

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6309950号
(P6309950)

(45) 発行日 平成30年4月11日(2018.4.11)

(24) 登録日 平成30年3月23日(2018.3.23)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006.01)
GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 4 1 A
GO 1 N 33/543 5 2 5 W
GO 1 N 33/543 5 2 5 E
GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/53 B

請求項の数 14 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-522194 (P2015-522194)
(86) (22) 出願日 平成25年7月3日(2013.7.3)
(65) 公表番号 特表2015-522823 (P2015-522823A)
(43) 公表日 平成27年8月6日(2015.8.6)
(86) 国際出願番号 PCT/IB2013/055442
(87) 国際公開番号 W02014/013372
(87) 国際公開日 平成26年1月23日(2014.1.23)
審査請求日 平成28年6月27日(2016.6.27)
(31) 優先権主張番号 61/672,835
(32) 優先日 平成24年7月18日(2012.7.18)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 590000248
コーニンクレッカ フィリップス エヌ
ヴェ
KONINKLIJKE PHILIPS
N. V.
オランダ国 5656 アーエー アイン
ドーフエン ハイテック キャンパス 5
High Tech Campus 5,
NL-5656 AE Eindhoven
(74) 代理人 100122769
弁理士 笛田 秀仙

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的成分を持つ試料流体の処理

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

磁性粒子を持つ試料流体中の標的成分の検出のためのカートリッジであって、
前記試料流体が中に備えられることができ、反応面を持つ、反応チャンバと、
前記反応面上に位置し、物理的障壁によって少なくとも部分的に境される、少なくとも一つの検査領域と、

前記反応チャンバへの前記試料流体の導入中に、前記磁性粒子を関連する検査領域において閉じ込める磁場を生成するための磁場発生器と、

前記検査領域内の標的成分の検出のための、光学的、磁氣的、機械的、音響的、熱的、若しくは電気的センサユニットと
を有し、

前記物理的障壁が1 μm乃至100 μmの高さと2 μm乃至500 μmの幅を持ち、かつ前記磁性粒子の側方運動を妨げない、
カートリッジ。

【請求項2】

標的成分を持つ試料流体の処理のためのカートリッジであって、
前記試料流体が中に備えられることができ、反応面を持つ、反応チャンバと、
前記反応面上に位置し、物理的障壁によって少なくとも部分的に境され、前記試料流体の標的成分と特異的に結合する試薬を有する、少なくとも一つの検査領域とを有し、

前記物理的障壁が1 μm乃至100 μmの高さと2 μm乃至500 μmの幅を持ち、か

つ前記磁性粒子の側方運動を妨げない、
カートリッジ。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載のカートリッジを製造するための方法であって、
反応面を持つ反応チャンバと、物理的障壁によって少なくとも部分的に境される少なくとも一つの検査領域を設けるステップと、
前記検査領域内に試薬を堆積させるステップとを有し、
前記物理的障壁が $1 \mu\text{m}$ 乃至 $100 \mu\text{m}$ の高さで $2 \mu\text{m}$ 乃至 $500 \mu\text{m}$ の幅を持ち、かつ前記磁性粒子の側方運動を妨げない、
方法。

10

【請求項 4】

試料流体中の標的成分の検出のための方法であって、
請求項 1 又は 2 に記載のカートリッジの前記反応チャンバに前記試料流体を導入するステップと、
前記検査領域内の試薬に結合した標的成分を検出するステップとを有する、方法。

【請求項 5】

前記検出が光学的、磁氣的、機械的、音響的、熱的、若しくは電気的手順によってなされる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記物理的障壁が突起及び / 又は陥凹若しくは隆起の壁を有する、請求項 1 又は 2 に記載のカートリッジ。

20

【請求項 7】

前記反応面が前記検査領域の外側で親水性であり、前記検査領域の内側で疎水性である、請求項 1 又は 2 に記載のカートリッジ。

【請求項 8】

前記検査領域が異なる試薬を有する少なくとも二つの個別のサブ領域に分割される、請求項 1 又は 2 に記載のカートリッジ。

【請求項 9】

前記試薬が、トロポニン I、ミオグロビン、B 型ナトリウム利尿ペプチド、及び / 又は 2, 3 C 反応性タンパク質を含む、核酸、タンパク質、抗原、リガンド、脂質、薬剤、ビタミン、ホルモン、ハプテン、炭水化物、細胞フラグメント、及び関連化合物、の少なくとも一つに特異的に結合する、請求項 1 又は 2 に記載のカートリッジ。

30

【請求項 10】

前記磁性粒子が前記試料流体に添加される、請求項 1 又は 2 に記載のカートリッジ。

【請求項 11】

前記磁性粒子が磁場によって所定領域において閉じ込められる、請求項 10 に記載のカートリッジ。

【請求項 12】

前記磁性粒子が前記カートリッジ内で、
前記検査領域において及び / 又はその中に、並びに / 或いは
前記反応面とは別の表面上に
堆積する、請求項 10 に記載のカートリッジ。

40

【請求項 13】

前記反応チャンバが、
異なる標的成分に特異的な試薬、及び / 又は、
異なるタイプの磁性粒子
を持つ、少なくとも二つの検査領域を有する、請求項 1 又は 2 に記載のカートリッジ。

【請求項 14】

分子診断、生物試料分析、化学試料分析、食品分析、及び / 又は法医学的分析のための

50

、請求項 1、2 及び 6 乃至 13 のいずれか一項に記載のカートリッジの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は標的成分を持つ試料流体の処理のためのカートリッジと方法に関する。さらに、これはかかるカートリッジを製造するため及びかかるカートリッジを使用するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

WO98/12539 A1は、特定の結合ドメインが親水性若しくは疎水性にされ、一方周囲面は反対の特性（疎水性若しくは親水性）を持ち得る、マルチアレイの多特異的電気化学発光検査システムを開示する。しかしながらこうした結合ドメインは小規模で十分な正確さで製造することが困難である。

