析対象物複合体に含まれる)標的分析対象物が、第1の相溶液もしくは第2の相溶液、または第1の相溶液と第2の相溶液との界面に優先的に分配されるようになる。

【0253】

50

いくつかの実施形態では、プローブ - 分析対象物複合体は、第 1 の相溶液もしくは第 2 の相溶液、または第 1 の相溶液と第 2 の相溶液との界面に極度に分配され、それによって (プローブ - 分析対象物複合体に含まれる) 標的分析対象物が、第 1 の相溶液もしくは第 2 の相溶液、または第 1 の相溶液と第 2 の相溶液との界面に極度に分配されるようになる。

【 0 2 5 4 】

いくつかの実施形態では、「優先的に分配される」という語句は、A T P S の第 1 の相溶液 / 第 2 の相溶液への標的分析対象物 (またはプローブ - 分析対象物複合体) の分配に関して使用されるとき、A T P S の別の相溶液と比較して、優先する相溶液により多くの量の標的分析対象物が含まれるようになることを示す。

10

【 0 2 5 5 】

いくつかの実施形態では、「極度に分配される」という語句は、A T P S の第 1 の相溶液 / 第 2 の相溶液への標的分析対象物 (またはプローブ - 分析対象物複合体) の分配に関して使用されるとき、A T P S の別の相溶液と比較して、優先する相溶液に約 9 0 % 以上の標的分析対象物が含まれるようになることを示す。

【 0 2 5 6 】

いくつかの実施形態では、より多くの量の標的分析対象物が第 1 の相溶液に分配される。いくつかの実施形態では、約 5 0 % 超、または約 5 5 % 超、または約 6 0 % 超、または約 6 5 % 超、または約 7 0 % 超、または約 7 5 % 超、または約 8 0 % 超、または約 8 5 % 超、または約 9 0 % 超、または約 9 5 % 超、または約 9 8 % 超、または約 9 9 % 超の標的分析対象物が第 1 の相溶液に分配される。いくつかの実施形態では、約 9 9 % 超、または約 9 9 . 1 % 超、または約 9 9 . 2 % 超、または約 9 9 . 3 % 超、または約 9 9 . 4 % 超、または約 9 9 . 5 % 超、または約 9 9 . 6 % 超、または約 9 9 . 7 % 超、または約 9 9 . 8 % 超、または約 9 9 . 9 % 超の標的分析対象物が第 1 の相溶液に分配される。

20

【 0 2 5 7 】

いくつかの実施形態では、より多くの量の分析対象物が第 2 の相溶液に分配される。いくつかの実施形態では、約 5 0 % 超、または約 5 5 % 超、または約 6 0 % 超、または約 6 5 % 超、または約 7 0 % 超、または約 7 5 % 超、または約 8 0 % 超、または約 8 5 % 超、または約 9 0 % 超、または約 9 5 % 超、または約 9 8 % 超、または約 9 9 % 超の標的分析対象物が第 2 の相溶液に分配される。いくつかの実施形態では、約 9 9 % 超、または約 9 9 . 1 % 超、または約 9 9 . 2 % 超、または約 9 9 . 3 % 超、または約 9 9 . 4 % 超、または約 9 9 . 5 % 超、または約 9 9 . 6 % 超、または約 9 9 . 7 % 超、または約 9 9 . 8 % 超、または約 9 9 . 9 % 超の標的分析対象物が第 2 の相溶液に分配される。

30

【 0 2 5 8 】

いくつかの実施形態では、より多くの量の分析対象物が、第 1 の相溶液と第 2 の相溶液との界面に分配される。いくつかの実施形態では、約 5 0 % 超、または約 5 5 % 超、または約 6 0 % 超、または約 6 5 % 超、または約 7 0 % 超、または約 7 5 % 超、または約 8 0 % 超、または約 8 5 % 超、または約 9 0 % 超、または約 9 5 % 超、または約 9 8 % 超、または約 9 9 % 超の標的分析対象物が界面に分配される。いくつかの実施形態では、約 9 9 % 超、または約 9 9 . 1 % 超、または約 9 9 . 2 % 超、または約 9 9 . 3 % 超、または約 9 9 . 4 % 超、または約 9 9 . 5 % 超、または約 9 9 . 6 % 超、または約 9 9 . 7 % 超、または約 9 9 . 8 % 超、または約 9 9 . 9 % 超の標的分析対象物が界面に分配される。

40

【 0 2 5 9 】

いくつかの実施形態では、デバイスは、1 つのプローブ (単一の分析対象物を対象とするプローブ) を含むか、もしくは利用するように構成され、及び / またはデバイスで実施されるアッセイでは、1 つのプローブ (単一の分析対象物を対象とするプローブ) が利用される。いくつかの実施形態では、デバイスは、少なくとも 2 つの異なるプローブ (異なる分析対象物をそれぞれが対象とする)、もしくは少なくとも 3 つの異なるプローブ、もしくは少なくとも 4 つの異なるプローブ、もしくは少なくとも 5 つの異なるプローブ、もしくは少なくとも 7 つの異なるプローブ、もしくは少なくとも 1 0 の異なるプローブ、も

50

しくは少なくとも15の異なるプローブ、もしくは少なくとも20の異なるプローブを含むか、もしくは利用するように構成され、及び/またはデバイスで実施されるアッセイでは、少なくとも2つの異なるプローブ(異なる分析対象物をそれぞれが対象とする)、もしくは少なくとも3つの異なるプローブ、もしくは少なくとも4つの異なるプローブ、もしくは少なくとも5つの異なるプローブ、もしくは少なくとも7つの異なるプローブ、もしくは少なくとも10の異なるプローブ、もしくは少なくとも15の異なるプローブ、もしくは少なくとも20の異なるプローブが利用される。

【0260】

いくつかの実施形態では、プローブは、合成ポリマー、金属、ミネラル、ガラス、石英、セラミック、生体ポリマー、プラスチック、及び/またはそれらの組み合わせのうちの一つまたは複数を含む。いくつかの実施形態では、プローブは、ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン(DEL R I N(登録商標))、ポリテトラフルオロエチレン(T E F L O N(登録商標))、デキストラン、及びポリ塩化ビニルを含むポリマーを含む。いくつかの実施形態では、ポリエチレンは、ポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態では、ポリプロピレンは、ポリプロピレングリコールである。いくつかの実施形態では、プローブは、コラーゲン、セルロース、及び/またはキッチンのうちの一つまたは複数を含む生体ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、プローブは、金属(例えば、金、銀、白金、パラジウム、セリウム、チタン、ステンレススチール、アルミニウム、またはそれらの合金のうちの一つまたは複数を含むもの)を含む。いくつかの実施形態では、プローブは、ナノ粒子(例えば、金ナノ粒子、銀ナノ粒子など)を含む。

