

(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2017-534885

(P2017-534885A)

(43) 公表日 平成29年11月24日(2017.11.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	2 G 0 5 4
<b>GO 1 N 37/00 (2006.01)</b>	GO 1 N 37/00 1 0 1	2 G 0 5 9
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 N	
<b>GO 1 N 21/41 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 9 5	
<b>GO 1 N 21/75 (2006.01)</b>	GO 1 N 21/41 1 0 1	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-537018 (P2017-537018)  
 (86) (22) 出願日 平成27年10月6日 (2015.10.6)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年5月31日 (2017.5.31)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/073036  
 (87) 国際公開番号 W02016/055469  
 (87) 国際公開日 平成28年4月14日 (2016.4.14)  
 (31) 優先権主張番号 1417640.8  
 (32) 優先日 平成26年10月6日 (2014.10.6)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)  
 (31) 優先権主張番号 107946A  
 (32) 優先日 平成26年10月6日 (2014.10.6)  
 (33) 優先権主張国 ポルトガル (PT)

(71) 出願人 511102240  
 バイオサーフィット、 ソシエダッド ア  
 ノニマ  
 ポルトガル国 アザンブジャ 2050-  
 317、ナンバー 66、ルア 25 デ  
 アプリル  
 (74) 代理人 100105924  
 弁理士 森下 賢樹  
 (72) 発明者 マニエール デ オリヴェイラ ガルシア  
 ダ フォンセカ、ジョアオ  
 ポルトガル国 アザンブジャ ピー-20  
 50-360、カサイス デ バイショ、  
 クインタ ダ ナセンテ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結合アッセイ分析

(57) 【要約】

試料中の標的物の試料濃度を決定する、例えば、血液試料または他の生物学的試料中の標的抗原または標的抗体の濃度を決定する方法が提供される。該方法は、アッセイアセンブリを用いるアッセイからのアッセイアセンブリの複数のアッセイ領域のそれぞれに固定化されている標的物の局所的な濃度を示す個別の局所的な測定値のデータ点を含むアッセイデータを得るステップを含む。アッセイ領域は、アッセイアセンブリを流れる試料が各アッセイ領域を順番に流れるように直列に連結される。各アッセイ領域はアッセイ領域の表面に固定化されている複数のプローブ物を含み、プローブ物は、試料がアッセイ領域の1つから次のものまで流れる際に標的物の濃度が減少するように、試料中の標的物に結合するように配置される。アッセイデータは、順番における個別のアッセイ領域の位置を示す量に対する局所的な測定値のパラメータ化された関数でモデル化され、1つ以上のパラメータは試料濃度に依存する。試料濃度を示す値は1つ以上のパラメータの少なくとも1つに基づいて決定される。

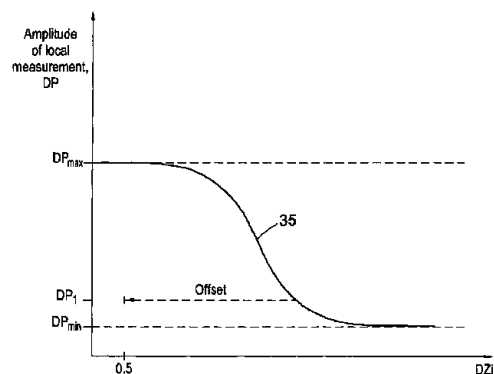


Fig. 4

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

試料中の標的物の試料濃度を決定する方法であって、

標的物の局所的な濃度を示す個別の局所的な測定値のデータ点を含むアッセイデータを、アッセイアセンブリの複数のアッセイ領域のそれぞれにて得るステップであって、前記アッセイ領域は、前記アッセイアセンブリを流れる試料が順番に各アッセイ領域を流れるように直列に連結され、各アッセイ領域は、その表面に固定化されている複数のプローブ物を含み、前記試料が前記アッセイ領域の 1 つから次のものまで流れる際に前記標的物の濃度が減少するように、前記プローブ物は前記試料中の前記標的物に結合するように配置されているステップと；

前記アッセイデータを順番における個別のアッセイ領域の位置を示す量に対する局所的な測定値のパラメータ化された関数でモデル化するステップであって、1 つ以上のパラメータは試料濃度に依存するステップと；

前記 1 つ以上のパラメータの少なくとも 1 つに基づいて試料濃度を示す値を決定するステップと、を含むことを特徴とする方法。

## 【請求項 2】

前記パラメータ化された関数が試料濃度の範囲について得られたアッセイデータセットから得られることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記 1 つ以上のパラメータの 1 つが、前記パラメータ化された関数が、オフセット量によって相殺される、順番におけるアッセイ領域の位置を示す量に対する局所的な測定値の関数であるように、順番におけるアッセイ領域の位置を示す前記量を相殺するオフセット量を示すことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記オフセット量が、前記アッセイアセンブリのアッセイ領域ごとの個別の局所的な測定値と前記パラメータ化された関数の対応する値との差を最小化することによって決定されることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記パラメータ化された関数が前記アッセイアセンブリに特有であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記パラメータ化された関数が、前記アッセイアセンブリに特有の 1 つ以上の固定パラメータによって少なくとも一部定められることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記 1 つ以上の固定パラメータが、試料標的濃度の範囲にわたる個別の試料標的濃度について得られた量に対する局所的な測定値のデータセットから決定されることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記パラメータ化された関数がロジスティック関数であることを特徴とする請求項 1 乃至 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記パラメータ化された関数が下記数式に比例することを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

## 【数 1】

$$\frac{DP_{\max}}{1 + \exp[\text{Shape} \times (DZ_i + \text{Offset})]}$$

(式中、 $DP_{\max}$  および  $\text{Shape}$  は前記アッセイアセンブリに特有の固定パラメータであり、 $\text{Offset}$  は試料標的濃度に依存するパラメータであり、 $DZ_i$  は、順番における個別のアッセイ領域  $i$  の位置を示す。)

10

20

30

40

50

## 【請求項 10】

Offsetの値を調節し、Offsetに基づいて前記試料中の標的物の濃度を示す値を決定することによって、前記パラメータ化された関数を前記アッセイデータに適合させるステップを含むことを特徴とする請求項9に記載の方法。

## 【請求項 11】

較正関数を用いて、前記1つ以上のパラメータの少なくとも1つに基づいて値を決定するステップを含み、前記較正関数が、所与の値を超える標的物の試料濃度での使用のための第1の関数と、所与の値未満の標的物の試料濃度での使用のための第2の関数と、を含むことを特徴とする請求項1乃至10のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記試料濃度を示す値が、較正関数を用いて決定され、前記較正関数が、所与の値を超える標的物の試料濃度で使用するための第1の関数と、所与の値未満の標的物の試料濃度での使用のための第2の関数を含み、前記第1の関数がOffsetの関数であり、前記第2の関数が下式の関数であることを特徴とする請求項9または10に記載の方法。

## 【数 2】

$$\frac{DP_{\max}}{1 + \exp[\text{Shape} \times \text{Offset}]}$$

## 【請求項 13】

各局所的な測定値が、前記個別のアッセイ領域の表面での屈折率の変動を示す請求項1乃至12のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記個別のアッセイ領域の表面での前記屈折率が、表面プラズモン共鳴の変化の検出に基づいて決定されることを特徴とする請求項13に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記個別のアッセイ領域の表面での前記屈折率の変動が、前記個別のアッセイ領域を流れる増幅器溶液によって増幅され、結合した標的物と増幅器が相互作用した際に前記個別のアッセイ領域での前記屈折率の変動が増幅するように、前記アッセイ領域の表面に結合した標的物と相互作用するように前記増幅器溶液が配置されていることを特徴とする請求項13または14に記載の方法。

## 【請求項 16】

各局所的な測定値が、増幅前シグナルと増幅後シグナルとの差を含み、前記試料と前記個別のアッセイ領域との相互作用後に、かつ前記増幅器溶液と個別のアッセイ領域に結合した標的物との相互作用前に、増幅前シグナルが検出され、前記個別のアッセイ領域に結合した標的物と前記増幅器溶液との相互作用後に、増幅後シグナルが検出されることを特徴とする請求項15に記載の方法。

## 【請求項 17】

前記アッセイデータをモデル化するステップが、調整期間を用いて前記試料のバルク屈折率を算定するステップを含むことを特徴とする請求項16に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記調整期間は、前記試料と前記アッセイ領域との相互作用の前に検出されたベースラインシグナルと、前記増幅前シグナルとの差に基づいて決定されることを特徴とする請求項17に記載の方法。

## 【請求項 19】

各局所的な測定値が、前記増幅器溶液が前記個別のアッセイ領域と相互作用する比率を示すことを特徴とする請求項15に記載の方法。

## 【請求項 20】

各局所的な測定値が、前記個別のアッセイ領域への前記増幅器溶液の導入から、シグナルの特徴、例えば最大または閾値のシグナル振幅の検出までにかかった時間を示す測定値

10

20

30

40

50

を含むことを特徴とする請求項 15 に記載の方法。

【請求項 21】

複数のアッセイ領域の各対の間の標的物を有するプローブ物の量が実質的に一定であることを特徴とする請求項 1 乃至 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

前記順番におけるアッセイ領域の位置を示す量が、前記アッセイ領域の位置の上流のプローブ物の量を示す請求項 1 乃至 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

各アッセイ領域が、順番における次のアッセイ領域に管を介して連結されていることを特徴とする請求項 1 乃至 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

アッセイデータを得るステップが、  
試料を前記アッセイアセンブリへ導入するステップと；  
前記試料を前記アッセイアセンブリに流すステップと；  
各アッセイ領域にて局所的な測定を実施するステップと、を含む請求項 1 乃至 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

試料中の標的物の試料濃度を決定するためのシステムであって、  
アッセイアセンブリの複数のアッセイ領域のそれぞれでの標的物の局所的な濃度を示す個別の局所的な測定値のデータ点を含むアッセイデータを得、

前記アッセイデータを順番における個別のアッセイ領域の位置を示す量に対する前記局所的な測定値のパラメータ化された関数でモデル化し、

1 つ以上のパラメータの少なくとも 1 つに基づいて試料濃度を示す値を決定するように配置された処理装置を含み、

ここで、前記アッセイ領域は、前記アッセイアセンブリを流れる試料が各アッセイ領域を順番に流れるように直列に連結されており、

各アッセイ領域はその表面に固定化されている複数のプローブ物を含み、前記プローブ物は、前記試料が前記アッセイ領域の 1 つから次のものまで流れる際に前記標的物の濃度が減少するように、前記標的物に結合するように配置されており、

1 つ以上のパラメータが試料濃度に依存することを特徴とするシステム。

【請求項 26】

請求項 1 乃至 25 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するように配置されている請求項 26 に記載のシステム。

【請求項 27】

前記システムは、アッセイアセンブリを流れる試料が各アッセイ領域を順番に流れるように直列に連結された複数のアッセイ領域を含み、各アッセイ領域はその表面に固定化されている複数のプローブ物を含み、前記プローブ物は、前記試料が前記アッセイ領域の 1 つから次のものまで流れる際に標的物の濃度が減少するように標的物に結合するように配置されているアッセイアセンブリと；

各アッセイ領域で局所的な測定を実施して、前記複数のアッセイ領域のそれぞれでの前記標的物の局所的な濃度を示す個別の局所的な測定値のデータ点を含むアッセイデータを得るように配置された少なくとも 1 つの検出器と、をさらに含み；

