

(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2020-503857  
(P2020-503857A)

(43) 公表日 令和2年2月6日(2020.2.6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 M 1/00 (2006.01)</b>	C 1 2 M 1/00 Z N A A	4 B O 2 9
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 M	4 B O 6 3
<b>C 1 2 Q 1/6855 (2018.01)</b>	C 1 2 Q 1/6855 Z	
<b>C 1 2 Q 1/686 (2018.01)</b>	C 1 2 Q 1/686 Z	
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/09 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 86 頁)

(21) 出願番号 特願2019-531192 (P2019-531192)  
 (86) (22) 出願日 平成29年12月11日 (2017.12.11)  
 (85) 翻訳文提出日 令和1年8月6日 (2019.8.6)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/065653  
 (87) 国際公開番号 W02018/111782  
 (87) 国際公開日 平成30年6月21日 (2018.6.21)  
 (31) 優先権主張番号 62/433,155  
 (32) 優先日 平成28年12月12日 (2016.12.12)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 504019928  
 セファイド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サニー  
 ベール カリビアン ドライブ 904  
 (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  
 (72) 発明者 カーラ・マリア・マクダウェル・ブキャ  
 ン  
 アメリカ合衆国・カリフォルニア・940  
 89・サニーベール・カリビアン・ドラ  
 イヴ・904

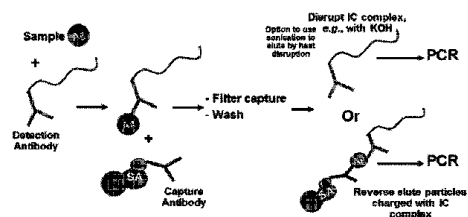
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自動反応カートリッジにおける統合化イムノPCR及び核酸分析

(57) 【要約】

各種実施形態において、イムノPCRを使用して標的検体を検出及び/又は定量し、任意に核酸を増幅する方法が提供される。特定の実施形態において、その方法は、イムノPCRを行い、1つ又は複数の標的検体を検出及び/又は定量し、核酸を任意に検出及び/又は定量するためにカートリッジを利用するものであり、前記カートリッジは、サンプル受容チャンパーと、フィルター及び/又はDNA結合剤として作用するマトリックス材料を含むチャンパーと、温度調節されたチャネル又はチャンパーと、イムノPCRを行うための試薬及び/又はバッファーを含む複数のチャンパーとを備え、複数のチャンパーは、検出される検体に結合する捕捉抗体を含むチャンパーを備え、複数のチャンパーは、検出抗体を含むチャンパーを備え、前記検出抗体は、直接的又は間接的にシグナルDNAに任意に付着し、複数のチャンパーは、PCRマスターミックスを含むチャンパーを備え、複数のチャンパーは、前記シグナルDNAの全て又は一領域を増幅するためのプライマーを含むチャンパーを備え、複数のチャンパーは、前記シグナルDNAの全て又は一領域を検出するための

Fig. 3



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

イムノPCRを実施して、1つ又は複数の標的検体を検出及び/又は定量し、任意に核酸を検出及び/又は定量するためのカートリッジであって、

サンプル受容チャンパーと、

フィルター及び/又はDNA結合剤として作用するマトリックス材料を含むチャンパーと、

温度調節されたチャンネル又はチャンパーと、

イムノPCRを実施するための試薬及び/又はバッファーを含む複数のチャンパーとを備え、

前記複数のチャンパーが、検出される検体に結合する捕捉抗体を含むチャンパーを備え、

前記複数のチャンパーが、検出抗体を含むチャンパーを備え、前記検出抗体が、直接又は間接的にシグナルDNAに任意に付着し、

前記複数のチャンパーが、PCRマスターミックスを含むチャンパーを備え、

前記複数のチャンパーが、前記シグナルDNAの全て又は一領域を増幅するためのプライマーを含むチャンパーを備え、

前記複数のチャンパーが、前記シグナルDNAの全て又は一領域を検出するためのプローブを含むチャンパーを備える、カートリッジ。

**【請求項 2】**

前記マスターミックス中の前記PCRプライマー、及び/又はプローブ、及び/又はポリメラーゼが、ビーズとして提供される、請求項1に記載のカートリッジ。

**【請求項 3】**

単一の検体を検出するための検出抗体を含む、請求項1又は2に記載のカートリッジ。

**【請求項 4】**

単一の検体を捕捉するための捕捉抗体を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載のカートリッジ。

**【請求項 5】**

複数の検体を検出するための検出抗体を含む、請求項1又は2に記載のカートリッジ。

**【請求項 6】**

前記捕捉抗体が、粒子に付着する、請求項1から5のいずれか一項に記載のカートリッジ。

**【請求項 7】**

前記粒子が、約0.5  $\mu\text{m}$ から若しくは約1  $\mu\text{m}$ から約10  $\mu\text{m}$ まで若しくは約3  $\mu\text{m}$ までの範囲のサイズであるか、又は、前記粒子が、約1  $\mu\text{m}$ から約2.8  $\mu\text{m}$ までの範囲のサイズである、請求項6に記載のカートリッジ。

**【請求項 8】**

前記複数のチャンパーが、前記シグナル核酸以外の核酸を増幅するためのPCRプライマーを含むチャンパーを更に備える、請求項1から7のいずれか一項に記載のカートリッジ。

**【請求項 9】**

前記複数のチャンパーが、前記シグナル核酸以外の核酸を検出及び/又は定量するためのプローブを含むチャンパーを更に備える、請求項1から8のいずれか一項に記載のカートリッジ。

**【請求項 10】**

前記標的検体がポリペプチドを含み、前記シグナル核酸以外の前記核酸が、前記ポリペプチド又はその断片をコードする核酸を含む、請求項8又は9に記載のカートリッジ。

**【請求項 11】**

前記標的検体がポリペプチドを含み、前記シグナル核酸以外の前記核酸が、前記ポリペプチドを産生する細胞、組織又は生物に特徴的な核酸を含む、請求項8又は9に記載のカートリッジ。

**【請求項 12】**

使用時において、

10

20

30

40

50

サンプルを含むチャンパーと、  
 前記検出抗体を含むチャンパーと、  
 前記捕捉抗体を含むチャンパーと、  
 洗浄バッファーを含むチャンパーと、  
 前記シグナルDNAを増幅するためのPCRマスターミックスを含むチャンパーと  
 を備えるように構成される、請求項1から11のいずれか一項に記載のカートリッジ。

【請求項13】

イムノPCRを実施して、1つ又は複数の標的検体を検出及び/又は定量し、任意に標的核酸を検出及び/又は定量する方法であって、  
 イムノPCRを実施するように構成されたカートリッジのサンプル受容チャンパーにサンプルを提供する工程と、前記カートリッジを使用して、  
 捕捉抗体が検体と結合して捕捉抗体/検体複合体を形成する条件下で、前記捕捉抗体と前記検体とを接触させる工程と、  
 検出抗体が前記捕捉抗体/検体複合体と特異的に結合して免疫複合体を形成する条件下で、シグナルDNAに付着する検出抗体と前記検体とを接触させる工程と、  
 前記シグナルDNAを含む前記免疫複合体又はその部分を放出させ、温度調節されたチャンネル又はチャンパーに前記免疫複合体又はその部分を送達する工程と、  
 前記温度調節されたチャンネル又はチャンパーにおいて核酸増幅を実施して前記シグナル核酸を検出及び/又は定量し、それにより前記検体を検出及び/又は定量する工程とを含む方法。

10

20

【請求項14】

イムノPCRを実施して、1つ又は複数の標的検体を検出及び/又は定量し、任意に核酸を検出及び/又は定量する方法であって、  
 イムノPCRを実施するように構成されたカートリッジのサンプル受容チャンパーにサンプルを提供する工程と、前記カートリッジを使用して、  
 捕捉抗体が検体と結合して捕捉抗体/検体複合体を形成する条件下で、前記捕捉抗体と前記検体とを接触させる工程と、  
 検出抗体が前記捕捉抗体/検体複合体と特異的に結合して免疫複合体を形成する条件下で、前記検出抗体と前記検体とを接触させる工程と、  
 前記検出抗体に結合する標識抗体であって、シグナルDNAに付着している標識抗体と前記免疫複合体とを、前記標識抗体が前記検出抗体に特異的に結合して標識免疫複合体を形成する条件下で接触させる工程と、  
 前記シグナルDNAを含む前記標識免疫複合体又はその部分を放出させ、温度調節されたチャンネル又はチャンパーに前記免疫複合体又はその部分を送達する工程と、  
 前記温度調節されたチャンネル又はチャンパーにおいて核酸増幅を実施して前記シグナル核酸を検出及び/又は定量し、それにより前記検体を検出及び/又は定量する工程とを含む方法。

30

【請求項15】

前記カートリッジが、請求項1から12のいずれか一項に記載のカートリッジである、請求項13又は14に記載の方法。

40

【請求項16】

同じカートリッジ内の複数の異なる検体に対して行われる、請求項13から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

約1時間以下、又は約50分以下、又は約40分以下、又は約30分以下、又は約20分以下、又は約15分以下で完了させることができる、請求項13から16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

請求項8から12のいずれか一項に記載のカートリッジにおいて行われ、前記シグナルDNA以外の核酸を増幅する工程を更に含む、請求項13から17のいずれか一項

50

に記載の方法。

【請求項 19】

前記シグナルDNA以外の核酸を増幅する工程が、  
前記サンプル由来の核酸をマトリックス材料に結合させる工程と、  
結合した核酸を洗浄して洗浄された核酸を提供する工程と、  
洗浄された核酸を溶出させる工程と、  
前記洗浄された核酸を増幅反応に供して、前記洗浄された核酸に存在する場合に標的核酸配列を増幅する工程と  
を含む、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

前記シグナルDNA以外の前記核酸が、DNAを含む、請求項18又は19に記載の方法。

【請求項 21】

前記シグナルDNA以外の前記核酸が、RNAを含む、請求項18又は19に記載の方法。

【請求項 22】

前記シグナルDNA以外の核酸を増幅する工程が、前記イムノPCRに使用されるサンプルチャンパー内の同じサンプルから得られる核酸に対して行われる、請求項18から21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記シグナルDNA以外の核酸の前記増幅が、前記イムノPCRに使用されるサンプルチャンパーとは異なるサンプルチャンパーのサンプルから得られる核酸に対して行われる、請求項18から21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

シグナルDNA及びシグナルDNA以外の核酸が、同じ温度調節されたチャンネル又はチャンパーにおいて順次増幅される、請求項18から23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

イムノPCRを実施して、1つ又は複数の標的検体を検出及び/又は定量し、任意に核酸を検出及び/又は定量するシステムであって、1つ又は複数のサンプル処理モジュールを含むように構成される筐体と、請求項1から12のいずれか一項に記載の着脱可能なカートリッジを保持するように構成される各サンプル処理モジュールとを備え、前記システムが、サンプル処理モジュールを操作して、イムノPCRを実施して、対応する着脱可能なサンプルカートリッジ内の1つ又は複数の標的検体の存在及び/又は量を決定し、任意に1つ又は複数の標的DNAの塩基配列のレベルを決定するように構成され、対応する着脱可能なサンプルカートリッジ内のサンプルに対する前記処理が、請求項13から24のいずれか一項に記載の方法を実施する、システム。

【請求項 26】

イムノPCRを実施して、1つ又は複数の標的検体を検出及び/又は定量し、任意に核酸を検出及び/又は定量するためのキットであって、  
請求項1から12のいずれか一項に記載のカートリッジを含む容器  
を備える、キット。

【請求項 27】

イムノPCR用のサンプルを調製するための1つ又は複数の試薬を含む容器を更に備える、請求項26に記載のキット。

【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、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2016年12月12日に提出された先行する米国仮出願第62/433,155号の利益を主張するものである。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

信頼性が高く、高感度で、特異的で、かつ迅速な診断検査の開発は、感染症及び他の病態の効果的な治療を決定するための主要な課題である。PCRは、感染因子由来の又は他の病態(例えば癌)に特徴的な核酸を直接検出するための最も普及している方法になっている。単一のDNA分子を検出できるPCRは、その感度が非常に高いため、診断目的のための優れた選択肢である。しかしながら、場合によっては、標的タンパク質が核酸より高いコピー数で発現されることがある。

#### 【0003】

イムノアッセイが1960年以降タンパク質の定量化のために用いられ(Lequin、2005、Clin. Chem. 51、2415~2418頁、Brechotら、(1985)、N. Engl. J. Med. 312、270~276頁等を参照)、診断法のための広範な、かつ強力なツールとなっている。イムノアッセイは、標的タンパク質(例えば病原体タンパク質)及び他の検体を直接検出する診断も、また微生物又は他の免疫原に対する抗体産生を間接的に検出する診断も可能とする。酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)は、抗原と抗体との反応を用いてサンプル中の抗体又は抗原を検出する、一般的に用いられている技術である(Lequin、(2005)、Clin. Chem. 51、2415~2418頁)。ELISAは単純な酵素アッセイの感度と抗体の特異性とを組み合わせたものであり、抗体は容易に分析される酵素にカップリングされる。その効果及びその特異性にもかかわらず、ELISAは、場合によっては、特に抗原が低濃度で存在するときにはそれを検出することができず、例えば、B型肝炎ウイルス(HBV)の抗原の場合がそれであり(Brechotら、(1985)、N. Engl. J. Med. 312、270~276頁)、すなわち宿主における維持機構としてその遺伝子の低レベルの転写を利用していると考えられる。

#### 【0004】

イムノPCR(I-PCR)は、ELISAの用途の広範さと、PCRの指数関数的増幅力及び感度性とを組み合わせることにより、アナログ的なELISAと比較し感度を上昇させるものである。イムノPCRは基本的にELISAに類似し(図1a)、抗原抗体反応を検出するものであるが、酵素コンジュゲート抗体を使用する代わりに、PCRにより増幅できるDNA断片で抗体を標識するものである。

#### 【0005】

イムノPCRを使用することで、検出限界をELISAよりも通常100~10000倍改善することが可能となった(Brechotら、(1985)、N. Engl. J. Med. 312、270~276頁)。この感度上昇にもかかわらず、長い期間、イムノPCRに関する研究はあまり行われず、その大部分の用途が試験研究用途であり、プロトコルを要するものであった。ELISA及びPCRの両方においては、実験に関する専門知識を要することや、プロトコルの複雑さ及び操作の煩雑さから、診断目的でのイムノPCRの使用は制限されていた。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0006】

- 【特許文献1】米国特許第6,027,998号
- 【特許文献2】米国特許第5,830,711号
- 【特許文献3】米国特許第6,027,889号
- 【特許文献4】米国特許第5,686,243号
- 【特許文献5】米国特許第6,605,451号明細書
- 【特許文献6】国際公開第97/31256号
- 【特許文献7】国際公開第01/92579号
- 【特許文献8】国際公開第00/56927A3号
- 【特許文献9】国際公開第98/03673A1号パンフレット
- 【特許文献10】米国特許第5,733,743号
- 【特許文献11】米国特許第5,091,513号
- 【特許文献12】米国特許第5,132,405号
- 【特許文献13】米国特許第4,956,778号
- 【特許文献14】国際公開第2007/059782号パンフレット

10

20

30

40

50

- 【特許文献 1 5】米国特許第5,831,012号
- 【特許文献 1 6】米国特許第5,168,038号
- 【特許文献 1 7】米国特許第5,210,015号
- 【特許文献 1 8】米国特許第6,174,670号
- 【特許文献 1 9】米国特許第6,569,627号
- 【特許文献 2 0】米国特許第5,925,517号
- 【特許文献 2 1】米国特許第4,230,558号
- 【特許文献 2 2】米国特許第4,811,218号
- 【特許文献 2 3】米国特許第4,659,839号
- 【特許文献 2 4】欧州特許出願第188,256号 10
- 【特許文献 2 5】米国特許第4,671,958号
- 【特許文献 2 6】米国特許第4,414,148号
- 【特許文献 2 7】米国特許第4,699,784号
- 【特許文献 2 8】米国特許第4,680,338号
- 【特許文献 2 9】米国特許第4,569,789号
- 【特許文献 3 0】米国特許第4,589,071号
- 【特許文献 3 1】米国特許第4,618,492号
- 【特許文献 3 2】米国特許第4,542,225号
- 【特許文献 3 3】米国特許第4,625,014号
- 【特許文献 3 4】米国特許第6,610,492号 20
- 【特許文献 3 5】欧州特許出願公開第0070685号明細書
- 【特許文献 3 6】米国特許第5,538,848号
- 【特許文献 3 7】米国特許第6,150,097号
- 【特許文献 3 8】国際公開第2014/052551号パンフレット
- 【特許文献 3 9】国際出願第PCT/US16/41917号
- 【非特許文献】
- 【0 0 0 7】
- 【非特許文献 1】Lequin、2005、Clin. Chem. 51、2415～2418頁
- 【非特許文献 2】Brechtら、(1985)、N. Engl. J. Med. 312、270～276頁
- 【非特許文献 3】Dieffenbach編、「PCR Primer: A Laboratory Manual」、第2版(Cold Spring Harbor Press, New York、2003) 30
- 【非特許文献 4】Ausbelら、(1995)「PCR Primer: A Laboratory Manual」Diffenbach編、Cold Spring Harbor Press
- 【非特許文献 5】Msuihら、(1996) J. Clin. Micro. 34: 501-07
- 【非特許文献 6】Rapley編、(2002) The Nucleic Acid Protocols Handbook, Humana Press, Totowa, N.J.
- 【非特許文献 7】Abramsonら、(1993) Curr. Opin. Biotechnol. 4(1):41-47
- 【非特許文献 8】Dayら、(1995) Genomics, 29(1): 152-162
- 【非特許文献 9】Ehrlichら、(1991) Science, 252: 1643-1650
- 【非特許文献 1 0】Innisら、(1990)「PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications」Academic Press 40
- 【非特許文献 1 1】Favisら、(2000) Nat. Biotechnol., 18: 561-564
- 【非特許文献 1 2】Rabenauら、(2000) Infection, 28: 97-102
- 【非特許文献 1 3】Belgrader, Barany及びLubin、「Development of a Multiplex Ligation Detection Reaction DNA Typing Assay,」、Sixth International Symposium on Human Identification, 1995 (promega.com/geneticidproc/ussymp6proc/blegrad.htmlのウェブサイト)
- 【非特許文献 1 4】LCR Kit Instruction Manual, Cat. #200520, Rev. #050002, Strata gene社、2002
- 【非特許文献 1 5】Baranyら、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 188-193 50

- 【非特許文献 1 6】Bi 及び Sambrook (1997) Nucl. Acids Res. 25: 2924-2951
- 【非特許文献 1 7】Zirvi 氏、(1999) Nucl. Acid Res. 27: e40i-viii
- 【非特許文献 1 8】Dean 氏、(2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 5261-5266
- 【非特許文献 1 9】Barany 及び Gelfand (1991) Gene, 109: 1-11
- 【非特許文献 2 0】Walker 氏、(1992) Nucl. Acid Res. 20: 1691-1696
- 【非特許文献 2 1】Polstra 氏、(2002) BMC Inf. Dis. 2: 18
- 【非特許文献 2 2】Lage 氏、(2003) Genome Res. 13(2): 294-307
- 【非特許文献 2 3】Landegren 氏、(1988) Science, 241: 1077-1080
- 【非特許文献 2 4】Demidov (2002) Expert Rev. Mol. Diagn. 2(6): 542-548
- 【非特許文献 2 5】Cook 氏、(2003) J. Microbiol. Meth. 53(2): 165-174 10
- 【非特許文献 2 6】Schweitzer 氏、(2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12(1): 21-27
- 【非特許文献 2 7】Tijssen(1993) 「Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes」、パート I、第 2 章、「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays」、Elsevier, N.Y.(「Tijssen」)
- 【非特許文献 2 8】Sambrook 及び Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.)、第 1~3 巻、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY
- 【非特許文献 2 9】Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993) 20
- 【非特許文献 3 0】Huston 氏、(1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883
- 【非特許文献 3 1】Reiter 氏、(1995) Protein Eng. 8: 1323-1331
- 【非特許文献 3 2】Harmsen 及び Haard (2007) Appl. Microbiol. Biotechnol. 77 (1): 13-22
- 【非特許文献 3 3】Muller 氏、(2010) J. Biol. Chem. 285(49): 38348-38361
- 【非特許文献 3 4】Dolk 氏 (2005) Appl. Environ. Microbiol. 71(1): 442-450
- 【非特許文献 3 5】Stanfield 氏、(2004) Science, 305(5691): 1770-1773
- 【非特許文献 3 6】Desmyter 氏、(1996) Nat. Struct. Biol. 3(9): 803-811
- 【非特許文献 3 7】Kolfschoten 氏、(2007) Science 317: 1554-1557
- 【非特許文献 3 8】Nord 氏、(1997) Nat. Biotechnol. 15: 772-777 30
- 【非特許文献 3 9】Ronmark 氏、(2002) Eur. J. Biochem., 269: 2647-2655
- 【非特許文献 4 0】McPherson 氏 編、(1995) 「PCR: A Practical Approach」第二版、IRL Press, Oxford
- 【非特許文献 4 1】Mackay 氏、(2002) Nucl. Acids Res. 30: 1292-1305
- 【非特許文献 4 2】Freeman 氏、(1999) Biotechniques、26:112-126
- 【非特許文献 4 3】Becker-Andre 氏、(1989) Nucl. Acids Res. 17:9437-9447
- 【非特許文献 4 4】Zimmerman 氏、(1996) Biotechniques、21:268-279
- 【非特許文献 4 5】Diviacco 氏、(1992) Gene、122:3013-3020
- 【非特許文献 4 6】Wheless 氏、(1985) 21~76 頁、「Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis」(Academic Press、New York) 40
- 【非特許文献 4 7】Swale 氏、(2014) PLoS ONE 9(8): e106118
- 【非特許文献 4 8】Niemeyer 氏、(2005) Trends Biotechnol. 23: 208-216
- 【非特許文献 4 9】Niemeyer 氏、(2007) Nat. Protoc. 2: 1918-1930
- 【非特許文献 5 0】Malou and Raoult (2011) Trends Microbiol. 19: 295-302
- 【非特許文献 5 1】Potuckova 氏、(2011) J. Immunol. Meth. 371: 38-47
- 【非特許文献 5 2】Mehta 氏、(2012) Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 72: 166-174
- 【非特許文献 5 3】Adler 氏、(2005) Biochem. Biophys. Res. Commun. 333: 1289-1294
- 【非特許文献 5 4】Barletta 氏、(2004) Am. J. Clin. Pathol. 122: 20-27
- 【非特許文献 5 5】Tian and Mandrell (2006) J. Appl. Microbiol. 100: 564-574
- 【非特許文献 5 6】Huang and Chang (2004) Clin. Chem. 50: 1673-1674 50

- 【非特許文献57】McKieら、(2002) J. Immunol. Meth. 270: 135-141
- 【非特許文献58】Niemeyerら、(1997) Anal. Biochem. 246: 140-145
- 【非特許文献59】March (1985) Advanced Organic Chemistry, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York; Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego
- 【非特許文献60】Feeneyら、(1982) Modification of Proteins; Advances in Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C.
- 【非特許文献61】Borlinghausら、(1987) Cancer Res. 47: 4071-4075
- 【非特許文献62】van Buggenumら、(2106) Sci. Rep., 6: 22675
- 【非特許文献63】Gongら、(2015) Bioconjug. Chem., 27: 217-227
- 【非特許文献64】Morinら、(2011) Analyst, 136(22): 4815-4821
- 【非特許文献65】Stryer (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 819-846
- 【非特許文献66】Selvin (1995) Meth. Enzymol. 246: 300-335
- 【非特許文献67】Cardulloら、(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8790-8794
- 【非特許文献68】Marrasら、(2002) Nucleic Acids Res. 30: e122
- 【非特許文献69】Johanssonら、(2002) J. Am. Chem. Soc. 124: 6950-6956
- 【発明の概要】
- 【課題を解決するための手段】
- 【0008】  
本明細書で考えられる各種実施形態としては、限定されないが、以下の1つ又は複数が挙げられうる:
- 【0009】  
実施形態1: イムノPCRを実施して、1つ又は複数の標的検体を検出及び/又は定量し、任意に核酸を検出及び/又は定量するためのカートリッジであって、サンプル受容チャンパーと、フィルター及び/又はDNA結合剤として作用するマトリックス材料を含むチャンパーと、温度調節されたチャネル又はチャンパーと、イムノPCRを実施するための試薬及び/又はバッファーを含む複数のチャンパーとを備え、  
前記複数のチャンパーは、検出される検体に結合する捕捉抗体を含むチャンパーを備え、  
前記複数のチャンパーは、検出抗体を含むチャンパーを備え、前記検出抗体は、直接又は間接的にシグナルDNAに任意に付着し、  
前記複数のチャンパーは、PCRマスターミックスを含むチャンパーを備え、  
前記複数のチャンパーは、前記シグナルDNAの全て又は一領域を増幅するためのプライマーを含むチャンパーを備え、  
前記複数のチャンパーは、前記シグナルDNAの全て又は一領域を検出するためのプローブを含むチャンパーを備える、カートリッジ。
- 【0010】  
実施形態2: 前記PCRマスターミックス及び前記プライマーが、同一のチャンパーに存在する、実施形態1のカートリッジ。
- 【0011】  
実施形態3: 前記PCRマスターミックス及び前記プローブが、同一のチャンパーに存在する、実施形態1又は2に記載のカートリッジ。
- 【0012】  
実施形態4: 前記マスターミックス中の前記PCRプライマー、及び/又はプローブ、及び/又はポリメラーゼが、ビーズとして提供される、実施形態1から3のいずれか1つに記載のカートリッジ。
- 【0013】  
実施形態5: 単一の検体を検出するための検出抗体を含む、実施形態1から4のいずれか1つに記載のカートリッジ。

10

20

30

40

50

## 【0014】

実施形態6:単一の検体を捕捉するための捕捉抗体を含む、実施形態1から5のいずれか1つに記載のカートリッジ。

## 【0015】

実施形態7:複数の検体を検出するための検出抗体を含む、実施形態1から4のいずれか1つに記載のカートリッジ。

## 【0016】

実施形態8:少なくとも2、又は少なくとも3、又は少なくとも4、又は少なくとも5、又は少なくとも6、又は少なくとも7、又は少なくとも8、又は少なくとも9、又は少なくとも10の異なる検体を検出するための検出抗体を含む、実施形態7のカートリッジ。

10

## 【0017】

実施形態9:複数の検体を捕捉するための捕捉抗体を含む、実施形態1から4及び6から7のいずれか1つに記載のカートリッジ。

## 【0018】

実施形態10:前記捕捉抗体が、反応チャンパーの壁に、又は前記マトリックス材料に付着する、実施形態1から9のいずれか1つに記載のカートリッジ。

## 【0019】

実施形態11:前記捕捉抗体が、反応チャンパーの壁に、又は前記マトリックス材料に化学的にコンジュゲートされている、実施形態10のカートリッジ。

## 【0020】

実施形態12:前記捕捉抗体が、反応室の壁に、又は前記マトリックス材料に、ビオチン/ストレプトアビジン相互作用を経て付着する、実施形態10のカートリッジ。

20

## 【0021】

実施形態13:前記捕捉抗体が、粒子に付着する、実施形態1から9のいずれか1つに記載のカートリッジ。

## 【0022】

実施形態14:前記捕捉抗体が、前記粒子に化学的にコンジュゲートされている、実施形態13のカートリッジ。

## 【0023】

実施形態15:前記捕捉抗体が、ビオチン/ストレプトアビジン相互作用を経て前記粒子に付着する、実施形態13のカートリッジ。

30

## 【0024】

実施形態16:前記粒子が、ラテックス粒子(ポリスチレン)、ポリ(スチレン/ジビニルベンゼン)コポリマー、ポリメチルメタクリレート(PMMA)、ポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート)(pHEMA)、シリカ粒子、テフロン(登録商標)粒子及び貴金属粒子及び磁性粒子からなる群から選択される粒子を含む、実施形態13から15のいずれか1つに記載のカートリッジ。