10

20

【0261】

いくつかの実施形態では、プローブは、コーティングをさらに含む。いくつかの実施形態では、コーティングは、ポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールを含む。いくつかの実施形態では、コーティングは、ポリプロピレンを含む。いくつかの実施形態では、コーティングは、ポリプロピレングリコールを含む。いくつかの実施形態では、コーティングは、デキストランを含む。いくつかの実施形態では、コーティングは、親水性タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、コーティングは、血清アルブミンを含む。いくつかの実施形態では、コーティングは、第1の相溶液または第2の相溶液に対する親和性を有する。

【0262】

いくつかの実施形態では、試料に含まれる標的分析対象物の量は非常に少なく、その結果、L F Aまたはフロースルーアッセイによる検出が可能ないように分析対象物を十分に濃縮する必要がある。ある特定の実施形態では、十分な濃縮は、界面で達成されるものであり、この理由は、分析対象物の濃縮度は、その分析対象物が分配または濃縮される相の体積に依存し、界面の「体積」は、バルク相と比較して非常に小さいためである。

30

【0263】

いくつかの実施形態では、プローブは、標的分析対象物が界面に向かって誘導されるように、界面に優先的に(または極度に)分配される。いくつかの実施形態では、プローブは、その界面化学に起因して界面に優先的に(または極度に)分配され、界面化学は、プローブが界面に誘導されるように最適化される。非限定的な例として、ポリエチレングリコール-リン酸カリウム(P E G / 塩)系などのポリマー-塩A T P S系の界面にプローブ-分析対象物複合体を誘導するために、プローブは、P E Gに複合化(すなわちP E G化される)されることでP E G高含有相とのP E G間相互作用を促進し、及び/または親水性タンパク質で修飾されることでP E G低含有相との親水性相互作用を促進する。特異的な抗体、または標的に結合する他の分子で修飾されたそのような最適化プローブを使用すると、標的分析対象物が捕捉され、界面に収集される。界面の体積は非常に小さいため、分析対象物は高度に濃縮され、その後のL F A、またはフロースルーアッセイの検出領域に加えられる。

40

【0264】

いくつかの実施形態では、P E G / 塩A T P Sの界面に分配されることができ金ナノ

50

プローブ (GNP) が調製され、操作条件は、相分離時間が短縮され、GNP / 分析対象物が非常に高度に回収されるように最適化される。

【0265】

いくつかの実施形態では、プローブ - 分析対象物複合体は、ATPSにおける固体と液体との界面に分配される。いくつかの実施形態では、固体は、ATPSを含むチャンバーの壁である。いくつかの実施形態では、固体は、アッセイデバイスのコレクターである。いくつかの実施形態では、固体は、固体ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、固体ポリマーは、ポリエチレン、セルロース、キチン、ナイロン、ポリオキシメチレン (DELFIN (登録商標))、ポリテトラフルオロエチレン (TEFLON (登録商標))、ポリ塩化ビニル、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、固体ポリマーは、ポリプロピレンを含む。いくつかの実施形態では、プローブ - 分析対象物複合体は、固体に付着し、高度に濃縮されるものであり、この理由は、プローブ - 分析対象物複合体が固体と液体との界面に位置する小さな体積部に存在し、バルク相の体積によって希釈されないためである。いくつかの実施形態では、バルク相は、濃縮された分析対象物を乱すことなく除去され、これは、洗浄によって収集された後、LFAまたはフロースルーアッセイデバイスに加えられる。いくつかの実施形態では、この手法によって分析対象物が十分に濃縮され、外力 (例えば、磁石) を使用することなく収集することが可能になる。あるいは、プローブは、磁性材料を含み、この手法では、磁石が併用される。いくつかの実施形態では、こうしたプローブは、分析対象物を極度に濃縮するために、界面に濃縮されるように改変される。上述のように、この手法では、磁石が使用されることで、ATPSによって非特異的に濃縮される他の混入物から標的分析対象物をさらに分離することが可能になる。いくつかの実施形態では、ATPSによる濃縮によって、磁性プローブがより効率的に働くことを可能になり、この理由は、磁性プローブが特定の位置 (界面) に位置する非常に小さな体積部に最初に濃縮されることになるためである。したがって、濃縮された分析対象物の収集に必要な磁石は小型化し、またはそれに必要な磁場は弱まることになる。いくつかの実施形態では、ATPSによる界面濃縮を磁性プローブと組み合わせると、現在の最新式のものと比較して、より効率的、迅速、かつ安価なデバイスを開発することが可能になる。

【0266】

結合部分

いくつかの実施形態では、結合部分は、標的分析対象物 (例えば、細菌、真菌、ウイルス、レクチン、糖、タンパク質、DNA など) と結合する分子である。いくつかの実施形態では、結合部分は、標的分析対象物と特異的に結合する分子である。いくつかの実施形態では、「特異的に結合する」は、分子が、標的分析対象物に優先的に結合するか、または他の分子と比較して高い親和性で標的分析対象物に結合することを示す。非限定的な例として、抗体は、抗原を標的として産生し、その抗原に選択的に結合することになる。また、非限定的な例として、DNA分子は、実質的に相補的な配列に結合することになり、厳密条件下では、無関係の配列には結合しない。いくつかの実施形態では、「特異的な結合」は、分子 (例えば、タンパク質及び他の生物製剤) の異種性集団に標的分析対象物が存在することを決定付ける結合反応を指し得る。いくつかの実施形態では、結合部分は、その特定の標的分析対象物に結合し、試料に存在する他の分子に顕著な量で結合しない。

【0267】

いくつかの実施形態では、結合部分は、抗体、レクチン、タンパク質、糖タンパク質、核酸、単量体の核酸、多量体の核酸、アプタマー、アプタザイム、小分子、ポリマー、レクチン、糖質、多糖、糖、脂質、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、結合部分は、標的分析対象物との結合対を形成することができる分子である。

【0268】

いくつかの実施形態では、結合部分は、抗体または抗体断片である。抗体断片には、限定はされないが、前述の Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、F

v'、Fd、Fd'、scFv、hsFv断片、ラクダ抗体、二重特異性抗体、及び他の断片が含まれる。

【0269】

ある特定の実施形態では、結合部分は、アプタマーを含む。いくつかの実施形態では、アプタマーは、核酸から形成される抗体類似体を含む。いくつかの実施形態では、アプタマーは、いくつかのアッセイ（ナノ-CHEM-FETなど）では、検出すべき標識の結合が必要なく、立体配置の再配置が直接的に検出されることになる。いくつかの実施形態では、結合部分は、アプタザイムを含む。いくつかの実施形態では、アプタザイムは、核酸から形成される酵素類似体を含む。いくつかの実施形態では、アプタザイムは、第2の特定の分析対象物が存在するときのみ、立体配置を変えて特定の分子を捕捉するように機能する。