10

【0003】

さらに、WO2009/125356 A1は検出面からの突起がアッセイ中に磁気ビーズの側方運動を制限する検出装置を開示する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

表面上のキャプチャプローブのような試薬を用いて試料流体の正確で費用効果的な処理を可能にする手段を提供することが本発明の目的である。

20

【課題を解決するための手段】

【0005】

この目的は請求項 1 及び 2 に記載のカートリッジ、請求項 3 及び 4 に記載の方法、並びに請求項 15 に記載の使用法によって達成される。好適な実施形態は従属請求項に開示される。

【0006】

一態様によれば、本発明は標的成分を有する流体の処理のためのカートリッジに関し、当該流体は参考のために（その由来若しくは目的に関して偏見なく）以下"試料流体"とよばれる。"標的成分"とは例えば生体分子、複合体、細胞分画若しくは細胞のような生物学的物質であり得る。"処理"とはあらゆる種類の例えば流体若しくはその一部の物理的若しくは化学的処置、特に標的成分の定性的若しくは定量的検出を有し得る。カートリッジは以下の構成要素を有する：

30

a) 中に試料流体が備えられることができ、表面を持つチャンバ。参考のために、チャンバは以下"反応チャンバ"、表面は"反応面"とよばれる。反応面は一般に反応チャンバの完全な表面であり得るが、これは典型的にはその一部のみである（例えば一つの平面壁によって構成される面）。

b) 前述の反応面上（若しくは中）に位置する少なくとも一つの領域であって、物理的障壁によって少なくとも部分的に境され、試薬、例えば流体の標的成分に特異的に結合し得るキャプチャプローブを有する、少なくとも一つの領域。参考のために、この領域は以下"検査領域"とよばれる。

40

【0007】

物理的障壁は通常、反応面に垂直な方向に広がる何らかの一枚壁を有する。これは典型的には反応面を画定する隣接体の材料によって形成される。物理的障壁の特性（例えばその高さ）は通常、抗体溶液若しくは磁気ビーズ溶液のような試薬の閉じ込めが、これらが反応面上に堆積する間（すなわちカートリッジ製造中）のみ達成され、後のアッセイ中には達成されないようになっている。特に、アッセイ中の磁性粒子のような試薬の側方運動は物理的障壁によって実質的に妨げられないものとする。

【0008】

上述のキャプチャプローブは例えば関連抗原に特異的に結合する抗体のようなキャプチ

50

ヤ分子を有し得る。キャプチャプローブによって覆われる領域は"結合領域"を構成し、これは検査領域全体若しくはその一部のみに広がり得る。

【0009】

本発明はさらに上記の類のカートリッジを製造するための方法に関し、方法は以下のステップを有する：

a) 反応面を持つ反応チャンバと、物理的障壁によって少なくとも部分的に境される少なくとも一つの検査領域を設けるステップ。

b) 前述の検査領域に試薬（例えばキャプチャプローブ）を堆積させるステップ。試薬は好適にはこの堆積ステップ中に液体として（若しくは液体中で）適用され、後に乾燥させられる。

10

【0010】

検出が試料流体でなされ得る"処理"の特に重要な例であることは既に述べた。従って、本発明は試料流体における標的成分の検出のための方法にも関し、方法は以下のステップを有する：

a) 上記の類のカートリッジ（反応チャンバ内の反応面と、物理的障壁によって部分的に若しくは完全に境され、一つ以上の結合領域を有する少なくとも一つの検査領域とを持つ）の反応チャンバへ試料流体を導入するステップ。

b) カートリッジの検査領域内のキャプチャプローブに結合する標的成分を検出するステップ。

【0011】

上記カートリッジ、カートリッジを製造するための方法、及び標的成分の検出のための方法は、同じ一般概念、すなわち物理的障壁で境することによる反応面上の検査領域の定義に関する。従って本発明の一実施形態について提供される説明と定義は、他の実施形態にも当てはまる。

20

【0012】

本発明のアプローチは、検査領域が物理的障壁、例えば反応面上の突起によって画定されるので、検査領域内のキャプチャプローブのような試薬の極めて限局した位置決めを可能にするという利点を持つ。これは、キャプチャプローブが通常は反応面の特定部分に広がる傾向がある液体として適用され、特定部分のサイズは多かれ少なかれ制御された形で表面の親水性の程度に依存するので、特に有利である。物理的障壁は複数の検査領域をより近づけて分布させ、反応面全体をより有効活用することも可能にする。さらに、多くの（光学的）応用にとって物理的障壁が見られることは好都合である。光学的検出手順において、物理的障壁は例えばキャプチャプローブがどこに位置するかを非常に明確に示すことができる。

30

【0013】

以下、上記カートリッジと方法に関する本発明の様々な好適な実施形態が記載される。

【0014】

試料流体中の標的成分の検出のための方法において、検出は随意に光学的、磁氣的、機械的、音響的、熱的、及び/又は電気的手順によってなされ得る。コイル、ホールセンサ、平面ホールセンサ、フラックスゲートセンサ、SQUID（超電導量子干渉素子）、磁気共鳴センサ、磁歪センサ、又はWO2005/010543 A1若しくはWO2005/010542 A2に記載の類の磁気抵抗センサ、特にGMR（巨大磁気抵抗）、TMR（トンネル磁気抵抗）、若しくはAMR（異方性磁気抵抗）を有する磁気センサが例えば設けられ得る。光学センサは特に検出面における標的粒子に起因する漏れ全反射（FTIR）から生じる出力光ビームにおける変動を検出するように構成され得る。このアプローチはWO2008/155716 A1、WO2009/016533 A2、若しくはWO2008/072156 A2により詳細に記載される。