前記処理装置が、前記少なくとも 1 つの検出器からアッセイデータを得るように配置されている請求項 25 および 26 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 28】

試料中の標的物の試料濃度を決定する方法であって、

アッセイアセンブリのアッセイ領域での標的物の局所的な濃度を示す局所的な測定値を含むアッセイデータを得るステップであって、前記アッセイ領域はその表面に固定化されている複数のプローブ物を含み、前記プローブ物は標的物に結合するように配置され、前記局所的な測定値は、前記アッセイ領域の表面での屈折率の変動を示すシグナルに基づき

10

20

30

40

50

、当該変動は前記アッセイ領域の表面に結合した標的物と増幅器溶液との相互作用の後に増幅され、前記局所的な測定値は、増幅前シグナルと増幅後シグナルとの差を含み、前記増幅前シグナルが、前記試料と前記アッセイ領域との相互作用の後で、かつ前記アッセイ領域に結合した標的物と前記増幅器溶液との相互作用の前に検出され、前記増幅後シグナルが、前記アッセイ領域に結合した標的物と前記増幅器溶液との相互作用後に検出されるステップと；

試料のバルク屈折率を考慮するように、調整期間を用いて局所的な測定値を調整するステップと；

調整した局所的な測定値を用いて、前記試料濃度を示す値を決定するステップと、を含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 29】

前記調整期間は、前記試料と前記アッセイ領域との相互作用の前に検出されるベースラインシグナルと、増幅前シグナルとの差に基づいて決定されることを特徴とする請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

試料中の標的物の試料濃度を決定するためのアッセイアセンブリであって、前記アッセイアセンブリを流れる試料が各アッセイ領域を順番に流れるように連続的に結合されている複数のアッセイ領域を含み、

各アッセイアセンブリが入口と出口とを含み、

前記複数のアッセイ領域におけるアッセイ領域の対ごとに、前記アッセイアセンブリを流れる試料が、第 1 のアッセイ領域から第 2 のアッセイ領域まで連結部分を介して流れるように、前記複数のアッセイ領域におけるアッセイ領域の対ごとに、前記第 1 のアッセイ領域の出口が前記連結部分によって前記第 2 のアッセイ領域の入口に連結されており；

20

各アッセイ領域はその表面に固定化されている複数のプローブ物を含み、前記試料が前記アッセイ領域の 1 つから次のものまで流れる際に前記標的物の濃度が検出可能に減少するように、前記プローブ物は前記標的物に結合するように配置されていることを特徴とするアッセイアセンブリ。

【請求項 31】

請求項 30 に記載のアッセイアセンブリを含むマイクロ流体デバイス。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本開示は、試料中の標的物の濃度を決定する、例えば、生物学的試料中の標的抗原または標的抗体の濃度を決定する方法およびシステムに関する。

【背景技術】

【0002】

イムノアッセイを使用して、試料中に存在する標的物、例えば抗原の濃度を定量的に決定することができる。マイクロ流体イムノアッセイの場合、試料が導入されるマイクロ流体チャンバーを含む配置を使用し得る。そのようなチャンバーは、チャンバーの表面上に固定化した複数のプローブ物、例えば抗体を含み、試料が表面を通過する際に、試料中の抗原がチャンバー内の抗体に結合するようになっている。抗体 - 抗原結合の量は、例えば、蛍光または表面プラズモン共鳴測定 (SPR) を用いて検出し得、定量し得、試料中の標的物の濃度はこの量から決定できる。

40

【0003】

既存のイムノアッセイに固有の制約、例えばプローブ密度または検出感度により、既知のマイクロ流体イムノアッセイによって検出できる試料中の標的物の濃度の範囲が制限される。いずれか 1 つのアッセイについて、検出および定量化は、標的濃度と検出シグナルとの関係の感知できる (理想的には直線状の) 範囲でのみ機能する。この範囲より下では、ノイズに対するシグナルの比率が低すぎ、この範囲を超えるとアッセイが飽和する。いずれにしても、測定したシグナルは、試料濃度から独立したものとなる。

50

## 【発明の概要】

## 【0004】

これらの問題に対処し、濃度が定量できるダイナミックレンジを拡張する標的濃度の決定方法およびシステムを提供することが望まれている。

## 【0005】

第1の態様では、試料中の標的物の試料濃度を決定する、例えば、血液試料または他の生物学的試料中の標的抗原または標的抗体の濃度を決定する方法が提供される。該方法は、アッセイアセンブリを用いるアッセイからのアッセイアセンブリの複数のアッセイ領域のそれぞれに固定化されている標的物の局所的な濃度を示す個別の局所的な測定値のデータ点を含むアッセイデータを得るステップを含む。アッセイ領域は、アッセイアセンブリを流れる試料が各アッセイ領域を順番に流れるように直列に連結される。各アッセイ領域はアッセイ領域の表面に固定化されている複数のプローブ物を含み、試料がアッセイ領域の1つから次のものまで流れる際に標的物の濃度が減少するように、プローブ物は試料中の標的物に結合するように配置されている。アッセイデータは、順番における個別のアッセイ領域の位置を示す量に対する局所的な測定値のパラメータ化された関数でモデル化され、ここで、1つ以上のパラメータは試料濃度に依存する。試料濃度を示す値は1つ以上のパラメータの少なくとも1つに基づいて決定される。

10

## 【0006】

複数の連続的に連結されたアッセイ領域から得られた減少データを用いて、標的 - プローブ結合に関する情報を、1つのアッセイ領域から次のものまで濃度が低下する際に異なる標的物の濃度で得ることができる。したがって、単一のアッセイ領域を含むシステムと比較して、より大きい範囲の標的物の試料濃度を決定できる。複数のアッセイ領域からの測定結果の量に対する関数でデータをモデル化することによって、ノイズに対する全体のシグナルの割合を改善し得るようにデータが組み合わせられる。

20

## 【0007】

データのモデル化は、例えば、当分野で周知のように、パラメータ化された関数の値とデータ点との間の矛盾を捕捉する対応する総和関数を減少させるか、または最小化することによって、パラメータ化された関数をデータ点に合わせるように、1つ以上のパラメータを調節することを含み得ることが理解される。そのような既知の技術の例は、一般に、非線形回帰、勾配降下および最小二乗最適化である。

30

## 【0008】

一部の実施形態では、パラメータ化された関数が、オフセット量によって相殺される順番におけるアッセイ領域の位置を示す量に対する局所的な測定値の関数であるように、1つ以上のパラメータの1つは、順番におけるアッセイ領域の位置を示す量を相殺するオフセット量を示す変数パラメータである。言い換えれば、アッセイ領域の位置  $i$  を順番に示す量を  $DZ_i$  で表した場合パラメータ化された関数は  $(DZ_i + Offset)$  ( $Offset$  はオフセット量) の関数である。

## 【0009】

パラメータ化された関数は、個別の試料濃度についてそれぞれ得られた複数のアッセイデータセットから導かれてもよく、該試料濃度は、試料濃度のある範囲をカバーする。

40

## 【0010】

パラメータ化された関数は、限定ではなく、理解を助ける例として、アッセイアセンブリのシステム特性における標的物の濃度の減少を定めるマスター減少曲線を表すものとして考えられ得、該システムは、順番における1つの概念上のアッセイ領域から順番における次の概念上のアッセイ領域まで、標的物の濃度が減少するように配置された複数の概念上のアッセイ領域を含む。概念上のアッセイ領域の数は、アッセイアセンブリ中のアッセイ領域の数より大きい。マスター減少曲線をアッセイデータセットに合わせることは、アッセイアセンブリのアッセイ領域が試料濃度に対応する概念上のアッセイ領域のセットに位置づけられるように、アッセイ領域をオフセット量で概念上相殺することと考えることができる。

50

## 【 0 0 1 1 】

パラメータ化された関数はロジスティック関数であり得る。一部の場合では、 $n$ 次多項式関数またはスプラインを使用してもよく、またはいずれの他の適した関数形式を使用してもよい。パラメータ化された関数は、例えば、ルックアップテーブル内でデータ入力の際にデータ点を作成するように補間を使用して、マスター減少曲線を表すためのルックアップテーブルを含み得る。

## 【 0 0 1 2 】

一部の実施形態では、オフセット量は、アッセイアセンブリのアッセイ領域ごとに、個別の局所的な測定値とパラメータ化された関数の対応する値との間の差異を最小限にすることによって決定される。例えば、オフセット量は、最小二乗近似またはいずれの他の適した近似を用いて決定し得る。

10

## 【 0 0 1 3 】

一部の実施形態では、オフセット量「Offset」は、以下の関数を最小にすることによって決定される。

## 【 数 1 】

$$\sum_{i=1}^n [DP(DZ_i) - f(DZ_i + Offset)]^2$$

式中、 $DP(DZ_i)$ は、個別のアッセイ領域 $i$ での局所的な測定値であり、 $f$ はパラメータ化された関数の対応する値である。前述したように、 $DZ_i$ は順番におけるアッセイ領域の位置を示す量である。いずれの適したコスト関数の最小化も実施して、パラメータ化された関数のアッセイデータへの最良の適合を得てもよい。例えば、カイ二乗最小化法を使用し得る。他の最小化アプローチは、局所的な測定値に重み付けを適用することであり得る。例えば、より低い重み付けがノイズ閾値に近い測定値に与えられ得る。例えば、順番内で前のアッセイ領域により高い重み付けが与えられ得る。

20

## 【 0 0 1 4 】

一部の実施形態では、1つ以上のパラメータが、所与のアッセイアセンブリの1つ以上の固定パラメータ特性を含み得る。例えば、1つの固定パラメータが、以下、時折 $DP_{max}$ と称される、アッセイ領域から検出できる局所的な測定値の最大振幅を示し得る。例えば、別の固定パラメータが、以下、時折 $Shape$ と称される、1つのアッセイ領域から次のものまで試料が流れる際に標的物の濃度が減少した量または割合を示し得る。これらのパラメータが、アッセイアセンブリ（または実質的に同一の条件下で製造したバッチまたはアッセイアセンブリ）の特性であり、アッセイされた試料の組成の関数として実質的に変動しないという意味で固定されたと言及されることが理解されるだろう。各アッセイアセンブリは、一部の実施形態では1回のみ使用され、それ故に同じ製造バッチからバッチを特徴付けるように個別のアッセイアセンブリを用いて実験が実施されることが理解されるだろう。決定した固定パラメータは、既知の試料濃度または標的物の試料と共にバッチの他のアセンブリを用いる検証実験で、バッチの代表であるとして検証し得る。

30

## 【 0 0 1 5 】

$DP_{max}$ および $Shape$ の値は、アッセイアセンブリについて決定され得、固定され得る。

40

## 【 0 0 1 6 】

1つ以上の固定パラメータは、実験データを用いて、例えば、複数の実験 $j$ のそれぞれでのアッセイアセンブリにおけるアッセイ領域 $i$ ごとに、個別の局所的な測定値とパラメータ化された関数の対応する値との間の差異を最小化することによって決定し得、ここで、各実験は、所与の濃度の標的物を有する試料を用いて実施され、濃度は濃度のある範囲に及ぶ。例えば、オフセット量は、最小二乗近似またはいずれの他の適した近似を用いて決定し得る。

## 【 0 0 1 7 】

1つの例では、1つ以上の固定パラメータまたは定数のセットを、以下の関数を最小

50

化することで決定し得る。

【数 2】

$$\sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^n [DP(DZ_i) - f_{\lambda}(DZ_i + Offset_j)]^2$$