10

【0270】

いくつかの実施形態では、プローブは、検出可能な標識を含む。検出可能な標識は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、または化学的な手段によって検出可能な任意の組成を有する。有用な標識の例には、限定はされないが、蛍光ナノ粒子（例えば、量子ドット（Qdot））、金属ナノ粒子（限定はされないが、金ナノ粒子、銀ナノ粒子、白金ナノ粒子を含む）、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質、及び同様のもの（例えば、Molecular Probes, Eugene, Oregon, USAを参照のこと））、放射標識（例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、³²P、⁹⁹Tc、²⁰³Pb、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁷²As、¹¹¹In、^{113m}In、⁹⁷Ru、⁶²Cu、⁶⁴LCu、⁵²Fe、^{52m}Mn、⁵¹Cr、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁷⁷As、⁹⁰Y、⁶⁷Cu、¹⁶⁹Er、¹²¹Sn、¹²⁷Te、¹⁴²Pr、¹⁴³Pr、¹⁹⁸Au、¹⁹⁹Au、¹⁶¹Tb、¹⁰⁹Pd、¹⁶⁵Dy、¹⁴⁹Pm、¹⁵¹Pm、¹⁵³Sm、¹⁵⁷Gd、¹⁵⁹Gd、¹⁶⁶Ho、¹⁷²Tm、¹⁶⁹Yb、¹⁷⁵Yb、¹⁷⁷Lu、¹⁰⁵Rh、¹¹¹Ag、及び同様のもの）、酵素（例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、及びELISAで一般に使用される他のもの）、さまざまな比色標識、磁性または常磁性の標識（例えば、磁性及び/または常磁性ナノ粒子）、スピン標識、放射線不透過性標識、ならびに同様のものが含まれる。

20

【0271】

あるいは、またはさらに、プローブは、検出可能な標識を含む別の粒子に結合することができる。いくつかの実施形態では、プローブは、検出ゾーン（例えば、試験ライン、対照ライン、試験領域、対照領域）で検出可能なシグナルを生成する。いくつかの実施形態では、検出可能な標識/特性は、比色標識/特性、蛍光標識/特性、酵素標識/特性、発色標識/特性、及び/または放射標識/特性のうちの1つまたは複数を含む。いくつかの実施形態では、プローブは、金ナノ粒子であり、検出可能な特性は、色である。いくつかの実施形態では、色は、オレンジ色、赤色、または紫色である。

30

【0272】

等温増幅。

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の方法及び/またはデバイスは、熱サイクリングを伴わずに標的核酸を増幅する（例えば、等温増幅）。等温核酸増幅方法は、二本鎖DNAに適用され得る。しかしながら、標的核酸分子を二本鎖DNA標的に限定する必要はない。例えば、本明細書に記載の等温増幅方法において使用するための二本鎖DNAは、ウイルスRNA、またはmRNA、または他の一本鎖RNA標的源から逆転写酵素によって調製され得る。別の例では、本明細書に記載の非サイクリング増幅方法において使用するための二本鎖DNAは、一本鎖DNA標的からDNAポリメラーゼによって調製され得る。さまざまな実施形態において、そのような方法は、以下に議論される等温増幅方法を適用する前に、最初の段階として適用され得る。

40

【0273】

等温増幅方法は、当業者によく知られている。そのような方法には、限定はされないが

50

、自己持続性シーケンス反応(3SR)、核酸ベースの転写アッセイ(NASBA)、転写増幅(TMA)、鎖置換増幅(SDA)、ヘリカーゼ依存性増幅(HDA)、ループ介在等温増幅(LAMP)、ステムループ増幅、シグナル介在RNA増幅技術(SMART)、等温多置換増幅(IMDA)、単一プライマー等温増幅(SPIA)、ならびに環状ヘリカーゼ依存性増幅(cHDA)(例えば、Notomi et al.(2000) Nucl. Acids Res. 28:e63、米国特許第6,743,605号、Gill and Ghaemi(2008) Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids, 27:224-243、及び同様のものを参照のこと)、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅(RPA)(例えば、Rohrman and Richards-Kortum(2012) Lab Chip, 12:3082-3088、Wang et al.(2017) PLoS ONE 12(1):e0166903、及び同様のものを参照のこと)が含まれる。

10

【0274】

等温核酸増幅のための構成成分(例えば、酵素)及びキットは、商業的に利用可能である。キットの例には、限定はされないが、ISOAMP(登録商標)III Universal HDAキット(BIOHELIX(登録商標)から提供される)、ループ介在等温増幅(LAMP)、及びTWISTAMP(登録商標)リコンビナーゼポリメラーゼ増幅(RPA)(TwistDxから提供される)が含まれる。

【0275】

試料採取

さまざまな実施形態において、本明細書に記載のデバイス及び方法を使用してアッセイされる試料は、生体試料、環境試料、食品試料などを含む。生体試料の例には、限定はされないが、生体液(血液または血液分画物、リンパ液、脳脊髄液、精液、尿、口腔液、膣液、及び同様のものなど)、組織試料、ブランク試料、子宮頸管内スワブ試料、細胞試料、組織または臓器の生検物または吸引物、組織学的検体、ならびに同様のものが含まれる。

20

【0276】

生体試料が組織を含む場合、ある特定の実施形態では、その組織は、溶解、ホモジナイズ、及び/または破砕され、任意選択で試料溶液に懸濁され得る。生体試料が生体液を含む場合、当該液は、直接的にアッセイされるか、またはアッセイの前に試料溶液に懸濁され得る。ある特定の実施形態では、試料溶液は、生体試料もしくはその構成成分を保存もしくは安定化するために働き得、及び/または生体試料もしくはその構成成分を抽出もしくは濃縮するために働き得る。ある特定の実施形態では、試料溶液は、保存剤を任意選択で含む緩衝剤、及び/または酵素(プロテアーゼ、ヌクレアーゼなど)、及び/または界面活性剤、及び/またはATPS構成成分を含み得る。

30

【0277】

ある特定の実施形態では、特定のポイント・オブ・ケアの実施形態では、試料は、直ちに、または適度な時間間隔を置いた後、アッセイデバイスに加えられ得る。ある特定の実施形態では、試料は、アッセイが実施される離れた試験施設に届けられ得る。

【0278】

生体試料を採取するための方法及びデバイスは、当業者によく知られており、例えば、以下に示されるものである。

40

【0279】

口腔液の採取

口腔液は、空のバイアルによだれを垂らすことによって採取した後、アッセイの濃縮コンポーネントに当該液を移すことができる。

【0280】

口腔液は、スワブ及び/または採取パッドを使用しても採取することができる。例えば、スワブまたは採取パッドを使用者の口に置くことで口腔液を吸い上げることができる。スワブまたは採取パッドは、口腔液の産生を刺激するための化合物(ペパーミント抽出物