40

【0015】

検査領域を少なくとも部分的に境する物理的障壁は特に、内部領域、すなわち検査領域を完全に若しくは部分的に境する（典型的には線形の）経路に沿って走る、反応面の高さ

50

よりも高くするリム若しくは堤防を構成する突起を有し得る。

【0016】

別の実施形態において、物理的障壁は陥凹若しくは隆起の壁を有し得る。検査領域はこの場合、それぞれ陥凹の底又は頂上若しくは隆起に少なくとも部分的に位置する。

【0017】

本発明の好適な実施形態において、反応面は検査領域の外側で親水性である。これは（水性）試料流体の処理中に反応面を湿らせるのに役立つので有利なことが多い。検査領域の内側で、反応面（検査領域に堆積したキャプチャプローブ若しくは他の物質の下）は親水性若しくは疎水性であり得る。前者の場合（親水性）は一つの結合領域に対してキャプチャプローブのような、一つのタイプの材料の検査領域への堆積中に有利であり得る。後者の場合（疎水性）は検査領域内のキャプチャプローブのような複数物質の堆積中に有利であり得る。

10

【0018】

反応面は随意に、透明材料の表面、例えばガラス若しくは透明プラスチック体の表面に位置し得る。好適には、反応チャンバを有する全体がこの材料から作られ得る。透明材料はこの材料中を伝播する光による試料流体の光学的処理を可能にする。反応面は透明材料の表面と同一であり得るか、又は中間（薄）層、例えば親水化層によってこれから分離され得る。

【0019】

検査領域を境する物理的障壁の寸法は典型的には検査領域の中若しくは上に堆積する試薬（例えばキャプチャプローブ及び/又は磁性粒子などの標識）を含む液体の層の厚さと、周辺からのこの層の必要な分離に依存して選ばれる。好適には、物理的障壁は以下の高さ（反応面より高い）を持つ：

20

約1 μm より高い及び/又は約100 μm より低い

約2 μm より高い及び/又は約80 μm より低い

並びに/或いは約5 μm より高い及び/又は約20 μm より低い。

【0020】

最も好適には高さは約10 μm に及ぶ。

【0021】

付加的に若しくは代替的に、物理的障壁は以下の幅（反応面と平行に測定される）を持ち得る：

30

約2 μm より大きい及び/又は約500 μm より小さい

約5 μm より大きい及び/又は約400 μm より小さい

並びに/或いは約10 μm より大きい及び/又は約300 μm より小さい。

【0022】

典型的な値は線形突起の場合約20 μm に及び、二次元隆起の場合若しくは二次元陥凹の場合約200 μm に及ぶ。

【0023】

本発明の多くの実施形態において、物理的障壁は反応面上のただ一つの、連結した一様な領域を境する若しくは取り囲み得る。本発明の他の実施形態において、検査領域は二つ以上のサブ領域に分割され得る。これらサブ領域の各々は異なる試薬を備え、例えば一つ以上のサブ領域がキャプチャプローブを備え（"結合領域"を構成する）、一つ以上のサブ領域が磁性粒子を備え得る。（サブ）領域に堆積し得る他の試薬は、アッセイ干渉をブロックする界面活性剤及び製剤など、意図したアッセイをサポートするものであり得る。所望の添加剤は反応チャンバで行われるアッセイに依存し、アッセイ開発の分野の当業者に周知である。

40

【0024】

上述の検査領域の分割は随意に一つ若しくは複数の物理的障壁によって具体化され得る。しかしながら、サブ領域は物理的障壁によって個別に境される必要はない。単一の物理的障壁が例えば複数の抗体スポット若しくは同様のものが中に堆積する一つの大きな領域

50

を取り囲んでもよく、物理的障壁は別の堆積試薬（例えば粒子溶液）を大きな領域に閉じ込めるのに役立つ。

【0025】

別の好適な実施形態において、一つ以上の検査（サブ）領域は一つの分析物（標的成分）に特異的なキャプチャプローブを備え、一方一つ以上の他の検査（サブ）領域は別の分析物に特異的なキャプチャプローブを含む。さらなる検査領域の追加を通じて、さらに多くの分析物に特異性を持つキャプチャ分子を含むさらに多くの異なる結合領域が収容され得る。

【0026】

以下の好適な実施形態において、複数の検査領域は同じ分析物に特異的なキャプチャプローブを備え、キャプチャプローブは同じ若しくは異なる濃度のいずれかで堆積する。

【0027】

さらに別の好適な実施形態において、キャプチャプローブと標識、例えば磁性粒子は、同じ検査領域に連続的に堆積し得るか、若しくはさらに同じ流体に提供されるとき同時に堆積し得る。

【0028】

反応チャンバは好適には二つ以上の検査領域を有し、これら検査領域の各々は試料流体の別の標的成分に特異的なキャプチャプローブを有する。従って、異なる標的成分は異なる検査領域において処理（例えば検出）される。これは複数標的成分の並列処理、従って一試料流体を持つ同じ反応チャンバでの多重アッセイの実行を可能にする。