ここで、m 回の実験からのデータが使用され、実験ごとに、n 個のアッセイ領域を含むアッセイアセンブリが使用される。固定パラメータに加えて、「Offset」の値も、複数の実験 j のそれぞれについて決定できる。このデータを用いて、実験ごとに Offset と試料の標的物の開始濃度 Concentration<sub>j</sub> との関係は、Offset の対応する値についての濃度値を与える校正関数として定義し得る。例えば、校正関数は、

10

【0018】

パラメータ化された関数はロジスティック関数であり得る。

【0019】

一部の実施形態では、パラメータ化された関数は、

【数 3】

$$\frac{DP_{\max}}{1 + \exp[Shape \times (DZ_i + Offset)]} \quad (1)$$

20

に比例する。式中、DP<sub>max</sub> は、アッセイ領域から検出できる局所的な測定値の最大振幅を示し、Shape は、試料が 1 つのアッセイ領域から次のものまで流れる際に標的物の濃度が減少する割合を示し、Offset は、データ適合によって決定される変数パラメータであり、DZ<sub>i</sub> は、順番における個別のアッセイ領域 i の位置を示す。

【0020】

一部の実施形態では、各アッセイ領域の中心で検出が実施され、したがって、DZ<sub>i</sub> は、アッセイ領域ごとに正の半整数値、すなわち 0.5、1.5、2.5 等を取り得る。これは、第 1 の測定値が取られる位置の前に、減少量が第 1 のアッセイ領域にて発生するからである。DZ<sub>i</sub> は整数値、またはいずれの他の適した値を取り得る。一部の実施形態では、整数および半整数値の混合を使用し得る。一部の実施形態では、順番における位置を示す量は、対応する測定値が取られる位置であるアッセイ領域の上流に存在するプローブ物（標的物と相互作用可能なもの）の量を示す。これらの実施形態では、1 つのアッセイ領域から次のものまでの量の変化が一定でなくてもよく、プローブ物の量または該当する 2 つのアッセイ領域間の標的物を結合する容量に依存してもよい。

30

【0021】

パラメータ化された関数は、Offset の値を調節することによって、得られたアッセイデータに合わせ得る。これは、例として、アッセイデータをマスター減少曲線に位置づけるものとして考えることができる。試料中の標的物の濃度を示す値は、Offset の値を校正関数と共に用いて決定し得る。

40

【0022】

上記式(1)によって与えられたパラメータ化関数では、アッセイアセンブリは、DP<sub>max</sub> および Shape を決定することによって特徴付けられる。より多くの複合モデル、例えば後述する 4PL および 5PL 関数は、システムを説明するのにより正確であり得るが、そのような複合モデルでは、追加の適合パラメータが使用される。

【0023】

試料濃度を示す値を決定し得、例えば校正関数を用いて計算し得る。校正関数はロジスティック関数、指数関数、またはいずれの他の適した関数であり得る。一部の実施形態では、校正関数は、所与の値を超える標的物の試料濃度で使用するための第 1 の関数と、所与の値未満の標的物の試料濃度で使用するための第 2 の関数とを含む。特定の実施形態で

50

は、第 1 の関数は *Offset* の関数であり、第 2 の関数は、

【数 4】

$$\frac{DP_{\max}}{1 + \exp[\text{Shape} \times \text{Offset}]} \quad (4)$$

の関数であるような、 $DZ_i = 0$  の概念上減少していない応答の関数である。標的物の試料濃度を示す値を決定するステップは、試料濃度自体を計算するステップまた試料濃度のいずれの変換も計算するステップを含み得る。同様に、試料濃度を示す値を決定するステップは、局所的な測定値を直接またはそれらのいずれの変換もモデル化するステップを含み得る。

10

【0024】

試料濃度の決定は反復プロセスであり得る。例えば、第 1 のステップを最初に適用し得、続いてより精密な結果をもたらし得る第 2 のステップを適用し得る。具体的には、一部の実施形態では、第 1 の関数を第 1 のステップで使用して、濃度を示す値を決定する。値が閾値未満である場合、第 2 のステップは第 2 の較正関数を用いて値を再計算する。一部の実施形態では、順序が逆転し、第 1 のステップからの（第 2 の関数からの）値が閾値を超える場合、第 1 の関数を第 2 のステップで使用する。

【0025】

一部の実施形態では、較正関数は、下記等式 (2) で示すような 4 パラメータロジスティック (4PL) 非線形回帰モデルである。

20

【数 5】

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b} \quad (2)$$

式中、 $a$ 、 $b$ 、 $c$  および  $d$  は固定パラメータであり、 $x = \text{Offset}$ （または他の適合パラメータ）である。

【0026】

一部の実施形態では、較正関数は、下記等式 (3) に示すような 5 パラメータロジスティック (5PL) 非線形回帰モデルである。

30

【数 6】

$$y = d + \frac{(a - d)}{\left(1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b\right)^g} \quad (3)$$

式中、 $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、 $d$  および  $g$  は固定パラメータであり、 $x = \text{Offset}$ （または他の適合パラメータ）を満たす。

【0027】

40

上述したように、4PL および 5PL 関数も、パラメータ化された関数として使用できる。その場合、例えば  $x = DZ_i + \text{Offset}$  である。

【0028】

一部の実施形態では、各局所的な測定値は、標的 - プローブ結合による個別のアッセイ領域の表面での屈折率の変動を示す。例えば、局所的な測定値は、検出領域での表面プラズモン共鳴 (SPR) 挙動の変化に対応し得る。そのような変化は、SPR 吸収のピークの変化、例えばピークが生じる散乱角の値によって検出され得る。例えば波長または相を基準とした他の SPR 検出パラダイムも、一部の実施形態で当然使用し得る。SPR 測定値を用いて、1つのアッセイ領域から次のものまでの標的物の局所的な濃度の  $0.5 \text{ nM}$  の変化が検出され得る。代替として、個別のアッセイ領域の表面での標的 - プローブ結合

50

の量を定量的に検出するためのいずれの他の適した手段も使用し得、例えば、蛍光または吸収検出（例えばUV吸収）および/または標的物に結合した標識（蛍光のものまたは他のもの）の検出を使用し得る。

【0029】

一部の実施形態では、個別のアッセイ領域の表面での屈折率の変動は、増幅器溶液を用いて増幅し得る。増幅器が結合した標的物と相互作用した際に個別のアッセイ領域での屈折率の変動が増幅するように、増幅器溶液は、アッセイ領域の表面に結合した標的物と相互作用するように用意される。増幅器溶液は、アッセイ領域の表面に順番に結合した標的物に結合するように用意されたものを含み得、例えば標的物に結合して標的特異的増幅をもたらすように官能化された金ナノ粒子、他の適したナノ粒子、二次抗体、およびビーズ

10

【0030】

標的物および/またはプローブ物は、分子または他の適したもの、例えばタンパク質、DNA、ペプチド、酵素、ウイルス、細菌、細胞等であり得る。試料は、血液試料またはいずれの他の液体の生物学的（または他の）試料であり得る。

【0031】

一部の実施形態では、各局所的な測定値は、試料のアッセイ領域との相互作用の前に検出されたベースラインシグナルと、個別のアッセイ領域に結合した標的物と増幅器溶液との相互作用の後に検出された増幅後シグナルとの間の差を含む。例えば、増幅後シグナルは、個別のアッセイ領域を緩衝液で洗浄した後に検出し得る。

20

【0032】

一部の実施形態では、各局所的な測定値は、増幅前シグナルと増幅後シグナルとの差を含む。試料と個別のアッセイ領域との相互作用後に、増幅器溶液と個別のアッセイ領域に結合した標的物との相互作用前に増幅前シグナルが検出される。増幅器溶液と個別のアッセイ領域に結合した標的物との相互作用後に、増幅後シグナルが検出される。増幅前シグナルは試料のバルク試料屈折率からの寄与を含み得る。増幅器の適用に続く洗浄ステップで、非結合増幅器および試料を緩衝液で実質的に洗い流した後に、増幅後シグナルを得てもよい。そのような実施形態では、局所的な測定値のパラメータ化された関数は、増幅前シグナルに影響を与えるが増幅後シグナルに影響を与えない試料のバルク試料屈折率を算定するための調整期間を含み得る。調整期間は、1つ以上の変数パラメータの一部としてデータ点に含わせてもよく、例えば一部の実施形態ではoffsetと共に同時に含わせてもよい。他の実施形態では、試料のアッセイ領域との相互作用前に検出されたベースラインシグナルと、増幅前シグナルとの差に基づいて調整期間を決定し得る。そのような実施形態では、この期間を合わせる必要はないが、調整期間は、局所的な測定値（増幅前と増幅後のシグナルの差）から単に引くことができる。

30

【0033】

増幅前シグナルと増幅後シグナルとの差を含む局所的な測定値を使用することには、局所的な測定値がより短い期間でもたらされ、それ故に比較されるシグナルにおけるいずれのドリフトの効果も低減されるという利点がある。増幅前シグナルへのバルク試料屈折率の寄与を算定する実施形態は、バルク試料屈折率の変化が算定される場合、増幅前の別個の洗浄ステップの必要性を好都合になくす。

40

【0034】

一部の実施形態では、増幅器溶液の濃度は、アッセイアセンブリ（すなわちすべてアッセイ領域）を増幅器で飽和させる程度のものである。

【0035】

一部の実施形態では、増幅器溶液の濃度は、アッセイアセンブリを増幅器で飽和させない程度のものである。そのような実施形態では、局所的な測定値は、標的試料中の濃度並びに増幅器溶液の濃度に依存する。それ故に、試料濃度と増幅器自体の両方からの減少効果が合わせられる。これらの2つの異なる減少プロセスは、パラメータ化された関数で特

50

徴づけられてもよく、例えば、パラメータ化された関数は、増幅器または追加の期間の減少を明らかにするための追加のパラメータを含有する。代替として、または追加して、「Shape」パラメータは、試料濃度および増幅器濃度の両方を変動させるベクトルであり得る。一部の実施形態では、Shapeは、増幅器の変動濃度を捕捉するための位置/上流の結合容量を示す量の関数であり得る。一部の実施形態では、増幅器の濃度の効果は、アッセイアセンブリ中に存在するプローブ物の密度の効果と同種であると考えることができる。したがって、例えば、 $DZ_i$ の値は、後に詳細に説明するように、アッセイアセンブリの相対結合容量を考慮するように $DZ_i$ をどのように調整するかと同様に、増幅器濃度を明らかにするように調整し得る。

【0036】

増幅器を非飽和条件で使用することは、増幅器の量の減少が必要となり、それ故にコストが低減するという利点がある。

【0037】

一部の実施形態では、アッセイ領域は、標的物に対して同じ結合容量を有する。

【0038】

一部の実施形態では、アッセイ領域は標的物に対して異なる結合容量を有する。一部の実施形態では、 $DZ_i$ は、アッセイアセンブリの位置*i*の上流のプローブ物の量を示す。

【0039】

アッセイ領域は、マイクロ流体回路で連結し得る。一部の実施形態では、アッセイ領域間の回路は、標的物に対する結合容量としてである。

【0040】

順番における個別のアッセイ領域を囲む隣接したチャンパーにチャンパーの対の間の導管によって連結されたチャンパーそれぞれに、アッセイ領域はそれぞれ位置し得る。各アッセイ領域は、チャンパーの一部を占め得、ここで、局所的な測定値は、それぞれの部分でもたらされる。代替として、アッセイ領域は、チャンパー全体を占め得る。一部の実施形態では、例えば近接している官能化された表面の一部として、複数のアッセイ領域が単一のチャンパー内で設けられ、該アッセイ領域は、単に測定が行われる位置によって定められる。