50

または酸味抽出物など)を含み得る。スワブまたは採取パッドは、下流の濃縮段階及び検出段階に影響し得る食品デブリ、混入物、または粘液を除去するためのフィルターとしても働くことができる。ある特定の実施形態では、スワブまたは採取パッドにおける口腔液は、濃縮のための水性二相コンポーネント(A T P S)構成成分で抽出及び混合することができる。採取デバイスからの口腔液の抽出は、例えば、スワブ/パッドに物理的圧力をかけて当該液を押し出すか、または毛細管作用で当該液を濃縮コンポーネントに導入することによって達成できる。別の構成は、スワブまたは採取パッドの下流にA T P S構成成分が脱水されて存在するものであり、その結果、使用者による追加行為は必要なくなる。

【0281】

ブランクの採取

ブランクは、歯の表面、歯茎、または歯間に対してブラシ、スワブ、またはピックを適用することによって採取できる。ある特定の実施形態では、その後、採取したブランクは、緩衝液またはその後の濃縮のためにA T P S溶液に混合して含めることができる。

【0282】

尿の採取

さまざまな実施形態において、尿は、採取カップを用いて取得することができる。その後、採取した尿は、その後の濃縮のためのA T P S溶液に混合して含めるか、またはA T P S構成成分が脱水されて濃縮コンポーネントに含められているのであれば、デバイスに直接的に加えることができる。カテーテルが挿入された対象では、カテーテルまたはカテーテル受入バッグから尿を取得することができる。

【0283】

膣/子宮頸管内スワブ

膣表面もしくは子宮頸部表面上及び/または膣液内の標的分析対象物は、商業的に利用可能なスワブによって採取することができる。採取したスワブは、標的を遊離させるために緩衝液に含めるか、または標的生体分子を直接的に濃縮するためにA T P S溶液に含めることができる。

【0284】

血液の採取

血液は、ピン(ランセット)穿刺、及び毛細管に採取するもの、シリンジによるもの、ならびに同様のものによって採取することができる。

【0285】

分析対象物の例

本明細書に記載のアッセイデバイス及び方法を使用すると、基本的にどのような分析対象物でも検出及び/または定量化することができるが、ある特定の実施形態では、分析対象物は、臨床的に意義を有する分析対象物(例えば、細菌、真菌、原生動物、アメーバ、ウイルス、及び同様のもの)である。

【0286】

臨床的に意義を有する標的は、当業者によく知られている。

【0287】

膣液における臨床的に重要な細菌

膣液または組織試料、パップスメアにおいて*Trichomonas vaginalis*、細菌性膣疾患、及びアクチノマイセス感染症が発見されることは、他の診断試験を実施せずとも、治療を要するという指標であると考えられ得る。選択患者では無症候性感染症を治療することで合併症を予防することができる。カンジダは、膣における共生細菌であり得、それ故に、無症候性患者の治療は必要ないこともあり得る。IUD使用者において*trichomonas vaginalis*及びカンジダによる感染症が検出される割合がより高いことは、IUDが膣感染症及び関連合併症のリスクを増加させ得ることを示している。

【0288】

淋病は、*Neisseria gonorrhoeae*という生物によって引き起こされ

10

20

30

40

50

る細菌性感染症であり、これは、臨床的に重要な病原体である。同様に、クラミジアは、*Chlamydia trachomatis*によって引き起こされ、梅毒は、*Treponema pallidum*によって引き起こされるものであり、これらは重要な性感染疾患であり、その診断は迅速であることが望ましい。

【0289】

尿における臨床的に重要な細菌

*Escherichia coli*及び*Proteus*属の1種は細菌病原体であり、この病原体が尿に見られると、典型的には、尿路感染症であることを意味する。

【0290】

口腔における臨床的に重要な細菌

グラム陰性口腔内嫌気性生物は、歯周病と関連する頻度が高く、種によっては、他と比較して高い頻度で関連する。そのような嫌気性生物には、限定はされないが、*Prevotella*属の種（例えば、*Pr. intermedia*、*Pr. nigrescens*、*Pr. melaninogenica*、*Pr. veroralis*、及び同様のもの）、ならびに*Porphyromonas*属の種（例えば、*Porph. gingivalis*）が含まれる。

10

【0291】

さらに、*Streptococcus mutans*は、う蝕の形成に関係するとされている。本開示の追加の臨床的に重要な細菌には、限定はされないが、*Actinomyces viscosus*、*Lactobacillus casei*、*Staphylococcus aureus*、*Candida albicans*、*Lactobacillus acidophilus*、*Capnocytophaga gingivalis*、*Fusobacterium nucleatum*、または*Bacteroides forsythus*が含まれる。

20

【0292】

こうした病原体は、例示的かつ非限定的であることを認識されよう。本明細書に記載のアッセイデバイス及び方法は、多数の他の分析対象物（限定はされないが、食品の毒素及び/または病原体、環境の毒素及び/または病原体、ならびに同様のものを含む）の検出及び/または定量化に使用できることを当業者であれば認識されよう。したがって、例えば、本明細書に記載の方法及びデバイスは、野菜もしくは他の食品への*E. coli*の混入の検出、及び/または任意の他の食品病原体（限定はされないが、表2に示されるものを含む）の検出に使用することができる。

30

【0293】

【表 2】

表 2. 本明細書に記載の方法及びデバイスを使用して検出することができる、例示的であるが非限定的な食品病原体.

病原体	源
<i>Campylobacter jejuni</i>	生乳、未処理水、生及び加熱不足の肉、家禽、または甲殻類
<i>Clostridium botulinum</i>	家庭で缶詰にした食品及び家庭で調製した食品、真空パック食品及びしっかりと包装された食品、肉製品、海産物、ならびに調理用ハーブ油
<i>Clostridium perfringens</i>	肉及び肉製品
<i>Escherichia coli</i> (E. coli)	肉（加熱不足または生のひき肉）、未調理の農産物、生乳、低温殺菌されていないジュース、汚染水、汚染された果実及び野菜
<i>Listeria monocytogenes</i>	冷蔵されたインスタント食品（肉、家禽、海産物、ならびに酪農場の低温殺菌されていない乳及び乳製品、または低温殺菌されていない乳で製造された食品）
ノロウイルス（ノーウオーク様ウイルス）	生ガキ、甲殻類、コールスロー、サラダ、焼いた食品、フロスティング、汚染水、及び氷。このウイルスは、ヒトからヒトを介しても拡散し得る。
<i>Salmonella enteritidis</i>	生及び加熱不足の卵、生肉、家禽、海産物、生乳、乳製品、農産物、及び木の実（例えば、アーモンド）
<i>Salmonella typhimurium</i>	生肉、家禽、海産物、生乳、乳製品、及び農産物
赤痢菌（ <i>Shigella</i> ）	サラダ、乳及び乳製品、生ガキ、ウシのひき肉、家禽、及び汚れた水
<i>Staphylococcus aureus</i>	乳製品、サラダ、クリーム入りの洋菓子、及び他のデザート、タンパク質高含有食品（調理済のハム、生肉及び家禽）、ならびにヒト（皮膚、感染した切傷、面皰、鼻、及び咽頭）
<i>Vibrio cholerae</i>	生及び加熱不足の海産物、または他の汚染された食品及び水。
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	生または加熱不足の魚及び甲殻類
<i>Vibrio vulnificus</i>	生魚及び甲殻類、特に、生ガキ
<i>Yersinia enterocolitica</i>	生肉及び海産物、乳製品、農産物、ならびに未処理水