【0029】

本発明にかかるカートリッジは好適には以下の成分の少なくとも一つに対する特異的なキャプチャプローブを有し得る：核酸及び関連化合物（例えばDNA、RNA、オリゴヌクレオチド若しくはそのアナログ、オリゴマー化核酸、ポリマー化核酸、PCR産物、ゲノムDNA、バクテリア人工染色体、プラスミド及び同様のもの）、タンパク質及び関連化合物（例えばポリペプチド、ペプチド、糖タンパク質、モノクローナル若しくはポリクローナル抗体、可溶性若しくは結合受容体、転写因子、免疫グロブリン、ホルモン、サイトカイン及び同様のもの）、抗原、リガンド、脂質、薬剤、ビタミン、ホルモン、ハプテン、炭水化物及び関連化合物（例えば多糖、オリゴ糖及び同様のもの）などの小分子、膜フラグメント、細胞内小器官、無傷細胞、バクテリア、ウイルス、原生動物及び同様のものなどの細胞フラグメント。最も好適には、これらキャプチャプローブの二つ以上は、対応する標的物質の並列処理（検出）を可能にするために同じカートリッジの異なる検査領域に存在する。血液試料からの心疾患の検出に特に有用な実施形態において、キャプチャプローブは以下のマーカの少なくとも一つに特異的に結合し得る：トロポニンI、ミオグロビン、B型ナトリウム利尿ペプチド、及び2, 3 C反応性タンパク質。

【0030】

本発明の好適な実施形態において、磁性粒子が試料流体に添加される（反応チャンバへの導入の前、最中、及び/又は後）。“磁性粒子”という語は永久磁性粒子だけでなく磁化可能粒子の両方、例えば超常磁性ビーズを有するものとする。磁性粒子のサイズは典型的には3 nm乃至50 µmに及ぶ。さらに、磁性粒子は実際に関心のある標的成分に、例えばそれらの表面に露出する分析物結合基を通じて、結合し得る。磁性粒子の使用は、磁場を用いて容易に操作されることができるので、好都合である。好適な実施形態において、磁性粒子は試料流体の添加前に反応面上の一つ以上の検査領域に存在する。別の好適な実施形態において、磁性粒子は反応面と反対の反応チャンバの面にある。

【0031】

上述の磁性粒子は好適には所定領域に、特に関連する検査領域に近い若しくはそれと反対のポリウムに、磁場によって閉じ込められ、この閉じ込めは特に反応チャンバへの試料流体の導入中に、及び/又は後で、特に検査領域内のアッセイ処理ステップ中に、起こり得る。閉じ込めは、磁性粒子が別の検査領域に達するチャンスが（ほとんど）ないようなものであり得る。定量的には、約90%より多く、好適には約99%より多くの磁性粒

10

20

30

40

50

子が関連する検査領域にとどまるものとする。従って、特定の検査領域における磁性粒子の量は一定の既知の値を持つ。さらに、異なるタイプの磁性粒子（例えば異なるサイズの粒子及び/又は異なる結合分子で覆われる）が、望ましくない交差反応のリスクなしに異なる検査領域において使用され得る。磁気閉じ込めは例えば検査領域の下に配置される磁石によって達成され得る。

【0032】

反応チャンバへの試料流体の導入中、磁性粒子は特に検査領域若しくは反対面にしっかりと引き付けられ得るので、これらは試料流体に流体力学的に分散しない。この目的のために、磁性粒子を支持する面へ向けられる十分な強度の傾斜磁場が、例えば反応面より下（磁性粒子が検査領域内にある場合）若しくは反応面より上（磁性粒子が検査領域と反対の面内にある場合）に配置される磁石を用いて、印加され得る。

10

【0033】

上述の磁性粒子が試料流体の追加の前にカートリッジ内に既にあるときは、これらは検査領域において及び/又はその中に堆積し得る。これは異なるタイプの磁性粒子を備えるものとする異なる検査領域がある場合に特に有用である。この場合、対応する磁性粒子は最初からそれらの関連する検査領域において/その中に位置し得る。

【0034】

付加的に若しくは代替的に、磁性粒子は反応面とは別の反応チャンバの面上に設けられ得る。カートリッジが例えばオープンチャンバ（反応面を有する）を持つ本体とこのチャンバを閉じるカバーから成る場合、磁性粒子はカバーの内面上に堆積し得る。この実施形態は同じタイプの磁性粒子が全試料流体内に分散するものとする場合に特に好都合である。

20

【0035】

反応チャンバが二つ以上の検査領域を有するとき、同じ若しくは異なるタイプの磁性粒子はこれら領域の一部（若しくは各々）に堆積し得る。従って、これらの検査領域内の異なる磁性粒子に基づいてアッセイを実行することができる。

【0036】

本発明はさらに分子診断、生物試料分析、化学試料分析、食品分析、及び/又は法医学的分析のための上記類のカートリッジの使用に関する。分子診断は例えば標的分子に直接若しくは間接的に付着する磁気ビーズ若しくは蛍光粒子を用いて達成され得る。最も好適には、この使用は疾患、例えば心疾患の検出を有する。

30

【0037】

本発明のこれらの及び他の態様は以下に記載の実施形態から明らかとなり、それらを参照して解明される。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】検査領域周辺の物理的障壁が突起によって形成される、本発明にかかるカートリッジの側面図を概略的に示す。

【図2】図1のカートリッジの反応面について上面図を示す。

【図3】図1のカートリッジの反応面の代替的な実施形態について上面図を示す。

40

【図4】検査領域周辺の物理的障壁が陥凹の壁によって形成される、カートリッジの側面図を概略的に示す。

【図5】検査領域周辺の物理的障壁が隆起の壁によって形成される、カートリッジの側面図を概略的に示す。

【図6】反応チャンバの充填前の磁性粒子を持つ四つの検査領域を示す。

【図7】磁性粒子が傾斜磁場によって押し下げられたとき（左）若しくは押し下げられないとき（右）の反応チャンバの充填後の上記四つの検査領域を示す。

【図8】反応チャンバの充填中に磁性粒子が傾斜磁場によってそれらの検査領域に閉じ込められたとき（左）若しくは閉じ込められないとき（右）の結合後の四つの検査領域を示す。