【0041】

各局所的な測定値は、増幅器溶液が個別のアッセイ領域と相互作用する割合を示し得、例えば定められた点での測定シグナルの変化の割合として測定される。

【0042】

各局所的な測定値は、個別のアッセイ領域への増幅器溶液の導入から閾値シグナル振幅、例えば最大シグナル振幅の検出までにかかった時間を示す測定値を含み得る。

【0043】

一部の実施形態では、アッセイデータの入手は、局所的な測定の実施を含み得る。代替として、アッセイデータは第3者から得てもよい。

【0044】

第2の態様では、試料中の標的物の試料濃度を決定するためのシステムが提供される。該システムは、アッセイアセンブリを用いるアッセイからのアッセイアセンブリの複数のアッセイ領域のそれぞれに固定化されている標的物の局所的な濃度を示す個別の局所的な測定値のデータ点を含むアッセイデータ得るように配置された処理装置を含み、アッセイ領域は、アッセイアセンブリを流れる試料が順番に各アッセイ領域を流れるように直列に連結され、各アッセイ領域はアッセイ領域の表面に固定化されている複数のプローブ物を含み、プローブ物は、試料がアッセイ領域の1つから次のものまで流れる際に標的物の濃度が減少するように、標的物に結合するように配置される。また、処理装置は、順番における個別のアッセイ領域の位置を示す量に対する局所的な測定値のパラメータ化された関数で、アッセイデータをモデル化するように配置され、ここで、1つ以上のパラメータは試料濃度に依存する。処理装置は、さらに、1つ以上のパラメータの少なくとも1つに基づいて試料濃度を示す値を決定するように配置される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 5 】

第3の態様では試料中の標的物の試料濃度を決定する方法が提供される。該方法は、アッセイアセンブリを用いるアッセイから試料をアッセイアセンブリに導入するステップを含み、アッセイアセンブリは複数のアッセイ領域を含み、アッセイ領域は、アッセイアセンブリを流れる試料が順番に各アッセイ領域を流れるように直列に連結され、各アッセイ領域はアッセイ領域の表面に固定化されている複数のプローブ物を含み、プローブ物は、試料がアッセイ領域の1つから次のものまで流れる際に標的物の濃度が減少するように、標的物に結合するように配置される。試料はアッセイアセンブリに流され、局所的な測定が各アッセイ領域で実施されて、アッセイアセンブリの複数のアッセイ領域のそれぞれに固定化されている標的物の局所的な濃度を示す個別の局所的な測定値のデータ点を含むアッセイデータが得られる。アッセイデータは、順番におけるアッセイ領域の位置を示す量に対する局所的な測定値のパラメータ化された関数でモデル化され、ここで、1つ以上のパラメータは試料濃度に依存する。試料濃度を示す値は1つ以上のパラメータの少なくとも1つに基づいて決定される。

10

## 【 0 0 4 6 】

さらなる態様では、試料中の標的物の試料濃度を決定するためのシステムが提供される。該システムは、アッセイアセンブリを流れる試料が順番に各アッセイ領域を流れるように直列に連結された複数のアッセイ領域を含むアッセイアセンブリを含み、ここで、各アッセイ領域は、アッセイ領域の表面に固定化されている複数のプローブ物を含み、プローブ物は、試料がアッセイ領域の1つから次のものまで流れる際に標的物の濃度が減少するように、標的物に結合するように配置される。該システムは、各アッセイ領域で局所的な測定を実施して複数のアッセイ領域のそれぞれに固定化されている標的物の局所的な濃度を示す個別の局所的な測定値のデータ点を含むアッセイデータを得るように配置された少なくとも1つの検出器をさらに含む。該システムは、順番におけるアッセイ領域の位置を示す量に対する局所的な測定値のパラメータ化された関数でアッセイデータをモデル化するように配置された処理装置をさらに含み、ここで、1つ以上のパラメータは試料濃度に依存する。また、処理装置は、1つ以上のパラメータの少なくとも1つに基づいて試料濃度を示す値を決定するように配置される。

20

## 【 0 0 4 7 】

一部の実施形態では、複数のアッセイ領域で、例えば検出器およびアッセイ領域の1つを残りのものに対して動かすことによって局所的な測定を実施するための単一の検出器が設けられる。代替として、アッセイ領域ごとに検出器を設けられ得る。

30

## 【 0 0 4 8 】

さらなる態様では、試料中の標的物の試料濃度を決定する方法が提供される。該方法は、アッセイアセンブリのアッセイ領域に固定化されている標的物の局所的な濃度を示す局所的な測定値を含むアッセイデータを、アッセイアセンブリを用いるアッセイから得るステップを備え、ここで、アッセイ領域はアッセイ領域の表面に固定化されている複数のプローブ物を含み、プローブ物は標的物に結合するように配置されている。増幅器溶液とアッセイ領域の表面に結合した標的物との相互作用の後に増幅した変動のような、アッセイ領域の表面での屈折率の変動を示すシグナルに局所的な測定値は基づいている。局所的な測定値は、増幅前シグナルと増幅後シグナルとの差を含み、ここで、増幅前シグナルは、試料とアッセイ領域との相互作用の後に、かつ増幅器溶液とアッセイ領域に結合した標的物との相互作用の前に検出され、増幅後シグナルは、増幅器溶液とアッセイ領域に結合した標的物との相互作用の後に、かつアッセイ領域を緩衝液で洗浄した後に検出される。該方法は、試料のバルク試料屈折率を考慮するように、調整期間を用いて局所的な測定値を調整するステップと、調整した局所的な測定値を用いて試料濃度を示す値を決定するステップとをさらに含む。

40

## 【 0 0 4 9 】

一部の実施形態では、調整期間は、試料とアッセイ領域との相互作用の前に検出されたベースラインシグナルと、増幅前シグナルとの差に基づいて決定される。ここで、上記の

50

試料のバルクのバルク試料屈折率の寄与に対する補償に関する特徴が同等に適用可能である。

【0050】

さらなる態様では、試料中の標的物の試料濃度を決定するためのアッセイアセンブリが提供される。該アッセイアセンブリは、アッセイアセンブリを流れる試料が各アッセイ領域を順番に流れるように連続的に接続された複数のアッセイ領域を含む。各アッセイアセンブリは、複数のアッセイ領域におけるアッセイ領域の対ごとに入口と出口とを含み、アッセイアセンブリを流れる試料が、複数のアッセイ領域におけるアッセイ領域の対ごとに、連結部分を介して第1のアッセイ領域から第2のアッセイ領域まで流れるように、第1のアッセイ領域の出口は、連結部分によって第2のアッセイ領域の入口に連結されている。さらに、各アッセイ領域は、アッセイ領域の表面に固定化されている複数のプローブ物を含み、プローブ物は、試料がアッセイ領域の1つから次のものまで流れる際に標的物の濃度が検出可能に減少するように、標的物に結合するように配置される。

10

【0051】

試料がアッセイアセンブリを通過する際、試料の流れは、拡散または他の混合効果を実質的に無視できるような層流であり得る。そのような場合、チャンバー表面に隣接した試料の一部内の標的物のみ、プローブ物との結合に利用できるだろう。試料が、試料の層流により、1つのチャンバーから次のチャンバーまで拡散を制限するのに十分に速く通過する場合、試料の同じ部分が各チャンバーの表面に隣接し、試料の同じ部分に存在する標的物のみが結合に利用可能である。それ故に、試料が1つのチャンバーから次のチャンバーまで流れる際に、各表面に隣接した試料の一部における標的物の濃度が減少する。減少は、試料のバルク中の標的物のほんの一部のみであり得る一方で、拡散が制限された層流により、標的物の減少は濃度の有意な検出可能な変化を表す。

20

【0052】

さらなる態様では、上記のアッセイアセンブリを含むマイクロ流体デバイスが提供される。

【0053】

上記の特徴のそれぞれは、説明した各態様に適用し得ることが理解される。簡潔に表現するために、すべての可能な組み合わせが本明細書で詳細に説明されていない。

【0054】

ほんの一例として、具体的な実施形態を添付の図面を参照しながら以下に説明する。

30

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1】アッセイアセンブリを含むデバイスの略図である。

【図2】図2 aは、図1のアッセイアセンブリのアッセイ領域における標的 - プローブ結合の断面の略図である。図2 bは、図1のアッセイアセンブリのアッセイ領域における増幅器 - 標的結合の断面の略図である。

【図3】試料中の標的物の濃度を決定するためのシステムの略図である。

【図4】減少マスター曲線のグラフである。

【図5】実験データを用いた図4の減少曲線のグラフである。

40

【図6】試料中の標的物の濃度を決定する方法を示すフローチャートである。

【図7】経時的な応答振幅の変動を示し、局所的な測定値  $G_{31}$ 、 $G_{32}$  および  $G_{21}$  を示すセンサーグラムである。

【図8】経時的な応答振幅の変動を示し、局所的な測定値  $G_{amp}$  を示すセンサーグラムである。

【図9】経時的な応答振幅の変動を示し、局所的な測定値  $G_t$  を示すセンサーグラムである。

【発明を実施するための形態】

【0056】

図1を参照すると、遠心力または「ラボオンディスク (lab on a disc)

50

」マイクロ流体デバイス2が軸4まわりの回転のために配置されている。典型的には、マイクロ流体デバイス2は、外径が120mm、厚さが~1.2mmであり、ディスクの中心の穴の寸法が直径15mmであるマイクロ流体ポリカーボネートディスクである。ディスクは、薄膜ポリマーによって一緒になって結合される2つの0.6mmディスクを含む。図1に示され、以下に説明するマイクロ流体の特徴は、ディスクおよび薄膜の1つで定められる。2つのディスクの他方は、後述するように金でコーティングした回析格子が設けられているSPR領域を含む。ディスク2は、複数のチャンバーにおけるチャンバーのそれぞれの対が管10で連結されるように直列に配置されている複数のチャンバー8を有するアッセイアセンブリ6を含む。チャンバーは、SPR領域と並ぶ。試料、例えば血液または他の液体が、アッセイアセンブリ6に、一連の第1のチャンバー8の入口を形成する流入管14を介して導入され、試料が、一連の最後のチャンバー8の出口を形成する放水管12を介してアッセイアセンブリから離れる。各チャンバー8は0.02mmの深さであり、ディスクの中心から50mmの距離に配置されている。各チャンバーは、典型的には容積が約50nlであり、アッセイアセンブリおよびデバイスは、約100μlの液体がアッセイアセンブリを約5~6分で流れることができるように配置されている。

10

20

30

40

50

#### 【0057】

図2aを参照すると、単一のチャンバー8が記載されている。チャンバー8は、試料が連結管10（または一連の第1のチャンバーの場合、流入管14）からチャンバー8に入り得る入口16と、連結管10（または一連の最後のチャンバーの場合、放水管12）を介して試料がチャンバー8から離れ得る出口18とを含む。試料がチャンバーを通過する際、試料は、入口16から出口18までのチャンバーを図2a中の矢印「F」で示される方向で流れる。

#### 【0058】

チャンバー8は、高さが100nmであり、周期が1600nmである正弦波形状の格子（図示せず）を含む表面20を有する。表面20は、金でコーティングされており、金表面上に固定化されているプローブ物22の単層を有する。標的物24を含む試料がチャンバー8を流れる際に、試料中の特定の標的物24がチャンバー表面20のプローブ物22に結合するように、各プローブ物22は、チャンバー8を通過した試料中に存在し得る特定の対応する標的物24に特異的に結合する能力を有する。