10

20

30

40

【0294】

下記の実施例は、例示のために提供されており、請求される発明を限定するものではない。

【実施例】

【0295】

50

実施例 1

DNA 増幅の結果

材料及び方法

tHDA のみの反応及びワンポットプラットフォームの調製

Escherichia coli (E. coli) O157:H7 を検出するために、tHDA のみの反応とワンポット系との両方を設計した。製造者のプロトコルに従い、緩衝剤、塩、ヌクレオチド塩基、遺伝子特異的プライマー、及びヘリカーゼとポリメラーゼとの酵素混合物を含む tHDA のみの従来反応を 50 μ L の反応液として調製した。全 E. coli 細胞もこの反応液に直接的に添加した。この懸濁液を 65 で 1 時間加熱した後、試料を抽出し、ゲル電気泳動を介して解析した。ワンポットプラットフォームについては、単一のチューブにおいて Triton X-100 界面活性剤を tHDA 反応の構成成分と混合した。全 E. coli 細胞も添加し、この懸濁液を混合することで混合ミセル水性二相系 (ATPS) を形成させた。この懸濁液を 65 で 1 時間加熱し、これによって相分離と DNA 増幅との両方を生じさせた。その後、ミセル低含有相である上相を抽出し、ゲル電気泳動を介して解析することで増幅が良好に生じたことを確認した。

10

【0296】

ワンポット系における DNA の分配係数の決定

ATPS の両方の相における DNA の濃度を比較するために、定量的 DNA 分配試験を実施した。この試験については、ワンポット系に関係する DNA を模倣するモデルとして、E. coli O157:H7 に由来するゲノム DNA、100 bp の DNA 断片、及び 25 bp の DNA 断片を選択した。混合ミセル ATPS は、Triton X-100 界面活性剤、tHDA 反応に関係する塩、及び二本鎖 DNA を混合することによって調製した。混合 ATPS は、3 つの DNA 型のそれぞれについて個別に調整した。これらの懸濁液を 65 で 1 時間加熱することで相分離を誘導した。相が分離したところで、ミセル含量の低い上相とミセル含量の高い下相との両方を抽出し、Quant-iT dsDNA 蛍光結合色素を添加した。その後、プレートリーダーで蛍光強度を測定した。濃度が既知の DNA で作成した標準曲線を使用し、上相及び下相の DNA 濃度を推定した。

20

【0297】

結果及び考察

ワンポットプラットフォームにおける DNA の分配

DNA 分配試験を実施することで、我々は、ワンポット系におけるそれぞれの DNA 型の分配係数を決定した。分配係数は、上相の DNA 濃度を下相の DNA 濃度で割ることによって計算した。試験した 3 つの DNA 型の中で、より大きなゲノム DNA 及び 100 bp の DNA 断片が同様の分配係数を有しており、これらの分配係数が 1 を超えることが明らかとなった (図 11)。このことは、ミセル低含有相である上相に DNA が優先的に分配され、それによってその相に DNA が濃縮されたことを示すものであった。一方、より小さな 25 bp の DNA 断片は、より小さな分配係数を有しており、その値は 1 に近く、このことは、2 つの相に 25 bp の DNA 断片がより均等に分配されたことを示している。

30

【0298】

ワンポットプラットフォームにおける E. coli の増幅及び検出の改善

tHDA 反応は、ミセル ATPS に適合することが明らかとなり、その結果、ワンポットプラットフォームの実証に成功した。ゲル電気泳動の実証に基づいて増幅が良好であることが決定され、このことは、増幅 DNA 領域の予測サイズに相当する 100 bp のバンドが存在することによって示された。ワンポット系を使用すると増幅及び検出が改善することを実証するために、tHDA のみの従来反応での増幅を、ワンポットプラットフォームにおいて実施した増幅と比較した。図 12 に可視化されるように、tHDA のみの従来反応では、 10^6 cfu/mL を含む細胞試料からは DNA が良好に増幅されたが、細胞濃度が低くなると増幅は達成されなかった。代わりに、ワンポットプラットフォームでは、 10^5 cfu/mL を含む細胞試料から DNA が良好に増幅され、これによって、検出

40

50

限界が10倍改善することが実証された。

【0299】

実施例2

酵素的なシグナル増強の結果

材料及び方法

アッセイ構成成分の調製

水性二相系 (ATPS) を、0.1 M のトリス緩衝液 (pH 9) においてポリ (エチレングリコール-ran-プロピレングリコール) 及び硫酸ナトリウム塩から調製した。アルカリホスファターゼ (ALP) と、*Chlamydia trachomatis* (CT) に特異的な抗体と、を金ナノ粒子に複合化することで、アルカリホスファターゼ-金ナノプローブ (ALP-GNP) を創出した。ニトロセルロース膜に対して、試験ラインとして抗CT抗体をプリントし、対照ラインとしてプロテインAをプリントすることによって、サンドイッチアッセイ形式のLFA試験ストリップを構築した。3 x 10 mm のガラス繊維パッドにALP-GNPを脱水吸着させることで複合パッドを創出し、これを膜の直ぐ上流に配置した。ニトロセルロース膜の下流に綿繊維吸収パッドを配置した。従来
のLFAでは、3 x 10 mm のガラス繊維の単一試料パッドを複合パッドの上流に配置した。増強LFAでは、ガラス繊維パッドの4つの (7 x 15 mm) 層からなる3-Dペーパー芯を複合パッドの上流に配置した。

10

【0300】

ATPS自動化シグナル増強の実証

シグナル増強アッセイを実施するために、CT (全体濃度が3.2 ng / μ Lとなるようにした)、及びALP基質であるニトロブルーテトラゾリウム / 5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルホスフェート (NBT / BCIP) を添加したATPSに、3-Dペーパー芯を備えたLFA試験ストリップを浸漬した。10分、30分、及び50分の時点で写真を撮った。

20

【0301】

ATPS及びシグナル増強を使用した、CTの検出改善

従来
のLFAを実施するために、さまざまな濃度の不活化CTを含むPBS溶液に試験ストリップを浸漬した。シグナル増強アッセイを実施するために、さまざまな濃度の不活化CT、及びALP基質であるニトロブルーテトラゾリウム / 5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルホスフェート (NBT / BCIP) を添加したATPSに、3-Dペーパー芯を備えたLFA試験ストリップを浸漬した。30分の時点で写真を撮った。