50

【発明を実施するための形態】

【0039】

同様の参照番号若しくは100の整数倍異なる番号は図中同一の若しくは同様の構成要素をあらわす。

【0040】

本発明は以下、唾液、尿、血液のような体液中の特定成分の検出用のバイオセンサに関して説明され、バイオセンサはキャプチャプローブで覆われる磁性粒子（ビーズ）を利用する。アッセイ性能を最適化するために特定の磁気駆動スキームがこれらのバイオセンサにおいて適用され得る。試料中の標的分子の存在は検出スポット若しくは"結合領域"への、すなわち特異的キャプチャ分子若しくはプローブで覆われる領域への磁気ビーズの結合の程度によって検出され得る。結合領域の内側だけでなく外側の検査領域に結合した磁気ビーズの存在は、例えば光学手段によって検出され得る。

10

【0041】

心臓応用の具体例において、バイオセンサは心筋梗塞の発生を示す複数のバイオマーカの定量的検出のために指先から採取した血液試料を使用し得る。バイオセンサはポイントオブケアセッティング（緊急治療室、ベッドサイド、救急車、診療所、若しくは家でも）において使用され得る。複数の重要な心臓マーカタンパク質が同定されており、臨床診療において使用され得る。例えば、トロポニンIはその絶対的心臓特異性とその長い血中半減期に基づいて標準バイオマーカとして使用され得る。心臓発作後の血流のミオグロビンレベルの急増は迅速な患者層別化を可能にし得る。B型ナトリウム利尿ペプチドは心不全の救急診断にとって、及び急性冠症候群患者の予後にとって有用であり得る。2, 3 C 反応性タンパク質は冠動脈性心疾患及び急性冠症候群の重要な予後指標である。

20

【0042】

こうした心臓マーカの同時定量化は、臨床医が冠動脈性心疾患を迅速に診断し、患者治療方針を正確に策定することを可能にする。心臓マーカのパネルの迅速で信頼できる検出は、医療専門家が同様の症状を示す患者を区別するのに役立つ。異なるマーカは診断上関連する異なる濃度で存在し、最適な検出下限とダイナミックレンジのために異なるアッセイ条件を要し得る。

【0043】

従って異なるマーカが一つの反応チャンバにおいて同時に測定されることができると期待されるバイオセンサ用のカートリッジを持つことが望ましい。これは、交差反応性効果が回避され、多重アッセイが実行され得るように、特異的アッセイに対応する抗体と磁気ビーズの空間的分離によって達成され得る。

30

【0044】

従って本発明によって対処される問題は、一つの反応チャンバにおける複数のアッセイスポットの統合に関する。例えば多心臓マーカの同時定量化のために、個々のアッセイフォーマットは多分析物検出に拡張される必要がある。

【0045】

多分析物バイオセンシングのための一つの方法は多標識を用いることであり得る。しかしながら、個別標識によって生成される信号の不十分な識別のために、多分析物フォーマットにおいては個別アッセイフォーマットと比較して感度の低下が観察されることが多い。従って本発明は、反応チャンバに物理的障壁を組み込むことによって、標的分析物の各々に特異的な異なる抗体が単一反応チャンバ内の個別領域において固定化される、抗体アレイフォーマットを使用することを提案する。このアプローチの利点の一つは、反応チャンバ内の異なる領域の機能的分離である。

40

【0046】

図1は本発明の一実施形態例にかかるカートリッジ110を通る断面を概略的に示す。カートリッジ110はカートリッジの反応チャンバ114を満たす試料流体（例えば血液）に含まれる標的成分T1, T2の検出のために使用される。カートリッジ110は透明基部111から成り、これは反応チャンバ114をその底部側で境し、反応面115を提

50

供する。反応チャンバ114の側壁は中間層112、例えば反応チャンバ用の開口と付随流体チャンネル（不図示）が中に切り込まれているテープによって構成される。反応チャンバ114はその上面において（プラスチック）カバー113によって覆われる。代替的に、反応チャンバは底部及び/又は上部における陥凹によって形成され得る。勿論反応チャンバの多くの他の設計も可能である。

【0047】

複数の検査領域117, 117'が反応面115上に形成される。各検査領域117, 117'は関連する検査領域用の試薬で満たされる領域を閉じ込める物理的障壁となる突起116, 118によって幾何学的に画定される。図示の実施例において、試薬は特に円形突起118によって囲まれる円盤状中央"結合領域"にあるキャプチャプローブCP1, CP2を有する。さらに、磁性粒子MP1, MP2が、上述の結合領域を有し、外側突起116によって境される広い面積に堆積する。突起116, 118は例えば約10 μ mの高さhと約20 μ mの幅wを持ち得る。

10

【0048】

結合部位CP1, CP2は具体的には例えばインクジェットによって塗布されて下層基板に結合する抗体であり得る。この領域周辺の突起118は抗体スポット溶液を、従って結果として得られる抗体スポットを、カートリッジの製造中に専用領域に閉じ込めたままにする。乾燥と洗浄の後、過剰材料が除去され得る。堆積した磁気ビーズMP1, MP2のボリュームはキャプチャプローブのボリュームよりも大きく、従って対応するリング状領域は中央結合領域よりも大きい。通常、磁性粒子MP1, MP2はキャプチャプローブ

20

【0049】

良好な親水性を得るために反応面115の親水化が可能である。随意に、反応面全体を親水化しないことを選択することができるが、親水化を物理的障壁の外側の領域に制限するために物理的障壁116, 118を使用する。これはキャプチャプローブが親水性面よりも疎水性面によく結合する場合に、疎水性面上へのキャプチャプローブCP1, CP2のスポッティングを可能にする。

【0050】

図2は反応面115についての上面図において、上記類の複数の検査領域が反応面115全体に広がることを示し、検査領域は異なる形状及び/又は直径（不図示）を持ち得るか、又は全て同じ形状及び/又は直径を持つ。