## 【0025】

実施形態17:前記粒子が、ラテックス粒子を含む、実施形態16のカートリッジ。

## 【0026】

実施形態18:前記粒子が、約0.5 $\mu\text{m}$ から又は約1 $\mu\text{m}$ から約10 $\mu\text{m}$ まで又は約3 $\mu\text{m}$ の範囲のサイズであるか、又は、前記粒子が、約1 $\mu\text{m}$ から約2.8 $\mu\text{m}$ までの範囲のサイズである、実施形態13から17のいずれか1つに記載のカートリッジ。

40

## 【0027】

実施形態19:前記複数のチャンパーが、非特異的結合を減少させる1つ又は複数のブロッキング剤を含むチャンパーを備える、実施形態1から18のいずれか1つに記載のカートリッジ。

## 【0028】

実施形態20:前記ブロッキング剤が、ポリマー、洗剤、炭水化物、タンパク質、界面活性剤及び多糖からなる群から選択される、実施形態19のカートリッジ。

50

## 【0029】

実施形態21:前記ブロッキング剤が、PEG、プルロニックF68/F108/F127(好ましくはF68)、PVP、Biolipidure 802(NOF America社)、Tween 20又は80、TEGME(トリ(エチレングリコール)モノエチルエーテル)、TEG(テトラエチレングリコール)及びホスホリルコリン含有ポリマーからなる群から選択される、ポリマー、洗剤又は炭水化物を含む、実施形態20のカートリッジ。

## 【0030】

実施形態22:前記ブロッキング剤が、カゼイン、BSA、ヤギ免疫グロブリンG、ウシ免疫グロブリンG、Stabilcoat(ThermoFisher社)、イオタ-カラゲナン、デキストラン硫酸、ニンシン又はサケ精子DNA及びマウス血清からなる群から選択される、タンパク質、界面活性剤又は炭水化物を含む、実施形態20のカートリッジ。

10

## 【0031】

実施形態23:前記検出抗体が、シグナルDNAに付着しておらず、前記カートリッジが、前記検出抗体に結合する標識抗体を含むチャンバーを更に備え、そこにおいて前記標識抗体がシグナルDNAに付着する、実施形態1から22のいずれか1つに記載のカートリッジ。

## 【0032】

実施形態24:前記検出抗体が、シグナルDNAに付着する、実施形態1から22のいずれか1つに記載のカートリッジ。

## 【0033】

実施形態25:前記シグナルDNAが、前記検出抗体に化学的にコンジュゲートするか、又は、前記標識抗体が存在するときに、前記シグナルDNAが前記標識抗体に化学的にコンジュゲートする、実施形態23又は24に記載のカートリッジ。

20

## 【0034】

実施形態26:前記シグナルDNAが、システインを介して、リジンを介して、又は炭水化物を介して前記抗体に化学的にコンジュゲートする、実施形態25のカートリッジ。

## 【0035】

実施形態27:前記シグナルDNAが、 $C_6 \sim C_{18}$ リンカー又は $C_6 \sim C_{12}$ リンカーと化学的にコンジュゲートする、実施形態25のカートリッジ。

## 【0036】

実施形態28:前記シグナルDNAが、ヘテロ二官能性架橋剤と化学的にコンジュゲートする、実施形態25のカートリッジ。

30

## 【0037】

実施形態29:前記シグナルDNAが、スクシンイミジル4-ヒドラジノニコチネートアセトンヒドラゾン(SANH)又はスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートエステル(SMCC)と化学的にコンジュゲートする、実施形態28のカートリッジ。

## 【0038】

実施形態30:前記シグナルDNAが、DNAのアジド修飾を経た、ジベンゾシクロオクチン(DBCO)部分を介する抗体との結合により、化学的にコンジュゲートする、実施形態25のカートリッジ。

40

## 【0039】

実施形態31:前記リンカーが、DBCO-PEG-NHSリンカーを含む、実施形態30のカートリッジ。

## 【0040】

実施形態32:前記シグナルDNAが、切断可能なリンカーと化学的にコンジュゲートする、実施形態25のカートリッジ。

## 【0041】

実施形態33:前記切断可能なリンカーが、切断可能なジスルフィド結合を含むリンカー、塩基によって切断可能なリンカー及び酸によって切断可能なリンカーからなる群から選択される、実施形態32のカートリッジ。

50

## 【0042】

実施形態34:前記切断可能なリンカーが、DTTによって切断可能なジスルフィド結合を含む、実施形態32のカートリッジ。

## 【0043】

実施形態35:前記切断可能なリンカーが、更にテトラジンを含む、実施形態34のカートリッジ。

## 【0044】

実施形態36:前記シグナルDNAが、ビオチン/アビジン相互作用を経て前記検出抗体に付着するか、又は、前記標識抗体が存在するとき、前記シグナルDNAが、ビオチン/アビジン相互作用を経て前記標識抗体に付着する、実施形態23又は24に記載のカートリッジ。

10

## 【0045】

実施形態37:前記ビオチン/アビジン相互作用が、ビオチン/ストレプトアビジン相互作用又はビオチン/ニュートラアビジン相互作用である、実施形態36のカートリッジ。

## 【0046】

実施形態38:前記シグナルDNAが、Ter配列を含み、前記検出抗体又は前記標識抗体が、Tusタンパク質に付着しており、前記シグナル核酸が、Tus-Ter相互作用を経て、前記検出抗体又は前記標識抗体に結合する、実施形態23又は24に記載のカートリッジ。

## 【0047】

実施形態39:前記検出抗体がビーズに付着し、かつ前記シグナルDNAが同じビーズに付着するか、又は、前記標識抗体が存在するとき、前記標識抗体がビーズに付着し、かつ前記シグナルDNAが同じビーズに付着する、実施形態23又は24に記載のカートリッジ。

20

## 【0048】

実施形態40:前記抗体及び/又は前記シグナルDNAが、前記ビーズに化学的にコンジュゲートする、実施形態39のカートリッジ。

## 【0049】

実施形態41:前記抗体及び/又は前記シグナルDNAが、ビオチン/ストレプトアビジン相互作用を経て前記ビーズに付着する、実施形態39のカートリッジ。

## 【0050】

実施形態42:前記ビーズが、ラテックス、シリカ、セラミック、テフロン(登録商標)、貴金属、半導体及び磁性材料からなる群から選択される材料を含む、実施形態39から41のいずれか1つに記載のカートリッジ。

30

## 【0051】

実施形態43:前記ビーズが金を含む、実施形態42のカートリッジ。

## 【0052】

実施形態44:前記検出抗体がファージの表面に提示され、前記シグナルDNAが前記ファージ中に含まれるか、又は、前記標識抗体が存在するとき、前記標識抗体がファージの表面に提示され、前記ファージ中に前記シグナルDNAが含まれる、実施形態23又は24に記載のカートリッジ。

## 【0053】

実施形態45:前記複数のチャンバーが、前記シグナル核酸以外の核酸を増幅するためのPCRプライマーを含むチャンバーを更に備える、実施形態1から44のいずれか1つに記載のカートリッジ。

40

## 【0054】

実施形態46:前記複数のチャンバーが、前記シグナル核酸以外の核酸を検出及び/又は定量するためのPCRプローブを含むチャンバーを更に備える、実施形態1から45のいずれか1つに記載のカートリッジ。

## 【0055】

実施形態47:前記標的検体がポリペプチドを含み、前記シグナル核酸以外の前記核酸が、前記ポリペプチド又はその断片をコードする核酸を含む、実施形態45又は46に記載のカートリッジ。

50

## 【 0 0 5 6 】

実施形態48:前記標的検体がポリペプチドを含み、前記シグナル核酸以外の前記核酸が、前記ポリペプチドを産生する細胞、組織又は生物に特徴的な核酸を含む、実施形態45又は46に記載のカートリッジ。

## 【 0 0 5 7 】

実施形態49: TaqMan PCR反応用の試薬を含む1つ又は複数のチャンバーを備える、実施形態1から48のいずれか1つに記載のカートリッジ。

## 【 0 0 5 8 】

実施形態50:増幅されたシグナルDNAのマーカである1つ又は複数の蛍光プローブと、任意に、増幅されたシグナルDNA以外の増幅された配列のマーカである1つ又は複数の蛍光プローブとを含む1つ又は複数のチャンバーを備える、実施形態1から49のいずれか1つに記載のカートリッジ。

10

## 【 0 0 5 9 】

実施形態51:前記プローブが、蛍光レポーター色素及びクエンチャー色素を含み、プローブが、Taq DNAポリメラーゼの5' 3'ヌクレアーゼ活性による分裂によりシグナルを提供する、実施形態50のカートリッジ。

## 【 0 0 6 0 】

実施形態52:前記シグナル核酸以外の核酸を増幅するための前記プライマー、及び/又は、前記シグナル核酸以外の核酸を検出するための前記プローブが、ビーズとして提供される、実施形態45から51のいずれか1つに記載のカートリッジ。

20

## 【 0 0 6 1 】

実施形態53:前記温度調節されたチャンネル又はチャンバーが、熱サイクリングチャンネル又はチャンバーである、実施形態1から52のいずれか1つのカートリッジ。

## 【 0 0 6 2 】

実施形態54:前記マトリックス材料が、ガラス又はシリカ、イオン交換樹脂及びヒドロキシアパタイトからなる群から選択される材料を含む、実施形態1から53のいずれか1つに記載のカートリッジ。

## 【 0 0 6 3 】

実施形態55:前記サンプル受容チャンバー、前記マトリックス材料を含むチャンバー、前記試薬を含む複数のチャンバー及び前記温度制御された加熱チャンネル又はチャンバーが、選択的に流体連通する、実施形態1から54のいずれか1つに記載のカートリッジ。

30

## 【 0 0 6 4 】

実施形態56:前記サンプル受容チャンバー、前記マトリックス材料を含むチャンバー、前記試薬を含む複数のチャンバー及び前記温度制御された加熱チャンネル又はチャンバーが、微小流体チャンネル及びバルブによって選択的に流体連通する、実施形態55のカートリッジ。

## 【 0 0 6 5 】

実施形態57:前記サンプル収容チャンバー、前記マトリックス材料を含むチャンバー、前記試薬を含む複数のチャンバー、及び前記温度制御された加熱チャンネル若しくはチャンバー又は前記温度調節されたチャンネル若しくはチャンバーへのポートが、中央バルブ周辺に配置され、選択的に前記中央バルブのチャンネルと流体連通し、前記中央バルブが、前記中央バルブと流体連通するチャンバーとの間で流体を給排出できるプランジャーを収容するように構成される、実施形態55のカートリッジ。

40

## 【 0 0 6 6 】

実施形態58:使用時において、サンプルを含むチャンバーと、前記検出抗体を含むチャンバーと、前記捕捉抗体を含むチャンバーと、洗浄バッファーを含むチャンバーと、前記シグナルDNAを増幅するためのPCRマスターミックスを含むチャンバーとを備えるように構成される、実施形態1から57のいずれか1つに記載のカートリッジ。

## 【 0 0 6 7 】

実施形態59:サンプルを含むチャンバーと、前記検出抗体を含むチャンバーと、前記捕

50

捉抗体を含むチャンパーと、洗浄バッファーを含むチャンパーと、KOHを含むチャンパーと、HEPES又はトリス-HClを含むチャンパーと、廃液を受容するチャンパーとを備える、実施形態58のカートリッジ。

【0068】

実施形態60: サンプルを含むチャンパーと、約pH 7.25のPBS中に前記検出抗体を含むチャンパーと、約pH 7.25のPBS中に前記捕捉抗体を含むチャンパーと、PBS洗浄バッファーを含むチャンパーと、KOHを含むチャンパーと、約pH 8.25のHEPES又は約pH 7.4のトリス-HClを含むチャンパーと、廃液を受容するチャンパーとを備える、実施形態58のカートリッジ。

【0069】

実施形態61: 前記捕捉抗体及び前記検出抗体が、ウイルス抗原、細菌抗原、プリオン、寄生虫抗原、マイコトキシン、及び癌マーカー、及び薬剤耐性遺伝子産物からなる群から選択される検体と結合する抗体である、実施形態1から60のいずれか1つに記載のカートリッジ。

【0070】

実施形態62: 前記捕捉抗体及び前記検出抗体が、B型肝炎表面抗原、C型肝炎表面抗原、ウシヘルペスウイルス抗原、ノロウイルスカプシド、ロタウイルス、広東住血線虫、ハンタウイルス属タンパク質、鳥インフルエンザウイルス抗原、HIV-1抗原及びH5N1抗原からなる群から選択されるウイルス抗原と結合する抗体である実施形態61のカートリッジ。

【0071】

実施形態63: 前記捕捉抗体及び前記検出抗体が、ウシPRP及びヒト脳PRPからなる群から選択されるプリオンと結合する抗体である、実施形態61のカートリッジ。

【0072】

実施形態64: 前記捕捉抗体及び前記検出抗体が、C.difficile抗原、C.difficile毒素A、C.difficile毒素B、P.piscidia、大腸菌抗原、Bacteroides fragilis、BoNT/A、Streptococcus pyogenesグループA、Staphylococcus aureus、Y.pestis抗原及びM. tuberculosis抗原からなる群から選択される細菌抗原又は細菌毒素と結合する抗体である、実施形態61のカートリッジ。

【0073】

実施形態65: 前記捕捉抗体及び前記検出抗体が、shiga毒素2、Clostridium botulinumニューロトキシンA、Staphylococcalエンテロトキシン、Bacillus thurigiensis毒素、C.difficile毒素A及びC.difficile毒素Bからなる群から選択される細菌毒素と結合する抗体である、実施形態61のカートリッジ。

【0074】

実施形態66: 前記捕捉抗体及び前記検出抗体が、薬剤耐性遺伝子によってコードされるポリペプチドと結合する抗体である、実施形態61のカートリッジ。

【0075】

実施形態67: 前記捕捉抗体及び前記検出抗体が、p糖タンパク質、OleCポリペプチド、mbcFポリペプチド、MsrAポリペプチド、bexAポリペプチド、bexBポリペプチド、kpsTポリペプチド及びkpsMポリペプチドからなる群から選択される薬剤耐性性ポリペプチドと結合する抗体である、実施形態61のカートリッジ。

【0076】

実施形態68: 前記捕捉抗体及び前記検出抗体が、宿主応答の炎症マーカーである検体と結合する抗体である、実施形態1から60のいずれか1つに記載のカートリッジ。

【0077】

実施形態69: 前記捕捉抗体及び前記検出抗体が、IL-8、カルプロテクチン及びラクトフェリンからなる群から選択される検体と結合する抗体である、実施形態68のカートリッジ。

【0078】

実施形態70: 前記捕捉抗体及び前記検出抗体が、癌マーカーである検体と結合する抗体

10

20

30

40

50

である、実施形態1から60のいずれか1つに記載のカートリッジ。

【0079】

実施形態71:前記捕捉抗体及び前記検出抗体が、Table 5(表5)の癌マーカーと結合する抗体である、実施形態70の方法。

【0080】

実施形態72:ウイルス抗原、細菌抗原、プリオン、寄生虫抗原、マイコトキシン及び癌細胞由来の検体からなる群から選択される検体又は検体の断片をコードする核酸を検出及び/又は定量するためのプライマー及びプローブを含む、実施形態45から71のいずれか1つに記載のカートリッジ。

【0081】

実施形態73:前記カートリッジが、ウイルス抗原又はその断片をコードする核酸を検出及び/又は定量するためのプライマー及びプローブを含み、前記抗原が、B型肝炎表面抗原、C型肝炎表面抗原、ウシヘルペスウイルス抗原、ノロウイルスカプシド、ロタウイルス、広東住血線虫、ハンタウイルス属タンパク質、鳥インフルエンザウイルス抗原、HIV-1抗原及びH5N1抗原からなる群から選択される、実施形態72のカートリッジ。

【0082】

実施形態74:前記カートリッジが、細菌抗原又は細菌毒素又はそれらの断片をコードする核酸を検出及び/又は定量するためのプライマー及びプローブを含み、前記細菌抗原又は細菌毒素が、C.difficile抗原、C.difficile Toxin A、C.difficile Toxin B、P.piscidia、大腸菌抗原、Bacteroides fragilis、BoNT/A、Streptococcus pyogenes群A、Staphylococcus aureus、Y.pestis抗原及びM. tuberculosis抗原からなる群から選択される、実施形態72のカートリッジ。

【0083】

実施形態75:前記カートリッジが、細菌毒素又はその断片をコードする核酸を検出及び/又は定量するためのプライマー及びプローブを含み、前記細菌毒素が、shiga毒素2、Clostridium botulinumニューロトキシンA、Staphylococcalエンテロトキシン、Bacillus thuringiensis毒素、C.difficile毒素A及びC.difficile毒素Bからなる群から選択される、実施形態72のカートリッジ。

【0084】

実施形態76:薬剤耐性遺伝子によって発現されるポリペプチドをコードする核酸を検出及び/又は定量するためのプライマー及びプローブを含む、実施形態72のカートリッジ。

【0085】

実施形態77:MRP、p糖タンパク質、OleCポリペプチド、mbcFポリペプチド、MsrAポリペプチド、bexAポリペプチド、bexBポリペプチド、kpsTポリペプチド及びkpsMポリペプチドからなる群から選択される薬剤耐性ポリペプチドをコードする核酸を検出及び/又は定量するためのプライマー及びプローブを含む、実施形態76のカートリッジ。

【0086】

実施形態78:宿主応答の炎症マーカー又はマーカーの断片をコードする核酸を検出及び/又は定量するためのプライマー及びプローブを含む、実施形態45から71のいずれか1つに記載のカートリッジ。

【0087】

実施形態79:IL-8、カルプロテクチン及びラクトフェリンからなる群から選択されるマーカー又はマーカーの断片をコードする核酸を検出及び/又は定量するためのプライマー及びプローブを含む、実施形態78のカートリッジ。

【0088】

実施形態80:癌マーカー又は癌マーカーの断片をコードする核酸を検出及び/又は定量するためのプライマー及びプローブを含む、実施形態45から71のいずれか1つに記載のカートリッジ。

【0089】

実施形態81:Table 5(表5)の癌マーカー又は癌マーカーの断片をコードする核酸を検出

10

20

30

40

50

及び/又は定量するためのプライマー及びプローブを含む、実施形態80のカートリッジ。

【0090】

実施形態82:生物由来、環境由来、医療由来又は患者由来の材料を含むサンプルをロードされる、実施形態1から81のいずれか1つに記載のカートリッジ。

【0091】

実施形態83:前記サンプルが、表層物質、土壌、水、植生及び工業由来サンプルからなる群から選択される環境サンプルを含む、実施形態82のカートリッジ。

【0092】

実施形態84:前記サンプルが、培養液、血液、唾液、脳脊髄液、尿、便、気管支吸引液、気管洗浄液、胸膜液、乳汁、リンパ液、痰、精液、ニードル吸引液、パンチ生検、外科的生検、低温保存切片、FFPE切片からなる群から選択される生物学的サンプルを含む、実施形態82のカートリッジ。

10

【0093】

実施形態85:前記サンプルが、表層物質、土壌、水、植生及び工業由来サンプルからなる群から選択される環境サンプルを含む、実施形態82のカートリッジ。

【0094】

実施形態86:前記サンプルが、食肉、食肉加工品、鳥肉又は鳥肉製品、牛乳又は乳製品、並びに農作物、並びに有機廃棄物からなる群から選択される食品又は農業由来サンプルを含む、実施形態82のカートリッジ。

【0095】

実施形態87:イムノPCRを実施して、1つ又は複数の標的検体を検出及び/又は定量し、任意に標的核酸を検出及び/又は定量する方法であって、イムノPCRを実施するように構成されたカートリッジのサンプル受容チャンパーにサンプルを提供する工程と、前記カートリッジを使用して、捕捉抗体が検体と結合して捕捉抗体/検体複合体を形成する条件下で、前記捕捉抗体と前記検体とを接触させる工程と、検出抗体が前記捕捉抗体/検体複合体と特異的に結合して免疫複合体を形成する条件下で、シグナルDNAに付着する検出抗体と前記検体とを接触させる工程と、前記シグナルDNAを含む前記免疫複合体又はその部分を放出させ、温度調節されたチャンネル又はチャンパーに前記免疫複合体又はその部分を送達する工程と、前記温度調節されたチャンネル又はチャンパーにおいて核酸増幅を実施して前記シグナル核酸を検出及び/又は定量し、それにより前記検体を検出及び/又は定量する工程とを含む方法。

20

30

【0096】

実施形態88:イムノPCRを実施して、1つ又は複数の標的検体を検出及び/又は定量し、任意に、核酸を検出及び/又は定量する方法であって、イムノPCRを実施するように構成されたカートリッジのサンプル受容チャンパーにサンプルを提供する工程と、前記カートリッジを使用して、捕捉抗体が検体と結合して捕捉抗体/検体複合体を形成する条件下で、前記捕捉抗体と前記検体とを接触させる工程と、検出抗体が前記捕捉抗体/検体複合体と特異的に結合して免疫複合体を形成する条件下で、前記検出抗体と前記検体とを接触させる工程と、前記検出抗体に結合する標識抗体であって、シグナルDNAに付着している標識抗体と前記免疫複合体とを、前記標識抗体が前記検出抗体に特異的に結合して標識免疫複合体を形成する条件下で接触させる工程と、前記シグナルDNAを含む前記標識免疫複合体又はその部分を放出させ、温度調節されたチャンネル又はチャンパーに前記免疫複合体又はその部分を送達する工程と、前記温度調節されたチャンネル又はチャンパーにおいて核酸増幅を実施して前記シグナル核酸を検出及び/又は定量し、それにより前記検体を検出及び/又は定量する工程とを含む方法。

40

50

## 【 0 0 9 7 】

実施形態89:前記核酸増幅が、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、リガーゼ検出反応(LDR)、多重ライゲーション依存的プローブ増幅法(MLPA)、Q-レプリカーゼ増幅が続くライゲーション法、プライマー伸長法、鎖置換増幅法(SDA)、過剰分岐鎖置換増幅法、多置換増幅法(MDA)、核酸鎖ベースの増幅法(NASBA)及びローリングサークル増幅法(RCA)からなる群から選択される方法を含む、実施形態87又は88に記載の方法。

## 【 0 0 9 8 】

実施形態90:前記核酸増幅が、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)を含む、実施形態89の方法。

## 【 0 0 9 9 】

実施形態91:前記核酸増幅が、qPCR法を含む、実施形態90の方法。

## 【 0 1 0 0 】

実施形態92:前記カートリッジが、実施形態1から77のいずれか1つのカートリッジである、実施形態87から91のいずれか1つに記載の方法。

## 【 0 1 0 1 】

実施形態93:前記カートリッジが、実施形態1から12及び23から77のいずれか1つのカートリッジであり、前記捕捉抗体が、反応チャンバーの壁に、又は前記マトリックス材料に付着し、前記検体の結合が、前記反応チャンバー又は前記マトリックス材料中の前記検体を固定する、実施形態87から91のいずれか1つに記載の方法。

## 【 0 1 0 2 】

実施形態94:前記カートリッジが、実施形態1から9及び13から77のいずれか1つのカートリッジであり、前記捕捉抗体が粒子に付着し、前記検体の結合が、前記検体を前記粒子に付着させる、実施形態87から91のいずれか1つに記載の方法。

## 【 0 1 0 3 】

実施形態95:前記検出抗体と前記検体との接触が、前記検出抗体と、前記粒子に付着した前記検体との接触を含む、実施形態94の方法。

## 【 0 1 0 4 】

実施形態96:前記マトリックスへの前記粒子のトラッピングを含む、実施形態94又は95に記載の方法。

## 【 0 1 0 5 】

実施形態97:実施形態87から96のいずれか1つに記載の方法であって、前記捕捉抗体がビーズに付着するときは、前記免疫複合体若しくはその部分を放出する工程、又は前記標識免疫複合体若しくはその部分を放出する工程が、全ての複合体を逆溶出させる工程と、前記温度調節されたチャンネル又はチャンパーに前記複合体を送達する工程とを含み、

前記捕捉抗体が、反応チャンパーの壁に、又は前記マトリックス材料に付着するときは、前記免疫複合体若しくはその部分を放出する工程、又は前記標識免疫複合体若しくはその部分の放出が、全ての複合体を前記壁又はマトリックス材料から切り離す工程と、前記温度調節されたチャンネル又はチャンパーにその複合体を送達する工程とを含む、方法。

## 【 0 1 0 6 】

実施形態98:前記免疫複合体若しくはその部分を放出する工程、又は前記標識免疫複合体若しくはその部分を放出する工程が、前記免疫複合体からシグナルDNAに付着した前記検出抗体を放出させ、シグナルDNAが付着した前記検出抗体を、前記温度調節されたチャンネル又はチャンパーに送達する工程、又は前記標識免疫複合体からシグナルDNAに付着した前記標識抗体を放出させ、シグナルDNAが付着した前記標識抗体を、前記温度調節されたチャンネル又はチャンパーに送達する工程を含む、実施形態87から96のいずれか1つに記載の方法。

## 【 0 1 0 7 】

実施形態99:前記放出する工程が、前記免疫複合体からの前記検出抗体を化学的に破壊するか、又は、前記標識免疫複合体からの前記標識抗体を化学的に破壊する工程を含む、

10

20

30

40

50

実施形態98の方法。

【0108】

実施形態100:前記破壊する工程が、前記免疫複合体又は標識免疫複合体を塩基と接触させる工程を含む、実施形態99の方法。

【0109】

実施形態101:前記破壊する工程が、前記免疫複合体又は標識免疫複合体をKOHと接触させる工程を含む、実施形態99の方法。

【0110】

実施形態102:前記放出する工程が、熱を用いて、前記免疫複合体からの前記検出抗体を破壊するか、又は、前記標識免疫複合体からの前記標識抗体を破壊する工程を含む、実施形態98の方法。

10

【0111】

実施形態103:前記放出する工程が、超音波処理を用いて、前記免疫複合体からの前記検出抗体を破壊するか、又は、前記標識免疫複合体からの前記標識抗体を破壊する工程を含む、実施形態98の方法。

【0112】

実施形態104:前記シグナルDNAが、前記検出抗体に、又は前記標識抗体に化学的にコンジュゲートし、前記免疫複合体若しくはその部分を放出する工程、又は前記標識免疫複合体若しくはその部分を放出する工程が、前記検出抗体に対して、又は前記標識抗体に対して前記シグナルDNAをコンジュゲートさせるリンカーを切断する工程と、前記温度調節されたチャンネル又はチャンパーに前記シグナルDNAを送達する工程とを含む、実施形態87から96のいずれか1つの方法。