#### 【0059】

試料がアッセイアセンブリを通過する際、試料の流れは、拡散または他の混合効果がアッセイアセンブリを通じて実質的に無視できる程度十分な速度の層流である。したがって、チャンバー表面20に隣接した試料の一部における標的物24のみ、プローブ物22との結合に利用可能である。試料が1つのチャンバー8から次のチャンバーまで通過する際、試料の層流により、試料の同じ部分が各チャンバー8の表面20に隣接し、それ故に試料の同じ部分に存在する標的物24のみ結合に利用可能である。このように、各表面20に隣接した試料の一部における標的物24の濃度が、試料が1つのチャンバー8から次のチャンバーまで流れる際に減少する。

#### 【0060】

薄層のみのプローブ物が結合に利用可能であることにより、1つのチャンバーから次のチャンバーまでのプローブ物に結合した標的物の濃度変化が、SPR法を用いて検出可能である。例えば、表面20に隣接した液体層の濃度の検出可能な変化は、チャンバー8中の1つの点から次のチャンバー8中の対応する点まで、0.5nMであり得る。

#### 【0061】

図3を参照すると、試料中の標的物24の濃度を決定するためのシステム26が記載されている。システム26は、上記のアッセイアセンブリ6を含むマイクロ流体デバイス2を含む。光源28が設けられ、チャンバー8の表面20の検出域30に放射光が入射するように位置合わせされている。典型的には、光源28は偏光単色光源、例えばダイオードレーザーである。使用時には、検出域30への入射光線が表面20から反射され、反射した光線が検出器32によって検出される。検出器32は、時間に対する角度の関数として

反射した光線の光度を測定するように配置されている。

【0062】

システムは、試料を含む種々の液体をデバイス2に導入し、定められた順序でアッセイアセンブリ6を流れるように、制御器の制御下でデバイス2を回転して、デバイス2内の液体の流れを駆動するための駆動装置をさらに含む。駆動装置は、明確とするために図3中に図示していないが、液体の流れをどのように制御し得るかについての更なる詳細は、国際公開第2011/122972号および国際公開第2012/131556号で見ることができ、これらの内容を参照によって本明細書に組み込む。

【0063】

使用時には、結合した標的物または結合した標的 - 増幅器複合体（下記参照）の存在による検出領域30の表面20での屈折率の変化は、表面20の共振挙動の変化、具体的には表面プラズモン共鳴挙動の変化を引き起こす。これは、時間の関数として反射した光にて光度の最小値が生じる角度の変化を検出することによって検出できる。チャンパー8の表面20におけるプローブ物22への標的物24の結合は、表面20での屈折率の変化を引き起こす。したがって、チャンパー8の表面20における標的 - プローブ結合の量を、チャンパーの表面20での屈折率の変化を検出することで、例えば表面プラズモン共鳴が生じる角度の変化を検出することで定量的に決定できる。一部の実施形態では、表面プラズモン効果を決定するための別のアプローチを使用し得る。SPR測定法の例は、Jiri Homola, "Surface Plasmon Resonance for Detection of Chemical and Biological Species", Chem. Rev. 108, pages 462 - 493 (2008) に記載されており、この文献の内容を参照によって本明細書に組み込む。

10

20

【0064】

試料が1つのチャンパー8から次のチャンパーまで流れる際の標的物24の局所的な濃度の減少は、図4に示されるマスター減少曲線35の一部を、その一部を定める試料の開始濃度によって確立すると考えることができる。マスター減少曲線35は、順番におけるチャンパー8の位置の上流のプローブ物の量を示す量に対する、個別のチャンパー8の表面20での標的物24の濃度を示す局所的な測定値の変動を特徴付ける。

【0065】

マスター減少曲線35は、標的物の濃度が非常に高い試料が導入される限定されない数の概念上のチャンパー（それ故に検出域）を有する仮説上のシステムを考慮することによって概念的に理解され得る。試料がアッセイアセンブリに導入された際、順番における最初のチャンパーが標的物で飽和され、それ故に局所的な測定値の最大振幅 $DP_{max}$ で測定シグナルが飽和する。試料が試料チャンパーを順番に流れる際標的物の量が逐次減少し、各チャンパーでの局所的な測定値の振幅が低減する。試料が更なるチャンパーを流れる際、標的物の量がさらに減少し、局所的な測定値の振幅が最小振幅 $DP_{min}$ に達する。その後、残りの概念上のチャンパーについての局所的な測定値は、この最小振幅でほぼ一定である。

30

【0066】

マスター減少曲線35は、試料の異なる開始標的物濃度で、一定の減少特性を有するアッセイアセンブリを用いて実施した複数の実験からの実験上のまたは仮説上のデータを考慮することによって理解され得る。減少特性は、とりわけ、流体の特徴を含む因子、例えばアッセイアセンブリ6を通る試料の流速、チャンパー8の高さおよび幅、および検出回路の長さ；認識層の特徴、例えばプローブ物22の密度、標的物24に対するプローブ物22の結合活性および親和性；並びに標的物24の特徴、例えば拡散係数によって決定される。実験を実施するのに使用されるアッセイアセンブリは、典型的には5～10個のチャンパーを有し、したがって、得られた減少データが、上述したように、マスター減少曲線の部分のみを代表する。

40

【0067】

図5を参照すると、マスター減少曲線は、既知の開始濃度の範囲で実施した実際の実験

50

または概念上の実験からのデータを組み合わせた曲線としてさらに理解され得る。得られたデータは、一緒に「縫合」されてマスター減少曲線を形成するものとして考えられ得る。別の実験での特定のチャンパーが同じまたは類似の局所的な標的濃度を有するという実験データのセットが「重複する」場合、データセットは、滑らかな線が得られるまでx軸に沿って概念上「シフト」され得る。

【0068】

図5に示した例では、マスター減少曲線は、4つの実験(i)~(iv)に由来する組み合わせた減少曲線として考えられ得る。各実験は、5つのチャンパーを含むアッセイアセンブリを用いて実施され、それ故に5つのデータ点を含むデータセットが各実験から得られる。実験(i)で使用した標的物の開始濃度は、(ii)で使用したものより高く、(ii)で使用したものは、(iii)で使用したものより高く、(iii)で使用したものは(iv)で使用したものより高い。各実験の開始濃度の情報を用いて、データセットを一緒に「縫合」してマスター減少曲線を形成することができる。

10

【0069】

マスター減少曲線はパラメータ化された関数で表される。具体的な実施形態では、関数はロジスティック関数である。

【0070】

パラメータ化された関数は、チャンパー8の順番内の位置、それ故に検出域または領域を示す量、より具体的には、順番におけるチャンパー8の位置iの上流のプロープ物の量  $DZ_i$  に対する個別のチャンパーで生じた局所的な測定値の振幅DPをモデル化する。一部の実施形態では、位置および量の数量は本質的に同じであり、一部のスケールリングのために保存する。各チャンパーでの量が一定ではない他の実施形態では、以下に説明するように、関係がより複雑であり得る。

20

【0071】

$DZ_i$ の値の例を下記表1、2、3および4に示し、表中、「#DZ」は順番におけるチャンパーの位置(それ故に検出域)であり、「DZ容量」は標的物に結合するためのチャンパーの相対容量であり、「 $DZ_i$ 」は、順番におけるチャンパーの位置i(当然順番内の位置の指標でもある)の上流のプロープ物の量を示す値である。 $DZ_i$ は、パラメータ化した関数で使用される。表1~4に示される例のそれぞれにおいて、各チャンパーの中心で検出が行われる。表1は、チャンパーがそれぞれ標的物を結合するための同じ相対容量(例えば標的物を結合するための上記プロープ物の同じ量)を有する場合を示す。この例では、使用した $DZ_i$ の値は0.5、1.5、2.5、3.5および4.5である(0.5オフセットが検出領域の上流の各チャンパーにおいて生じる結合を表すものである)。

30

【表1】

#DZ	1	2	3	4	5
DZ容量	1	1	1	1	1
適合のためのDZi	0.5	1.5	2.5	3.5	4.5

40

【0072】

表2は、チャンパーの相対容量が1つのチャンパーから次のチャンパーまで倍になる場合を示す。チャンパーの相対容量におけるこの違いは、使用した $DZ_i$ の値で説明される。

【表 2】

#DZ	1	2	3	4	5
DZ容量	1	2	4	8	16
適合のためのDZ <sub>i</sub>	0.5	2	5	11	23

## 【0073】

表 3 は、1 番目、4 番目および 5 番目のチャンバーが 1 の相対容量を有し、2 番目および 3 番目のチャンバーが 2 の相対容量を有する場合を示す。この場合もやはり、相対容量におけるこの違いは、 $DZ_i$  の調整によって説明される。

【表 3】

#DZ	1	2	3	4	5
DZ容量	1	2	2	1	1
適合のためのDZ <sub>i</sub>	0.5	2	4	5.5	6.5

## 【0074】

チャンバーは、マイクロ流体回路で連結され得る。一部の実施形態では、チャンバーは、標的物に対する結合能力を有するチャンバーの間のマイクロ流体回路で連結される。表 4 は、アッセイ領域が 1 の相対結合容量を有し、チャンバー間の回路が、0.5 の相対容量を有する場合を示す。回路では検出は実施されない。この場合、 $DZ_i$  は、システムの相対容量を算定するように、表 4 に従って調整される。

【表 4】

#DZ	1	2	3	4	5
DZ容量	1	2	2	1	1
適合のためのDZ <sub>i</sub>	0.5	2.5	5	7	8.5

## 【0075】

アッセイアセンブリおよびその減少特性、 $DP_{max}$  および  $Shape$  に関し、所与のアッセイアセンブリおよびアッセイについて一定である定数をパラメータ化された関数は含む。また、試料の開始濃度を示す、試料中の標的物 2 4 の濃度に依存するパラメータ  $Offset$  も関数は含む。パラメータ  $Offset$  は、パラメータ化した関数を実施した実験それぞれでのデータ点に合わせることによって決定される。

## 【0076】

上記の概念上のおよび例証の説明では、 $Offset$  は、マスター減少曲線上の実際のチャンバー / 検出領域でのデータ点の位置を決定する。

## 【0077】

図 4 を参照すると、 $Offset$  は、マスター減少曲線が x 軸に沿ってシフトした程度を示す値と理解できる。例えば、標的濃度が低い試料では、順番中の第 1 のチャンバーで得られる局所的な測定値は、相応に低い測定値  $DP_1$  である。マスター減少曲線をこの実験データに合わせるには、局所的な測定値  $DP_1$  が第 1 のチャンバー  $i = 1$  を示す  $DZ_i$  の値に対応するようにシフトしなければならない。これは、図 4 中、 $DZ_1 = 0.5$  で示される。マスター減少曲線がシフトしなければならない量であり、得られたアッセイデータを合わせるために、方向が試料の標的濃度に依存するだろう。したがって、 $Offset$  の値は、パラメータ化した関数、およびそれ故にマスター減少曲線を、アッセイアセンブリにおける各チャンバーで得られる個別の局所的な測定値に合わせるによって決定される。

## 【0078】

10

20

30

40

50

パラメータ化した関数は、下記等式(5)で表される。

【数7】

$$DP = \frac{2 \times DP_{\max}}{1 + \exp[\text{Shape} \times (DZ_i + \text{Offset})]} \quad (5)$$