30

【0051】

図1において、左検査領域117の磁性粒子MP1は反応チャンバ114への試料流体の導入前（及びその直後）と仮定される静止凝集状態で示される。右検査領域117'において、磁性粒子MP2の一部は既に試料流体の隣接ボリュームに溶解している。

【0052】

図1は検査領域の磁性粒子MP1, MP2が操作され得る反応チャンバ114内の磁場Bを生成するための磁場発生器、例えば電磁石150をさらに示す。特に、磁性粒子が反応チャンバ全体中に広がることのできないように、試料流体での反応チャンバ114の充填中に反応面115へ磁性粒子をしっかりと引き付けることが可能である。反応チャンバの充填（すなわち試料の適用と試料での反応チャンバの完全な充填との間の時間）は、例えば約1秒乃至120秒の間、好適には約5秒乃至60秒の間持続し得る。

40

【0053】

カートリッジの充填の後に典型的には磁性粒子による分析物キャプチャを可能にするインキュベーション期間が続く。その後、それらの関連する検査領域へのそれらの選択的結合（例えば磁性粒子MP1を検査領域117におけるボリュームへ）を最適化するために磁性粒子を駆動するように磁場Bが使用され得る。この駆動中、異なる検査領域間の交差反応も最小限であるように、磁性粒子の最小限の側方拡散が起こることが観察された。反応チャンバの充填中の傾斜磁場の平均強度は典型的には次の期間（例えばインキュベーションの期間）中よりも強く、例えば約2倍、最も好適には約10倍強い。反応チャンバの

50

充填中に（傾斜）磁場を印加するが、次のインキュベーション期間中は印加しない（ゼロ勾配）ことも可能である。

【 0 0 5 4 】

磁場発生器は随意に他の若しくはさらなる磁石、例えばカートリッジ 1 1 0 の反対側の磁石を有し得ることが留意されるべきである。電磁石 1 5 0 は好適には二つの極が y 方向に縦に一列に配列した U 字形磁石であり得る。

【 0 0 5 5 】

図 1 は反応面 1 1 5 において全反射されてから光検出器（不図示）へ向かって出力光ビーム L 2 としてカートリッジ 1 1 0 から出る入力光ビーム L 1 をさらに示す。これらの光ビームは検査領域 1 1 7 , 1 1 7 ' の磁性粒子 M P 1 , M P 2 及びキャプチャプローブ C P 1 , C P 2 に特異的に結合する試料流体の標的成分を検出するために使用され得る。このアッセイと漏れ全反射（F T I R）による標的成分の光学的検出のさらなる詳細は例えば引用により本明細書に組み込まれる W O 2 0 0 8 / 1 1 5 7 2 3 A 1 に見られる。

【 0 0 5 6 】

カートリッジの基部 1 1 1 は好適には射出成形プラスチック（例えばポリスチレン、ポリカーボネート、C O P、C O C、A B S など）で作られる。提案される物理的障壁 1 1 6 , 1 1 8 は例えばモールドでの集束イオンビーム処理若しくはフェムト秒レーザーアブレーションによって製造され得るが、多くのバリエーションが物理的障壁の製造のために考えられ得る。

【 0 0 5 7 】

上記実施例では、それぞれ抗体 C P 1 , C P 2 及び磁気ビーズ M P 1 , M P 2 のために各検査領域において個別領域若しくはサブ領域が設けられる。本発明の別の実施形態において、磁性粒子は反応面上ではなくカバー 1 1 3（積層）上に堆積し得る。この場合抗体を堆積させるために小さな円盤状領域のみが必要である。

【 0 0 5 8 】

これは標的分析物の各々に特異的な異なる抗体が個別領域において固定化されるアレイフォーマットをもたらす。完全に統合されたシステムにおいて同時アッセイが使用されることができ、たった一滴の血液において同時多重決定をもたらす。

【 0 0 5 9 】

図 3 は図 1 のもののようなカートリッジのための反応面の代替的实施形態について上面図を概略的に示す。

【 0 0 6 0 】

図 3 の左側において、同一円形の複数の検査領域が、単一の連結領域を囲む円形突起 2 1 6 によって形成される。この領域は例えばキャプチャプローブ C P、磁性粒子 M P 又は他の試薬若しくは試薬の任意の組み合わせなどの試薬で覆われ得る。

【 0 0 6 1 】

図 3 の中心部において、複数の検査領域が角丸の正方形（若しくは長方形）を持つ単一の連結領域を囲む突起 3 1 6 によって形成される。先と同様に、領域は例えばキャプチャプローブ C P、磁性粒子 M P 又は他の試薬若しくは試薬の任意の組み合わせなどの試薬で覆われ得る。

【 0 0 6 2 】

図 3 の右側において、突起 4 1 6 は反応面上の長方形グリッドを構成する。このグリッドのセルは例えばキャプチャプローブ C P、磁性粒子 M P 又は他の試薬若しくは任意の試薬の組み合わせなどの試薬で覆われ得る検査領域である。

【 0 0 6 3 】

図 4 は本発明の別の実施形態にかかるカートリッジ 2 1 0 を概略的に図示する。カートリッジ 2 1 0 は複数の検査領域 2 1 7 が位置する反応面 2 1 5 を持つ反応チャンバ 2 1 4 を有する。これらの検査領域 2 1 7 は陥凹の壁 2 1 6 の形の物理的障壁によって境され、この壁は高さ h を持つ（障壁の幅はおおよそゼロである）。検査領域 2 1 7 自体はこれら陥凹の底に位置する。陥凹は約 5 0 μ m 乃至約 3 0 0 μ m の幅 W を持つ。上記の通り、検