20

【0113】

実施形態105:前記シグナルDNAを前記検出抗体に、又は前記標識抗体に付着させるリンカーが、酸に不安定なリンカーであり、前記切断する工程が、前記リンカーを切断できる酸と前記リンカーとを接触させる工程を含む、実施形態104の方法。

【0114】

実施形態106:前記シグナルDNAを前記検出抗体に、又は前記標識抗体に付着させるリンカーが、塩基に不安定なリンカーであり、前記切断する工程が、前記リンカーを切断できる塩基と前記リンカーとを接触させる工程を含む、実施形態104の方法。

30

【0115】

実施形態107:前記シグナルDNAを前記検出抗体に、又は前記標識抗体に付着させるリンカーが、ジスルフィド結合を含み、前記切断する工程が、前記ジスルフィド結合を破壊できる剤と前記リンカーとを接触させる工程を含む、実施形態104の方法。

【0116】

実施形態108:前記ジスルフィド結合を破壊できる前記剤がジチオスレイトール(DTT)を含む、実施形態106の方法。

【0117】

実施形態109:前記シグナルDNAが、前記検出抗体若しくは前記標識抗体に化学的にコンジュゲートするか、又は前記検出抗体若しくは前記標識抗体にアビジン/ビオチン相互作用によって連結され、前記免疫複合体若しくはその部分を放出する工程、又は前記標識免疫複合体若しくはその部分を放出する工程が、前記シグナルDNAを切断して核酸増幅反応の検出又は定量ができる前記シグナルDNAの断片を放出する工程と、前記温度調節されたチャンネル又はチャンパーに前記シグナルDNAの前記放出された断片を送達する工程とを含む、実施形態87から96のいずれか1つに記載の方法。

40

【0118】

実施形態110:前記シグナルDNAを切断する工程、前記シグナルDNAの制限酵素部位を認識して、前記制限酵素部位で、又はその近傍で前記シグナルDNAを切断する制限エンドヌクレアーゼと前記シグナルDNAとを接触させる工程を含む、実施形態109の方法。

【0119】

50

実施形態111:前記シグナルDNAがビーズに結合し、前記検出抗体又は前記標識抗体が同じビーズに結合し、前記シグナルDNAを放出する工程が、前記シグナルDNA及び/又はビーズを加熱又は超音波破碎して前記シグナルDNAを放出する工程と、前記温度調節されたチャンネル又はチャンバーに前記シグナルDNAを送達する工程とを含む、実施形態87から96のいずれか1つに記載の方法。

【0120】

実施形態112:前記検出抗体が前記シグナルDNAを含むファージの表面に提示されるか、又は、前記標識抗体が前記シグナルDNAを含むファージの表面に提示され、前記シグナルDNAを放出する工程が、前記ファージを加熱又は超音波破碎又は溶解して前記シグナルDNAを放出する工程と、前記温度調節されたチャンネル又はチャンバーに前記シグナルDNAを送達する工程とを含む、実施形態87から96のいずれか1つの方法。

10

【0121】

実施形態113:前記免疫複合体若しくはその部分又は前記標識免疫複合体若しくはその部分を放出させる前に、前記免疫複合体又は前記標識免疫複合体を洗浄して、結合していない材料又は非特異的に結合した材料を除去する工程を含む、実施形態87から112のいずれか1つに記載の方法。

【0122】

実施形態114:前記温度調節されたチャンネル又はチャンバーが、熱サイクリングチャンネル又はチャンバーを備え、前記増幅する工程がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を含む、実施形態87から113のいずれか1つに記載の方法。

20

【0123】

実施形態115:前記PCRがqPCRを含む、実施形態114の方法。

【0124】

実施形態116:前記増幅する工程が、直鎖状ポリメラーゼ反応、リガーゼ連鎖反応、鎖置換反応、核酸配列ベースの増幅及びローリングサークル増幅反応からなる群から選択される方法を含む、実施形態87から113のいずれか1つに記載の方法。

【0125】

実施形態117:前記増幅が、前記シグナルDNAを含む反応混合物を増幅条件に供する工程と、反応混合物中の指示薬の光シグナルをモニターする工程とを含む、実施形態87から116のいずれか1つに記載の方法。

30

【0126】

実施形態118:前記光シグナルが、蛍光シグナル、化学発光シグナル、電気化学的発光シグナル及び比色シグナルからなる群から選択される、実施形態117の方法。

【0127】

実施形態119:光シグナルが蛍光指示薬によって発生する蛍光光シグナルである、実施形態118の方法。

【0128】

実施形態120:前記蛍光指示薬が、二本鎖DNA生成物と結合する非特異的インターカラーション色素である、実施形態119の方法。

【0129】

実施形態121:前記蛍光指示薬が、標的配列に特異的なプローブを含む、実施形態119の方法。

40

【0130】

実施形態122:前記標的配列に特異的なプローブが、TAQMANプローブ、SCORPIONプローブ及びMOLECULAR BEACONからなる群から選択される、実施形態121の方法。

【0131】

実施形態123:同じカートリッジ内の複数の異なる検体に対して行われる、実施形態87から122のいずれか1つに記載の方法。

【0132】

実施形態124:前記複数が、少なくとも2、又は少なくとも3、又は少なくとも4、又は少

50

なくとも5、又は少なくとも6つの異なる検体である、実施形態123の方法。

【0133】

実施形態125:前記複数の検体を含む各検体が、前記カートリッジ内の同じサンプルに由来する、実施形態123又は124に記載の方法。

【0134】

実施形態126:前記複数の検体を構成する各検体を表すシグナルDNAが、同じ温度調節されたチャンネル又はチャンパーにおいて順次増幅される、実施形態123から125のいずれか1つに記載の方法。

【0135】

実施形態127:各増幅反応の間、  
洗浄溶液により前記温度調節されたチャンネル又はチャンパーを洗浄する工程と、  
前記温度調節されたチャンネル又はチャンパーから前記洗浄溶液を除去し、洗浄溶液を流動させて廃液リザーバーに移動させる工程と  
を含む、実施形態126の方法。

10

【0136】

実施形態128:前記温度調節されたチャンネル又はチャンパーから前記洗浄溶液を除去した後、前記温度調節されたチャンネル又はチャンパーへ空気を供給する工程と、チャンネル又はチャンパーをDNA変性温度以上の温度に加熱する工程とを含む、実施形態127の方法。

【0137】

実施形態129:前記変性温度が約90 ~ 約99 の範囲である、実施形態128の方法。

20

【0138】

実施形態130:前記複数の検体を構成する各検体を表すシグナルDNAが、前記カートリッジ内の異なる温度調節されたチャンネル又はチャンパーにおいて同時に各々増幅される、実施形態123から125のいずれか1つに記載の方法。

【0139】

実施形態131:前記複数の検体を構成する各検体を表すシグナルDNAが、前記カートリッジ内の同じ温度調節されたチャンネル又はチャンパーにおいて同時に増幅され、各シグナルDNAの増幅が、異なる識別可能な光シグナルを提供する、実施形態123から125のいずれか1つに記載の方法。

【0140】

実施形態132:約1時間以下、又は約50分以下、又は約40分以下、又は約30分以下、又は約20分以下、又は約15分以下で完了させることができる、実施形態87から131のいずれか1つに記載の方法。

30

【0141】

実施形態133:実施形態45から77のいずれか1つのカートリッジにおいて行われ、前記シグナルDNA以外の核酸を増幅する工程を更に含む、実施形態87から132のいずれか1つに記載の方法。

【0142】

実施形態134:前記シグナルDNA酸以外の核酸を増幅する工程が、  
前記サンプル由来の核酸をマトリックス材料に結合させる工程と、  
結合した核酸を洗浄して洗浄された核酸を提供する工程と、  
洗浄された核酸を溶出させる工程と、  
前記洗浄された核酸を増幅反応に供して、前記洗浄された核酸に存在する場合に標的核酸配列を増幅する工程と  
を含む、実施形態133の方法。

40

【0143】

実施形態135:前記シグナルDNA以外の前記核酸が、DNAを含む、実施形態133又は134に記載の方法。

【0144】

実施形態136:前記シグナルDNA以外の前記核酸が、RNAを含む、実施形態133又は134に記

50

載の方法。

【0145】

実施形態137:前記シグナルDNA以外の核酸を増幅する工程が、前記イムノPCRに使用されるサンプルチャンパー内の同じサンプルから得られる核酸に対して行われる、実施形態133から136のいずれか1つに記載の方法。

【0146】

実施形態138:前記シグナルDNA以外の核酸を増幅する工程が、前記イムノPCRに使用されるサンプルチャンパーとは異なるサンプルチャンパーのサンプルから得られる核酸に対して行われる、実施形態133から136のいずれか1つに記載の方法。

【0147】

実施形態139:シグナルDNA及びシグナルDNA以外の核酸が、同じ温度調節されたチャンネル又はチャンパーにおいて順次増幅される、実施形態133から138のいずれか1つに記載の方法。

【0148】

実施形態140:シグナルDNAが、シグナルDNA以外の核酸の増幅の前に増幅される、実施形態139の方法。

【0149】

実施形態141:シグナルDNAが、シグナルDNA以外の核酸の増幅の後に増幅される、実施形態139の方法。

【0150】

実施形態142:前記シグナルDNAの増幅とシグナルDNA以外の核酸の増幅との間に、洗浄溶液により前記温度調節されたチャンネル又はチャンパーを洗浄する工程と、前記温度調節されたチャンネル又はチャンパーから前記洗浄溶液を除去し、洗浄溶液を流動させて廃液リザーバーに移動させる工程とを含む、実施形態139から141のいずれか1つに記載の方法。

【0151】

実施形態143:前記温度調節されたチャンネル又はチャンパーから前記洗浄溶液を除去した後、前記温度調節されたチャンネル又はチャンパーへ空気を供給する工程と、チャンネル又はチャンパーをDNA変性温度以上の温度に加熱する工程とを含む、実施形態142の方法。

【0152】

実施形態144:前記変性温度が約90 ~ 約99 の範囲である、実施形態143の方法。

【0153】

実施形態145:シグナルDNA及びシグナルDNA以外の核酸が、前記カートリッジ内の異なる温度調節されたチャンネル又はチャンパー内において各々同時に増幅される、実施形態133から144のいずれか1つに記載の方法。

【0154】

実施形態146:シグナルDNA及びシグナルDNA以外の核酸が、前記カートリッジ内の同じ温度調節されたチャンネル又はチャンパー内において同時に増幅され、シグナルDNAの増幅及びシグナルDNA以外の核酸が、異なる識別可能な光シグナルを提供する、実施形態133から144のいずれか1つに記載の方法。

【0155】

実施形態147:シグナルDNA以外の核酸の前記増幅が、前記シグナルDNA以外の核酸を含む反応混合物を増幅条件に供する工程と、反応混合物中の指示薬の光シグナルをモニターする工程とを含む、実施形態133から146のいずれか1つに記載の方法。

【0156】

実施形態148:前記光シグナルが、蛍光シグナル、化学発光シグナル、電気化学的発光シグナル及び比色シグナルからなる群から選択される、実施形態147の方法。

【0157】

実施形態149:光シグナルが蛍光指示薬によって発生する蛍光光シグナルである、実施形態148の方法。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 5 8 】

実施形態150:前記蛍光指示薬が、二本鎖DNA生成物と結合する非特異的インターカラーション色素である、実施形態149の方法。

## 【 0 1 5 9 】

実施形態151:前記蛍光指示薬が、標的配列に特異的なプローブを含む、実施形態149の方法。

## 【 0 1 6 0 】

実施形態152:前記標的配列に特異的なプローブが、TAQMANプローブ、SCORPIONプローブ及びMOLECULAR BEACONからなる群から選択される、実施形態151の方法。

## 【 0 1 6 1 】

実施形態153:前記サンプルが、生物由来、環境由来、医療由来又は患者由来の材料を含む、実施形態88から152のいずれか1つに記載の方法。

## 【 0 1 6 2 】

実施形態154:前記サンプルが、表層物質、土壌、水、植生及び工業由来サンプルからなる群から選択される環境サンプルを含む、実施形態153の方法。

## 【 0 1 6 3 】

実施形態155:前記サンプルが、培養液、血液、唾液、脳脊髄液、尿、便、気管支吸引液、気管洗浄液、胸膜液、乳汁、リンパ液、痰、精液、ニードル吸引液、パンチ生検、外科的生検、低温保存切片、FFPE切片からなる群から選択される生物学的サンプルを含む、実施形態153の方法。

## 【 0 1 6 4 】

実施形態156:前記サンプルが、表層物質、土壌、水、植生及び工業由来サンプルからなる群から選択される環境サンプルを含む、実施形態153の方法。

## 【 0 1 6 5 】

実施形態157:前記サンプルが、食肉、食肉加工品、鳥肉又は鳥肉製品、牛乳又は乳製品、並びに農作物、並びに有機廃棄物からなる群から選択される食品又は農業由来サンプルを含む、実施形態153の方法。

## 【 0 1 6 6 】

実施形態158:前記検体が、ポリペプチド、レクチン、脂質、炭水化物及び有機小分子からなる群から選択される部分を含む、実施形態87から157のいずれか1つに記載の方法。

## 【 0 1 6 7 】

実施形態159:検体が、ウイルス抗原、細菌抗原、プリオン、寄生虫抗原、マイコトキシン、及び癌マーカー、及び薬剤耐性遺伝子産物からなる群から選択される、実施形態87から158のいずれか1つに記載の方法。

## 【 0 1 6 8 】

実施形態160:前記検体が、B型肝炎表面抗原、C型肝炎表面抗原、ウシヘルペスウイルス抗原、ノロウイルスカプシド、ロタウイルス、広東住血線虫、ハンタウイルス属タンパク質、鳥インフルエンザウイルス抗原、HIV-1抗原及びH5N1抗原からなる群から選択されるウイルス抗原を含む、実施形態159の方法。

## 【 0 1 6 9 】

実施形態161:前記検体が、ウシPRP及びヒト脳PRPからなる群から選択されるプリオンを含む、実施形態159の方法。

## 【 0 1 7 0 】

実施形態162:前記検体が、C.difficile抗原、C.difficile Toxin A、C.difficile Toxin B、P.piscidia、大腸菌抗原、Bacteroides fragilis、BoNT/A、Streptococcus pyogenes群A、Staphylococcus aureus、Y.pestis抗原及びM. tuberculosis抗原からなる群から選択される細菌抗原又は細菌毒素を含む、実施形態159の方法。

## 【 0 1 7 1 】

実施形態163:前記検体が、shiga毒素2、Clostridium botulinumニューロトキシンA、Staphylococcalエンテロトキシン、Bacillus thurigiensis毒素、C.difficile毒素A及びC.d

10

20

30

40

50

*C. difficile*毒素Bからなる群から選択される細菌毒素を含む、実施形態159の方法。

【0172】

実施形態164:前記検体が、薬剤耐性遺伝子によってコードされるポリペプチドを含む、実施形態159の方法。

【0173】

実施形態165:前記検体が、p糖タンパク質、OleCポリペプチド、mbcFポリペプチド、MsrAポリペプチド、bexAポリペプチド、bexBポリペプチド、kpsTポリペプチド及びkpsMポリペプチドからなる群から選択される薬剤耐性ポリペプチドを含む、実施形態164の方法。

【0174】

実施形態166:前記検体が、宿主応答の炎症マーカーを含む、実施形態87から157のいずれか1つに記載の方法。 10

【0175】

実施形態167:前記マーカーが、IL-8、カルプロテクチン及びラクトフェリンからなる群から選択される、実施形態166の方法。

【0176】

実施形態168:前記検体が、癌マーカーを含む、実施形態87から157のいずれか1つに記載の方法。

【0177】

実施形態169:前記検体が、Table 5(表5)に記載の癌マーカーを含む、実施形態168の方法。 20

【0178】

実施形態170:ウイルス抗原、細菌抗原、プリオン、寄生虫抗原、マイコトキシン及び癌細胞由来の検体からなる群から選択される検体又は検体の断片をコードする核酸を増幅する工程を含む、実施形態133から169のいずれか1つに記載の方法。

【0179】

実施形態171: B型肝炎表面抗原、C型肝炎表面抗原、ウシヘルペスウイルス抗原、ノロウイルスカプシド、ロタウイルス、広東住血線虫、ハンタウイルス属タンパク質、鳥インフルエンザウイルス抗原、HIV-1抗原及びH5N1抗原からなる群から選択されるウイルス抗原又はその断片をコードする核酸を増幅する工程を含む、実施形態170の方法。

【0180】

実施形態172: *C. difficile*抗原、*C. difficile* Toxin A、*C. difficile* Toxin B、*P. piscidia*、大腸菌抗原、*Bacteroides fragilis*、BoNT/A、*Streptococcus pyogenes*群A、*Staphylococcus aureus*、*Y. pestis*抗原及び*M. tuberculosis*抗原からなる群から選択される細菌抗原又は細菌毒素又はそれらの断片をコードする核酸を増幅する工程を含む、実施形態170の方法。 30

【0181】

実施形態173: shiga毒素2、*Clostridium botulinum*ニューロトキシンA、*Staphylococcal* エンテロトキシン、*Bacillus thurigiensis*毒素、*C. difficile*毒素A及び*C. difficile*毒素Bからなる群から選択される、細菌毒素又はその断片をコードする核酸を増幅する工程を含む、実施形態170の方法。 40

【0182】

実施形態174:薬剤耐性遺伝子によって発現されるポリペプチドをコードする核酸を増幅する工程を含む、実施形態170の方法。

【0183】

実施形態175:前記カートリッジが、p糖タンパク質、OleCポリペプチド、mbcFポリペプチド、MsrAポリペプチド、bexAポリペプチド、bexBポリペプチド、kpsTポリペプチド及びkpsMポリペプチドからなる群から選択される薬剤耐性ポリペプチドをコードする核酸を検出及び/又は定量するためのプライマー及びプローブを含む、実施形態174の方法。

【0184】

実施形態176:宿主応答の炎症マーカーをコードする核酸を増幅する工程を含む、実施形 50

態133から169のいずれか1つに記載の方法。

【0185】

実施形態177:前記カートリッジが、IL-8、カルプロテクチン及びラクトフェリンからなる群から選択されるマーカーをコードする核酸を検出及び/又は定量するためのプライマー及びプローブを含む、実施形態176の方法。

【0186】

実施形態178:癌マーカーをコードする核酸を増幅する工程を含む、実施形態133から169のいずれか1つに記載の方法。

【0187】

実施形態179: Table 5(表5)に記載の癌マーカーをコードする核酸を増幅する工程を含む、実施形態178の方法。

10

【0188】

実施形態180:イムノPCRを実施して、1つ又は複数の標的検体を検出及び/又は定量し、任意に核酸を検出及び/又は定量するシステムであって、前記システムが、1つ又は複数のサンプル処理モジュールを含むように構成される筐体と、実施形態1から86のいずれか1つに係る着脱可能なカートリッジを保持するように構成される各サンプル処理モジュールとを備え、前記システムが、サンプル処理モジュールを操作して、イムノPCRを実施して、対応する着脱可能なサンプルカートリッジ内の1つ又は複数の標的検体の存在及び/又は量を決定し、任意に1つ又は複数の標的DNAの塩基配列のレベルを決定するように構成され、対応する着脱可能なサンプルカートリッジ内のサンプルに対する前記処理が、実施形態87

20

【0189】

実施形態181:1つのサンプル処理モジュールを備えるように構成される、実施形態180のシステム。

【0190】

実施形態182:少なくとも2つのサンプル処理モジュール、又は少なくとも4つのサンプル処理モジュール、又は少なくとも8つのサンプル処理モジュール、又は少なくとも12のサンプル処理モジュール、又は少なくとも16のサンプル処理モジュール、又は少なくとも20のサンプル処理モジュール、又は少なくとも24のサンプル処理モジュール、又は少なくとも28のサンプル処理モジュール、又は少なくとも32のサンプル処理モジュール、又は少なくとも64のサンプル処理モジュール、又は少なくとも128のサンプル処理モジュールを備えるように構成される、実施形態180のシステム。

30

【0191】

実施形態183:前記モジュールが、前記カートリッジ内の温度調節されたチャンバー又はチャンネルを加熱する1つ又は複数の加熱プレートを備える、実施形態180から182のいずれか1つに記載のシステム。

【0192】

実施形態184:前記モジュールが、前記カートリッジ内の温度調節されたチャンネル又はチャンバーを冷却するように構成されるファンを備える、実施形態180から183のいずれか1つに記載のシステム。

40

【0193】

実施形態185:前記モジュールが、コンピュータに分析のための情報(例えば光学的情報)を供給する回路を備える、実施形態180から184のいずれか1つに記載のシステム。

【0194】

実施形態186:前記モジュールが、前記カートリッジ内の反応によって発生する1つ又は複数の光シグナルの励起及び/又は検出を行う光学的ブロックを備える、実施形態180から185のいずれか1つに記載のシステム。

【0195】

実施形態187:前記カートリッジを操作してイムノPCRを実施するように構成される、実施形態180から186のいずれか1つに記載のシステム。

50

## 【0196】

実施形態188:前記カートリッジを操作してシグナルDNA以外の核酸の増幅を実施するように構成される、実施形態180から187のいずれか1つに記載のシステム。

## 【0197】

実施形態189:前記カートリッジを操作して実施形態87から175のいずれか1つの方法を実施するように構成される、実施形態180から188のいずれか1つに記載のシステム。

## 【0198】

実施形態190:イムノPCRを実施して、1つ又は複数の標的検体を検出及び/又は定量し、任意に核酸を検出及び/又は定量するためのキットであって、実施形態1から86のいずれか1つに記載のカートリッジを含む容器を備える、キット。

10

## 【0199】

実施形態191:イムノPCR用のサンプルを調製するための1つ又は複数の試薬を含む容器を更に備える、実施形態190のキット。

## 【0200】

実施形態192:核酸増幅用のサンプルを調製するための1つ又は複数の試薬を含む容器を更に備える、実施形態190又は191に記載のキット。

## 【0201】

実施形態193:核酸増幅用のサンプルを調製するための前記1つ又は複数の試薬が、血清、又は血漿、又はFFPEサンプルの溶解溶液を含む、実施形態192のキット。

20

## 【0202】

実施形態194:核酸増幅用のサンプルを調製するための前記1つ又は複数の試薬が、プロテイナーゼKを含む、実施形態192又は193に記載のキット。

## 【0203】

実施形態195:イムノPCRの実施のための前記カートリッジの使用説明書を含む、実施形態190から194のいずれか1つに記載のキット。

## 【0204】

実施形態196:前記イムノPCRに加えて核酸増幅を実施するための前記カートリッジの使用説明書を含む、実施形態195に記載のキット。

## 【0205】

上記の各種実施形態のいずれにおいても、捕捉抗体及び/又は検出抗体で、及び/又は、存在するときには標識抗体で、目的とする標的と結合する他の部分を置換できることが理解される。したがって、例えば、特定の実施形態では、捕捉抗体がアプタマーで置換され、及び/又は、検出抗体がアプタマーで置換され、及び/又はアプタマーが、存在するときには標識抗体で置換される。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0206】

【図1】図1は、直接的なサンドイッチアッセイ(左)及び間接的なサンドイッチアッセイ(右)を示す。特に、表面は、粒子表面、又はチャンバー若しくはチャネル壁若しくは底部の表面、又はマトリクス材料(例えばフィルター)の表面であってもよい。

40

【図2】図2は、粒子に付着する、捕捉抗体を有する直接的なサンドイッチ免疫複合体を示す。

【図3】図3は、カートリッジにおいて実施されるいくつかの非限定的なイムノPCR法の例を示す。

【図4】図4(パネルA~D)は、シグナルDNAを抗体に連結するための各種スキームを示す。パネルAは、シグナル核酸がリンカーを介して検出抗体に化学的にコンジュゲートされたことを示す。パネルBは、シグナルDNAがアビジン/ビオチン結合を介して検出抗体に付着したことを示す。パネルCは、シグナルDNAが検出抗体も付着する粒子に付着したことを示す。パネルDは、ファージ内に含まれるシグナルDNAを有するファージ上に提示される検出抗体を示す。なお、間接的アッセイにおいて、これらの実施形態のいずれかの検出抗体は

50

、検出抗体と結合する標識抗体で置換できることが理解される。

【図5A】図5Aは、本明細書に記載の方法での使用に適するカートリッジ(例えばGENEXPERT(登録商標)カートリッジ)の主な部品を示す。

【図5B】図5Bは、中央バルブ付近にチャンバーが配置されたカートリッジの上面図を示す。

【図6A】図6Aは、1つの非限定的な例示的实施態様に係るイムノPCR用に構成されたGENEXPERT(登録商標)カートリッジを示す。

【図6B】図6Bは、1つの非限定的な例示的实施態様に係る、イムノPCR及び核酸分析用に構成されたGENEXPERT(登録商標)カートリッジを示す。

【図7】図7(パネルA~C)は、本明細書に記載のイムノPCR及び任意の統合化核酸分析に適する、GENEXPERT(登録商標)カートリッジの一実施形態を例示する。

【図8A】図8A~8Cは、ポリペプチドのイムノPCR検出及び/又は定量、並びに任意の統合化核酸分析のための、モジュール及びシステム(例えば処理装置)の、非限定的な実施形態を示す。図8Aは、GENEXPERT(登録商標)カートリッジの操作のためのモジュールを示す。

【図8B】図8Bは、イムノPCR及び任意の核酸分析用のカートリッジの操作のためのモジュールの一実施形態のいくつかの成分を例示する。

【図8C】図8Cは、複数のモジュールを組み込んだシステム(例えば処理装置)を例示する。

【図9】図9は、捕捉抗体を含む免疫複合体が表面(例えばビーズの表面)に結合した様子、すなわち、捕捉抗体が抗原(検体)と結合し、次に検出抗体と結合する様子を示す。検出抗体は、リンカーを介して単一のDNAに付着し、また検出抗体は、抗FITCアルカリ性ホスファターゼコンジュゲートと結合できるFAMに結合する。

【図10】図10A及び10Bは、イムノPCR及び任意の核酸分析のための非限定的なワークフローを図示する。ある種の実施形態では、イムノPCR及び核酸分析の両方を実施するとき、同じサンプルで実施する。したがって、単一のサンプルを1つのサンプルチャンバーに導入することができる(図10A)。他の実施形態では、サンプルを、イムノPCR及び核酸分析で異なる処理に供することもできる。かかる例において、イムノPCRサンプルを1つのサンプルチャンバーに導入し、核酸分析サンプルを同じカートリッジの他のサンプルチャンバーに導入することができる(図10B)。示される核酸調製物は例示的なものであり、限定的なものではない。

【図11】図11は、実施例2に記載されるGeneXpert(登録商標)カートリッジを使用した自動イムノPCRアッセイの概略図である。

【図12】図12は、実施例2に記載されているGeneXpert(登録商標)カートリッジを使用した自動イムノPCRアッセイ用のカートリッジチャンバー(CH)の割り当て、試薬及び初期体積を示す。

【図13】図13は、実施例2に記載されているヒトIL-8の検出における用量反応曲線である。

【図14】図14は、実施例2に記載されているC.difficileの検出における用量反応曲線である。

【図15】図15A~15Bは、(A)手動、及び(B)自動による、C.difficile毒素BのイムノPCRフォーマットにおける用量反応曲線である(実施例2を参照)。

【発明を実施するための形態】

【0207】

定義

本発明の理解を促進するため、用語及び表現のいくつかについて以下の通り定義する：

【0208】

本明細書において、用語「検出する」、「検出すること」又は「検出」とは、検出可能に標識された組成物を一般的に発見し又は認識すること、又は具体的に観察することを表しうる。