30

【0302】

結果及び考察

自動化シグナル増強の実証

3-Dペーパー芯を備えたLFA試験ストリップを、CT及びNBT / BCIP基質を含むATPSに浸漬すると、ATPSは、それが試験ストリップを通過するにつれて分離し、その2つの巨視的な相となった。最初に、濃縮されたCT細菌を含む塩高含有相が先行し、ALP-GNPを可溶化すると共に、試験ライン及び対照ラインにALP-GNPが結合し得る場所であるLFA試験ゾーンにALP-GNPを送達し、このことは、10分後に2つのラインが出現することによって可視化された。その後、ポリマー高含有相が遅行し、NBT / BCIP基質を送達することでシグナル増強反応が始まり、その結果、30分及び50分の時点で、試験ラインと対照ラインとの両方が黒くなった (図14)。NBT / BCIP基質は、ポリマー高含有相に好都合に分配されたため、シグナル増強の早発が回避された。

40

【0303】

自動化シグナル増強を使用した、LFAによるCT検出の改善

バックグラウンドの増進を最小化しながらLFAでのシグナル増強反応を自動化するというATPSの能力を実証した後、我々は、このアッセイの検出限界が従来
のLFAを上回って改善したかどうかを決定したいと考えた。最初に、我々は、バイオマーカーの予備

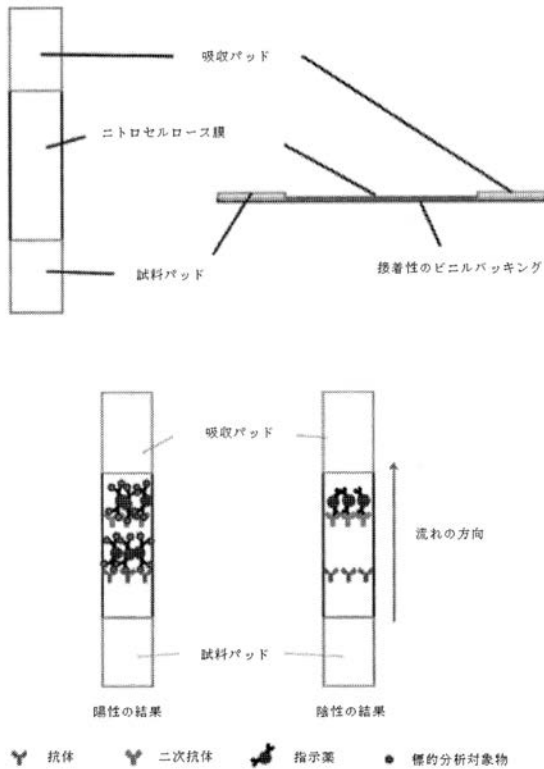
50

濃縮段階及びシグナル増強段階を行うことなく、PBSにおいて希釈した不活化CTを試験することによって従来のLFAの検出限界を同定した。サンドイッチアッセイ形式では2つのラインが存在することによって試験が陽性であることが示されるため、我々の従来のLFAでは10 ng / μLのCTを良好に検出することが可能であった。従来のLFAの検出限界を改善するために、次に我々は、バイオマーカーの予備濃縮段階及びシグナル増強段階をATPSによって自動化してLFAと組み合わせた。CTのさまざまな希釈物で試験をすると、増強LFAでは、0.32 ng / μLのCTを検出することが可能であり、これによって、従来のLFAを上回って30倍の改善が生じたことが実証された(図15)。こうして検出限界が30倍改善したことは、バイオマーカーの予備濃縮とシグナル増強との両方に起因して複合的な改善が生じた結果である。バイオマーカーの予備濃縮とシグナル増強の構成成分との両方をさらに最適化することで、30倍を超える改善が可能である。

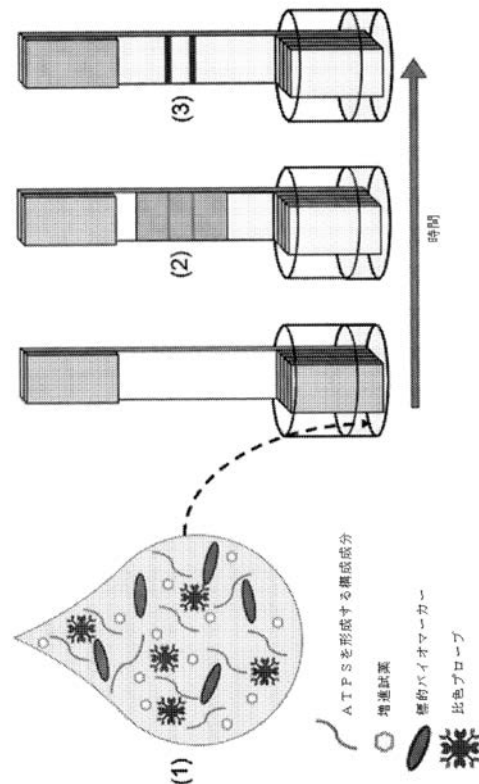
【0304】

本明細書に記載の実施例及び実施形態は、例示のみを目的としており、それらの観点から当業者であればさまざまな改変または変更を思いつくであろうし、こうした改変または変更は、本出願の趣旨及び範囲ならびに添付の特許請求の範囲に含まれることになると理解される。本明細書に引用される刊行物、特許、及び特許出願はすべて、すべての目的のために参照によってそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【図1】



【図2】



【 図 3 】

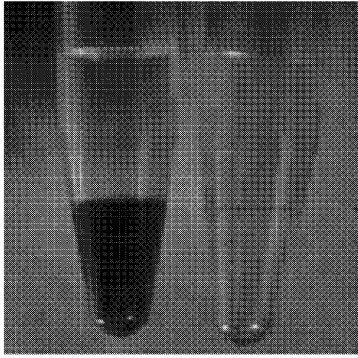
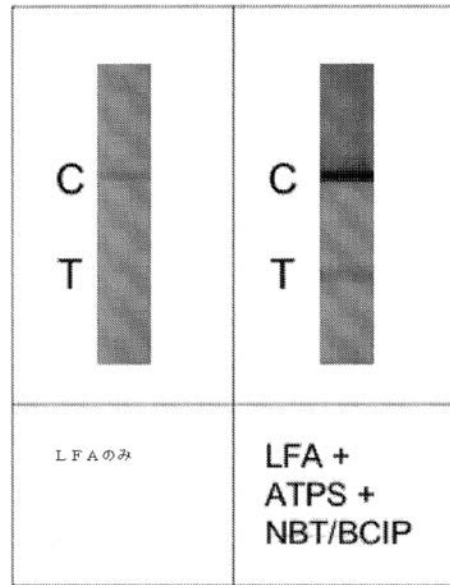
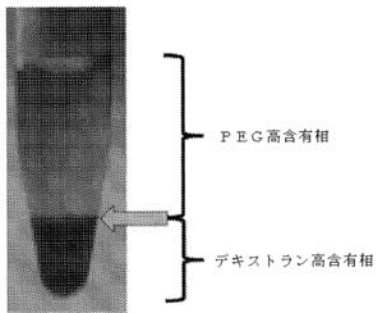