10

20

30

40

50

査領域は試薬、特にキャプチャプローブCP及び/又は磁性粒子MPで充填され得る。

【0064】

図5は本発明のさらに別の実施形態にかかるカートリッジ310を概略的に図示する。カートリッジ310は複数の検査領域317が位置する反応面315を持つ反応チャンバ314を有する。これらの検査領域317は隆起若しくは柱の壁316の形の物理的障壁によって境され、この壁は高さhを持つ(障壁の幅はおおよそゼロである)。検査領域317自体はこれら柱の頂上に位置する。柱は約50 μ m乃至約300 μ mの幅Wを持つ。上記の通り、試薬、特にキャプチャプローブCP及び/又は磁性粒子MPが検査領域内に堆積し得る。

【0065】

図4及び5における壁216及び316は図1における突起116, 118と同じように物理的障壁として機能する。従って突起に関してなされた説明は壁216及び316にも同様に当てはまる。例えば、壁216及び316の高さは典型的には約10 μ mの高さhを持ち得る。

【0066】

図6 8は図2に図示の通り同心突起で設計される四つの検査領域を持つ反応面の写真を示す。画像はカートリッジ充填中の磁気閉じ込めの効果を例示する。関連実験において、キャプチャプローブ(抗体)が検査領域の内側突起に堆積し、磁性粒子がこれらキャプチャプローブの上に堆積し、また外側突起内の領域も覆った。

【0067】

図6は試料の導入前の検査領域を示す。堆積した磁性粒子はFTIRにおいて可視である(黒色)。全磁性粒子はそれらの関連する検査領域の内側に良好に位置付けられる。

【0068】

カートリッジ充填中、磁性粒子はカートリッジの下の電磁石を用いて適切な傾斜磁場Bによって反応面へ向かって引き付けられた(図7, 8の左画像)、若しくは引き付けられなかった(図7, 8の右画像)。その後、標準アッセイが実行された(磁気駆動無しインキュベーション、そして磁気駆動による結合、そして磁気洗浄)。

【0069】

図7の画像は結合フェーズ中にとられた。カートリッジ充填中の磁気引き付けは磁性粒子をそれら特有の突起の場所(検査領域)に非常によく保持したが、一方磁気引き付け無しではそれらはもっと反応面中に広がったことが明らかである。充填中の磁気閉じ込めの利点は、検査領域より上のビーズ濃度が極めて高く保たれることである。従来技術において、磁気ビーズは反応チャンバ全体より上に堆積する。これらが検査領域の突起の内側に堆積するとき、ずっと少ないボリュームが利用可能であり、もっと少ないビーズが堆積し得る。充填中の磁気閉じ込めのおかげで、ビーズは検査領域より上で濃縮されたままであり、もっと少ない数のビーズが堆積するときでも良好なアッセイ信号が依然として得られる。

【0070】

磁気押し下げ(hold down)ステップの別の利点は、磁気ビーズが非常によく分離されたままに保たれ、同じチャンバ内の他のビーズ及び検査領域との干渉を減らし、従って多重検出を容易にすることである。これは図8の測定によって例示される。上部及び下部検査領域より上に、非機能的磁性粒子が堆積し、一方左及び右検査領域より上に堆積した磁性粒子は機能的であった(すなわち標的分子に対するキャプチャ部位を備える)。充填中の磁気閉じ込めにより(左画像)、そこでの信号の欠如から明らかのように、機能的磁性粒子は上部及び下部検査領域へ移動せず結合しない。磁気押し下げステップ無しでは、粒子結合は上部及び下部検査領域においても観察され、機能的粒子が左及び右スポットからそこへ移動したことを示す。

【0071】

要約すると、本発明は異なるマーカが一つの反応チャンバにおいて同時に測定されることができるとカートリッジに関する。その特異的アッセイに対応する抗体及び磁気ビーズの

10

20

30

40

50

局所的分離のために、交差反応性効果が回避され、多重アッセイ条件が実行されること
ができる。

【0072】

本発明は例えば単一測定において多分析物を同時に測定する多重アッセイにおいて適用
され得る。これらは機能ゲノミクス実験、プロテオミクス、インクジェットプリンタ、血
球分離装置、生化学アッセイ、化学合成、遺伝子解析、薬剤スクリーニング、及び疾患の
即時ポイントオブケア診断において広く使用される。

【0073】

本発明は図面と上記説明において詳細に図示され記載されているが、かかる図示と記載
は例示若しくは説明であって限定ではないとみなされるものとし、本発明は開示の実施形
態に限定されない。開示の実施形態への他の変更は、図面、開示及び添付の請求項の考察
から、請求される発明を實踐する上で当業者によって理解されもたらされることができ
る。請求項において、“有する”という語は他の要素若しくはステップを除外せず、不定冠詞
“a”若しくは“an”は複数を除外しない。特定の手段が相互に異なる従属請求項に列挙さ
れるという単なる事実は、これら手段の組み合わせが有利に使用されることができないこ
とを示さない。請求項における任意の参照符号は範囲を限定するものと解釈されるべきで
はない。