【0209】

10

20

30

40

50

本明細書中で使用する「検出可能的に異なる」又は「スペクトルで識別可能である」という用語は、同時に検出でき、また区別できる一組のラベル(例えば色素/蛍光団)を意味する。

#### 【0210】

本明細書において、用語「患者」及び「対象」は、典型的にはヒトを指すものとして交換可能に使用される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、ヒト以外の動物由来のサンプルに使用することができ、例えば、ヒト以外の霊長類、イヌ、ウマ、ネコ、ブタ、ウシ、ウサギ等に使用できる。更に、用語「患者」は、獣医学の文脈ではヒト以外の動物に使用される場合もある。

#### 【0211】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すものとして本明細書において交換可能に使用される。特定の実施形態において、ポリペプチドは、少なくとも2アミノ酸長、又は少なくとも4アミノ酸長、又は少なくとも4アミノ酸長、又は少なくとも6アミノ酸長、又は少なくとも8アミノ酸長、又は少なくとも10アミノ酸長、又は少なくとも15アミノ酸長、又は少なくとも20アミノ酸長、又は少なくとも25アミノ酸長、又は少なくとも30アミノ酸長、又はそれ以上である。当該用語は、1つ又は複数のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工的・化学的アナログである、並びに、天然に存在するアミノ酸ポリマーである、アミノ酸ポリマーに適用される。当該用語には、ポリペプチドを構成するアミノ酸を連結する従来のペプチド結合における変異体が含まれる。好適な「ペプチド/ポリペプチド/タンパク質」は、炭素がペプチド結合で連結されたアミノ酸の鎖である。したがって、鎖の一端の末端アミノ酸(N末端)は遊離アミノ基を有し、一方、鎖の他端の末端アミノ酸(カルボキシ末端)は遊離カルボキシル基を有する。本明細書において、用語「アミノ末端」(略してN末端)は、タンパク質のN末端のアミノ酸上の遊離 -アミノ基、又は、タンパク質内の他のいかなる位置のアミノ酸の -アミノ基(ペプチド結合を構成するときはイミノ基)を指す。同様に、用語「カルボキシ末端」は、タンパク質のカルボキシ末端上の遊離カルボキシル基、又はタンパク質内の他のいかなる位置のアミノ酸のカルボキシル基を指す。タンパク質にはまた、限定されないがペプチド擬晶(例えばアミド結合ではなくエーテル結合したアミノ酸)等の他のいずれのポリアミノ酸も基本的に包含される。典型的には、本明細書において提供されるタンパク質配列は、全て「L」型のアミノ酸を含む。しかしながら、特定の実施形態では、本明細書において提供されるタンパク質配列のいずれかは、「L」及び「D」アミノ酸の組合せを含むことができる。特定の実施形態において、本明細書において記載されるタンパク質配列のいずれかは、全て「D」型アミノ酸を含むことによって、D-エナンチオマー又はタンパク質のインベルソ形態を提供する。特定の実施形態において、本明細書において記載されるタンパク質配列のいずれかは、アミノ酸が全ての「L」型アミノ酸であるレトロタンパク質を、但し逆の順序で含む。特定の実施形態において、本明細書において記載されるタンパク質配列のいずれかは、逆の順序で全て「D」型アミノ酸から構成されるレトロインベルソタンパク質を含む。

#### 【0212】

本明細書において、用語「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド」、「核酸分子」等は、核酸含有分子のことを指し、限定されないがDNAが包含される。当該用語には、限定されないが、4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、プソイドイソシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブロムウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチル-グアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノ-メチル-2-チオウラシル、-D-マンノ合成キユエオシン、5'-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチ

10

20

30

40

50

オ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシプトキソシン、プソイドウラシル、キュエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、プソイドウラシル、キュエオシン、2-チオシトシン及び2,6-ジアミノプリン等のDNA及びRNAの公知の塩基アナログのいずれかを含む配列が包含される。特定の実施形態では、用語「オリゴヌクレオチド」とは、典型的には500以下のヌクレオチドを有する一本鎖ポリヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも6nt、又は少なくとも8nt、又は少なくとも約10nt、又は少なくとも約12nt、又は少なくとも約15ntであり、多くとも約200nt、又は多くとも約100nt、又は多くとも約50nt、又は多くとも約30nt、又は多くとも約25ntである。オリゴヌクレオチドはそれらの長さによって表示されてもよく、例えば24残基オリゴヌクレオチドは「24-mer」と称することもある。

10

#### 【0213】

本明細書において、標的遺伝子(又はその標的領域)と「相補性」という用語、並びに、標的遺伝子配列に対するプローブ配列の「相補性」のパーセンテージとは、標的遺伝子の配列、又は該標的遺伝子の相補配列に対する「同一性」のパーセンテージのことを指す。本明細書に記載の組成物において使用されるプローブ(又はその領域)と標的遺伝子との間の「相補性」の程度を、例えば本明細書において開示されるように決定する際、「相補性」の程度は、プローブ(又はその領域)の配列と標的遺伝子又は該標的遺伝子の相補配列との間の、それらを最も適切に整列させたときの同一性パーセントとして表される。パーセンテージは、整列配置された2つの配列間において同一である塩基の数を計数し、プローブの隣接するヌクレオチド総数で除算し、100を乗算することによって算出される。用語「相補的」を使用するときは、特に明記しない限り、対象となるオリゴヌクレオチドは、標的分子と少なくとも90%相補的である。いくつかの実施形態において、対象オリゴヌクレオチドは、標的分子と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%相補的である。

20

#### 【0214】

用語「プライマー」は、二重鎖をポリヌクレオチド鋳型と共に形成した後、核酸合成の開始部分として作用し、鋳型に沿ってその3'末端から伸張し、その結果伸張型二重鎖を形成する能力を有する天然又は合成オリゴヌクレオチドを指す。プライマーの伸張は、通常核酸ポリメラーゼ(例えばDNA又はRNAポリメラーゼ)によって実施される。伸張プロセスで追加されるヌクレオチドの配列は、鋳型ポリヌクレオチドの配列により決定される。通常、プライマーがDNAポリメラーゼによって伸張される。各種実施形態において、プライマーは、約14~約40ヌクレオチド長の範囲、又は約18~約36若しくは約30若しくは約25ヌクレオチド長の範囲を典型的に有する。特定の実施形態において、用語「プライマー」は、例えば標的遺伝子、シグナルDNA等の、標的核酸分子の一連の少なくとも8つの隣接するヌクレオチドと相補的である領域を含むオリゴヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態では、プライマー又はプローブは、標的分子の少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも29、少なくとも30、少なくとも31、少なくとも32、少なくとも33、少なくとも34、少なくとも35、少なくとも36、少なくとも37、少なくとも38、少なくとも39、又は少なくとも40の隣接するヌクレオチド配列に対する相補的領域を含む。プライマー又はプローブが「標的分子の隣接する少なくともxヌクレオチドと相補的である」領域を含むとき、当該プライマー又はプローブは、標的分子の隣接する少なくともxヌクレオチドと少なくとも95%相補的である。いくつかの実施形態において、プライマー又はプローブは、標的分子と少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%相補的である。プライマーは、様々な核酸の増幅反応において使用され、例えば

30

40

50

単一のプライマーを使用する直鎖的な増幅反応又は2つ以上のプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応に使用される。特定の用途のためのプライマーの長さ及び配列を選択するためのガイダンスは当業者に周知であり、参照により本明細書に組み込むDieffenbach編、「PCR Primer: A Laboratory Manual」、第2版(Cold Spring Harbor Press, New York、2003)に記載される通りである。

#### 【0215】

「核酸増幅」という用語には、典型的に鋳型依存的な方法で、少なくとも1つの標的核酸の少なくとも一部が複製されるかいはなる手段も含まれ、限定されないが、一次関数的に、又は指数関数的に、核酸配列を増幅する幅広い範囲の技術が含まれる。増幅する工程を実施するための例示的な手段としてはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、リガーゼ検出反応(LDR)、複合ライゲーション依存的プローブ増幅(MLPA)、ライゲーション後のQ-レプリカーゼ増幅に、プライマー伸長、鎖置換増幅(SDA)、過剰分岐鎖置換増幅、多置換増幅(MDA)、核酸鎖ベースの増幅(NASBA)、二段階多重増幅、ローリングサークル増幅(RCA)が挙げられ、それらの多重バージョン及びそれらの組合せも含まれ、例えば、限定されないがOLA/PCR、PCR/OLA、LDR/PCR、PCR/PCR/LDR、PCR/LDR、LCR/PCR、PCR/LCR(別名、複合連鎖反応 CCR)、デジタル増幅等が含まれる。かかる技術に関する説明は、多くの出典の中でも、Ausbelら、(1995)「PCR Primer: A Laboratory Manual」Dieffenbach編、Cold Spring Harbor Press;Msuihら、(1996) J. Clin. Micro. 34: 501-07;Rapeley編、(2002) The Nucleic Acid Protocols Handbook, Humana Press, Totowa, N.J.;Abramsonら、(1993) Curr. Opin. Biotechnol. 4(1):41-47;Dayら、(1995) Genomics, 29(1): 152-162;Ehrlichら、(1991) Science, 252: 1643-1650;Innisら、(1990)「PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications」Academic Press;Favisら、(2000) Nat. Biotechnol., 18: 561-564;Rabenauら、(2000) Infection, 28: 97-102;Belgrader, Barany及びLubin、「Development of a Multiplex Ligation Detection Reaction DNA Typing Assay,」、Sixth International Symposium on Human Identification, 1995 (promega.com/geneticidproc/ussymp6proc/blegrad.htmlのウェブサイト);LCR Kit Instruction Manual, Cat. #200520, Rev. #050002, Stratagene社、2002;Baranyら、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 188-193;Bi及びSambrook (1997) Nucl. Acids Res. 25: 2924-2951;Zirviら、(1999) Nucl. Acid Res. 27: e40i-viii;Deanら、(2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 5261-5266;Barany及びGelfand (1991) Gene, 109: 1-11;Walkerら、(1992) Nucl. Acid Res. 20: 1691-1696;Polstraら、(2002) BMC Inf. Dis. 2: 18;Lageら、(2003) Genome Res. 13(2): 294-307;Landegrenら、(1988) Science, 241: 1077-1080;Demidov (2002) Expert Rev. Mol. Diagn. 2(6): 542-548;Cookら、(2003) J. Microbiol. Meth. 53(2): 165-174, Schweitzerら、(2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12(1): 21-27;米国特許第6,027,998号、第5,830,711号、第6,027,889号、第5,686,243号及び第6,605,451号明細書;国際公開第97/31256号、第01/92579号、第00/56927A3号及び第98/03673A1号パンフレット等に記載が存在する。

#### 【0216】

いくつかの実施形態において、増幅は、以下の経時的な手順の少なくとも1つのサイクルを含む:

少なくとも1つの標的核酸と相補的な、又は実質的に相補的な配列を有する少なくとも1つのプライマーをアニールすること、ポリメラーゼを使用してテンプレート依存的な方法で少なくとも1つのヌクレオチド鎖を合成すること、及び新たに形成された核酸二重鎖を変性させて鎖を分離させること。当該サイクルは、繰り返してもよく、又は繰り返さなくともよい。増幅は、熱サイクリングを含んでもよく、又は特定の実施形態においては、等温的に実施してもよい。

#### 【0217】

本明細書において使用する用語「ハイブリダイズする」とは、典型的には「特異的なハイブリダイゼーション」を指し、すなわち、実施形態によってはストリンジェントな条件下で、核酸分子が優先的に特定のヌクレオチド配列に対して、結合、デュプレキシング又

はハイブリダイズすることである。「ストリンジェントな条件」という用語は、プローブがその標的配列に対し優先的にハイブリダイズし、他の配列とは少ない程度でハイブリダイズするか、又は全くハイブリダイズしない条件を指す。核酸ハイブリッド形成の文脈の「ストリンジェントなハイブリダイゼーション」及び「ストリンジェントなハイブリダイゼーション洗浄条件」は、配列依存的で、そして、異なる環境因子の下で異なる。例えば、核酸のハイブリダイゼーションの詳細なガイドは、Tijssen(1993)「Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes」、パートI、第2章、「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays」、Elsevier, N.Y.(「Tijssen」)に記載されている。

一般的に、フィルターハイブリダイゼーションのための非常にストリンジェントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件は、所定のイオン強度及びpHにおいて、特定の配列に対する熱融解点(T<sub>m</sub>)より約5%低いものが選択される。T<sub>m</sub>は、(所定のイオン強度及びpH下で)標的配列の50%が完全にマッチするプローブとハイブリダイズする温度である。特定の実施形態において、非常にストリンジェントな条件は、特定のプローブのT<sub>m</sub>と等しいものが選択される。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーのバッファー組成物、温度及びプローブ長に対する依存性は、当業者に公知である(Sambrook及びRussell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.)、第1~3巻、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NYを参照)。

10

## 【0218】

本明細書中で使用する「抗体」とは、ヒト又は他の種由来の免疫グロブリン遺伝子又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つ又は複数のポリペプチド、又は、それらに由来する標的分子(例えば抗原)と結合できるポリペプチドからなるタンパク質を意味する。確認されているヒト免疫グロブリン遺伝子は、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\lambda$ 及び $\kappa$ 定常領域遺伝子、並びに無数のイムノグロブリン可変領域遺伝子を含む。軽鎖は、 $\kappa$ 又は $\lambda$ に分類される。重鎖は、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 、 $\alpha$ 又は $\beta$ に分類され、それらはそれぞれ、免疫グロブリンG、免疫グロブリンM、免疫グロブリンA、免疫グロブリンD及び免疫グロブリンEの免疫グロブリンクラスとして定義される。

20

## 【0219】

典型的なイムノグロブリン(抗体)構造単位は、四量体を含むことが公知である。各四量体は、2対の同一のポリペプチド鎖(各対当たり1つの「軽」鎖(約25kD)及び1つの「重」鎖(約50~70kD))から構成される。各鎖のN末端は、主に抗原認識の基となる約100~110以上のアミノ酸による可変領域を決定する。用語「可変軽鎖(VL)及び可変重鎖(VH)」は、それぞれそれらの軽鎖及び重鎖を指す。

30

## 【0220】

抗体は、本来のイムノグロブリンとして存在するか、又は種々のペプチダーゼによる消化によって産生され十分に解析されたいくつかの断片として存在する。すなわち、例えば、ペプシンを用いてヒンジ領域のジスルフィド結合の下の部分で抗体を消化し、それ自体ジスルフィド結合によってVH-CH1に連結する軽鎖であるFabのダイマー、すなわちF(ab)'<sub>2</sub>を得る。F(ab)'<sub>2</sub>は穏やかな条件で還元され、ヒンジ領域のジスルフィド結合が切断され、それにより(Fab')<sub>2</sub>のダイマーがFab'モノマーに変換されうる。Fab'モノマーは、基本的にヒンジ領域の部分をもつFabである(他の抗体断片に関する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)。完全抗体の消化物として各種の抗体断片が定義されているが、当業者であれば、かかるFab'断片を、化学的に、又は組換えDNA法を利用することによって新たに合成できることを理解する。したがって、本明細書で用いられる用語「抗体」には、全長抗体の修飾によって産生されるか、又は組換えDNA法を使用して新たに合成される抗体断片も含まれる。特定の好適な抗体としては、単鎖抗体(単一のポリペプチド鎖として存在する抗体)、より好ましくは単鎖Fv抗体(sFv又はscFv)が挙げられ、それらは、可変重鎖及び可変軽鎖が(直接、又はペプチドリンカーで)連結されて連続したポリペプチドを形成したものである。単鎖Fv抗体は、共有結合で連結されたVH-VLヘテロダイマーであり、それらは、直接連結される

40

50

か、又はペプチドをコードするリンカーを介して連結されたVH-及びVL-をコードする核酸配列から発現することができる。Hustonら、(1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883。VH及びVLは、単一のポリペプチド鎖として相互に連結される一方で、VH及びVLドメインは、非共有結合的に会合する。繊維状ファージの表面に初めて発現させた機能性抗体分子は単鎖Fv(scFv)であったが、しかしながら、代替的な発現戦略も奏功した。例えば、鎖の1つ(重鎖又は軽鎖)がg3キャプシドタンパク質と融合し、その相補鎖が可溶性分子としてペリプラズムに輸送される場合、Fab分子はファージ上に提示される。2つの鎖は、同一又は異なるレプリコンにコードされるが、重要な点は、各Fab分子の2つの抗体鎖が翻訳後に会合し、ダイマーが、例えば鎖の1つのg3pへの連結を経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5,733,743号を参照)。抗体V領域に由来する、天然に凝集するが化学的には分離された軽及び重ポリペプチド鎖が、抗原結合部位の構造と実質的に類似する三次元構造にフォールディングされる分子に変換される、scFv抗体及び他の多くの構造が、当業者に公知である(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)。特に好適な抗体としては、ファージ上に提示するあらゆるもの(例えば、scFv、Fv、Fab及びジスルフィド結合されたFv)とすべきである(Reiterら、(1995) Protein Eng. 8: 1323-1331を参照)。また、本明細書で用いられる抗体には、限定されないが、nanobody(例えば、ラクダ抗体)(Harmsen及びHaard (2007) Appl. Microbiol. Biotechnol. 77 (1): 13-22; Muller ら、(2010) J. Biol. Chem. 285(49): 38348-38361; Dolkら (2005) Appl. Environ. Microbiol. 71(1): 442-450; Stanfieldら、(2004) Science, 305(5691): 1770-1773; Desmyterら、(1996) Nat. Struct. Biol. 3(9): 803-811等を参照)、unibody(Kolfschotenら、(2007) Science 317: 1554-1557; 国際公開第2007/059782号パンフレット等)、affibody(Nordら、(1997) Nat. Biotechnol. 15: 772-777; Ronmarkら、(2002) Eur. J. Biochem., 269: 2647-2655; 米国特許第5,831,012号等)が含まれる。

10

20

30

40

50

#### 【0221】

「特異的に結合する」というフレーズは、ある分子がある目的の標的に優先的に結合するか、又は、他の分子よりも標的(検体)に対して高い親和性で結合することを指す。例えば、抗体は、それに対応する抗原に選択的に結合する。DNA分子は実質的に相補的な配列に結合し、ストリンジェントな条件下では無関係な配列とは結合しない。特異的な結合とは、雑多な分子集団(例えばタンパク質及び他の生物学的物質)中における標的の有無を決定付けるような結合反応を指す場合もある。すなわち、所定の条件下(例えば抗体の場合、イムノアッセイ条件、又は核酸の場合、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件)では、特異的なリガンド又は抗体は、その特定の「標的」分子と結合し、その他の顕著な量でサンプル中に存在する分子とは結合しない。すなわち、各種実施形態において、ある分子の他の分子に対する結合、例えばプローブの場合には標的配列に対する結合に関する「特異的である」又は「特異性」とは、2つの分子の間での認識、接触及び安定な錯体形成が行われる一方で、その分子の他の分子に対しては実質的に少ない認識、接触又は錯体形成が行われることを意味する。1つの態様では、第1の分子の第2の分子に対する結合に関して「特異的である」とは、反応又はサンプルにおいて第1の分子が他の分子を認識し、複合体を形成する場合において、それが第2の分子と最も多い数で複合体を形成することを意味する。好ましくは、この最も多い数は、複合体の少なくとも50%、又は少なくとも60%、又は少なくとも70%、又は少なくとも80%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%が、複合体のいずれかの部材によって形成される。一般的には、特異的結合のイベントに関係する分子は、それらの表面上に、又は空洞に、各々結合する分子間での特定の認識を生じさせる領域を有する。特異的結合の例としては、抗体-抗原相互作用、酵素-基質相互作用、ポリヌクレオチド及び/又はオリゴヌクレオチドの二重鎖又は三重鎖の形成、受容体-リガンド相互作用等が挙げられる。本明細書において「接触」とは、特異性又は特異的結合に関しては、2つの分子が、十分に近接する位置関係であるため、弱い非共有結合的な化学的相互作用(例えばVan der Waal力、水素結合、塩基スタッキング相互作用、イオン性及び疎水相互作用等)の分子間相

相互作用が支配的に作用することを意味する。

【0222】

用語「サンプル」とは、標的検体(例えばポリペプチド、核酸等)の検出又は測定が求められる、生物学的、環境的、医療的、又は患者の身体的な起源に由来する一定量の材料を指す。一方で、用語「サンプル」には、試料又は培養物(例えば微生物学的な培養物)が含まれる。他方で、用語「サンプル」には、生物学的及び環境的サンプルの両方が含まれる。サンプルには、合成された試料が含まれる。生物学的サンプルは、ヒトを含む動物、液体、固体(例えば便)、細胞又は組織、並びに液体及び固体状の食品及び餌料、並びに例えば乳製品、野菜、食肉及び食肉副産物等の製品及び成分、並びに廃棄物であってもよい。生物学的サンプルには、限定されないが、培養組織、血漿、血清、血液、唾液、羊水、粘液、尿、腓液、脳脊髄液、胸膜液、乳汁、リンパ液、痰、精液、皮膚生検、気管支及び/又は気管吸引液、ニードル吸引液、パンチ生検、低温保存された切片、FFPE切片等の、対象(例えば患者)から採取した材料が含まれる。生物学的サンプルは、ヒト及び各種の家畜、並びに、限定されないが有蹄類、クマ、魚、齧歯動物、ウサギ等の動物を含む野性動物の全てから得ることができる。環境的サンプルには、環境物質(例えば表層、土壌、水及び産業的サンプル)、並びに食品及び乳製品の加工機械、装置、器材、用具、使い捨て可能及び非使い捨て可能なアイテムから得られるサンプルが含まれる。これらの例は、本発明に適用できるサンプルのタイプを限定するものとして解釈すべきでない。用語「サンプル」及び「試料」は互換的に用いられる。

10

【0223】

用語「検体」は、検出される及び/又は定量されるあらゆる部分を指す。検体には、限定されないが、特定の生体分子(タンパク質、抗体、核酸(例えばDNA及び/又はRNA)、炭水化物、レクチン等)、細菌又はその構成要素、細菌毒素又はその構成要素、ウイルス又はその構成要素(例えばコートタンパク質)、菌類又はその構成要素、菌類毒素又はその構成要素、原生動物又はその構成要素、原虫性毒素又はその構成要素、薬剤、他の毒素、食品病原体等が含まれる。

20

【0224】

用語「ポリメラーゼ連鎖反応」(又は「PCR」)とは、DNAの相補鎖の同時プライマー伸長による、特異的なDNA配列のインビトロ増幅反応を指す。換言すれば、PCRとは、プライマー結合部位に隣接する標的核酸の複数のコピー又は複製物を製造するための反応であり、かかる反応には、以下の工程の一回以上の反復が含まれる:(i)標的核酸を変性させる工程と、(ii)プライマー結合部位にプライマーをアニールさせる工程と、(iii)ヌクレオシド3リン酸の存在下で、核酸ポリメラーゼによりプライマーを伸張させる工程。通常、当該反応は、サーマルサイクラー装置において、工程ごとに最適化された異なる温度を周期的に繰り返す。具体的な温度、各工程の時間及び工程間の変化の速度は、当業者に公知の多くの要因に依存し変化する(McPhersonら編、(1995)「PCR: A Practical Approach」第二版、IRL Press, Oxford等を参照)。例えば、従来Taq DNAポリメラーゼを使用するPCRにおいては、二本鎖の標的核酸を約90 超の温度で変性させ、約50~約75 の範囲の温度でプライマーをアニールさせ、プライマーを約72 ~約78 の範囲の温度で伸張させる。用語「PCR」には、かかる反応の派生形態が含まれ、限定されないが、RT-PCR、リアルタイムPCR、入れ子型PCR、定量的PCR、多重PCR等が含まれる。各種の実施形態において、PCR反応液の量は、数百ナノリットル(例えば200nL)から数百 $\mu$ L(例えば約200 $\mu$ L)の範囲であってもよい。

30

40

【0225】

「逆転写PCR」(又は、「RT-PCR」)という用語は、標的RNAを相補一本鎖DNAに変換する逆転写反応の後、それを増幅するPCRのことを指す(米国特許第5,168,038号参照)。

【0226】

用語「リアルタイムPCR」は、反応の進行に伴い、反応生成物(すなわちアンプリコン)の量がモニターされるPCRのことを指す。リアルタイムPCRには多くのタイプが存在し、それらは、反応生成物をモニターするために使用される検出用化学物質の点で主に異なる(G

50

elfandら、米国特許第5,210,015号(「TAQMAN(商標)」);Wittwerら、米国特許第6,174,670号、及び第6,569,627号(インターカレーション色素);Tyagiら、米国特許第5,925,517号(モレキュラービーコン)等を参照)。リアルタイムPCR用の検出用化学物質は、特にMackayら、(2002) Nucl. Acids Res. 30: 1292-1305にレビューが存在する。

#### 【0227】

用語「定量的PCR」又は「qPCR」は、サンプル又は試料中の1つ又は複数の特異的な標的配列の量を測定するよう設計されたPCRのことを指す。定量的PCRには、かかる標的配列の絶対量の定量及び相対量の定量の両方が含まれる。典型的には、定量的測定は、標的配列とは別に、又は共に分析できる1つ又は複数の参照配列を使用して行われる。参照配列は、サンプル又は試料に内在するか、又は外部由来のものであってもよく、後者の場合、1つ又は複数の競合テンプレートを含めてもよい。典型的な内在性の参照配列としては、限定されないが、以下の遺伝子の転写セグメントが挙げられる： -アクチン、GAPDH、 2-マイクログロブリン、リボソームRNA等。定量的PCR技術は、当業者に公知である(例えばFreemanら、(1999)Biotechniques、26:112-126;Becker-Andreら、(1989)Nucl.Acids Res.17:9437-9447;Zimmermanら、(1996)Biotechniques、21:268-279;Diviaccoら、(1992)Gene、122:3013-3020等を参照)。

#### 【0228】

複数の光学的(例えば蛍光)ラベルに関して「スペクトル分解可能な」又は「異なる、識別可能な」という用語は、ラベルの光シグナル(例えば蛍光放射)バンドが十分に区別でき、すなわち十分に非オーバーラップであるため、標準的な光検波システム(例えばバンドパスフィルター及び光電子増倍管等のシステム等)を使用してそれぞれのラベルによって発生するシグナル(例えば蛍光発光)に基づいて、それぞれのラベルが付着した分子タグを識別できることを意味する(米国特許第4,230,558号、第4,811,218号等、又はWhelessら、(1985)21~76頁、「Flow Cytometry:Instrumentation and Data Analysis」(Academic Press、New York)を参照)。

#### 【0229】

用語「試験管式手順」とは、カセット式(例えば、本明細書に記載のGENEXPERT(登録商標)又は改良GENEXPERT(登録商標)カートリッジ)ではなく標準的な研究室用の装置類を用いて作動させる手順を意味する。