【0079】

図4について上述したように、 $DP_{\max}$ は、アッセイアセンブリの第1のチャンバ-8で得ることができ、実験を通じて一定のままである局所的な測定値の最大振幅である。パラメータ $\text{Shape}$ は、試料が1つのチャンバ-から次のチャンバ-まで流れる際に、チャンバ-表面での標的物の濃度が減少する割合を示す。この値は、アッセイアセンブリの減少特性に依存し、所与のアッセイアセンブリおよびアッセイのための実験を通じて一定のままであり、 $\exp$ は、典型的にはオイラー数 $e$ であるが、いずれの他の適した基数も他のパラメータで対応する調整を行って使用し得る。

10

【0080】

上記で説明したように、 $DZ_i$ は、順番におけるそれぞれのチャンバ-の位置 $i$ の上流のプローブ物の量を示す値に対応する。図2aを参照すると、各チャンバ-8での検出域30が、チャンバ-表面20の中心の一部である。したがって、この配置では、チャンバ-ごとに、 $DZ_i$ は、正の半整数値、すなわち0.5、1.5、2.5、3.5等を取り得る。代替として、 $DZ_i$ は、整数値、またはアッセイアセンブリにおけるチャンバ-の位置の上流のプローブ物の量を示すいずれの他の適した値を取り得る。

20

【0081】

$\text{Shape}$ および $DP_{\max}$ の定数は、実験を実施して試料濃度を決定する前にアッセイアセンブリのバッチを特徴付けることによって決定される。各アッセイアセンブリは、1回のみ使用され、それ故にアセンブリのバッチを特徴付けるための実験が、同じ製造バッチからの個別のアッセイアセンブリを使用して、マイクロ流体装置2のバッチを特徴付けることで実施される。 $\text{Shape}$ および $DP_{\max}$ の決定した値は、既知の試料濃度の試料または標的物を有するバッチの他のアセンブリを用いる検証実験によって、バッチを表すものとして検証される。次に、決定した値は、例えば、包装で示してデバイス2を積むか、またはバーコードまたはこの情報を運ぶための他の適した手段を用いて、値を示すようにデバイス2自体をマーキングすることによって、マイクロ流体装置2と関連付けられる。包装および/またはディスクは、この情報を直接運び得るか、またはネットワーク、例えばインターネットを通じたアクセスのためにこの情報が保存される遠隔位置へのリンクを運び得る。

30

【0082】

これらの値は、アッセイアセンブリについて、すべての個別の局所的な測定値にわたって一定である。でまとめて表される $DP_{\max}$ および $\text{Shape}$ は、既知の標的物の開始濃度(所定の濃度の範囲にわたる濃度)をそれぞれ有し、複数のアッセイ領域 $i$ を有するアッセイアセンブリを用いてそれぞれ実施される複数の実験 $j$ から得られた既知の実験データを用いて決定される。 $DP_{\max}$ および $\text{Shape}$ は、下記の総和を最小化することによって決定される：

40

【数8】

$$\sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^n [DP(DZ_i) - f_x(DZ_i + \text{Offset})]^2 \quad (6)$$

式中、 $DP(DZ_i)$ は、アッセイ領域 $i$ での局所的な測定値であり、 $f$ は、定数を有するパラメータ化された関数の対応する値である。 $m$ 回の実験からのデータが使用され、各実験は、 $n$ 個のアッセイ領域を有するアッセイアセンブリを用いて実施されたものである。一部の実施形態では、 $\text{Shape}$ および $DP_{\max}$ のパラメータは、いずれの適した最適化法、例えば最小二乗法、勾配降下法、回帰法またはカイ二乗最小化法を用いて決定される。上記総和(6)から、「Offset」も複数の実験 $j$ ごとに決定され、それ故

50

に、「Offset」と標的物の開始濃度との間の関係が決定される。複数の実験  $j$  ごとの  $Offset_j$  と濃度  $Concentration_j$  との間のこのような関係は、較正関数を適合させるのに使用できるデータ点  $\{Concentration_j, Offset_j\}$  を定める。さらに以下に説明するように、この較正関数を用いて、Offset の値に基づいて試料濃度を決定する。

【0083】

特徴付けられた（決定した）についての値）バッチからのアセンブリを用いて、試料中の標的物の未知の濃度を見出すためのアッセイ実験が実施される。Offset の値は、試料の開始濃度の指標を提供するために、所与の実験からのアッセイデータに適合される。疑いを避けるために、本明細書で「開始濃度」とは、試験される試料中の標的物の濃度を指すものとして理解すべきである。パラメータ化された関数は、下記の総和を最小化することによって決定されるアッセイデータおよび Offset の値に適合され得る：

10

【数9】

$$\sum_{i=1}^n [DP(DZ_i) - f(DZ_i + Offset)]^2 \quad (7)$$

式中、 $DP(DZ_i)$  は、アッセイ領域  $i$  での局所的な測定値であり、 $f$  はパラメータ化された関数の対応する値である。このようなコスト関数またはいずれの適したコスト関数の最小化は、パラメータ化された関数のアッセイデータへの最良の適合を得るように実施できる。一部の実施形態では、最小二乗回帰の最小化法が、カイ二乗試験を用いて使用され、有効である。

20

【0084】

Offset の値が、パラメータ化された関数を得られた実験データに適合させることによって決定されると、試料の開始標的濃度を示す値が較正関数を用いて決定できる。

【0085】

較正関数は、第1の関数および第2の関数を含む。第1の関数  $f_1$  が、標的濃度が高いことが知られている試料についての標的濃度を決定するのに使用され、「Offset」の関数であり、例えば  $f_1$  は、上記のデータ点  $\{Concentration_j, Offset_j\}$  へ適した関数を適合させることによって見出し得る。第2の関数  $f_2$  が、標的濃度が低いことが知られている試料についての標的濃度を決定するのに使用され、システムによって得られる減少していない測定値の関数、言い換えれば、 $DZ_i = 0$  の場合の仮説上の局所的な測定値の関数である。したがって、第2の関数は、下記式(8)の関数である：

30

【数10】

$$\frac{2 \times DP_{\max}}{1 + \exp[Shape \times Offset]} \quad (8)$$

【0086】

一部の実施形態では、第1および第2の関数は、下記等式(9a)および(9b)によって示されるような指数関数の形態で表される。

40

【数11】

$$f_1 = X_1 + Y_1 \exp[-Z_1 \times Offset] \quad (9a)$$

【数12】

$$f_2 = X_2 + Y_2 \exp[+Z_2 \times DP(DZ_i = 0)] \quad (9b)$$

【0087】

50

$DP(DZ_i = 0)$  は  $DZ_i = 0$  の場合の局所的な測定値の振幅である。パラメータ  $X_{1,2}$ 、 $Y_{1,2}$  および  $Z_{1,2}$  は、実験データへ上記と同様に適合させることによって得られる。

【0088】

一部の実施形態では、試料濃度の決定は反復プロセスである。例えば、第1のステップを最初に適用した後、より精密な結果をもたらす第2のステップを適用してもよい。具体的には、一部の実施形態では、第1の関数を第1のステップで使用して、濃度を示す値を決定する。値が閾値未満である場合、第2のステップは第2の校正関数を用いて値を再計算する。一部の実施形態では、順序を逆にし、第1のステップからの（第2の関数からの）値が閾値を超える場合、第1の関数を第2のステップで使用する。

10

【0089】

代替として、一部の実施形態では校正関数は、Offsetを試料の標的濃度に関連付ける単一の関数である。

【0090】

一部の実施形態では、Offsetに対する試料濃度の校正曲線は、ロジスティック関数、例えば4PL非線形回帰モデルである。4PLモデルの場合、試料濃度は、(Offset、a、b、c、d)の関数であり、ここで、a、b、cおよびdは、最小化法、例えばカイ二乗最小化法、および上記の実験データを用いて得ることが可能なモデルのパラメータである。

【0091】

試料中の標的物の濃度を決定する方法の概略を図6を参照して説明する。第1のステップ36では、アッセイデータが得られる。得られたアッセイデータは複数のデータ点を含み、各データ点は、個別のチャンバー8で実施した局所的な測定に対応する。局所的な測定値は、チャンバーそれぞれの表面での屈折率の変化の検出に関連し、個別のチャンバー8の表面20での標的物24の濃度を示す。アッセイデータは、上記のように、第2のステップ38でパラメータ化された関数によってモデル化され、パラメータ化された関数は、試料中の標的物の濃度に依存するパラメータOffsetを含む。その後、試料中の標的物の濃度を示す値が、上記の第1および第2の校正関数を用いて、「Offset」に基づいて第3のステップ40で決定される。ステップ38の前のいくつかの点で、例えばデバイス2をシステム26に搭載する場合、上記のように、パラメータが、例えば手入力

20

30

【0092】

上記および図3に示されるシステム26を用いて、アッセイデータを得る。最初に、緩衝液がアッセイアセンブリ6にベースラインとして流され、続いて試験される試料、増幅器溶液、最後に第2の緩衝液を有する洗浄液が流される。図7を参照すると、個別のチャンバー8それぞれについて、検出されたシグナルの振幅、例えば表面プラズモン共鳴が発生する角度の変化が、チャンバー表面20での屈折率の変化の大きさに正比例して増加するようなチャンバー表面20での屈折率の変化が検出器32によって検出できる。

【0093】

個別のチャンバー8ごとに、緩衝液がチャンバー8を流れると、ベースライン測定値42が検出領域30のために測定される。その後、ある量の標的物24を含む試料がチャンバー8に導入される。標的物24がチャンバーの表面20でプローブ物22に結合する際、表面20での屈折率が変化し、結果として、検出領域30についての測定したシグナルの振幅の増加44aがある。一部の 경우에는、一部の標的-プローブ結合は可逆であり、それ故に検出領域30について測定したシグナルの振幅の減少44bが定常状態に達するまで生じ得る。そのような減少は、試料中の標的物24の濃度が非常に高い場合には見ることができない。

40

【0094】

図2bおよび図7を参照すると、続いて、増幅器溶液がチャンバー8に流される。増幅

50

器溶液中の活性成分 2 5 が標的物 2 4 に結合し、次にプローブ物 2 2 に結合する。結合した標的物が増幅器で飽和する程十分に高い濃度の増幅器がチャンバー 8 に流される。

【 0 0 9 5 】

これは、チャンバー 8 の表面 2 0 での屈折率へのさらなる変化をもたらし、結果として検出領域 3 0 について測定したシグナルの振幅の増加 4 6 a がある。標的 - プローブ結合と同様に、一部の場合では、一部の増幅器 - 標的結合が可逆であり、それ故に検出領域 3 0 について測定したシグナルの振幅の減少 4 6 b が定常状態に達するまで生じ得る。そのような減少は、増幅器中の活性成分の濃度が非常に高い場合には見ることができない。

【 0 0 9 6 】

最後に第 2 の緩衝液がチャンバー 8 に流されて、いずれの残存する非結合の試料または増幅器も洗い流す。結果として、検出領域 3 0 について測定したシグナルの振幅は一定のまま 4 8 である。局所的な測定値は、多くの適した測定値のいずれかであってもよく、それらの一部は下記の実施形態でより詳細に説明される。

10

【 0 0 9 7 】

代替として、アッセイデータをいずれの他の適した手段によって得てもよく、また事前に行ったアッセイから得てもよく、場合により第三者によって実行されたアッセイから得てもよい。