10

【図1】

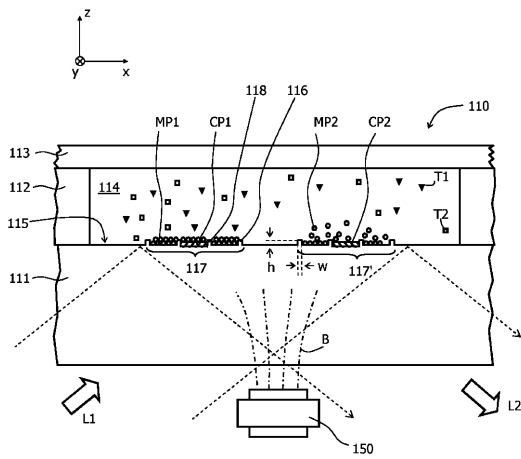


Fig. 1

【図2】

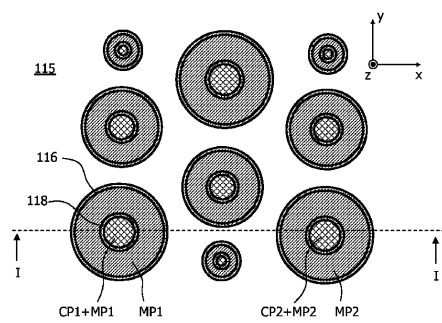


Fig. 2

【図3】

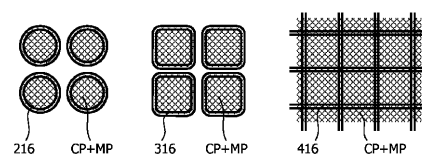


Fig. 3

【 図 4 】

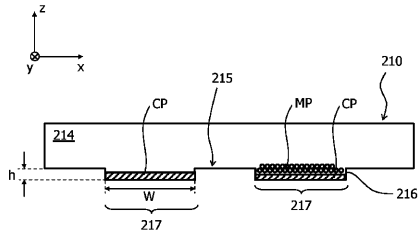


Fig. 4

【 図 5 】

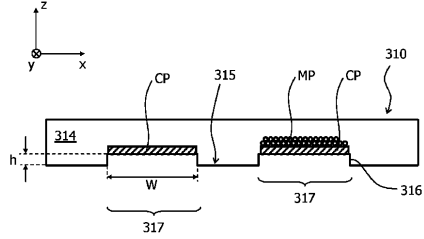


Fig. 5

【 図 6 】

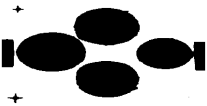


Fig. 6

【 図 7 】



Fig. 7

【 図 8 】

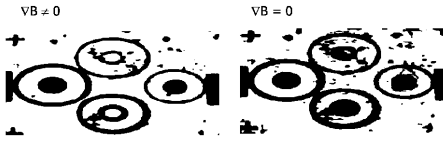


Fig. 8

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/53 X
- (72)発明者 マース ヨースト ヒュベルト
オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイ テック キャンパス ビルディング
5
- (72)発明者 デットメル ウェンディ ウエン
オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイ テック キャンパス ビルディング
5
- (72)発明者 セイベルス マラ ヨハンナ ヤコバ
オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイ テック キャンパス ビルディング
5
- (72)発明者 イミンク アルベルト ヘンドリク ヤン
オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイ テック キャンパス ビルディング
5
- (72)発明者 プルルス ドミニク マリア
オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイ テック キャンパス ビルディング
5
- (72)発明者 オルセル ヨウケ ガレリナ
オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイ テック キャンパス ビルディング
5

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 特表2012-513586(JP,A)
特開2006-187770(JP,A)
特表2003-523518(JP,A)
国際公開第2009/125356(WO,A1)
米国特許出願公開第2003/0040129(US,A1)
国際公開第2011/027291(WO,A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)
G 0 1 N 33/48 - 33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	用目标组分处理样品液		
公开(公告)号	JP6309950B2	公开(公告)日	2018-04-11
申请号	JP2015522194	申请日	2013-07-03
[标]申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦电子股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦NV哥德堡		
当前申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦NV哥德堡		
[标]发明人	マースヨーストヒュベルト ディットメルウエンディウエン セイベルスマラヨハンナヤコバ イミンクアルベルトヘンドリクヤン ブルルスドミニクマリア オルセルヨウケガレリナ		
发明人	マース ヨースト ヒュベルト ディットメル ウエンディ ウエン セイベルス マラ ヨハンナ ヤコバ イミンク アルベルト ヘンドリク ヤン ブルルス ドミニク マリア オルセル ヨウケ ガレリナ		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54333 G01N21/253 G01N21/552 G01N27/745 G01N33/54326 G01N35/0098		
FI分类号	G01N33/543.541.A G01N33/543.525.W G01N33/543.525.E G01N33/53.D G01N33/53.B G01N33/53.X		
优先权	61/672835 2012-07-18 US		
其他公开文献	JP2015522823A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明涉及一种盒 (110) 和用于处理样本流体的目标成分 (T1 , T2) 的方法, 例如检测血液中的心脏标记。盒 (110) 包括具有亲水反应表面 (115) 的反应室 (114)。反应表面 (115) 上的物理屏障 (116,118) , 例如突起, 至少部分地与包括特异性结合目标组分 (T1 , T2) 的捕获探针 (CP1 , CP2) 的研究区域 (117,117'的样品流体。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6309950号 (P6309950)
(45) 発行日 平成30年4月11日 (2018. 4. 11)	(24) 登録日 平成30年3月23日 (2018. 3. 23)	
(51) Int. Cl. G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)	F I G01N 33/543 541A G01N 33/543 525W G01N 33/543 525E G01N 33/53 D G01N 33/53 B	請求項の数 14 (全 14 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号 特願2015-522194 (P2015-522194) (86) (22) 出願日 平成25年7月3日 (2013. 7. 3) (65) 公表番号 特表2015-522823 (P2015-522823A) (43) 公表日 平成27年8月6日 (2015. 8. 6) (86) 国際出願番号 PCT/IB2013/055442 (87) 国際公開番号 W02014/013372 (87) 国際公開日 平成26年1月23日 (2014. 1. 23) 審査請求日 平成28年6月27日 (2016. 6. 27) (31) 優先権主張番号 61/672, 835 (32) 優先日 平成24年7月18日 (2012. 7. 18) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(73) 特許権者 590000248 コーニンクレッカ フィリップス エヌ ヴェ KONINKLIJKE PHILIPS N. V. オランダ国 5656 アーエー アイ ドフェン ハイテック キャンパス 5 High Tech Campus 5, NL-5656 AE Eindhoven n (74) 代理人 100122769 弁理士 苗田 秀仙	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的成分を持つ試料流体の処理