#### 【0230】

詳細な説明

各種の実施形態において、イムノPCRを使用してポリペプチド(又は他の検体)の迅速な検出及び/又は定量を容易にする装置及び方法が提供される。特定の実施形態において、当該装置はまた、PCR又は他の増幅方法による目的の(イムノPCRのシグナルDNA以外の)核酸の検出及び/又は定量を提供する。ポリペプチド(又は他の検体)及び核酸の両方を検出及び/又は定量する能力に鑑み、本発明において提供される装置は、標的検体(例えばポリペプチド)の検出又は定量、及び、任意に、関連する核酸の反射アッセイ、又は、逆にいえば、標的核酸の検出又は定量、及び、関連するポリペプチドの反射アッセイを可能にする。特定の実施形態において、自動反応カートリッジを利用して、1つ又は複数の標的検体(例えばポリペプチド)及び、任意に1つ又は複数の核酸標的の検出及び/又は定量を容易にする方法において、迅速かつ正確なイムノPCR並びに核酸検出(例えばqPCRを介して)を容易にする自動反応カートリッジが提供される。

#### 【0231】

ある種の実施形態では、本明細書に記載されるカートリッジは、限定されないが直接的、及び間接的なサンドイッチフォーマットの両方を含む1つ又は複数のイムノPCR反応の全部又は一部を実施する。特定の実施形態において、当該カートリッジは、標的イムノコンジュゲートを調製し、任意に全ての免疫複合体を除去し、又は、シグナルDNAで標識された抗体を除去し、又は、後で分離される結合したイムノコンジュゲートからシグナルDNAを除去し、そしてこれらの部分のいずれかを、例えば、PCRカートリッジ、又はペンチトップPCRシステムで別に分析することができる。特定の実施形態において、当該カートリ

ッジは、増幅及び増幅された生成物の検出及び/又は定量を含む完全なイムノPCRアッセイを提供する。特定の実施形態において、当該カートリッジは更に、イムノPCR反応において使用されるシグナルDNA以外の核酸(例えばRNA、DNA)を、核酸分析(例えば調製、増幅及び検出及び/又は定量)に対し提供する。特定の実施形態において、イムノPCRによって分析される標的検体、及び任意に、分析される更なる核酸の単離及び精製が提供される。

#### 【0232】

イムノPCR分析の自動化により、例えば全体の処理時間の低減、効率の改善、ユーザーエラー及び変動性の低減、工程間のロスの最小化、及びより少量のサンプルを使用する際の改良された能力等、いくつかの利点が得られる。本明細書に記載されるように、カートリッジベースのプロセスの使用は、複数のサンプルタイプを用いた迅速かつ簡単な試験を可能にする。更に、同じサンプルに対する核酸分析(例えばRNA又はDNAのqPCR)を実施する能力により、最小の時間及び資源の使用により有効な反射アッセイが実施でき、また検出閾値及び精度が改善されると考えられる。

10

#### 【0233】

本明細書に記載されるイムノPCRカートリッジ及び方法は、幅広い範囲で使用できる。例えば、イムノPCRは、限定されないが、ウイルス、細菌、菌類、原生動物、並びに、限定されないが、かかる微生物のあらゆる病原性の形態/種/株等、様々な微生物の存在を同定し、及び/又はその定量に用いることができる。

#### 【0234】

特定の実施形態において、イムノPCRは、これらの微生物のいずれかによって産生される、例えば志賀毒素、Clostridium difficile毒素A及び毒素B、ボツリヌスニューロトキシンA及びB、各種のマイコトキシン等を含むが、これらに限定されない毒素を同定するために用いることができる。本明細書のイムノPCR装置及び方法は、例えばClostridium difficile感染(Swaleら、(2014) PLoS ONE 9(8): e106118参照)と関連するIL-8、カルプロテクチン及びラクトフェリン等の宿主応答炎症マーカーを同定するために用いることができる。本明細書に記載のイムノPCR装置及び方法は、各種の癌又は癌マーカーを同定し、薬剤耐性を示す癌細胞又は微生物(例えばMRSA、薬物抵抗性結核、ドキシソルピシン又はゲンタマイシン耐性癌細胞等)を同定するために用いることができる。イムノPCRアッセイは、特に、医療分野のみならず、環境分野(例えば水及び土壌汚染物質のスクリーニング)及び農業分野(例えば牛肉、鳥肉、各種の食用作物等のスクリーニング)での使用を見出す。

20

30

#### 【0235】

各種実施形態において、本明細書に記載のカートリッジが、(1つ又は複数の標的検体の)イムノ-PCR分析及び(1つ又は複数の標的核酸の)核酸分析の両方を可能にするため、第1にイムノPCRの標的のアッセイを行い、次に関連する核酸に関する反射アッセイを行うか、又は、第1に核酸標的のアッセイを行い、次に関連する標的検体に関する反射イムノPCRアッセイを行うことが可能である。基本的に同じ検体に対してかかる反射アッセイを迅速に行う能力は、アッセイ(例えば、特に転写と翻訳のパターンが必ずしも正の相関でない場合)の感度を改善し、偽陽性の発生を減らすことができる。

#### 【0236】

##### イムノPCR法

イムノPCR(I-PCR)は、ELISAの用途の広範さと、PCRの指数関数的増幅力及び感度性とを組み合わせることにより、アナログ的なELISAと比較し感度を上昇させるものである。イムノPCRは、抗原-抗体相互作用を検出するELISAと類似するが、酵素コンジュゲート抗体を使用する代わりに、抗体にはDNAフラグメント(シグナルDNA)のラベルが付着しており、それは例えばPCRによって増幅することができる。ELISAは、抗原の検出のための最も一般的に用いられる方法であるにもかかわらず、標的抗原の濃度が低いときには機能しないことが多い。PCRは、核酸分子の検出のためのルーチン法として実験室では広く用いられるが、それは非核酸分子を検出することができない。

40

#### 【0237】

イムノPCRは、タンパク質(又は他の)抗原及びそれらの抗原に対して生じる抗体の検出

50

を可能にする用途範囲の広い方法である。イムノPCRは、限定されないが、サイトカイン、腫瘍マーカー、T細胞受容体、アンジオテンシノーゲン、毒素、ホルモン類、並びに自己免疫疾患及びアルツハイマー型疾患のバイオマーカー等、様々な生体分子の検出のために広く研究されてきた。それは、微生物抗原及び抗体の検出のための新規な診断ツールとして構成することができる(Niemeyerら、(2005) Trends Biotechnol. 23: 208-216;Niemyerら、(2007) Nat. Protoc. 2: 1918-1930;Malou and Raoult (2011) Trends Microbiol. 19: 295-302;Potuckovaら、(2011) J. Immunol. Meth. 371: 38-47;Mehtaら、(2012) Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 72: 166-174等を参照)。イムノPCRは、各種のウイルス及び細菌タンパク質(例えばロタウイルス抗原VP6(Adlerら、(2005) Biochem. Biophys. Res. Commun. 333: 1289-1294を参照)、HIV p24抗原(例えばBarlettaら、(2004) Am. J. Clin. Pathol. 122: 20-27を参照)、ノロウイルスカプシド(例えばTian and Mandrell (2006) J. Appl. Microbiol. 100: 564-574を参照)、及びStaphylococcus aureusの細胞壁のプロテインA(例えばHuang and Chang (2004) Clin. Chem. 50: 1673-1674を参照))の検出に使用されてきた。イムノPCRは、ヒト血清中の流行性耳下腺炎特異的免疫グロブリンG(IgG)の測定(例えばMcKieら、(2002) J. Immunol. Meth. 270: 135-141等を参照)等、抗体検出用にも構成され、適用されてきた。

10

20

30

40

50

#### 【0238】

一般的に用いられるイムノPCRのいくつかのフォーマットとしては、直接的イムノPCR、間接的イムノPCR、サンドイッチイムノPCR及び間接的サンドイッチイムノPCRが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0239】

従来のサンドイッチイムノPCRにおいては、マイクロタイタープレートのウェルに付着する捕捉抗体によって、検出される抗原(標的検体)が結合し、捕捉抗体と、同様に抗原と結合する検出抗体との間にはさまれる(例えば図1の左図参照)。検出抗体には、シグナルDNA(別名レポーターDNA)が付着し、それは検出シグナルを提供させるためにその後増幅される。「サンドイッチ」(捕捉Ab-検体-検出Ab-シグナルDNA)の形成により、免疫複合体(IC)(別名イムノコンジュゲート)が生じる。結合していない材料及び/又は非特異的に結合した材料を除去するために洗浄した後、シグナルDNAを検出抗体から除去するか、又は、免疫複合体を破壊してシグナルDNAを担持する検出抗体を放出させ、それにより、次のシグナルDNA増幅産物の増幅及び検出及び/又は定量を行うことができ、それにより、標的検体の存在及び/又は量の指標を提供することが可能となる。本明細書に記載の特定の新たな実施形態において、免疫複合体全体を増幅反応に供することができる。

#### 【0240】

間接的サンドイッチイムノPCRにおいて、抗原(標的検体)は、捕捉抗体(典型的にはマイクロタイタープレートウェルに付着)と検出抗体との間に挟まれる。検出抗体は次に、シグナルDNA(別名レポーターDNA)が付着した標識抗体と結合し、該DNAは検出シグナルを提供させるためにその後増幅される(図1の右図参照)。「標識サンドイッチ」(捕捉Ab-検体-検出Ab-標識Ab-シグナルDNA)の形成により、標識イムノコンジュゲート(別名標識免疫複合体)を提供する。結合していない材料及び/又は非特異的に結合した材料を除去するために洗浄した後、シグナルDNAを標識抗体から除去するか、又は、免疫複合体を破壊してシグナルDNAを担持する標識抗体を放出させ、それにより、次のシグナルDNA増幅産物の増幅及び検出及び/又は定量を行うことができ、それにより、標的検体の存在の指標すること、及び/又はその量の測定が可能となる。本明細書に記載の特定の新たな実施形態において、標識免疫複合体全体を増幅反応に導入することができる。

#### 【0241】

直接的イムノPCR及び間接的イムノPCRにおいては、捕捉抗体は省略され、検体は表面(例えばマイクロタイタープレートの表面)に直接結合する。

#### 【0242】

特定の理論に拘束されないが、サンドイッチフォーマット(例えばサンドイッチイムノPCR及び間接的サンドイッチイムノPCR)は、直接的イムノPCR及び間接的イムノPCRよりも優

れていると考えられ、その理由としては、サンドイッチ法では表面上に検体を直接塗布する必要がなく、それにより、安定性を損なうことなく非特異的結合を減少させることができることが挙げられる(Niemeyerら、(1997) Anal. Biochem. 246: 140-145; Mehtaら、(2012) Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 72: 166-174等を参照)。本明細書においては、カートリッジ式のイムノPCR法をサンドイッチ法に関して記載するが、各種実施形態において、ビーズに、及び/又はチャンパー/チャンネル/マトリックス表面に検体を直接付着させる非サンドイッチフォーマットにフォーマット変更することもできることが理解できるであろう。

#### 【0243】

後述するように、本明細書に記載のカートリッジ法では、シグナルDNAの付着及び/又は放出のための多数のストラテジーを利用することができる。

10

#### 【0244】

本明細書に記載されるイムノPCRは、単にシグナルDNAのPCR増幅だけに限定されないことも理解される。本発明では他の増幅方法も考えられ、例えば、限定されないが、リガーゼ連鎖反応(LCR)、リガーゼ検出反応(LDR)、複合ライゲーション依存的なプローブ増幅(M LPA)、ライゲーション及びそれに続くQ-レプリカーゼ増幅、プライマー伸長法、鎖置換増幅(SDA)、過剰分岐鎖置換増幅、多置換増幅(MDA)、核酸鎖ベースの増幅(NASBA)、ローリングサークル増幅(RCA)、近傍リガーゼアッセイ(PLA)等が挙げられる。

#### 【0245】

カートリッジベースのイムノPCR法

20

各種実施形態においてイムノPCR、及び、任意に、イムノPCRに使用するシグナルDNA以外の核酸の核酸分析(例えばqPCR)は、カートリッジにおいて行われる。特定の実施形態において、イムノPCR及び核酸分析の両方が実施される場合、両方のアッセイを同じカートリッジにおいて実施することができる。

#### 【0246】

特定の実施形態において、標的検体(例えばポリペプチド)の結合、サンドイッチ免疫複合体(又は間接アッセイの場合、標識サンドイッチ免疫複合体)の形成、シグナルDNAの放出、並びに次のシグナルDNAの増幅及び検出及び/又は定量(標的検体の存在及び/又は量の測定)は、いずれも単一のカートリッジにおいて行われる。同様に、核酸分析を更に実施する場合、精製及び増幅及び増幅された核酸の検出及び/又は定量は、いずれも同じカートリッジにおいて実施することができる。

30

#### 【0247】

イムノPCRの際、サンプルを、イムノPCRと互換性を有するバッファー/溶液において任意に調製した上で、カートリッジのサンプルチャンパーに導入する。カートリッジは典型的には、直接的イムノPCR反応又は間接的イムノPCR反応を実施するのに必要な1つ又は複数の、又は全ての試薬を含む。特定の実施形態において、カートリッジは、イムノPCRを使用して複数の検体を検出するための1つ又は複数又は全ての試薬を含む。すなわち、カートリッジは、例えば2若しくは3、4若しくは5、6若しくは7、8若しくは9、又は10以上の異なる標的検体のための捕捉及び/又は検出抗体を含んでもよい。

40

#### 【0248】

特定の実施形態において、カートリッジを処理モジュールに設置し、処理モジュールを制御するソフトウェアの選択画面において一通りクリックし、イムノPCRアッセイが開始される(図10A及び10Bを参照)。次に、カートリッジはイムノPCRアッセイを行う。特定の実施形態において、核酸分析(例えばDNA又はRNAの検出又は定量)も行われる。ある特定の実施形態においては、操作の全てがそのカートリッジにおいて行われ、一方他の実施形態においては、例えば後述するように、全操作のうちのサブセットがそのカートリッジにおいて行われる。

#### 【0249】

各種の例示的であるが非限定的な実施形態において、サンプルとして、検出しようとする検体を含むと考えられるいかなる材料も挙げられる。特定の実施形態において、サン

50

ルは、標的検体(例えばポリペプチド、有機小分子、糖、レクチン、炭水化物、核酸等)の検出又は測定が求められる、生物学的、環境的、医療的、又は患者の身体的な起源に由来する一定量の材料を含む。各種実施形態において、サンプルは、試料又は培養物(例えば微生物学的な培養物)を含む。特定の実施形態において、サンプルは、ヒト又はヒト以外の動物由来の生体サンプル(例えば体液、生体内固形物(例えば便)、細胞又は組織)を含む。特定の実施形態において、サンプルは、便、血漿、血清、血液、唾液、羊水、粘液、尿、涙液、脳脊髄液、胸膜液、乳汁、リンパ液、痰、精液、皮膚生検、気管支及び/又は気管吸引液、ニードル吸引液、パンチ生検、低温保存された切片、FFPE切片等の、対象(例えばヒト患者又は動物)から採取した材料を含む。特定の実施形態において、サンプルは、液体又は固体状の食品及び餌料(例えば乳製品、野菜、食肉及び食肉副産物等)を含む。特定の実施形態において、サンプルは、環境由来のサンプル(例えば表層物質、土壌、水及び/又は植生)を含む。特定の実施形態において、サンプルは、細菌、ウイルス、原生動物又は他の病原体を含むことが疑われる材料を含みうる。

10

#### 【0250】

各種実施形態において、直接アッセイを使用した例示的なカートリッジベースのイムノPCRでは、イムノPCRを行うように構成されるカートリッジの(例えば後述するような)サンプル受容チャンパーにサンプルを提供し、更にカートリッジを用いて、

- 1) 捕捉抗体が検体と結合して捕捉抗体/検体複合体を形成する条件下で、捕捉抗体と検体(サンプルに存在する場合)とを接触させ、
- 2) 検出抗体が特異的に捕捉抗体/検体複合体と結合し、免疫複合体を形成する条件下で、シグナルDNAに付着する検出抗体と検体とを接触させ、
- 3) シグナルDNAを含む免疫複合体又はその部分を放出して、温度調節されたチャンネル又はチャンパーに免疫複合体又はその部分を送達し、
- 4) 温度調節されたチャンネル又はチャンパーにおいて核酸増幅を行い、シグナル核酸を検出及び/又は定量し、それにより、検体を検出及び/又は定量する。

20

#### 【0251】

特定の実施形態において、間接アッセイを使用した例示的なカートリッジベースのイムノPCRでは、イムノPCRを行うように構成されるカートリッジの(例えば後述するような)サンプル受容チャンパーにサンプルを提供し、更にカートリッジを用いて、

- 1) イムノPCRを行うように構成されるカートリッジのサンプル受容チャンパーにサンプルを提供し、カートリッジを用いて、
- 2) 捕捉抗体が検体と結合して捕捉抗体/検体複合体を形成する条件下で、捕捉抗体と検体(サンプルに存在する場合)とを接触させ、
- 3) 検出抗体が捕捉抗体/検体複合体と特異的に結合し、免疫複合体を形成する接触条件下で、検出抗体と検体とを接触させ、
- 4) シグナルDNAに付着する標識抗体が検出抗体と特異的に結合し、標識免疫複合体を形成する接触条件下で、検出抗体に結合する標識抗体と免疫複合体とを接触させ、
- 5) シグナルDNAを含む標識免疫複合体又はその部分を放出して、温度調節されたチャンネル又はチャンパーに免疫複合体又はその部分を送達し、
- 6) 温度調節されたチャンネル又はチャンパーにおいて核酸増幅を行い、シグナル核酸を検出及び/又は定量し、それにより、検体を検出及び/又は定量する。

30

40

#### 【0252】

各種実施形態において、核酸増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、リガーゼ検出反応(LDR)、複合ライゲーション依存的なプローブ増幅(MLPA)、ライゲーション及びそれに続くQ-レプリカーゼ増幅、プライマー伸長法、鎖置換増幅(SDA)、過剰分岐鎖置換増幅、多置換増幅(MDA)、核酸鎖ベースの増幅(NASBA)及びローリングサークル増幅(RCA)からなる群から選択される方法を含む。

#### 【0253】

イムノPCRは、多くのフォーマットのいずれかを使用するカートリッジにおいて実施することができる。例えば、特定の実施形態では、捕捉抗体を反応チャンパーの壁に、又は

50

カートリッジのチャンパー内のマトリックス材料(例えばシリカ)に付着させ、検体の結合では、前記反応チャンパー又はマトリックス材料に検体を固定する。検出抗体が結合し、また間接アッセイの場合、標識抗体が結合し、得られるイムノコンジュゲート又は標識イムノコンジュゲートを洗浄して未結合の材料及び/又は非特異的に結合した材料を除去し、シグナルDNA(直接アッセイでは検出抗体に付着、又は間接アッセイでは標識抗体に付着)を、例えば後述するように、次の増幅のために放出させる。

【0254】

しかしながら、各種実施形態において、捕捉抗体は、粒子(例えばラテックス粒子、シリカ粒子、テフロン(登録商標)粒子、貴金属粒子(例えば金)、磁性粒子等)に(例えば図2に図示するように)付着する。特定の実施形態において、捕捉抗体は、(例えば粒子及び抗体上に存在する官能性基間の反応を介して)直接粒子に付着するか、又は、捕捉抗体は、抗体(例えば二官能性リンカー、例えばヘテロ二官能性リンカー)を介して化学的にコンジュゲートするか、又は、当該抗体は、ビオチン/アビジン反応により粒子に連結される。

10

【0255】

粒子に付着する捕捉抗体は検体と結合し、それは次に検出抗体と結合することができ、免疫複合体(又は、間接アッセイの場合には標識免疫複合体)を形成する。なお、図2は、直接サンドイッチアッセイによって産生される免疫複合体を例示するものである。洗浄後、例えば後述するように、シグナルDNAが放出され、検出のために増幅される(例えば図3参照)。

20

【0256】

特定の実施形態において、粒子は、表面に付着せず、<粒子>-<捕捉Ab>-<検体>-<検出Ab>-シグナルDNA>免疫複合体、又は、<粒子>-<捕捉Ab>-<検体>-<検出Ab>-<ラベルAb>-シグナルDNA>標識免疫複合体が、溶液/懸濁液において形成される。得られる免疫複合体又は標識免疫複合体を、次に、例えば、基材に対する粒子の化学結合(例えばビオチン/アビジン相互作用)を経て、例えば本明細書に記載されるマトリックス材料に固定させることもでき、又は、得られる免疫複合体又は標識免疫複合体を、多孔性基材(例えば本明細書に記載されるマトリックス材料)への単純な機械的包括及び/又は吸着により固定させることもできる。

30

【0257】

シグナルDNAの放出機構は、シグナルDNAを検出抗体に、又は間接アッセイの場合、標識抗体に付着させるために使用される具体的な結合様式に依存する。各種実施形態において、免疫複合体全体若しくは標識免疫複合体全体、又は、免疫複合体若しくは標識免疫複合体の一部、又は、シグナルDNA若しくはシグナルDNAの断片は、放出され、増幅のため、温度調節されたチャンネル又はチャンパーに送達される。

【0258】

図4(パネルA~D)は、シグナルDNAを検出抗体に、又は標識抗体にカップリングさせるための、いくつかの例示的であるが非限定的な方法を示す。図4に例示するように、パネルAの特定の実施形態では、シグナルDNAを検出抗体(又は標識抗体)に化学的にコンジュゲートさせることができる。

40

【0259】

典型的には、リンカーは、核酸に対して抗体を化学的にコンジュゲートさせるために用いる。一般にリンカーは官能性基を含む。官能性基には、1つの反応基を含む単官能性リンカー、並びに、2つ以上の異なる機能的標的と結合を形成することができる2つ以上の反応基を含む多官能性リンカーが含まれる。いくつかの実施形態において、多官能性リンカーは、2つ以上の異なる反応基を含むヘテロ二官能性リンカーである。

【0260】

適切な反応基としては、チオール(-SH)、カルボキシレート(COOH)、カルボキシル(-COOH)、カルボニル、アミン(NH<sub>2</sub>)、ヒドロキシル(-OH)、アルデヒド(-CHO)、アルコール(ROH)、ケトン(R<sub>2</sub>CO)、活性水素、エステル、スルフヒドリル(SH)、リン酸塩(-PO<sub>3</sub>)又は光反

50

応性部分が挙げられるが、これらに限定されない。アミン反応基としては、例えばイソチオシアネート、イソシアネート、アシルアザイド、NHSエステル、塩化スルホニル、アルデヒド及びグリオキサール、エポキサイド及びオキシラン、カルボネート、アリアル化剤、イミドエステル、カルボジイミド及び無水物が挙げられるが、これらに限定されない。チオール反応基としては、例えばハロアセチル及びハロゲン化アルキル誘導体、マレイミド、アジリジン、アクリロイル誘導体、アリアル化剤、及びチオール-ジスルフィド交換試薬が挙げられるが、これらに限定されない。カルボキシレート反応基としては、例えばジアゾアルカン及びジアゾアセチル化合物、例えばカルボニルジイミダゾール及びカルボジイミドが挙げられるが、これらに限定されない。ヒドロキシル反応基としては、例えばエポキサイド及びオキシラン、カルボニルジイミダゾール、過ヨウ素酸による酸化、N、N'-ジスクシニミジルカルボネート又はN-ヒドロキシスクシニミジクロロホルメート、酵素的酸化、ハロゲン化アルキル及びイソシアネートが挙げられるが、これらに限定されない。アルデヒド及びケトン反応基としては、例えば Schiff 塩基形成又は還元アミノ化のためのヒドラジン誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。活性水素反応基としては、例えばマンニヒ凝集反応及びヨウ素化反応のためのジアゾニウム誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。光反応性基としては、例えばアリアルアジド及びハロゲン化アリアルアジド、ベンゾフェノン、ジアゾ化合物及びジアジリン誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0261】

化学的コンジュゲートを形成する際に有用な他の適切な反応基及び反応の種類としては、バイオコンジュゲートの化学で公知のものが挙げられる。抗体の化学的コンジュゲート反応において現在用いられる種類としては、求核置換(例えばハロゲン化アシルとアミン及びアルコールとの反応、活性化エステル)、求電子置換(例えばエナミン反応)及び炭素-炭素及び炭素-ヘテロ原子多重結合への付加(例えばミカエル反応、ディールス-アルダー付加)が挙げられるが、これらに限定されない。これらの、また他の有用な反応は、例えば March (1985) *Advanced Organic Chemistry*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York; Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego; 及び Feeney ら、(1982) *Modification of Proteins; Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C. に記載されている。

20

#### 【0262】

特定の実施形態において、リンカーは典型的には、両方の分子(例えば抗体及び核酸)と共有結合を形成することができる。特に適切なリンカーは、当業者に公知であり、直鎖状又は分岐鎖状の炭素リンカー、複素環式炭素リンカー又はペプチドリナーが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、リンカーは、抗体の構成アミノ酸に対し、それらの側鎖基を介して(例えばシステインに対するジスルフィド結合によって)連結されうる。しかしながら、特定の実施形態では、リンカーは、抗体上の末端アミノ酸の炭素アミノ基及びカルボキシル基に連結される。

30

#### 【0263】

特定の実施形態において、抗体上の基との反応性を有する1つの官能性基と、核酸との反応性を有する他の基とを有する二官能性リンカーを用いることで、所望のコンジュゲートを形成できる。或いは、誘導体化を行うことでも官能性基を提供できる。すなわち、例えばペプチド上への遊離スルフヒドリル基の生成手順も公知である(米国特許第4,659,839号を参照)。

40

#### 【0264】

特定の実施形態において、連結剤は、2つ以上の異なる反応基を含むヘテロ二官能性リンカーである。例えば、システイン等のヘテロ二官能性リンカーは、アミン反応基を有することができる、チオール反応基は、誘導体化されたペプチド上のアルデヒドと相互作用することができる。特定の実施形態において、リンカーはリジンとカップリングすることができる。ヘテロ二官能性リンカーに適する反応基の更なる組合せとしては、例えばアミン及びスルフヒドリル反応基、カルボニル及びスルフヒドリル反応基、アミン及び光反応性

50

基、スルフヒドリル及び光反応性基、カルボニル及び光反応性基、カルボキシレート及び光反応性基、並びにアルギニン及び光反応性基、が挙げられる。特定の実施形態において、適切なリンカーとしては、スクシンイミジル4-ヒドラジノニコチネートアセトンヒドラゾン(SANH)又はスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)、シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0265】

ペプチド又はタンパク質に対する各種の分子を付着させるための様々な手順及びリンカー分子が公知である(例えば、欧州特許出願第188,256号;米国特許第4,671,958号、第4,659,839号、第4,414,148号、第4,699,784号;第4,680,338号;第4,569,789号及び第4,589,071号、並びにBorlinghausら、(1987) *Cancer Res.* 47: 4071-4075;van Buggenumら、(2106) *Sci. Rep.*, 6: 22675;Gongら、(2015) *Bioconjug. Chem.*, 27: 217-227等を参照)。

10

【0266】

特定の実施形態において、標識DNAを検出抗体(又は標識抗体に)に連結するリンカーは、切断不可能なリンカーである。

【0267】

化学的コンジュゲーションに代わるものとして、アビジン/ビオチン相互作用を使用して核酸に抗体を連結することができる(例えば図4のパネルBを参照)。かかる相互作用としては、アビジン/ビオチン相互作用、ストレプトアビジン/ビオチン相互作用、ニュートラアビジン/ビオチン相互作用等が挙げられるが、これらに限定されない。アビジン-ビオチン相互作用は、適切な化学的条件下では基本的に不可逆的である。