Fig. 3

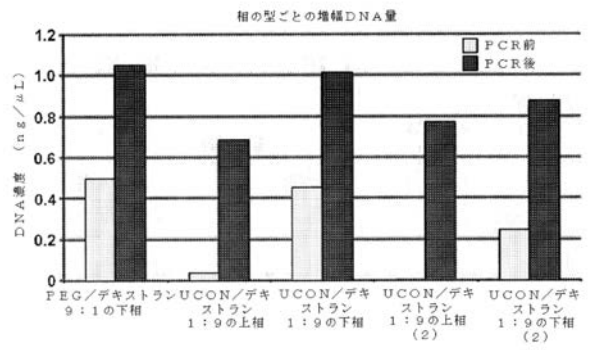
【 図 4 】



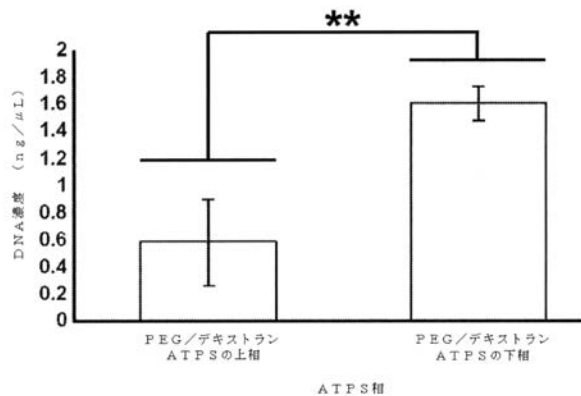
【 図 5 】



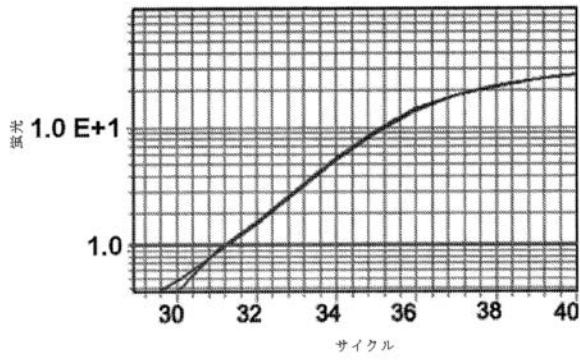
【 図 7 】



【 図 6 】

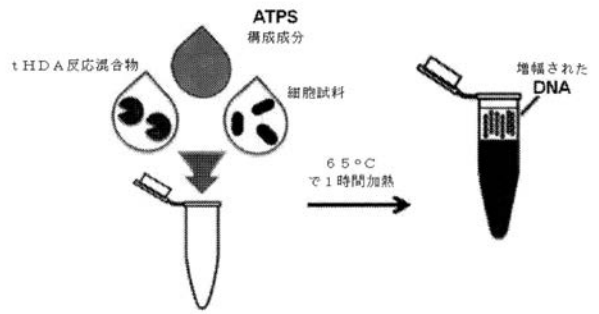


【 図 8 】



干渉試験	平均 サイクル数
水におけるDNA	32
PEG/デキストラン 下相	31

【 図 9 】



【 図 10 】

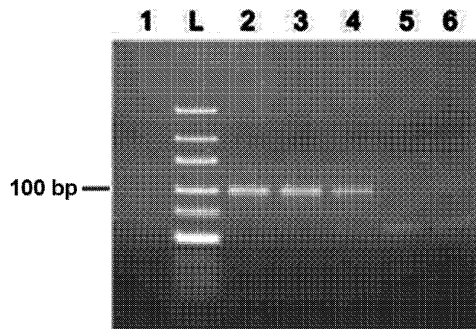
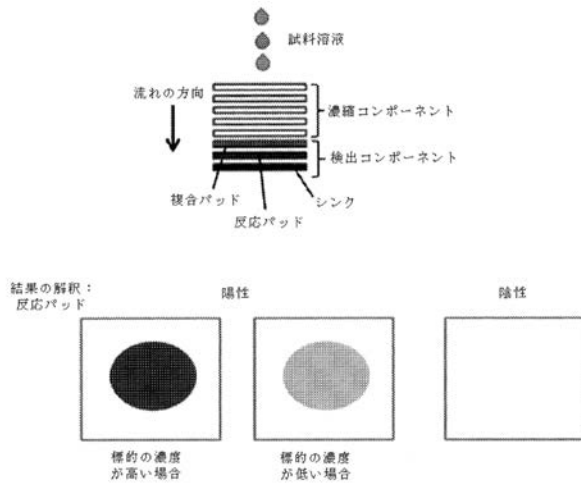
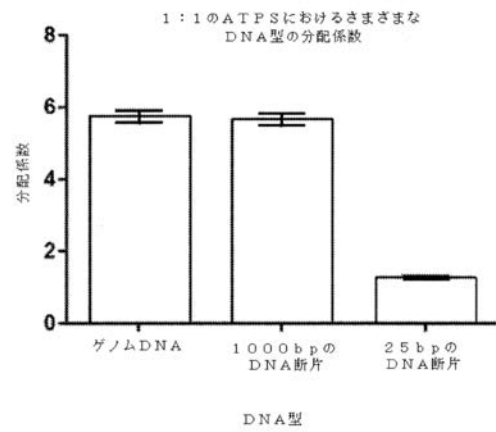


Fig. 10

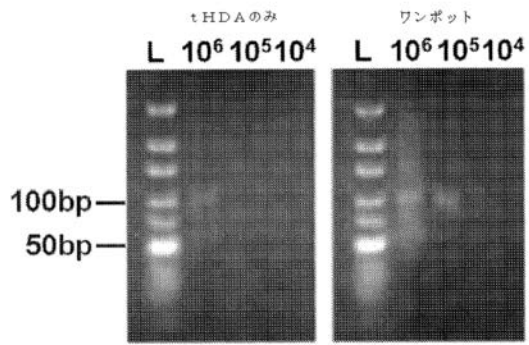
【 図 11 】



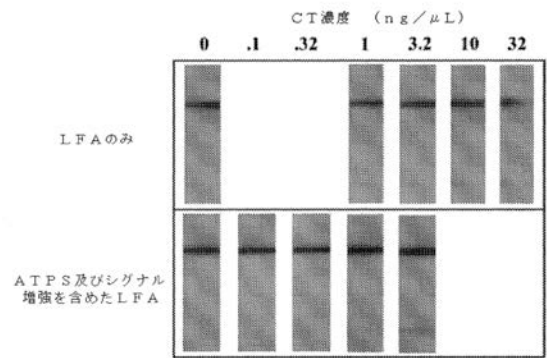
【 図 12 】



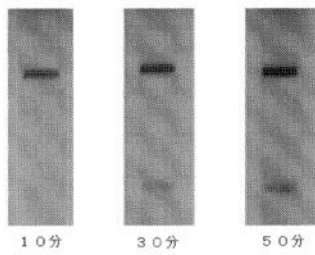
【 図 1 3 】



【 図 1 5 】



【 図 1 4 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/036418**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.: See below.
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:
Claims 8, 10, 13, 21-25, 27-28, 30-34, 36, 38-39, 42-46, 49, 51, 74, 77, 83-85, 87-88, 90-93, 95, 97-98, 101-105, 108, 111-115, 123-125, 127-128, 134, 141-142 and 150 refer to one of claims which are not drafted in accordance with PCT Rule 6.4(a).
3. Claims Nos.: See the extra page.
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 fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
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