【 0 0 9 8 】

アッセイデータを得たら、それをパラメータ化された関数でモデル化し、「Offset」の値を上記のように決定する。アッセイアセンブリの定数  $DP_{max}$  および  $Shape$  の特徴は、上記の方法を用いて事前に決定され、マイクロ流体デバイス自体に、例えばバーコードを用いてマーキングされている。パラメータ化された関数は、個別のチャンバー 8 それぞれで実施した局所的な測定値を量  $DZ$  に対してモデル化する。測定したデータのパラメータ化された関数への適合の質は、例えば、カイ二乗最小化法を用いて、またはいずれの他の適した手段を用いて、適合のためにピアソンの係数を計算することによって評価される。適合の質は、それが閾値を満たすのに十分に良好でない場合にはデータが処分されるように所定の閾値と比較される。

20

【 0 0 9 9 】

Offset の値を、パラメータ化された関数を得られたアッセイデータに適合させることによって決定したら、試料の標的濃度を示す値を上述したように較正関数を用いて決定できる。

30

【 0 1 0 0 】

実施形態 1

第 1 の実施形態では、局所的な測定が、図 7 で検出点 1 として示される  $B_1$  で試料がチャンバー 8 に流される前に得られたベースライン応答の振幅を検出し、図 7 で検出点 3 として示される  $B_3$  で第 2 の緩衝剤がチャンバー 8 を流れた後の応答の振幅を検出し、2 つの応答の間の差  $\Delta_{31} = B_3 - B_1$  を決定することによって、アッセイアセンブリ中の個別のチャンバー 8 それぞれで実施される。

【 0 1 0 1 】

したがって、個別の局所的な測定値それぞれについてのパラメータ化された関数は、下記等式 ( 1 0 ) によって与えられる。

40

【 数 1 3 】

$$\Delta_{31} \cong \frac{2 \times DP_{max\_amp}}{1 + \exp[Shape \times (DZ_i + Offset)]} \quad (10)$$

【 0 1 0 2 】

式中、 $DP_{max\_amp}$  は、増幅器とチャンバー 8 との相互作用の後のチャンバー 8 での局所的な測定値の最大振幅である。この場合、チャンバー中のバルク溶液が緩衝液である（すなわち各測定でのバルク溶液が同じ屈折率を有する）場合に測定  $B_1$  および  $B_3$

50

が行われることから、 $DZ_i$  がより大きくなると、 $DP$  はゼロになる傾向があり、それ故にマスター曲線 / パラメータ化した関数の振幅  $DP_{min}$  はゼロである。

【0103】

実施形態 2

実施形態 1 で説明したアプローチでの潜在的な欠点は、例えば温度の変動、システムの振動等により、比較されるシグナルのドリフトが存在し得ることである。表面プラズモン共鳴の例では、シグナルは検出表面近くの局所的な屈折率に依存する。したがって、そのようなシグナルは、(i) 特定の密度で標的物がプローブに結合しているプローブ / 標的層；(ii) 周囲の液体；(iii) チャンバーの表面に存在する金属、例えば金からの寄与を含む。これらの 3 つの寄与の屈折率は、温度に依存し、それ故に、温度のドリフトが、検出されたシグナルのドリフトを引き起こす。類似のドリフト効果が、システムの機械的振動によって生じる。

10

【0104】

これは図 7 に示されている。このドリフトの結果として、システムのノイズレベルがより高くなり、結果として、検出能力が低下する。これを克服するために、以下に説明するように、局所的な測定値  $_{32}$  が  $_{31}$  の代わりに使用できる。

【0105】

局所的な測定  $_{32}$  が、アッセイアセンブリ中の個別のチャンバー 8 のそれぞれで実施される。 $_{32}$  は、図 7 中の検出点 2 として示される、試料とチャンバー表面 20 との相互作用後に、かつ表面に結合した標的物と増幅器との相互作用前に、応答の振幅  $B_2$  を検出することによって測定される。その後、図 7 中の検出点 3 として示される、チャンバー 8 内への第 2 の緩衝剤の導入後の応答の振幅  $B_3$  が検出され、2 つの応答の差、 $_{32} = B_3 - B_2$  が決定される。

20

【0106】

このような  $_{32}$  の測定には、測定がより短い期間にわたって行われ ( $B_2$  と  $B_3$  との間の時間が  $B_1$  と  $B_3$  との間の時間より短いため)、それ故にドリフトの効果が低減されるという利点がある。

【0107】

$B_2$  を検出する際にはチャンバー 8 内のバルク材料が試料である一方で、 $B_3$  を検出する際にはチャンバー 8 内のバルク材料が緩衝液である。試料および緩衝液は、それぞれ異なる屈折率を有し、それ故に局所的な測定値  $_{32}$  は、 $B_2$  と  $B_3$  との間の試料から緩衝液までのバルク材料における変化によって生じた寄与を含む。したがって、 $_{32}$  は、下記等式 (11) によって表すことができる。

30

【数 14】

$$\Delta_{32} = f(\text{Offset}) + \Delta_{bulk} \quad (11)$$

式中、 $f(\text{Offset})$  は、パラメータ化された関数 / マスター曲線であり、 $_{bulk}$  は試料の屈折率による寄与である。

【0108】

試料が血液である場合、例えば、 $B_2$  と  $B_3$  との間のバルク溶液における差異による屈折率の変化  $_{bulk}$  は、ヒトそれぞれで変わり、したがって未知の量である。

40

【0109】

$_{bulk}$  は、関数 (11) を実験データに適合させる、すなわち、同じ時間での  $\text{Offset}$  および  $_{bulk}$  を調整することによって、更なる変数パラメータとして得ることができる。代替として、図 7 を参照すると、 $_{21}$  が以下に説明するように測定でき、 $_{bulk}$  への近似 (増幅していない標的 - プローブ結合の効果を無視する) として使用できる。 $_{21}$  は、ベースライン応答の振幅  $B_1$  を検出し、緩衝液がアッセイアセンブリを流れたら、試料とチャンバー表面 20 との相互作用後、かつ表面に結合した標的物と増幅器との相互作用前の応答の振幅  $B_2$  を検出し、 $B_1$  と  $B_2$  との差、すなわち  $_{21} = B$

50

$\Delta_{21}$  を決定することによって測定される。測定値  $\Delta_{21}$  は、下記等式 (12) に従って推考できる。

【数 15】

$$\Delta_{21} = \Delta_{unamplified\_binding} + \Delta_{bulk} \quad (12)$$

式中、 $\Delta_{unamplified\_binding}$  は、チャンバーの表面への標的物の結合が増幅していないことによる寄与である。バルクからのシグナルへの寄与が、チャンバーの表面への標的物の結合が増幅していないことから寄与よりはるかに大きいため、測定値  $\Delta_{21}$  は、 $\Delta_{bulk}$  にほぼ等しいと考えることができる。したがって、一部の実施形態では、 $\Delta_{32} - \Delta_{21}$  が局所的な測定値として使用でき、すなわち局所的な測定値が  $\Delta_{32} - \Delta_{21} = f(\text{Offset})$  としてモデル化される。当然、それは、モデル  $\Delta_{32} = \Delta_{21} + f(\text{Offset})$  と同等であり、これは一部の実施形態では代わりに使用される。

10

【0110】

実施形態 3

別の実施形態では、増幅器がチャンバー 8 の表面 20 を流れる際に検出器 32 によって検出された応答シグナルの振幅の変化  $G_{amp}$  が、局所的な測定値として使用される。この測定値は、増幅器中の活性成分が個別のチャンバー 8 に結合した標的物 24 と結合する割合を反映する。

20

【0111】

また、図 4 に示され、上述したマスター減少曲線も、局所的な測定値が  $G_{amp}$  であり、対応するモデルが  $G_{amp} = f(\text{Offset})$  ( $f$  は上記のように定義される) であるこのような場合に、たとえそのパラメータが適合されている、例えば、 $DP_{max}$  が、飽和したチャンバー 8 での概念上の最大変化率であるとしても適用される。

【0112】

図 8 に示した例では、 $G_{amp}$  は、センサーグラム上の点 4 で示される時間  $t_1$  での曲線の勾配に相当する。当然、いずれの他の適した、例えば増幅、頻度依存性の測定も採り得る。

【0113】

実施形態 4

さらに別の実施形態では、個別のチャンバー内への増幅器の導入から応答シグナルの閾値振幅またはシグナルの特徴 (例えば最大) の検出までにかかった時間が測定される。 $1/t$  を局所的な測定値として用いることによって、図 4 に示され、上述したマスター減少曲線も適用され、実験データが  $1/t = f(\text{Offset})$  ( $f$  は上記の通り定義される) として、たとえそのパラメータが調整されている、例えば  $DP_{max}$  が、飽和させたチャンバー 8 での  $1/t$  の概念上の最大値 ( $t$  の最小) であるとしてもモデル化できる。

30

【0114】

当然、いずれの他の適した時間依存性の測定も採り得る。

40

【0115】

上記と同じシステムおよび方法を用い、いずれの適した局所的な測定を行うことで、増幅器中の活性成分の濃度がアッセイセンブリを飽和させるほど十分に高いものではない場合、局所的な測定値は、増幅器が 1 つのチャンバーから次のチャンバーまで流れる際に減少するであろうこの活性成分濃度にも依存する。したがって、パラメータ化された関数は、この依存性を算定するように調整される。例えば、パラメータ化された関数は、活性成分濃度の減少を算定するための追加のパラメータを含み得る。代替として、または加えて、「Shape」パラメータは、試料濃度および増幅器濃度の両方によって変化するベクトルであり得る。一部の実施形態では、増幅器の濃度の効果は、第 1 の近似としてアッセイセンブリ中に存在するプローブ物の密度の効果と同種と考えることができる。したが

50

って、例えば、 $DZ_i$ の値は、上記で詳細に説明した、アッセイアセンブリの相対結合容量を考慮するように $DZ_i$ を調整する方法と同様に、増幅器濃度を算定するように調整され得る。

【0116】

一般に、増幅器濃度が飽和しない場合、2つの減少効果、すなわち1)標的物の減少；2)増幅器の減少が生じる。(2)は、各検出領域での標的物の濃度に依存する。全体の効果はこれらの2つの効果の組み合わせに依存する。各効果は、一部の実施形態では、独立して評価され、高次関数を用いて、両方の効果を組み合わせる。代替として、両方の効果は、適した高次関数および/または減少特性を適合させるためのより多くのパラメータを有する関数(例えば4PLまたは5PL関数)を用いて容易に捕捉され得る。

10

【0117】

増幅器が飽和濃度で提供されるか否かは、使用した局所的な測定値から独立しており、飽和していない増幅器濃度が、上記の実施形態で特定したいずれの局所的な測定、または実際にはいずれの他の局所的な測定とともに使用し得ることが理解される。

【0118】

当然ながら、具体的な実施形態について上記の通り説明したが、これらは例示に過ぎず、当業者であれば多くの改変および変化を成し、そのような改変および変化は添付の特許請求の範囲に含まれることが意図される。例えば、上記の説明は、表面プラズモン共鳴の変化の検出の観点から述べられたものであるが、表面20での標的-プローブ結合の量を定量的に検出するためのいずれの他の適した手段も使用し得、例えば、標的物24のUV吸収蛍光および/または標的物24に結合した標識の検出を使用し得ることが理解される。一部の実施形態では、複数の検出域が単一チャンバーに設けられ、例えば官能化された表面のストリップに沿って間隔をおいた、シグナルが測定される検出領域が設けられる。