20

【0268】

ある種の実施形態では、特に抗体に対するシグナルDNAの付着が切断できない場合、増幅反応部位(例えば温度制御チャンネル又はチャンパー)に対するシグナルDNAの送達は、単に免疫複合体(又は標識免疫複合体)全てを増幅反応に送達することによって達成できる。したがって、例えば本明細書に記載されるように免疫複合体が粒子上に形成される場合、粒子は単に(例えばマトリックス材料への)機械的包括から逆溶出させることができる。(最初に粒子に結合した免疫複合体を送達した方向から)流れ方向を逆転させることにより、増幅反応における検出のために十分な量の免疫複合体が放出される。

【0269】

特定の実施形態において、免疫複合体は、シグナルDNAを担持する検出抗体、又はシグナルDNAを担持する標識抗体を放出させるために単に破壊することもでき、それにより、抗体が結合したシグナルDNAが増幅反応に送達される。抗体/検体複合体を破壊する方法は、当業者に公知である。かかる方法としては、抗体/検体複合体を加熱して、又は抗体/検体複合体を塩基性溶液(例えばKOH)下に置くことが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、抗体/検体複合体は、例えば、高塩条件、例えばSDS/尿素(例えば8M)等の変性条件、グリシン・HCl等を使用して破壊することができる。

30

【0270】

特定の実施形態において、抗体は、切断可能なリンカーを使用してシグナルDNAに付着する。多数の切断可能なリンカーが当業者に公知である(例えば米国特許第4,618,492号;第4,542,225号、第4,625,014号等を参照)。切断可能なリンカーの例としては、酸に不安定なリンカー、塩基に不安定なリンカー、プロテアーゼ切断可能なリンカー、ジスルフィドリンカー等が挙げられるが、これらに限定されない。酸に不安定なリンカーは、中性付近のpHで安定であるが、低いpH条件では不安定になり、分解するよう設計されている。プロテアーゼ切断可能なリンカーは、カートリッジに添加されてかかる切断を触媒できる各種のプロテアーゼに感受性を有するよう設計されている。1つの例示的であるが非限定的なプロテアーゼ切断可能なリンカーは、各種のカテプシンにより迅速に加水分解されるVal-Cit結合を含む。ジスルフィド結合を含むリンカーは、例えばジチオスレイトール(DTT)又はトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TECP)等を用いて容易に切断できる。

40

【0271】

1つの例示的であるが非限定的な実施形態において、シグナルDNAに対する抗体のコンジ

50

ユゲーションは、アルキン-アジド環化付加(銅フリークリック反応)を使用して実施でき、そこでは、抗体がジベンゾシクロオクチン(DBCO)部分により活性化され、その後アジド変性DNAと共有結合で連結される(Gongら、(2015) *Bioconjug. Chem.*, 27: 217-225を参照)。リンカーには、プロテアーゼ切断可能な結合、ジスルフィド結合等を容易に組み込むことができる。他の例示的であるが非限定的なアプローチでは、抗体は、化学的に切断可能なNHS-s-s-テトラジンによって官能化される。二本鎖DNAは、N3-dATPの酵素的付加及びトランス-シクロオクテン-PEG-ジベンゾシクロオクチンへのカップリングにより、TCO官能化される。次に官能化された抗体及びdsDNAを、例えば1:2の低いモル比で混合することにより、コンジュゲートが効率的に得られる(例えばvan Buggenumら、(2016) *Sci. Rep.*, 6: 22675を参照)。特定の実施形態において、リンカーを構成するPEGはPEG12である。

10

**【0272】**

抗体を切断可能なリンカーを使用してシグナルDNAに付着させる場合、カートリッジは、リンカーを切断するのに適する試薬(例えばプロテアーゼ、DTT、酸、塩基等)を含むことができる。シグナルが放出される場合、免疫複合体(又は標識免疫複合体)を切断試薬に接触させ、それによりシグナルDNAを放出させ、それを増幅反応(例えば温度制御された反応チャンパー又はチャネル)へ送達できるよう、カートリッジを操作する。

**【0273】**

特定の実施形態において、シグナルDNAはビーズに付着し、それはまた、検出抗体に、又は標識抗体に付着する(例えば図4のパネルC参照)。抗体又はシグナルDNAが、切断可能なリンカーを介してビーズに付着する場合、例えば、上記の通りリンカーを切断することにより、シグナルDNAは粒子から放出でき、又はビーズ-シグナルDNA複合体は抗体から放出できる。シグナルDNA及び抗体が切断できない手段(例えば切断されないリンカー、ビオチン/アビジン相互作用等)によってビーズに付着する場合、抗体/検体複合体は、例えば、上記の通りに破壊することができ、それにより、検出抗体-ビーズ-シグナルDNA部分、又は標識抗体-ビーズ-シグナルDNA部分が放出され、それを増幅反応に送達することができる。特定の実施形態において、熱によりビーズからシグナルDNAを十分に放出させることができる。

20

**【0274】**

ある種の実施形態では、例えば、シグナルDNAが抗体に化学的にコンジュゲートする場合、又は、シグナルDNAがビオチン/アビジン相互作用によって抗体に付着する場合、又は、抗体及びシグナルDNAがビーズに付着する場合、シグナルDNAの配列は、一部のシグナルDNAの切断により放出できる。特定の実施形態において、シグナルDNAは、それが化学試薬を使用して容易に切断されるヌクレオチドを組み込むように調製されうる。これについては、例えば米国特許第6,610,492号は、所定の数のいずれかのヌクレオチドを含む核酸、容易に切断される修飾複素環窒素塩基を記載している。特定の実施形態において、核酸は、塩基化合物、特にアミン含有塩基を使用して切断される。塩基の例としては、3-ピロリジノール、2-ピロリジンメタノール、3-ピロリジンメタノール、4-ヒドロキシピペリジン、4-ピペリジンエタノール等が挙げられるが、これらに限定されない。

30

**【0275】**

特定の実施形態において、制限エンドヌクレアーゼによって認識されるヌクレオチド配列(制限酵素部位)を有するシグナルDNAが提供される。シグナルDNAが対応する制限エンドヌクレアーゼと接触することにより、シグナルDNAが切断される。典型的に、シグナルDNAが切断されるときは、切断された断片が十分な長さ及び配列同一性を有することで増幅及び検出が可能となるよう、シグナルDNAは設計される。

40

**【0276】**

他の例示的であるが非限定的な実施形態において、抗体-シグナルDNAコンジュゲートは、Tus-Terロックを使用して作製することができる(例えばMorinら、(2011) *Analyst*, 136(22): 4815-4821参照)。このアプローチでは、Tusペプチド配列(別名末端利用物質)を抗体に融合させ、またTer配列を有するシグナルDNAを提供する。Ter配列をTusペプチドに結合させ、それによりイムノコンジュゲートを得る。特定の実施形態において、シグナルDN

50

Aを、免疫複合体の形成後、検出抗体又は標識抗体と接触させる。他の実施態様において、免疫複合体の形成前にTus-Terイムノコンジュゲーションを提供する。

【0277】

他のアプローチにおいて、検出抗体又は標識抗体はファージ(例えば繊維状ファージ)の表面に発現され、ファージ内部にシグナルDNAが提供される(例えば図4のパネルD参照)。免疫複合体又は標識免疫複合体の形成後、熱及び/又は溶解試薬によるファージの溶解によりシグナルDNAが放出される。次に、放出されたシグナルDNAが増幅反応に送達される。

【0278】

各種実施形態において、1つ又は複数のシグナルDNAの増幅は、シグナルDNAを含む反応混合物を増幅条件下に置き、反応混合物中の指示薬のシグナル(例えば光シグナル)をモニターする工程を含む。特定の実施形態において、シグナルは、蛍光シグナル、化学発光シグナル、電気化学的発光シグナル及び比色シグナルからなる群から選択される光シグナルを含む。特定の実施形態において、光シグナルは、蛍光指示薬によって発生する蛍光シグナルを含む。特定の実施形態において、蛍光指示薬は、二本鎖DNA生成物に結合する非特異的なインターカレーション色素であり、一方、他の実施形態において、蛍光指示薬は、標的配列特異的なプローブを含む。特定の実施形態において、標的配列に特異的なプローブは、TAQMANプローブ、SCORPIONプローブ及びMOLECULAR BEACONからなる群から選択される。

10

【0279】

特定の実施形態において、イムノPCRは、同じカートリッジ中の複数の異なる検体(例えば、少なくとも2つ、又は少なくとも3つ、又は少なくとも4つ、又は少なくとも5つ、又は少なくとも6つの異なる検体)に対して実施される。特定の実施形態において、前記複数の検体を構成する各検体は、前記カートリッジ内の同じサンプルに由来する。特定の実施形態において、複数含まれる各検体を表すシグナルDNAは、同じ温度調節されたチャンネル又はチャンパーにおいて順次増幅される。特定の実施形態において、チャンパーは、増幅反応の間における相互のコンタミネーションを減少させ、又は回避するため、増幅反応の間に「洗浄」され、「浄化」される。すなわち、例えば、特定の実施形態では、温度調節されたチャンネル又はチャンパーは、洗浄溶液により洗浄される。特定の実施形態において、洗浄溶液を除去した後、温度調節されたチャンネル又はチャンパーに空気が供給され、チャンネル又はチャンパーは、DNA変性温度以上の温度(例えば約90 ~ 約99 )に加熱される。

20

30

【0280】

特定の実施形態において、複数含まれる各検体を表すシグナルDNAは、前記カートリッジ内の異なる温度調節されたチャンネル又はチャンパーにおいて各々同時に増幅される。特定の実施形態において、前記複数含まれる各検体を表すシグナルDNAは、カートリッジ内の同じ温度調節されたチャンネル又はチャンパーにおいて同時に増幅され、各シグナルDNAの増幅は、異なる識別可能な光シグナルを提供する。

【0281】

特定の実施形態において、カートリッジベースのイムノPCRは、非特異的結合を減少させ、又は防止するため、1つ又は複数のブロッキング剤を使用して実施してもよい。

【0282】

ブロッキング剤の例としては、限定されないが、各種ポリマー、及び/又は界面活性剤、及び/又は炭水化物(例えばPEG、プルロニックF68/F108/F127(好ましくはF68)、PVP、Bi-olipidure 802(NOF America社製)、Tween 20又は80、TEGME(トリ(エチレングリコール)モノエチルエーテル)、TEG(テトラエチレングリコール)等)、及び/又は各種タンパク質及び/又は界面活性剤及び/又は多糖(例えばカゼイン、BSA、ヤギ免疫グロブリンG、ウシ免疫グロブリンG、Stabilcoat(ThermoFisher社製)、イオタカラギーナン、デキストラン硫酸、マウス血清等)が挙げられる。

40

【0283】

上記のように、本明細書に記載されるカートリッジにおいて行われるイムノPCR法は、従来のイムノPCR法より典型的に顕著により迅速であり、かつ実質的に労働集約的でない

50

。特定の実施形態において、上記の方法は、約1時間以下、又は約50分以下、又は約40分以下、又は約30分以下、又は約20分以下、又は約15分以下で完了させることができる。

【0284】

核酸増幅と組み合わせたイムノPCR

各種実施形態において、本明細書において提供されるカートリッジは、イムノPCR反応に加え、核酸分析(例えば核酸の検出及び/又は定量)も提供する。同じカートリッジにおけるイムノPCR反応及び核酸増幅反応を行う能力により、特に、1つ又は複数の標的検体のイムノPCR分析の反射としての、同じサンプルにおける核酸分析、又は、逆に、1つ又は複数の検体の核酸分析の反射としての、イムノPCRアッセイが可能となる。

【0285】

特定の実施形態において、イムノPCRと同じサンプルに対して核酸分析が行われるが、その際、イムノPCRアッセイと同じサンプルチャンバーから核酸分析用のサンプルが引き継がれる(図10A参照)。他の実施形態において、第1サンプルチャンバーから引き出されるサンプルに対してイムノPCR分析を行うことができ、一方、第2試料チャンバーから引き出されるサンプルに対して核酸分析が実施される(例えば図10B参照)。後者のアプローチは、イムノPCRにおいて使用されるサンプルと核酸分析において使用されるサンプルとで、異なるサンプル処置を可能にする。すなわち、例えば、核酸分析では、カートリッジにサンプルを配置する前にDNAの単離及び/又は精製を行う必要が生じる場合もあり、或いは、そのカートリッジ自体においてそれを実施することも可能である。したがって、特定の実施形態では、核酸分析用のサンプルが直接反応カートリッジに添加され、一方、他の実施形態では、サンプルが1つ又は複数の試薬と混合される。特定の実施形態において、DNA調製物は典型的には、実質的に単離されたDNAを調製する必要が生じる。この場合、細胞を溶解させてDNAを放出させ、粒子及び細胞残渣を除去し、及び/又はタンパク質成分を除去し、実質的に純粋な核酸(例えば実質的に純粋なDNA、及び/又はDNAとRNAの実質的に純粋な組合せ)を含むサンプルを提供する必要が生じうる。例示的であるが非限定的な一実施形態では、サンプル(例えば組織サンプル)を溶解試薬中に添加し、攪拌し、その後で更なる処理のためにカートリッジに挿入される。或いは、全てのサンプル処置をカートリッジ内で実施する。

【0286】

したがって、各種実施形態において、本発明に係るカートリッジベースのイムノPCR法は、イムノPCRにおいて使用されるシグナルDNA以外の核酸を増幅する工程を更に含む。特定の実施形態において、前記シグナルDNA以外の核酸を増幅する工程は、前記サンプル由来の核酸をマトリックス材料に結合させる工程と、結合した核酸を洗浄して洗浄された核酸を提供する工程と、洗浄された核酸を溶出させる工程と、洗浄された核酸を増幅反応に供して、洗浄された核酸に存在する場合に標的核酸配列を増幅する工程とを含む。

【0287】

特定の実施形態において、核酸は、イムノPCRイムノコンジュゲート又は標識イムノコンジュゲートとの結合、或いは固定化するために用いる同じマトリックス材料に結合する。他の実施形態において、第2の、異なるマトリックス材料(例えば第2の異なるチャンバー/チャンネルにおいて)を用いて、核酸を結合させ、溶出させる。

【0288】

特定の実施形態において、シグナルDNA以外の核酸を増幅する工程が、前記イムノPCRに使用されるサンプルチャンバー内の同じサンプルから得られる核酸に対して行われる。特定の実施形態において、シグナルDNA以外の核酸を増幅する工程が、イムノPCRに使用されるサンプルチャンバーとは異なるサンプルチャンバーのサンプルから得られる核酸に対して行われる。特定の実施形態において、シグナルDNA及びシグナルDNA以外の核酸が、同じ温度調節されたチャンネル又はチャンバーにおいて順次増幅される。特定の実施形態において、シグナルDNAが、シグナルDNA以外の核酸の増幅の前に、同じ温度調節されたチャンネル又はチャンバーにおいて増幅され、他の実施形態では、シグナルDNAが、シグナルDNA以外の核酸の増幅の後に増幅される。特定の実施形態において、温度調節されたチャンネル及び

10

20

30

40

50

/又はチャンパーは、イムノPCRシグナルDNA増幅とシグナルDNA以外の核酸に対して行われる増幅反応の間に洗浄され、及び/又はフラッシュされる。特定の実施形態において、洗浄する工程は、洗浄溶液で温度調節されたチャンネル又はチャンパーを洗浄する工程を含む。特定の実施形態において、洗浄及びフラッシングする工程は、温度調節されたチャンネル又はチャンパーから洗浄溶液を除去し、温度調節されたチャンネル又はチャンパーへ空気を供給し、DNA変性温度以上の温度(例えば約90 から約99 )にチャンネル又はチャンパーを加熱する工程を含む。

#### 【0289】

特定の実施形態において、シグナルDNA及びシグナルDNA以外の核酸は、カートリッジ内の異なる温度調節されたチャンネル又はチャンパー内において各々同時に増幅される。特定の実施形態において、シグナルDNA及びシグナルDNA以外の核酸が、カートリッジ内の同じ温度調節されたチャンネル又はチャンパー内において同時に増幅され、シグナルDNA及びシグナルDNA以外の核酸の増幅が、異なる識別可能なシグナル(例えば異なる識別可能な光シグナル)を提供する。各種実施形態において、シグナルDNA以外の核酸の増幅は、シグナルDNA以外の核酸を含む反応混合物を増幅条件下に置き、反応混合物中の指示薬のシグナル(例えば光シグナル)をモニターする工程を含む。特定の実施形態において、シグナルは、蛍光シグナル、化学発光シグナル、電気化学的発光シグナル及び比色シグナルからなる群から選択される光シグナルを含む。特定の実施形態において、光シグナルは、蛍光指示薬によって発生する蛍光光シグナルである。特定の実施形態において、蛍光指示薬は、二本鎖DNA生成物に結合する非特異的なインターカラー色素であるか、又は標的配列特異的なプローブを含む。特定の実施形態において、蛍光指示薬は、標的配列に特異的なプローブを含み、それはTAQMANプローブ、SCORPIONプローブ及びMOLECULAR BEACONからなる群から選択される。

#### 【0290】

上記のカートリッジベースのイムノPCR及びイムノPCR/核酸分析法の組合せは例示的、かつ非限定的なものである。当業者であれば、本明細書における教示を基に、多数の他のカートリッジベースのイムノPCR及びイムノPCR/核酸分析法の組合せを利用できる。

#### 【0291】

イムノPCR及び任意の核酸分析のためのカートリッジ、モジュール及びシステム  
カートリッジ

各種実施形態において、本明細書に記載されるイムノPCR法の実施のためのカートリッジが提供される。特定の実施形態において、カートリッジは、本明細書に記載されるイムノPCR法の実施、並びにイムノPCR反応において使用されるシグナルDNA以外の1つ又は複数の核酸の増幅のために提供される。

#### 【0292】

特定の例示的であるが非限定的な実施形態において、カートリッジは、1つ又は複数のサンプル受容チャンパーと、フィルター及び/又はDNA結合剤として作用するマトリックス材料を含む1つ又は複数のチャンパーと、1つ又は複数の温度調節されたチャンネル又はチャンパーと、

イムノPCRを実施するための試薬及び/又はバッファーを含む複数のチャンパーと、検出される検体に結合する捕捉抗体を含むチャンパーを備える複数のチャンパーと、直接的又は間接的にシグナルDNAに任意に結合する検出抗体を含むチャンパーを備える複数のチャンパーと、PCRマスターミックスを含む1つ又は複数のチャンパーを備える複数のチャンパーと、イムノPCRシグナルDNAの全て又は一領域を増幅するためのプライマーを含む1つ又は複数のチャンパーを備える複数のチャンパーと、イムノ-PCRシグナルDNAの全て又は一領域を検出するためのプローブを含むチャンパーを備える複数のチャンパーとを備える。

#### 【0293】

特定の実施形態において、PCRマスターミックス、及び/又はプライマー、及び/又はプローブは、同一のチャンパーに存在する。各種実施形態において、PCRプライマー、及び/又はプローブ、及び/又はマスターミックス中のポリメラーゼは、ビーズとして提供され

る。特定の実施形態において、カートリッジは、単一の検体の検出用の検出抗体を含み、一方、他の実施形態において、カートリッジは、複数の検体の検出用の検出抗体を含む。特定の実施形態において、カートリッジは、単一の検体の捕捉用の捕捉抗体を含み、一方、他の実施形態において、カートリッジは、複数の検体の検出用の検出抗体を含む。特定の実施形態において、複数の検体は、少なくとも2、又は少なくとも3、又は少なくとも4、又は少なくとも5、又は少なくとも6、又は少なくとも7、又は少なくとも8、又は少なくとも9、又は少なくとも10の異なる検体を含む。

#### 【0294】

特定の実施形態において、イムノPCRカートリッジは、チャンバー又は反応チャンバーのチャンネルの壁又は底面に付着した(例えば化学的にコンジュゲートした、又はビオチン/アビジン相互作用を介して連結した、又は磁気引力により固定化した)1つ又は複数のタイプの捕捉抗体を含む。特定の実施形態において、イムノPCRカートリッジは、粒子(例えばラテックス、ガラス、テフロン(登録商標)、金属(例えば金等の貴金属)、半導体、磁性体等)に付着する1つ又は複数の捕捉抗体を含む。特定の実施形態において、捕捉抗体は、(例えば上記の通りの)粒子に化学的にコンジュゲートする。特定の実施形態において、捕捉抗体は、ビオチン/ストレプトアビジン相互作用を経て粒子に付着する。特定の実施形態において、粒子は、約0.5 μmから若しくは約1 μmから約10 μmまで若しくは約3 μmまでの範囲のサイズであるか、又は、粒子は、約1 μmから約2.8 μmまでの範囲のサイズである。

10

#### 【0295】

特定の実施形態において、複数のチャンバーを備えるイムノPCRカートリッジは、非特異的結合を低減できる1つ又は複数のブロッキング剤を含む1つ又は複数のチャンバーを備える。ブロッキング剤の例としては、限定されないが、各種ポリマー、及び/又は界面活性剤、及び/又は炭水化物(例えばPEG、ブルロニックF68/F108/F127(好ましくはF68)、PVP、Biolipidure 802(NOF America社製)、Tween 20又は80、TEGME(トリ(エチレングリコール)モノエチルエーテル)、TEG(テトラエチレングリコール)等)、及び/又は各種タンパク質及び/又は界面活性剤及び/又は多糖(例えばカゼイン、BSA、ヤギ免疫グロブリンG、ウシ免疫グロブリンG、Stabilcoat(ThermoFisher社製)、イオタカラギーナン、デキストラン硫酸、マウス血清等)が挙げられる。

20

#### 【0296】

特定の実施形態において、カートリッジは、直接的なサンドイッチアッセイ用の試薬を含む(例えば、カートリッジは特に、捕捉抗体(粒子に付着しうる)、及び付着するシグナルDNAを有する、又は、シグナルDNAを付着するように構成される部分(例えばTusタンパク質)を有する検出抗体を含む)。特定の実施形態において、カートリッジは、間接的なサンドイッチアッセイ用の試薬を含む(例えば、カートリッジは特に、捕捉抗体(粒子に付着しうる)、及び付着するシグナルDNAを有する、又は、シグナルDNAを付着するように構成される部分(例えばTusタンパク質)を有する標識抗体を含む)。特定の実施形態において、シグナルDNAは、検出抗体に化学的にコンジュゲートするか、又は、標識抗体が存在するときに、シグナルDNAが標識抗体に化学的にコンジュゲートする。特定の実施形態において、シグナルDNAは、システインを介して、リジンを通じて、又は炭水化物を介して抗体に化学的にコンジュゲートする。特定の実施形態において、シグナルDNAは、C<sub>6</sub>~C<sub>18</sub>リンカー又はC<sub>6</sub>~C<sub>12</sub>リンカーを含むリンカーにより抗体に化学的にコンジュゲートする。特定の実施形態において、リンカーはヘテロ二官能性架橋剤である。特定の実施形態において、シグナルDNAは、スクシンイミジル4-ヒドラジノニコチネートアセトンヒドラゾン(SANH)又はスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートエステル(SMCC)と化学的にコンジュゲートする。特定の実施形態において、シグナルDNAは、DNAのアジド修飾を経た、ジベンゾシクロオクチン(DBCO)部分を介する抗体との結合により、抗体に化学的にコンジュゲートする。特定の実施形態において、リンカーはDBCO-PEG-NHSリンカーを含む。

30

40

#### 【0297】

50

特定の実施形態において、シグナルDNAは、切断可能なリンカーにより、検出抗体、又は標識抗体が存在する場合には標識抗体に、化学的に付着する。切断可能リンカーの例としては、限定されないが、切断可能なジスルフィド結合、塩基切断可能リンカー及び酸切断可能リンカーを含むリンカー、プロテアーゼ/ペプチダーゼ認識部位を含むリンカー、又は制限酵素部位を含むリンカーが挙げられる。特定の実施形態において、切断可能リンカーは、DTTにより切断可能なジスルフィド結合を含む。特定の実施形態において、切断可能リンカーは、テトラジンを更に含む。

【0298】

特定の実施形態において、シグナルDNAは、アビジン/ビオチン相互作用を使用して検出抗体に付着するか、又は、シグナルDNAは、標識抗体が存在するときは、アビジン/ビオチン相互作用を使用して標識抗体に付着する。

10

【0299】

特定の実施形態において、検出抗体、又は存在するときは標識抗体は、Tusタンパク質に付着し、例えば遺伝的に融合し、またシグナルDNAは、Tusタンパク質により認識され、結合されるTer配列を有する。

【0300】

特定の実施形態において、検出抗体がビーズに付着し、かつシグナルDNAが同じビーズに付着するか、又は、標識抗体が存在するときは、標識抗体がビーズに付着し、かつシグナルDNAが同じビーズ(例えば金のビーズ)に付着する。特定の実施形態において、抗体及び/又はシグナルDNAは、(例えば上記の)ビーズに化学的にコンジュゲートし、一方、他の実施形態において、抗体及び/又はシグナルDNAは、ビオチン/ストレプトアビジン相互作用を介してビーズに付着する。特定の実施形態において、ビーズは、例えばラテックス、シリカ、テフロン(登録商標)、貴金属、半導体材料及び磁性材料等の材料を含む。特定の実施形態において、ビーズは金を含む。

20

【0301】

特定の実施形態において、検出抗体は、ファージ(例えば、ファージディスプレイライブラリー由来のファージ)の表面に提示され、シグナルDNAはファージ内に含まれるか、又は、標識抗体が存在するときは、標識抗体は、ファージの表面に提示され、シグナルDNAはファージ内に含まれる。

【0302】

各種実施形態において、カートリッジは、更にイムノPCRシグナルDNA以外の核酸の分析(例えば増幅及び検出及び/又は定量)を行うように構成される。かかる実施形態において、複数のチャンパーは、シグナル核酸以外の核酸を増幅し、検出するためのPCRプライマー及び/又はプローブを含むチャンパーを更に備えてもよい。

30

【0303】

特定の実施形態では、標的検体がポリペプチドを含む場合、シグナル核酸以外の核酸は、該ポリペプチド又はその断片をコードする核酸を含みうる。特定の実施形態では、標的検体がポリペプチドを含む場合、シグナル核酸以外の核酸は、該ポリペプチドを産生する細胞、組織又は微生物に特徴的な核酸を含みうる。

【0304】

特定の実施形態において、カートリッジは、TAQMANプローブ、及び/又はSCORPIONプローブ、及び/又はMOLECULAR BEACONを含む1つ又は複数のチャンパーを備える。特定の実施形態において、カートリッジは、TaqMan PCR反作用の試薬を含む1つ又は複数のチャンパーを含む。

40

【0305】

特定の実施形態において、カートリッジは、増幅されたシグナルDNAのマーカである1つ又は複数の蛍光プローブ、及び任意に、増幅されたシグナルDNA以外の増幅された配列のマーカである1つ又は複数の蛍光プローブを含む、1つ又は複数のチャンパーを備える。特定の実施形態において、プローブは、蛍光レポーター色素及びクエンチャー色素を含み、該プローブは、Taq DNAポリメラーゼの5' 3'ヌクレアーゼ活性による切断によりシ

50

グナルを提供する。特定の実施形態において、シグナル核酸以外の核酸を増幅するためのプライマー、及び/又はシグナル核酸以外の核酸を検出するためのプローブは、ビーズとして提供される。