International application No.
PCT/US2017/036418

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
G01N 33/558(2006.01)i, G01N 33/543(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)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) G01N 33/558, G01N 1/40; G01N 33/538; G01N 33/53; G01N 33/50; G01N 33/543; C12Q 1/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: aqueous two phase system, lateral flow assay, integration, leading fluid, lagging fluid, probe, enzyme, signal enhance		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015-134938 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 11 September 2015 See paragraphs [0011], [0077], [0102]-[0109], [0137], [0146], [0149], [0173], [0560]; figures 1, 52, 77-79; and table 1.	1-6, 53-57, 59, 116-121, 143-148
A		58, 60, 66-71
X	CHIU, R. Y. T. et al., 'An aqueous two-phase system for the concentration and extraction of proteins from the interface for detection using the lateral-flow immunoassay' PLoS One, 2015, DOI: 10.1371/journal.pone.0142654, Internal pages 1-14 See abstract; pages 3-7; and figures 3-4.	1-6, 53-57, 59, 116-121, 143-148
X	CHIU, R. Y. T. et al., 'Biomarker concentration and detection directly on paper' 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2014, pages 1572-1574 See abstract; and pages 1573-1574.	1-6, 53-57, 59, 116-121, 143-148
X	WO 2011-159537 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 22 December 2011 See pages 24-30; claims 1-25; and figures 1-5.	1-6, 53-57, 59, 116-121, 143-148
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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 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		"I" 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 September 2017 (18.09.2017)		Date of mailing of the international search report 20 September 2017 (20.09.2017)
Name and mailing address of the ISA/KR International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer LEE GYONG CHEOL Telephone No. +82-42-481-8611

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/036418

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 9207236 B2 (CARY, R. B.) 08 December 2015 See the whole document.	1-6, 53-60, 66-71 .116-121, 143-148

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US2017/036418

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015-134938 A1	11/09/2015	AU 2015-226930 A1 CN 106662582 A EP 3114482 A1 JP 2017-513015 A KR 10-2016-0141749 A US 2015-0253320 A1	20/10/2016 10/05/2017 11/01/2017 25/05/2017 09/12/2016 10/09/2015
WO 2011-159537 A2	22/12/2011	WO 2011-159537 A3	31/05/2012
US 9207236 B2	08/12/2015	CN 102084238 A CN 102084238 B EP 2279403 A1 EP 2279403 B1 EP 3067694 A1 JP 2011-522521 A JP 2015-108637 A JP 6026570 B2 US 2011-0117540 A1 US 2016-0083716 A1 WO 2009-137059 A1	01/06/2011 01/06/2016 02/02/2011 16/03/2016 14/09/2016 04/08/2011 11/06/2015 16/11/2016 19/05/2011 24/03/2016 12/11/2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/036418

Continuous of Box No. II

3. Claims Nos.: 7, 9, 11-12, 14-20, 26, 29, 35, 37, 40-41, 47-48, 50, 52, 61-65, 72-73, 75-76, 78-82, 86, 89, 94, 96, 99-100, 106-107, 109-110, 122, 126, 129-133, 135-140, 149, 151-154

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	G 0 1 N 33/569	
C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/02	
	C 1 2 Q 1/68	
	C 1 2 Q 1/6844	Z
	C 1 2 Q 1/686	

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T R I T O N

2 . T W E E N

(72) 発明者 ダニエル・タカシ・カメイ
アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 1 7 5 5・モンテレー・パーク・ルピン・プレイス・2 6 2

(72) 発明者 ベンジャミン・ミン・ウ
アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 1 1 0 8・サン・マリノ・ロレイン・ロード・2 7 4 0

(72) 発明者 ダニエル・ウィリアム・ブラッドバリー
アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 0 0 2 4・ロサンゼルス・ウェイバーン・プレイス・9 2 5
・#シー09

(72) 発明者 シン・ティン・シェリーン・フリーダ・チュン
アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 0 0 2 4・ロサンゼルス・ベテラン・アヴェニュー・4 4 0

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB02 FA09 FA12
4B063 QA01 QQ06 QQ42 QQ52 QS16 QS25 QS36 QS39

专利名称(译)	用于纸基免疫分析的生物标记物富集和信号放大，以及用于DNA提取，富集和扩增的单一平台		
公开(公告)号	JP2019525136A	公开(公告)日	2019-09-05
申请号	JP2018564267	申请日	2017-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
发明人	ダニエル・タカシ・カメイ ベンジャミン・ミン・ウ ダニエル・ウィリアム・ブラッドバリー シン・ティン・シェリール・フリーダ・チュン		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/569 C12M1/00 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6844 C12Q1/686		
CPC分类号	C12Q1/6813 C12Q1/6844 G01N33/5432 G01N33/558 C12Q2563/159 C12Q2565/625 C12Q2521/513 C12Q2531/119 C12Q2531/143 C12Q2531/113 C12Q2565/631 G01N33/5308 G01N33/543 G01N33 /54306 G01N33/54386		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/543.515.M G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/53.S G01N33/569 C12M1 /00.A C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6844.Z C12Q1/686		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB02 4B029/FA09 4B029/FA12 4B063/QA01 4B063/QQ06 4B063/QQ42 4B063 /QQ52 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QS39		
代理人(译)	村山彦 安倍晋三龙彦		
优先权	62/348038 2016-06-09 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在各种实施例中，提供了用于检测和/或定量分析物的方法和设备。在一个特定的实施方案中，水两相系统 (ATPS) 包括分离成第一相溶液和第二相的混合相溶液，其中第一相溶液是使用中的前一相。第二相溶液变为滞后相，ATPS，侧向流动测定法 (LFA)，探针和/或增强剂，其中探针用于ATPS的前一阶段。提供了一种装置，其在ATPS的滞后相中包含与第一相溶液结合的探针和/或增强剂和/或与第二相溶液结合的增强剂。在某些实施方案中，例如，ATPS和等温扩增试剂用于提供“一锅”系统以纯化和扩增核酸。