20

【図1】

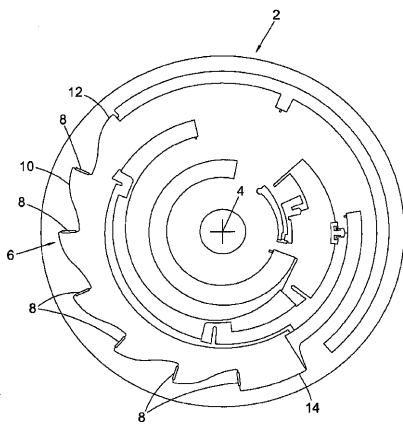


Fig. 1

【図2b】

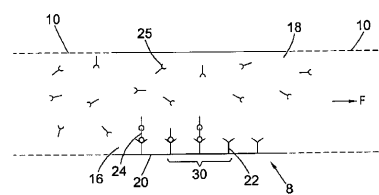


Fig. 2b

【図3】

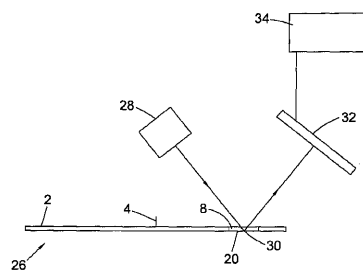


Fig. 3

【図2a】

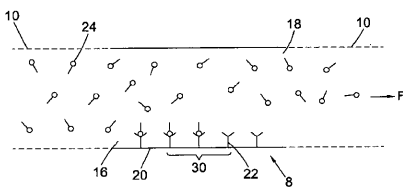
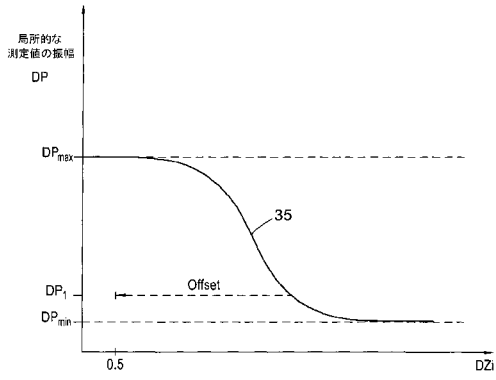
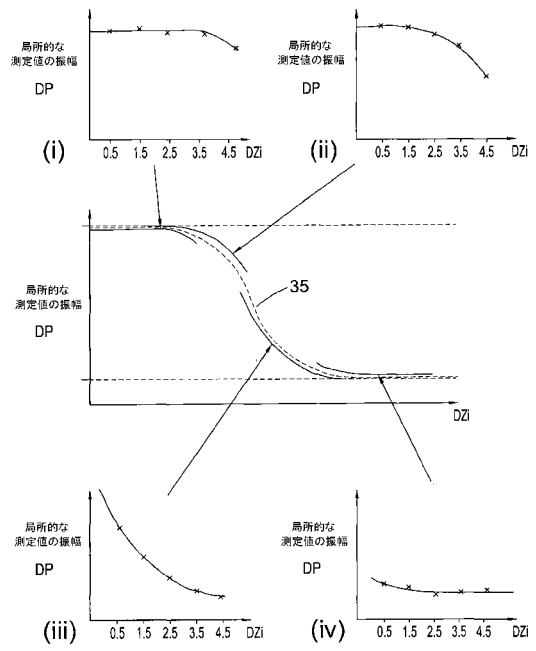


Fig. 2a

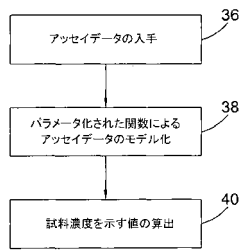
【 図 4 】



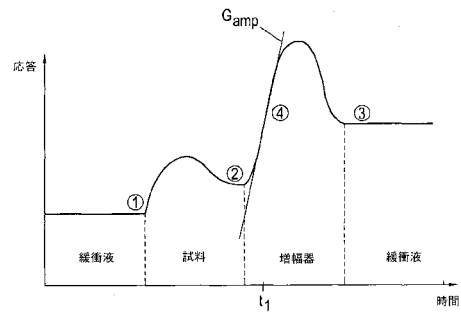
【 図 5 】



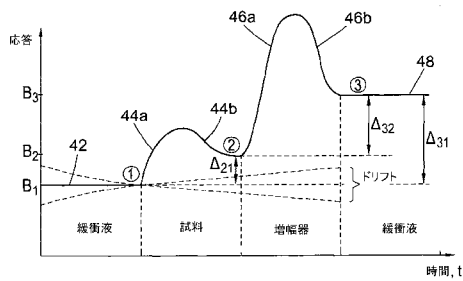
【 図 6 】



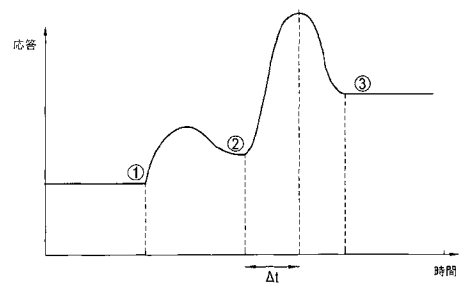
【 図 8 】



【 図 7 】



【 図 9 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/073036
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. G01N21/05	G01N21/25	G01N21/552 G01N21/64 G01N33/543
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/017436 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; ZHANG ZHEN [US]; CHAN DANIEL W [US]) 10 February 2011 (2011-02-10) the whole document -----	1-31
Y	US 2009/087925 A1 (WAGNER PETER [US] ET AL) 2 April 2009 (2009-04-02) abstract; figures 1, 5, 6 paragraph [0002] - paragraph [0083] -----	1-31
A	WO 2004/084708 A2 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV [US]; TAYLOR THOMAS H JR [US]) 7 October 2004 (2004-10-07) page 1 - page 12; figures 1, 4, 5, 7 ----- -/--	1-31
<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		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  13 January 2016		Date of mailing of the international search report  20/01/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Pisani, Francesca

3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/073036

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>W0 03/048736 A2 (UNIV WASHINGTON [US])  12 June 2003 (2003-06-12)  abstract; figures 1D, 5  page 4 - page 17  page 23 - page 31  -----</p>	1-31
A	<p>SMITH W C ET AL: "Conceptual and  statistical issues in the validation of  analytic dilution assays for  pharmaceutical applications",  JOURNAL OF BIOPHARMACEUTICAL STATISTICS,  MARCEL DEKKER, NEW YORK, NY, US,  vol. 8, no. 4, 1 January 1998 (1998-01-01)  , pages 509-532, XP009153793,  ISSN: 1054-3406, DOI:  10.1080/10543409808835257  paragraph [0001] - paragraph [0003]  -----</p>	1-31
A	<p>JENNIFER O. FOLEY ET AL: "Concentration  Gradient Immunoassay. 2. Computational  Modeling for Analysis and Optimization",  ANALYTICAL CHEMISTRY,  vol. 79, no. 10, 1 May 2007 (2007-05-01),  pages 3549-3553, XP055236511,  US  ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac062350v  page 3549 - page 3550  page 3552  -----</p>	1-31

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/073036

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011017436 A2	10-02-2011	US 2012142554 A1 WO 2011017436 A2	07-06-2012 10-02-2011
US 2009087925 A1	02-04-2009	US 2009087925 A1 US 2013236914 A1	02-04-2009 12-09-2013
WO 2004084708 A2	07-10-2004	AU 2004224317 A1 CA 2517198 A1 EP 1616023 A2 US 2006265143 A1 WO 2004084708 A2	07-10-2004 07-10-2004 18-01-2006 23-11-2006 07-10-2004
WO 03048736 A2	12-06-2003	AU 2002360499 A1 CA 2468674 A1 EP 1461606 A2 JP 4191608 B2 JP 2005512045 A JP 2008304475 A JP 2008304476 A US 2003124623 A1 WO 03048736 A2	17-06-2003 12-06-2003 29-09-2004 03-12-2008 28-04-2005 18-12-2008 18-12-2008 03-07-2003 12-06-2003

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
G 0 1 N 21/75 Z

(81) 指定国 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, 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, KN, KP, KR, 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, UA, UG, US

Fターム(参考) 2G054 AA03 AA07 AA08 AB04 CA20 CA22 CA23 CA28 EA05 EA10  
EB03 FA07 FA08  
2G059 AA01 BB06 BB09 BB13 BB14 CC13 EE02 FF04 GG01 GG04  
KK01 MM04 MM14

【要約の続き】

【選択図】図4

专利名称(译)	结合试验分析		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017534885A</a>	公开(公告)日	2017-11-24
申请号	JP2017537018	申请日	2015-10-06
[标]申请(专利权)人(译)	拜森菲特有限公司		
申请(专利权)人(译)	适合生物爵士, Soshiedaddo ANONIMA		
[标]发明人	マニユエルデオリヴェイラガルシアダフォンセカジョアオ		
发明人	マニユエル デ オリヴェイラ ガルシア ダ フォンセカ、ジョアオ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N37/00 G01N33/543 G01N21/41 G01N21/75		
CPC分类号	G01N21/05 G01N21/00 G01N21/25 G01N21/253 G01N21/552 G01N21/554 G01N21/64 G01N21/6452 G01N33/00 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.D G01N37/00.101 G01N33/53.N G01N33/543.595 G01N21/41.101 G01N21/75.Z		
F-TERM分类号	2G054/AA03 2G054/AA07 2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/CA20 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/CA28 2G054/EA05 2G054/EA10 2G054/EB03 2G054/FA07 2G054/FA08 2G059/AA01 2G059/BB06 2G059/BB09 2G059/BB13 2G059/BB14 2G059/CC13 2G059/EE02 2G059/FF04 2G059/GG01 2G059/GG04 2G059/KK01 2G059/MM04 2G059/MM14		
代理人(译)	森下Kenju		
优先权	2014017640 2014-10-06 GB 2014107946 2014-10-06 PT		
其他公开文献	JP2017534885A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了用于确定样品中靶标的样品浓度的方法，例如确定血液样品或其他生物样品中靶标抗原或靶标抗体的浓度。该方法使用化验组件从化验中提供化验数据，包括指示固定在化验组件的多个化验区域的每一个中的靶标的局部浓度的各个局部测量数据点。包括获取步骤。测定区域串联连接，使得流过测定组件的样品依次流过每个测定区域。每个测定区域包括固定在测定区域表面上的多个探针制品，探针制品使得当样品从一个测定区域流向另一个测定区域时，靶的浓度降低。它被安排与样品中的靶标结合。将测定数据建模为局部测量值与指示序列中各个测定区域位置的数量的参数化函数，一个或多个参数取决于样品浓度。基于一个或多个参数中的至少一个确定指示样品浓度的值。[选择图]图4

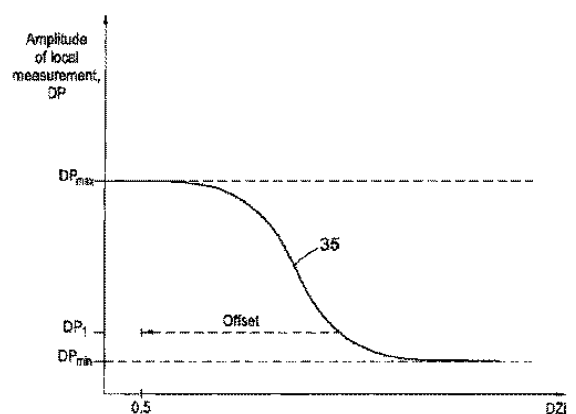


Fig. 4