#### 【0306】

各種実施形態において、カートリッジ内の温度調節されたチャンネル又はチャンパーは、熱サイクリングチャンネル又はチャンパーである。各種実施形態において、マトリックス材料は、免疫複合体(例えばビーズに結合した免疫複合体又はビーズに結合した標識免疫複合体)を吸着でき、又は化学的に結合でき、又は機械的にトラップすることができるものである。特定の実施形態において、マトリックス材料は、更に核酸に結合することができる、また溶出させることができる。特定の実施形態において、マトリックス材料は、ガラス又はシリカ、イオン交換樹脂及びヒドロキシアパタイトからなる群から選択される材料を含む。

10

#### 【0307】

各種の例示的であるが非限定的な実施形態において、サンプル受容チャンパー、マトリックス材料を含むチャンパー、試薬を含む複数のチャンパー、及び温度制御された加熱チャンネル又はチャンパーは、選択的に流体連通する。特定の実施形態において、サンプル受容チャンパー、マトリックス材料を含むチャンパー、試薬を含む複数のチャンパー、及び温度制御された加熱チャンネル又はチャンパーは、微小流体チャンネル及びバルブにより選択的に流体連通する。

#### 【0308】

カートリッジの特定の実施形態において、サンプル収容チャンパー、マトリックス材料を含むチャンパー、試薬を含む複数のチャンパー、及び温度制御された加熱チャンネル若しくはチャンパー又は温度調節されたチャンネル若しくはチャンパーへのポートが、中央バルブ周辺に配置され、選択的に中央バルブのチャンネルと流体連通し、中央バルブが、中央バルブと流体連通するチャンパーとの間で流体を給排出できるプランジャーを収容するように構成される。

20

#### 【0309】

各種実施形態において、カートリッジは、使用時において、サンプルを含むチャンパーと、検出抗体を含むチャンパーと、捕捉抗体を含むチャンパーと、洗浄バッファーを含むチャンパーと、シグナルDNAを増幅するためのPCRマスターミックスを含むチャンパーとを備えるように構成される。各種実施形態において、カートリッジは、使用時において、サンプルを含むチャンパーと、検出抗体を含むチャンパーと、捕捉抗体を含むチャンパーと、洗浄バッファーを含むチャンパーと、KOHを含むチャンパーと、HEPES又はトリス-HClを含むチャンパーと、廃液を受容するチャンパーとを備える。各種実施形態において、カートリッジは、使用時において、サンプルを含むチャンパーと、約pH 7.25のPBS中に検出抗体を含むチャンパーと、約pH 7.25のPBS中に捕捉抗体を含むチャンパーと、PBS洗浄バッファーを含むチャンパーと、KOHを含むチャンパーと、約pH 8.25のHEPES又は約pH 7.4のトリス-HClを含むチャンパーと、廃液を受容するチャンパーとを備える。

30

#### 【0310】

各種実施形態において、カートリッジは、サンプル収容チャンパー、前記カラム、複数のチャンパー、及び温度調節されたチャンネル又はチャンパーが、選択的に流体連通するように構成される。特定の実施形態において、選択的な流体連通は、微小流体チャンネル及びバルブにより提供される。特定の実施形態において、選択的な流体連通は、サンプル収容チャンパー、前記カラム、複数のチャンパー、及び加熱チャンネル若しくはチャンパー又は加熱チャンネル若しくはチャンパーへのポートを、中央バルブ周辺に配置し、選択的に前記中央バルブのチャンネルと流体連通させることにより提供される。

40

#### 【0311】

図5A、5B、6A、6B及び7は、本明細書に記載される方法の実施に適するカートリッジを例示する。図示するカートリッジは、GENEXPERT(登録商標)cartridge(Cepheid社、Sunnyvale、CA)に基づくものである。図7のパネルAに示すように、カートリッジ200は、複数の

50

試薬を含むカートリッジ本体202及び/又はバッファチャンバー208を備える。チャンバーは、バルブ本体210(パネルB及び図5B)と流体連通しガasket204で密閉される中央シリンジパレル206周辺に配置される。バルブ本体210はキャップ212を備えることができ、カートリッジ本体全体をカートリッジベース226で支持することができる。カートリッジは典型的には、本明細書に記載されるマトリックス材料を含むことができ、イムノPCR免疫複合体を固定化し、任意に核酸と結合し、溶出させるよう機能できる1つ又は複数のチャンネル又は空洞(チャンバー)214を備える。各種実施形態において、カートリッジは、1つ又は複数の温度調節されたチャンネル又はチャンバー216を更に備え、特定の実施形態において、熱サイクリングチャンパーとして機能することができる。図示しないが、「ブランジャー」は、シリンジパレル206に流体を吸引する操作を行うことができ、シリンジパレル206及び付随するバルブ本体210の回転は、各種の試薬チャンパー208及びチャンネル、反応チャンパー及び温度調節されたチャンネル又はチャンパーの間に選択的な流体連通を提供する。したがって、各種の試薬チャンパー208、反応チャンパー、マトリックス材料及び温度調節されたチャンパー又はチャンネルは、選択的にブランジャーの回転により流体連通し、試薬の移動(例えばチャンパーへのローディング又はアンローディング)は、ブランジャーの「シリンジ」作用により操作される。

10

#### 【0312】

図5Aに示すように、特定の実施形態において、カートリッジは、例えば、増幅製品、シークエンシング操作における塩基同一性等のリアルタイム検出を行うための光学窓を提供する。

20

#### 【0313】

上記の(及び実施例1、例えば図6A及び6B参照)方法を、GENEXPERT(登録商標)カートリッジの具体的なチャンパーに関して記載するが、その具体的な試薬/チャンパーの設定は、イムノPCR及び/又は更なる核酸検出/定量の特殊性に応じて適宜変更できることが理解される。特定の実施形態において、GENEXPERT(登録商標)カートリッジの改良型も想定されることも理解される。改良型としては、限定されないが、試薬チャンパーを多くし、又は試薬チャンパーを少なくし、及び/又はチャンパーのサイズを変更し、サンプル受容チャンパーを2つ(又はそれ以上)にし、温度調節されたチャンネル又はチャンパーを2つ(又はそれ以上)にし、積み重ねカートリッジ(1台のモジュールによって2つのカートリッジを制御)とする、等が挙げられる。

30

#### 【0314】

##### 反応モジュール

特定の実施形態において、カートリッジ200は、(例えば図8Aに示すように)反応モジュール300へ挿入されるように構成される。図8Bに図示するように、モジュールはカートリッジ200を受容するように構成される。特定の実施形態において、反応モジュールは、ヒートプレート308を有し、温度調節されたチャンパー又はチャンネルを加熱する。モジュールはファン304を更に任意に備え、温度調節されたチャンネル又はチャンパーが熱循環チャンネル又はチャンパーである場合に、冷却機能を発揮する。電子回路部品302を設けることにより、情報(例えば光学的情報)を分析用のコンピュータに提供できる。特定の実施形態において、モジュールは光学ブロック306を備えることにより、例えば、イムノPCRシグナルDNA以外の各種のイムノPCR標的及び/又は各種の増幅された核酸の増幅されたシグナルDNAを表す1つ又は複数(例えば、1、2、3、4又はそれ以上)の光シグナルの励起及び/又は検出が可能となる。各種実施形態において電気コネクタ312を設けることにより、(例えばシステムコントローラー、又は別々の分析/制御装置)を有するシステムを有するモジュールとの相互作用が可能となる。図示するように、図8Bでは、サンプルを、ピペット310を使用してカートリッジに導入することができる。

40

#### 【0315】

特定の実施形態において、モジュールはまた、シリンジパレルのブランジャー及びバルブ本体の回転を操作するコントローラーを備える。

#### 【0316】

50

## システム

特定の実施形態において、システム(例えば処理装置)が提供される。1つの例示的であるが非限定的な実施形態を図8Cに示す。ある種の実施形態では、処理装置は、各処理モジュールが本明細書に記載される着脱可能なカートリッジを保持し、操作するように構成される、1つ又は複数のサンプル処理モジュールを含むように構成される筐体を備える。特定の実施形態において、システムは、対応する着脱可能なサンプルカートリッジ内で、1つ又は複数の標的検体に対するイムノPCRアッセイを実施し、任意に1つ又は複数の(イムノPCRシグナルDNA以外の)標的RNA/DNAの配列のレベルを測定するためのサンプル処理モジュールを操作するように構成される。典型的には、対応する着脱可能なサンプルカートリッジ内のサンプルに対する処理は、カートリッジを操作して本明細書に記載される方法を実施することを含む。特定の実施形態において、システムは、1つのサンプル処理モジュールを備えるように構成される。特定の実施形態において、システムは、少なくとも2つのサンプル処理モジュール、又は少なくとも4つのサンプル処理モジュール、又は少なくとも8つのサンプル処理モジュール、又は少なくとも12のサンプル処理モジュール、又は少なくとも16のサンプル処理モジュール、又は少なくとも20のサンプル処理モジュール、又は少なくとも24のサンプル処理モジュール、又は少なくとも28のサンプル処理モジュール、又は少なくとも32のサンプル処理モジュール、又は少なくとも64のサンプル処理モジュール、又は少なくとも128のサンプル処理モジュールを備えるように構成される。特定の実施形態において、システムは、ユーザーが入力操作を行う際の指示、及び/又は、1つ又は複数のイムノPCR検体の存在及び/又は量、及び/又はイムノPCRシグナルDNAでない1つ又は複数の核酸の存在及び/又は量を決定するためのカートリッジの操作のモニターを可能にする、ユーザーインターフェースを提供する。

10

20

### 【0317】

本明細書に記載される方法はGENEXPERT(登録商標)カートリッジ(Cepheid社製、Sunnyvale, CA)に関して主に記載するが(例えば図5A参照)、本明細書の教示に鑑み、方法が、他のカートリッジ/微小流体システムにおいても実施できることが理解できるであろう。かかるカートリッジ/微小流体システムとしては、例えばソフトリソグラフィを使用して実施される微小流体システム、ハードリソグラフィを使用して実施されるマイクロ/ナノレベルの微小流体システム等が挙げられる。

### 【0318】

シグナルDNA及び/又はイムノPCRのDNA以外の核酸の検出/定量

各種実施形態において、イムノPCR反応からのシグナルDNAを増幅し、検出及び/又は定量を行うことができる。特定の実施形態において、イムノPCRシグナルDNA以外の核酸(例えばDNA、mRNA等)を追加的に増幅(例えば同じカートリッジで作動させるイムノPCRからの反応)して、検出及び/又は定量を行う。特定の実施形態において、増幅は、限定されないが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、リガーゼ検出反応(LDR)、複合ライゲーション依存的なプローブ増幅(MLPA)、ライゲーション及びそれに続くQ-レプリカーゼ増幅、プライマー伸長法、鎖置換増幅(SDA)、過剰分岐鎖置換増幅、多置換増幅(MDA)、核酸鎖ベースの増幅(NASBA)及びローリングサークル増幅(RCA)等の多くの方法のうちのいずれかを含む。

30

40

### 【0319】

例示的であるが非限定的な実施形態において、増幅反応は、増幅された標的核酸(例えばシグナルDNA)の量に比例する光シグナルを生じさせることができる。例示的な光シグナルとしては蛍光シグナル、化学発光シグナル、電気化学発光シグナル、比色シグナル等が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、光シグナルは、蛍光指示薬によって発生する蛍光シグナルである。特定の実施形態において、蛍光指示薬は、二本鎖DNA生成物に結合する非特異的なインターカレーション色素であり、一方、他の実施形態において、蛍光指示薬は、標的配列特異的なプローブ(例えばTAQMAN(登録商標)プローブ、SCORPION(登録商標)プローブ、MOLECULAR BEACON(登録商標)等)を含む。

### 【0320】

50

順次作動するイムノPCRによりシグナルDNAが順次分析され、また、同時のイムノPCRによりシグナルDNAが異なる温度調節されたチャンネル又はチャンパーにおいて同定されて区別できるため、単一のイムノPCR反応又は順次に(又は別々の温度制御されたチャンネル又はチャンパーで同時に)実施される複数のイムノPCR反応も、同じ検出可能マーカーを使用できる。カートリッジを更に1つ又は複数の(イムノPCRシグナルDNA以外の)標的核酸の分析/増幅用に使用する場合も同様である。すなわち、この増幅により生じるシグナルは、それが同時に作動しないため、及び/又は、それが異なる反応チャンネル/チャンパーにおいて作動するため、他の増幅産物と区別できる。

【0321】

しかしながら、複数のイムノPCR産物が同一チャンパーにおいて同時に作動する場合、及び/又は、(イムノPCRシグナルDNA以外の核酸に対する)核酸増幅が同一チャンパーにおいて同時に作動する場合も、分析ごとの反応生成物は、典型的には異なる、識別可能な標識を用いて検出され及び/又は定量される。

10

【0322】

特定の実施形態において、増幅産物(増幅されたシグナルDNA、及び核酸分析の実施から得られた増幅された核酸)は、当業者に公知の方法を使用して検出することができる。特定の実施形態において、増幅は、直接的な単純なPCR増幅反応である。しかしながら、特定の実施形態では、イムノPCRシグナルDNA標的及び核酸分析の実施により増幅された核酸に対して入れ子PCR反応を用いる。

【0323】

各種実施形態において、特に同じ増幅反応において複数のイムノPCR検体を分析することが望ましい場合、及び/又は、イムノPCR分析と同じ増幅反応における核酸分析の生成物を分析することが望ましい場合には、多重PCRアッセイが可能である。特定の実施形態においてかかる多重増幅反応では、(例えば各特異的な検体に対する)各プローブは、それが他のプローブとは独立に検出可能となるよう、それ自身の特異的な色素/fluorを有する。

20

【0324】

特定の実施形態において、シグナル発生の際、典型的には、各種の増幅反応において使用するプローブは、他の分子又は部分とのその相互作用の変化に起因するフルオロフォアの蛍光変化を利用するものであり、かかる変化は、フルオロフォアと、増幅産物の検出及び/又は定量用の相互作用分子又は部分との間の距離を変化させることによりもたらされるものである。或いは、サンプル中のポリヌクレオチドを検出する他の方法として、限定されないが、放射性標識等のプローブの使用が可能である。

30

【0325】

蛍光ベースのアッセイは、典型的には蛍光共鳴エネルギー転移(又は「FRET」)におけるシグナル発生に依存し、それによれば、蛍光変化は第1フルオロフォアと相互作用する共鳴エネルギーアクセプター(他のフルオロフォア又はクエンチャー)との間の距離の変化により生じる。フルオロフォア及び相互作用分子又は部分の組合せとしては、クエンチング分子又はその部分が挙げられ、「FRETペア」として公知である。FRETペアの相互作用の機構では、典型的には、ペア中の1つの物質の吸収スペクトルが他の物質(第1フルオロフォア)の発光スペクトルと重なることが必要である。相互作用分子又はその部分がクエンチャーである場合、その吸収スペクトルは、典型的にはフルオロフォアの発光スペクトルに重なる(例えばStryer (1978) *Ann. Rev. Biochem.* 47: 819-846; Selvin (1995) *Meth. Enzymol.* 246: 300-335等を参照)。ペアの吸収及び発光スペクトルが顕著な程度で重なるとき、効果的なFRET相互作用が典型的に達成される。FRET相互作用の効率は、その重なりと直線的に比例する。典型的には、顕著な程度のシグナル(すなわち高度な重なり)が必要となる。したがって、フルオロフォア-クエンチャーのペア等のFRETペアは、かかる点を基礎に典型的に選択される。

40

【0326】

様々な標識核酸ハイブリダイゼーションプローブ、並びにFRET及びFRETペアを利用する検出アッセイが公知である。かかるスキームは、Cardulloら、(1988) *Proc. Natl. Acad.*

50

Sci. USA, 85: 8790-8794、及びHellerら、欧州特許出願公開第0070685号明細書に記載されている。このスキームは、標的DNA鎖の隣接する領域と相補的な一対のオリゴデオキシヌクレオチドを含むプローブを使用する。1つのプローブ分子は、その5'末端上に蛍光標識(フルオロフォア)を含み、他のプローブ分子は、その3'末端上に異なる蛍光標識(またフルオロフォア)を含む。プローブが標的配列にハイブリダイズするとき、2つの標識は各々非常に近接した位置関係となる。サンプルが適切な周波数の光により刺激されるとき、1つの標識から他の標識への蛍光共鳴エネルギー転移が発生する。FRETは標識からの顕著なスペクトル応答の変化を生じさせ、それにより標的の存在に関するシグナルを供給する。1つの標識は「クエンチャー」であってもよく、特に、熱として受容したエネルギーを放出する相互作用部分(又は分子)でありうる。

10

## 【0327】

FRETペアを利用する他のタイプの核酸ハイブリダイゼーションプローブアッセイは、例えば米国特許第5,210,015号及び第5,538,848号に記載される「TAQMAN(登録商標)」アッセイである。プローブは、典型的には、FRETペアが標識された一本鎖オリゴヌクレオチドである。TAQMAN(登録商標)アッセイにおいて、DNAポリメラーゼは、それが標的の鎖とハイブリダイズするとき、オリゴヌクレオチドプローブの切断によって単一又は複数のヌクレオチドを放出する。その放出は、FRETペアのクエンチャー標識とフルオロフォア標識とを分離する方法を提供する。

## 【0328】

特定の実施形態において、非FRET蛍光プローブ(例えばTyagiら、米国特許第6,150,097号に記載)を使用することもできる。例えば、Tyagiらの特許では、標識ペアの吸収スペクトルの変化が、どのように蛍光変化に代わるものとして検出可能なシグナルとして使用できるかについて述べている。吸収変化を利用するとき、標識ペアは、いかなる2つのクロモフォア(すなわちフルオロフォア、クエンチャー及び他のクロモフォア)を含んでもよい。標識ペアは、同一のクロモフォアであってもよい。

20

## 【0329】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法及びカートリッジにおいて使用されるプライマー及び/又はプローブに、色素及び他の部分(例えばクエンチャー)が導入される。特定の実施形態において、かかる色素及びクエンチャーとしては、FRETプローブとしての用途に適する色素(fluors)が挙げられるが、これに限定されない。特定の実施形態において、色素及び/又はクエンチャーは、修飾ヌクレオチドを含む。「修飾ヌクレオチド」は、未だヌクレオチドとして機能する化学修飾されたヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態において、修飾ヌクレオチドは、共有結合する化学的部分(例えば色素又はクエンチャー)を有し、例えばポリヌクレオチドの固相法によりポリヌクレオチドに導入することができる。いくつかの実施形態において、修飾ヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドの核酸への組み入れの前に、その間に、又はその後、色素又はクエンチャーと反応できる1つ又は複数の反応性基を含む。いくつかの実施形態において、修飾ヌクレオチドは、アミン修飾ヌクレオチド(すなわち反応性アミン基を有するよう修飾されたヌクレオチド)である。いくつかの実施形態において、修飾ヌクレオチドは、修飾塩基部分(例えばウリジン、アデノシン、グアノシン及び/又はシトシン)を含む。いくつかの実施形態において、アミン修飾ヌクレオチドは、5-(3-アミノアリル)-UTP、8-[(4-アミノ)ブチル]-アミノ-ATP及び8-[(6-アミノ)ブチル]-アミノ-ATP、N6-(4-アミノ)ブチル-ATP、N6-(6-アミノ)ブチル-ATP、N4-[2,2-オキシピス-(エチルアミン)]-CTP、N6-(6-アミノ)ヘキシル-ATP、8-[(6-アミノ)ヘキシル]-アミノ-ATP、5-プロパルギルアミノ-CTP、5-プロパルギルアミノ-UTPから選択される。いくつかの実施形態において、異なる核酸塩基部分を有するヌクレオチドが、同様に修飾される(例えば5-(3-アミノアリル)-UTPの代わりに5-(3-アミノアリル)-GTP)。例えば、多くのアミン修飾ヌクレオチドは、Applied Biosystems社、Sigma社、Jena Bioscience社及びTriLink社等から市販されている。適切なfluorsの例示的であるが非限定的なリストをTable 1(表1)に示す。

30

40

## 【0330】

50

【表 1 A】

Table 1.本明細書に記載されるプライマー及び/又はプローブに用いられる例示的であるが非限定的なフルオロフォア(蛍光標識)

色素	吸光波長	放出波長
Alexa fluor	345	442
Alexa fluor 430	430	545
Alexa fluor 488	494	517
Alexa fluor 532	530	555
Alexa fluor 546	556	573
Alexa fluor 555	556	573
Alexa fluor 568	578	603
Alexa fluor 594	590	617
Alexa fluor 633	621	639
Alexa fluor 633	650	668
Alexa fluor 660	663	690
Alexa fluor 680	679	702
アロフィコシアニン	650	660
アミノクマリン	350	445
Cy2	490	510
Cy3	550	570
Cy3.5 581	581	596
Cy5	650	670
Cy5.5	675	694
Cy7	743	770
FAM	495	516
フルオレセイン FITC	495	518
HEX	535	556
ヒドロキシクマリン	325	386
メトキシクマリン	360	410
Red 613	480;565	613
ローダミン Red-X	560	580
Rox	575	602
R-フィコエリトリン(PE)	480;565	578
Tamara	565	580

10

20

30

40

【表 1 B】

テキサスレッド	615	615
TRITC	547	572
TruRed	490;675	695

## 【 0 3 3 2 】

アッセイが1つの標的DNA配列(例えば、1つのイムノPCRシグナルDNA)を検出するように設計されている場合、1つの蛍光ハイブリダイゼーションプローブのみの使用が必要となり、特定の実施形態では、FAM、TET又はHEX(又はTable 2(表2)に列挙されるそれらの変形例のいずれか)が、プローブを標識するのに適するフルオロフォアである。これらのフルオロフォアは、各種の分光蛍光分析的なサーマルサイクラーにおいて容易に励起され、検出される。更に、これらのフルオロフォアのホスホラミダイト誘導体の入手可能性、及びクエンチャーに連結された対照用の孔ガラス製カラムの入手可能性のため、これらの標識を有する蛍光ハイブリダイゼーションプローブは、自動化されたDNA合成プロセスで完全に合成することができ、比較的少ない製造コスト及び労力のプローブ製造の利点がある。

## 【 0 3 3 3 】

## 【表 2】

Table 2. 蛍光ハイブリダイゼーションプローブのための更なる例示的なフルオロフォアアラベル

フルオロフォア	代替フルオロフォア	励起 (nm)	放出 (nm)
Cy3 <sup>3</sup>	NED <sup>2</sup> , Quasar 570 <sup>1</sup> , Oyster 556 <sup>4</sup>	550	570
Cy5 <sup>3</sup>	LC red 670 <sup>5</sup> , Quasar 670 <sup>1</sup> , Oyster 645 <sup>4</sup>	650	670
HEX	JOE, VIC <sup>B</sup> , CAL Fluor Orange 560 <sup>1</sup>	535	555
LC レッド 640 <sup>5</sup>	CAL Fluor Red 635 <sup>A</sup>	625	640
LC レッド 705 <sup>5</sup>	Cy5.5 <sup>3</sup>	680	710
ROX	LC red 610 <sup>5</sup> , CAL Fluor Red 610 <sup>1</sup>	575	605
TET	CAL Fluor Gold 540 <sup>1</sup>	525	540
テキサスレッド	LC red 610 <sup>5</sup> , CAL Fluor Red 610 <sup>1</sup>	585	605
TMR	CAL Fluor Red 590 <sup>1</sup>	555	575

<sup>1</sup>)CAL 及び Quasar フルオロフォアは Biosearch Technologies 社から入手可能、<sup>2</sup>)VIC 及び NED は Applied Biosystems 社から入手可能、<sup>3</sup>)Cy 色素は Amersham Biosciences 社から入手可能、<sup>4</sup>)Oyster フルオロフォアは Integrated DNA Technologies 社から入手可能、<sup>5</sup>)LC(Light Cycler)フルオロフォアは Roche Applied Science 社から入手可能。

## 【 0 3 3 4 】

特定の実施形態において、例えば異なるイムノPCR反応のための異なるシグナルDNAを用い、及び/又は、イムノPCRシグナルDNAとは別の核酸を増幅に供する増幅反応を行うことにより、複数の標的を単一の多重反応において検出する。いくつかの実施形態において、異なる増幅産物から標的とされる各プローブは、多重反応において用いられる他のプローブ

ブから、スペクトルにより識別可能である(検出可能に異なる)。多重検出に適するプローブの組合せは、当業者に公知である。例えば、4標的マルチプレックスシステムにおける、検出可能に異なるフルオロフォアの例示的な組合せとしては、限定されないが以下のものが挙げられる:

【0335】

<sup>1)</sup>FAM、TMR、テキサスレッド及びCy5、

【0336】

<sup>2)</sup>FAM、TET、TMR及びテキサスレッド、

【0337】

<sup>3)</sup>FAM、HEX、テキサスレッド及びCy5、並びに

【0338】

<sup>4)</sup>FAM、Cy3、テキサスレッド及びCy5。

【0339】

5標的マルチプレックスシステムにおける、検出可能に異なるフルオロフォアの例示的な組合せとしては、FAM、TET、TMR、テキサスレッド及びCy5である。例えば、6標的マルチプレックスシステムにおける、検出可能に異なるフルオロフォアの例示的な組合せとしては、限定されないが以下のものが挙げられる:

【0340】

<sup>1)</sup>FAM、TET、HEX、TMR、ROX及びテキサスレッド、並びに

【0341】

<sup>2)</sup>FAM、HEX、LCred610、LCred640、LCred670及びLCred705。

【0342】

これらのフルオロフォアの組合せは例示的、かつ非限定的であると認識され、また当業者であれば多数の他のフルオロフォアを利用できる。

【0343】

上記のように、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)を利用する蛍光ハイブリダイゼーションプローブの設計においては、十分なスペクトルの重なりを有するフルオロフォア-クエンチャーのペアが選択されなければならない。500~550nm間の発光極大のフルオロフォア(例えばFAM、TET及びHEX)は、450~550nmの間の吸収極大を有するクエンチャー(例えばダブルシル、BHQ-1等)により最もクエンチされる(例えばクエンチャーラベルの例についてはTable 3(表3)参照)。550nm以上の発光極大のフルオロフォア(例えばローダミン(TMR、ROX及びテキサスレッドを含む)及びCy色素(Cy3及びCy5を含む)は、550nm以上の吸収極大を有するクエンチャー(BHQ-2を含む)により効果的にクエンチされる。

【0344】

接触クエンチングを利用する蛍光ハイブリダイゼーションプローブの設計においては、非蛍光性のクエンチャーを、フルオロフォアからのエネルギーの良好なアクセプターとして利用することができる。例えば、Cy3及びCy5は、BHQ-1及びBHQ-2クエンチャーにより効果的にクエンチされる。

【0345】

10

20

30

## 【表3】

Table 3. 蛍光ハイブリダイゼーションプローブ用の例示的なクエンチャーラベル

クエンチャー	吸収極大 (nm)
BHQ-1 <sup>4</sup>	534
BHQ-2 <sup>4</sup>	580
BHQ-3 <sup>4</sup>	670
ダブシル	475
DDQ-I <sup>1</sup>	430
DDQ-II <sup>1</sup>	630
Eclipse <sup>2</sup>	530
Iowa Black FQ <sup>3</sup>	532
Iowa Black RQ <sup>3</sup>	645
QSY-21 <sup>5</sup>	660
QSY-7 <sup>5</sup>	571

<sup>1</sup>)DDQ 又は Deep Dark Quenchers は Eurogentec から入手可能、<sup>2</sup>)Eclipse クエンチャーは Epoch Biosciences から入手可能、<sup>3</sup>)Iowa クエンチャーは Integrated DNA Technologies から入手可能、<sup>4</sup>)BHQ 又は Black Hole クエンチャーは Biosearch Technologies から入手可能、並びに <sup>5</sup>)QSY クエンチャーは Molecular Probes から入手可能である。

10

20

## 【0346】

特定の実施形態において、ヌクレオチドはフルオロフォアの蛍光をクエンチでき、最も効率的なクエンチャーはグアノシン、それに続き、アデノシン、シチジン及びチミジンである。一般に、500～550nmの間の励起波長を有するフルオロフォアは、より長い励起波長を有するフルオロフォアよりも、ヌクレオチドにより効率的にクエンチされる。蛍光ハイブリダイゼーションプローブの設計において、フルオロフォアから高い蛍光シグナルを得るために、グアノシンの隣に直接フルオロフォアラベルを配置することを回避するのが望ましい場合もある。

30

## 【0347】

接触クエンチングにより相互作用するいくつかのフルオロフォア-クエンチャーペアの安定化効果には、ハイブリダイゼーションプローブの設計のための重要な知見が含まれると考えられる(例えばMarrasら、(2002) Nucleic Acids Res. 30: e122、Johanssonら、(2002) J. Am. Chem. Soc. 124: 6950-6956を参照)。例えば、BHQ-1又はBHQ-2によりクエンチされるフルオロフォアで標識されたハイブリダイゼーションプローブが、同じプローブ配列を有するが、ダブシルによりクエンチされるフルオロフォアで標識されたハイブリダイゼーションプローブと比較し、約4 のハイブリッド融解温度の増加を示すことが観察されている。また、強い親和性がCy、Cy3及びCy5色素とBlack HoleクエンチャーであるBHQ-1及びBHQ-2との間に観察された点にも留意すべきである。

40

## 【0348】

本明細書において提供される前述の記載及び実施例及び教示に鑑み、本明細書に記載される方法及びカートリッジに対し、多数のプライマー/プローブの組合せが利用できる。

## 【0349】

50

### イムノPCR検出/定量及び任意の核酸分析のための標的/検体

本明細書に記載されるイムノPCRカートリッジ及び方法は、幅広い範囲で使用を見出す。例えば、イムノPCRは、限定されないが、ウイルス、細菌、菌類、植物、藻類、原生動物、並びに、限定されないが、かかる生物又は微生物のあらゆる病原性の形態/種/株等、様々な生物又は微生物の存在を同定し、及び/又はその定量に用いることができる。特定の実施形態において、イムノPCRは、これらの微生物のいずれかにより産生される毒素を同定するために用いることができる。各種実施形態において、本明細書に記載されるイムノPCR装置及び方法は、各種の癌又は癌マーカーを同定及び/又は薬剤耐性を示す癌細胞又は微生物(例えばMRSA、薬物耐性結核、ドキシソルピシン又はゲンタマイシン耐性癌細胞等)を同定するために用いることができる。イムノPCRアッセイは、特に、医療分野のみならず、環境分野(例えば水及び土壌汚染物質のスクリーニング)、農業分野(例えば牛肉、鳥肉、各種の食用作物等のスクリーニング)での使用を見出す。

10

#### 【0350】

したがって、カートリッジには、生物学的な、環境由来の、医療用の、又は患者由来の材料を含むサンプルをロードする(又は、例えばロードされるように構成される)。各種実施形態において、サンプルには、物体の表面、土壌、水、植生及び産業的なサンプルからなる群から選択される環境サンプルが含まれる。特定の実施形態において、サンプルには、肉、食肉加工品、鳥肉又は鳥肉製品、牛乳又は乳製品、及び作物、及び有機廃棄物からなる群から選択される食品又は農業サンプルが含まれる。特定の実施形態において、サンプルには、培養物、血液、唾液、脳脊髄液、尿、便、気管支吸引液、胸膜液、気管液、乳汁、リンパ液、痰、精液、ニードル吸引液、パンチ生検、外科的生検、低温保存された切片、FFPE切片等からなる群から選択される生体サンプルが含まれる。

20

#### 【0351】

特定の実施形態において、イムノPCRカートリッジ及びその使用方法は、各種の病原性細菌及び/若しくはウイルス、又はかかる病原性細菌及び/若しくはウイルスにより産生される毒素を検出及び/又は定量し、それにより、疾患の状態を診断及び/又は特徴づけ、適切な治療法の選択を容易にするために利用される。この点に関して、例えばTable 4(表4)に示すように、多くのウイルス、細菌及び細菌毒素を検出及び/又は定量するために、イムノPCRが用いられていることに留意されたい。更に、イムノPCRは、プリオンタンパク質(Table 4(表4)を参照)を検出するために用いられ、したがって、プリオン病(例えばウシ、又はヒトの海綿状脳症)を検出すること、及び/又はプリオンに感染した動物性の製品のスクリーニングに用いることができる。本明細書で提供される教示を用いて、またTable 4(表4)を参照して、本明細書に記載されるカートリッジにおいて、各種記載されるイムノPCRアッセイを容易に実施できる。

30

#### 【0352】

【表 4 A】

Table 4. イムノ PCR を使用して検出された例示的な標的(検体/抗原)

ウイルス抗原		
B 型肝炎 表面抗原(HbsAg)	Maia ら、(1995) <i>J. Virol. Meth.</i> 52: 273-286; Wacker ら、(2007) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 357: 391-396	
ウシヘルペスウイルス 1 抗原	Mweene ら、(1996) <i>J. Clin. Microbiol.</i> 34: 748-750	10
ウマインフルエンザウイルスの NSP-1	Ozaki ら、(2001) <i>Jpn. J. Vet. Res.</i> 48: 187-195	
呼吸器合胞体ウイルス (RSV)表面タンパク質	Perez ら、(2013) <i>Meth. Mol. Biol.</i> 1026: 93-110.	
精製された口蹄疫ウイルス (FMDV)	Ding ら、(2011) <i>Virol. J.</i> 8: 148	
H5N1 トリインフルエンザウイ ルス (AIV)	Deng ら、(2011) <i>Mol. Biol. Rep.</i> 38: 1941-1948; Deng ら、(2011) <i>Vet. Immunol. Immunopathol.</i> 141: 183-189.	20
HIV P24 抗原	Barletta ら、(2004) <i>Am. J. Clin. Pathol.</i> 122: 20-27 、Barletta ら、(2009) <i>J. Virol. Meth.</i> 157: 122-132	
ノロウイルスカプシド	Tian 及び Mandrell (2006) <i>J. Appl. Microbiol.</i> 100; 564-574	
ロタウイルス	Adler ら、(2005) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 333: 1289-1294	
ウマインフルエンザ	Ozaki ら、(2001) <i>J. Vet. Res.</i> 48: 187-195	30
ハンタウイルスヌクレオカプシ ドタンパク質	Chen ら、(2009) <i>J. Immunol. Meth.</i> 346: 64-70、 Guo ら、(2006) <i>Nucleic Acids Res.</i> 34: e62	
トリインフルエンザウイルス	Deng ら、(2010) <i>Mol. Biol. Rep.</i> 38: 1941-1948	
細菌抗原		
<i>Pasteurella piscicida</i>	Liang ら、(2003) <i>J. Immunol. Meth.</i> 279: 101-110 、Kakizaki, E. ら、(1996) <i>Lett. Appl. Microbiol.</i> 23: 101-103	
A 群連鎖球菌	Liang ら、(2003) <i>J. Immunol. Meth.</i> 279: 101-110、 Barletta (2006) <i>Mol. Aspects Med.</i> 27: 224-253	40
大腸菌 $\beta$ -グルクロニダーゼ(GUD)	Chang 及び Huang (1997) <i>J. Immunol. Meth.</i> 208: 35-42	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Huang 及び Chang (2004) <i>Clin. Chem.</i> 50: 1673- 1674	

【表 4 B】

<i>Bacteroides fragilis</i>	Zhang 及び Pan (1998) <i>Anaerobe</i> 4: 189-196	
<i>Streptococcus pyogenes</i> 群 A	Liang ら、(2003) <i>J. Immunol. Meth.</i> 279: 101-110.	
<i>Staphylococcus aureus</i> プロテイン A	Huang 及び Chang (2004) <i>Clin. Chem.</i> 50: 1673-1674	
<i>X. fastidiosa</i> 9a5c 菌株	Peroni ら、(2008) <i>J. Microbiol. Meth.</i> 75: 302-307	10
歯髄の <i>Y. pestis</i>	Malou ら、(2012) <i>PLoS ONE</i> 7: e31744	
<i>M. tuberculosis</i> ESAT-6, CFP-10、CFP-21 及び MPT-64 抗原	Mehta ら、(2012) <i>FEMS Immunol. Med. Microbiol.</i> 66: 20-36	
細菌毒素		
志賀毒素産生大腸菌由来の志賀毒素 2 (STEC)	Zhang ら、(2008) <i>J. Clin. Microbiol.</i> 46: 1292-1297; He ら、(2011) <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 77: 3558-3564.	20
<i>Clostridium botulinum</i> ニューロトキシン A	Chao ら、(2004) <i>Toxicon</i> , 43: 27-34	
<i>Staphylococcus aureus</i> エンテロトキシン A <i>Staphylococcus aureus</i> エンテロトキシン B	Rajkovic ら、(2006) <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 72: 6593-6599; Fischer ら、(2007) <i>J. Mol. Med. (Berl)</i> , 85: 461-469.	
<i>Bacillus thuringiensis</i> 毒素	Allen ら、(2006) <i>J. Immunol. Meth.</i> 308: 109-115	
プリオンタンパク質		30
組換えウシプリオン	Gofflot ら、(2004) <i>J. Immunoassay-Immunochem.</i> 25: 241-258	
組換えヒトプリオン	Gofflot ら、(2005) <i>Clin. Chem.</i> 51: 1605-1611	
組換えプリオンタンパク質	Guo ら、(2006) <i>Nucleic Acids Res.</i> 34: e62	
抗体		
血清中のムンプス特異的な IgG	McKie ら、(2002) <i>J. Immunol. Meth.</i> 270: 135-141	40
その他		
<i>Angiostrongylus cantonensis</i> 204kDa AcL5(第 5 齢虫)	Chye ら、(2004) <i>Clin. Chem.</i> 50: 51-57	
アフラトキシン B1	Babu 及び Muriana (2011) <i>J. Microbiol. Meth.</i> 86: 188-194	

## 【 0 3 5 4 】

各種実施形態において、本明細書に記載されるようなカートリッジベースのイムノPCRを使用して各種の微生物に特徴的な抗原性マーカーを検出及び/又は定量し、微生物の存

在及び/又は量の検出を提供する。かかるスクリーニングは、患者の診断、環境試験、及び家畜、肉及び農産物のスクリーニングにおいて使用を見出す。

【0355】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるイムノPCRカートリッジ及び方法は、各種の細菌毒素を検出及び/又は定量するために用いる。細菌毒素には、ボツリヌス菌のニューロトキシン、クロストリジウム-ディフィシルの毒素A、毒素B、リポポリサッカライド又はエンドトキシン(グラム陰性菌に関連)、テタヌトキシン、志賀毒素、志賀様毒素、スタフィロコッカス毒素(例えば黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンA及びB)、炭疽毒素、シアノトキシン、ジフテリア毒素、エキソトキシン、百日咳毒素等が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0356】

菌類及び/又は各種の菌類により産生されるマイコトキシンに特徴的な各種の抗原性マーカーの検出も可能である。本明細書に記載されるカートリッジベースのイムノPCRを用いて検出できるマイコトキシンとしては、アフラトキシン、オクラトキシン、シトリニン、麦角アルカロイド、パツリン、フザリウム毒素等が挙げられるが、これらに限定されない。アフラトキシンは、*A. flavus*及び*A. parasiticus*等のアスペルギルス属の菌類により産生される一種のマイコトキシンである。アフラトキシンには、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>及びG<sub>2</sub>と称される4つの異なるマイコトキシンのタイプが含まれる。アフラトキシンB<sub>1</sub>(最も有毒)は、強力な発癌物質であり、多くの動物種において健康に対する負の効果(例えば肝癌)と直接関連するものであった[8]。アフラトキシンは、熱帯及び亜熱帯地方で生産される、綿、ピーナッツ、スパイス、ピスタチオ及びトウモロコシ等の生活必需品と主に関連する。マイコトキシンであるオクラトキシンは、3つの二次代謝産物を形成するが、その全ては*Penicillium*及び*Aspergillus*属の種により産生される。オクラトキシンB(OTB)がオクラトキシンA(OTA)の非含塩素形であり、オクラトキシンC(OTC)がエチルエステル型のオクラトキシンAである点で、3つの形態は異なる。*Aspergillus ochraceus*は、飲料(例えばビール及びワイン)等の広範囲にわたる必需品の汚染物質として検出される。*Aspergillus carbonarius*は、ぶどう果で検出される主な種であり、それはジュースの製造工程の間にその毒素を放出する。OTAは、発癌物質及び腎毒素とされており、ヒト尿路の腫瘍に関連する。シトリニンは、*Penicillium*の12の種、及び*Aspergillus*のいくつかの種において同定されている。これらの種の一部は、チーズ(*Penicillium camemberti*)、酒、味噌及び醤油(*Aspergillus oryzae*)等のヒトの食品の生産に使用される。シトリニンは、日本米の黄変米病と関連し、試験した全ての動物種において腎毒素として作用する。それは、*Monascus*の色素により変色した小麦、米、穀物、大麦、オート麦、ライ麦及び食品を含むがこれに限定されない多くのヒト食品と関連する。麦角アルカロイドは、*Claviceps*の種の菌核アルカロイドの有毒な混合物として産生される化合物を含み、それは各種の草種における共通の病原体である。感染した穀類からの麦角菌核の摂取は、一般に汚染された小麦粉から生産されたパンを通じて、歴史的に聖アントニーの火として公知のヒト疾患である麦角中毒を生じさせる。麦角中毒には2つの形式が存在し、1つは壊疽で、四肢への血液供給に影響を与えるものであり、もう1つは痙攣で、中枢神経系に影響を与えるものである。現代の精白方法の発達により、ヒト疾患としての麦角中毒が著しく減少したが、未だ重要な獣医学的な課題である。パツリンは、*P. expansum*、*Aspergillus*、*Penicillium*及び*Paecilomyces*の菌種により産生される毒素である。*P. expansum*は、特に腐りかけのリンゴ及びイチジク等、特にかびの生えた一定の範囲の果菜類と関連する。それは、発酵プロセスにより破壊され、リンゴ飲料(例えばサイダー)では検出されない。パツリンは、発癌性を示すことが示されなかったが、動物の免疫系にダメージを与えることが報告されている。2004年において、欧州共同体は食品製品におけるパツリン濃度を規制した。フザリウム毒素は、*Fusarium*の50以上の種により産生され、例えば小麦及びトウモロコシ等の穀類の発芽粒子をこれまで汚染させてきた。それらは、例えば、フモニシン(ウマの神経系に影響を及ぼし、齧歯動物において癌を生じさせる)、トリコセセン(動物及びヒトの慢性及び致命的な毒性作用と最も強く関連する)、及びゼアラレノン(動物又はヒトにおけるいかなる致命的

20

30

40

50

な毒性作用とも相関しない)等の一定範囲のマイコトキシンを含む。フザリウム毒素の他のいくつかの主なタイプとしては、ボーベリシン及びエンニアチン、プテノリド、エクイセチン及びフザリン等が挙げられる。

【0357】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるイムノPCRカートリッジ及び方法は、各種の藻類により産生される各種の藻類の抗原性マーカー及び/又は毒素の検出に使用される。各種の藻類及び藻類の毒素は、特に魚介類産業において重要な病原体である。藻類の毒素としては、シアノバクテリア(例えばMicrocystis sp.、Anabaena sp.、Aphanizomenon sp.、Nodularia sp.、Oscillatoria sp等)により産生される毒素、肝臓毒(例えばマイクロシスチン及びノジュラリン)及びニューロトキシン(例えばアナトキシンa及びアナトキシンa類)、貝毒に関連するPseudonitzschia sp.により産生されるニューロトキシンであるドモイ酸、麻痺型貝中毒の原因となるAlexandrium sp.により産生されるニューロトキシンであるサキシトキシン、Gymnodinium sp.により産生されるニューロトキシンであるプレベトキシン等が挙げられる。

10

【0358】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるイムノPCRカートリッジ及び方法は、各種の薬剤耐性遺伝子又は各種の薬剤耐性病原菌の株に特徴的な抗原性マーカーの検出に使用される。すなわち、特定の実施形態において、本明細書において記載されているイムノPCRカートリッジ及び方法は、薬剤耐性細菌を迅速に同定し、治療方針を知らせるために用いることができ、又は、癌の場合、特定の薬剤耐性の癌細胞を同定するために用いることができ、それにより、最も適切な化学療法を決定することが可能となる。薬剤耐性細菌の例としては、Staphylococcus aureus (MRSA)、Burkholderia cepacian、Pseudomonas aeruginosa、Clostridium difficile、Klebsiella pneumoniae、Escherichia coli (E. coli)、Acinetobacter baumannii、Mycobacterium tuberculosis、Neisseria gonorrhoeae、Streptococcus pyogenes等の薬剤耐性株が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0359】

特定の実施形態では、本明細書に記載されるイムノPCRカートリッジ及び方法は、炎症反応(例えば宿主応答炎症)の1つ又は複数のマーカーを検出するために用いる。かかるマーカーとしては、限定されないが、IL-8、カルプロテクチン及びラクトフェリンが挙げられる。

30

【0360】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるイムノPCRカートリッジ及び方法は、1つ又は複数の癌マーカーを検出するために用いる。かかるマーカーとしては、限定されないが、Table 5(表5)に示される癌マーカーが挙げられる。

【0361】

【表 5 A】

Table 5. 癌マーカー及び関連する参照の例

マーカー	参照
5 $\alpha$ レダクターゼ	Delos ら、(1998) <i>Int J Cancer</i> , 75:6 840-846
$\alpha$ -フェトプロテイン	Esteban ら、(1996) <i>Tumour Biol.</i> , 17(5): 299-305
AM-1	Harada ら、(1996) <i>Tohoku J Exp Med.</i> , 180(3): 273-288
APC	Dihlmann ら、(1997) <i>Oncol Res.</i> , 9(3) 119-127
APRIL	Sordat ら、(1998) <i>J Exp Med.</i> , 188(6): 1185-1190
BAGE	Boel ら、(1995) <i>Immunity</i> , 2: 167-175.
$\beta$ -カテニン	Hugh ら、(1999) <i>Int J Cancer</i> , 82(4): 504-11
Bcl2	Koty ら、(1999) <i>Lung Cancer</i> , 23(2): 115-127
bcr-abl (b3a2)	Verfaillie ら、(1996) <i>Blood</i> , 87(11): 4770-4779
CA-125	Bast ら、(1998) <i>Int J Biol Markers</i> , 13(4): 179-187
CASP-8/FLICE	Mandruzzato ら、(1997) <i>J Exp Med.</i> , 186(5): 785-793.
カテプシン	Thomssen ら、(1995) <i>Clin Cancer Res.</i> , 1(7): 741-746
CD19	Scheuermann ら、(1995) <i>Leuk Lymphoma</i> , 18(5-6): 385-397
CD20	Knox ら、(1996) <i>Clin Cancer Res.</i> , 2(3): 457-470
CD21, CD23	Shubinsky ら、(1997) <i>Leuk Lymphoma</i> , 25(5-6): 521-530
CD22, CD38	French ら、(1995) <i>Br J Cancer</i> , 71(5): 986-994
CD33	Nakase ら、(1996) <i>Am J Clin Pathol.</i> , 105(6): 761-768
CD35	Yamakawa ら、 <i>Cancer</i> , 73(11): 2808-2817
CD44	Naot ら、(1997) <i>Adv Cancer Res.</i> , 71: 241-319
CD45	Buzzi ら、(1992) <i>Cancer Res.</i> , 52(14): 4027-4035
CD46	Yamakawa ら、(1994) <i>Cancer</i> , 73(11): 2808-2817
CD5	Stein ら、(1991) <i>Clin Exp Immunol.</i> , 85(3): 418-423
CD52	Ginaldi ら、(1998) <i>Leuk Res.</i> , 22(2): 185-191
CD55	Spendlove ら、(1999) <i>Cancer Res.</i> , 59: 2282-2286.
CD59 (791Tgp72)	Jarvis ら、(1997) <i>Int J Cancer</i> , 71(6): 1049-1055
CDC27	Wang ら、(1999) <i>Science</i> , 284(5418): 1351-1354
CDK4	Wolfel ら、(1995) <i>Science</i> , 269(5228): 1281-1284
CEA	Kass ら、(1999) <i>Cancer Res.</i> , 59(3): 676-683

10

20

30

40

【表 5 B】

c-myc	Watson ら、(1991) <i>Cancer Res.</i> , 51(15): 3996-4000	
Cox-2	Tsuji ら、(1998) <i>Cell</i> , 93: 705-716	
DCC	Gotley ら、(1996) <i>Oncogene</i> , 13(4): 787-795	
DcR3	Pitti ら、(1998) <i>Nature</i> , 396: 699-703	
E6/E7	Steller ら、(1996) <i>Cancer Res.</i> , 56(21): 5087-5091	10
EGFR	Yang ら、(1999) <i>Cancer Res.</i> , 59(6): 1236-1243.	
EMBP	Shiina ら、(1996) <i>Prostate</i> , 29(3): 169-176.	
Ena78	Arenberg ら、(1998) <i>J. Clin. Invest.</i> , 102: 465-472.	
FGF8b 及び FGF8a	Dorkin ら、(1999) <i>Oncogene</i> , 18(17): 2755-2761	
FLK-1/KDR	Annie 及び Fong (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59: 99-106	
葉酸受容体	Dixon ら、(1992) <i>J Biol Chem.</i> , 267(33): 24140-72414	20
G250	Divgi ら、(1998) <i>Clin Cancer Res.</i> , 4(11): 2729-2739	
GAGE ファミリー	De Backer ら、(1999) <i>Cancer Res.</i> , 59(13): 3157-3165	
ガストリン 17	Watson ら、(1995) <i>Int J Cancer</i> , 61(2): 233-240	
ガストリン放出ホルモン(ボンベシン)	Wang ら、(1996) <i>Int J Cancer</i> , 68(4): 528-534	
GD2/GD3/GM2	Wiesner 及び Sweeley (1995) <i>Int J Cancer</i> , 60(3): 294-299	
GnRH	Bahk ら、(1998) <i>Urol Res.</i> , 26(4): 259-264	30
GnTV	Hengstler ら、(1998) <i>Recent Results Cancer Res.</i> , 154: 47-85	
gp100/Pmel17	Wagner ら、(1997) <i>Cancer Immunol Immunother.</i> , 44(4): 239-247	
gp-100-in4	Kirkin ら、(1998) <i>APMIS</i> , 106(7): 665-679	
gp15	Maeurer ら、(1996) <i>Melanoma Res.</i> , 6(1): 11-24	
gp75/TRP-1	Lewis ら、(1995) <i>Semin Cancer Biol.</i> , 6(6): 321-327	
hCG	Hoermann ら、(1992) <i>Cancer Res.</i> , 52(6): 1520-1524	
ヘパラーナーゼ	Vlodavsky ら、(1999) <i>Nat Med.</i> , 5(7): 793-802	40
Her2/neu	Lewis ら、(1995) <i>Semin Cancer Biol.</i> , 6(6): 321-327	
Her3		
HMTV	Kahl ら、(1991) <i>Br J Cancer</i> , 63(4): 534-540	
Hsp70	Jaattela ら、(1998) <i>EMBO J.</i> , 17(21): 6124-6134	

【表 5 C】

hTERT (テロメラーゼ)	Vonderheide ら、(1999) <i>Immunity</i> , 10: 673-679. 1999.	
IGFR1	Ellis ら、(1998) <i>Breast Cancer Res. Treat.</i> , 52: 175-184	
IL-13R	Murata ら、(1997) <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> , 238(1): 90-94	
iNOS	Klotz ら、(1998) <i>Cancer</i> , 82(10): 1897-1903	10
Ki 67	Gerdes ら、(1983) <i>Int J Cancer</i> , 31: 13-20	
KIAA0205	Gueguen(1998) <i>J Immunol.</i> , 160(12): 6188-6194	
K-ras, H-ras, N-ras	Abrams ら、(1996) <i>Semin Oncol.</i> , 23(1): 118-134	
KSA (CO17-1A)	Zhang ら、(1998) <i>Clin Cancer Res.</i> , 4(2): 295-302	
LDLR-FUT	Caruso ら、(1998) <i>Oncol Rep.</i> , 5(4): 927-930	20
MAGE ファミリー (MAGE1、MAGE3 等)	Marchand ら、(1999) <i>Int J Cancer</i> , 80(2): 219-230	
マンマグロビン	Watson ら、(1999) <i>Cancer Res.</i> , 59: 3028-3031	
MAP17	Kocher ら、(1996) <i>Am J Pathol.</i> , 149(2): 493-500	
メラン-A/ MART-1	Lewis 及び Houghton (1995) <i>Semin Cancer Biol.</i> , 6(6): 321-327	30
メソテリン	Chang ら、(1996) <i>Proc. Natl. Acad. Sci., USA</i> , 93(1): 136-140	
MIC A/B	Groh ら、(1998) <i>Science</i> , 279: 1737-1740	
MT-MMP(例えば MMP2、MMP3、 MMP7、MMP9)	Sato 及び Seiki (1996) <i>J Biochem (Tokyo)</i> , 119(2): 209-215	
Mox1	Candia ら、(1992) <i>Development</i> , 116(4): 1123-1136	40
ムチン(例えば MUC-1 、MUC-2、MUC-3 及 び MUC-4)	Lewis 及び Houghton (1995) <i>Semin Cancer Biol.</i> , 6(6): 321-327	
MUM-1	Kirkin ら、(1998) <i>APMIS</i> , 106(7): 665-679	
NY-ESO-1	Jager ら、(1998) <i>J. Exp. Med.</i> , 187: 265-270	

【表 5 D】

オステオネクチン	Graham ら、(1997) <i>Eur J Cancer</i> , 33(10): 1654-1660	
p15	Yoshida ら、(1995) <i>Cancer Res.</i> , 55(13): 2756-2760	
P170/MDR1	Trock ら、(1997) <i>J Natl Cancer Inst.</i> , 89(13): 917-931	
p53	Roth ら、(1996) <i>Proc. Natl. Acad. Sci., USA</i> , 93(10): 4781-4786.	
p97/メラノトランス フェリン	Furukawa ら、(1989) <i>J Exp Med.</i> , 169(2): 585-590	10
PAI-1	Grondahl-Hansen ら、(1993) <i>Cancer Res.</i> , 53(11): 2513-2521	
PDGF	Vassbotn ら、(1993) <i>Mol Cell Biol.</i> , 13(7): 4066-4076	
プラスミノーゲン (uPA)	Naitoh ら、(1995) <i>Jpn J Cancer Res.</i> , 86(1): 48-56	
PRAME	Kirkin ら、(1998) <i>APMIS</i> , 106(7): 665-679	
プロバシン	Matuo ら、(1985) <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> , 130(1): 293-300	20
プロゲニポイエチン	-----	
PSA	Sanda ら、(1999) <i>Urology</i> , 53(2): 260-266.	
PSM	Kawakami ら、(1997) <i>Cancer Res.</i> , 57(12): 2321-2324	
RAGE-1	Gaugler ら、(1996) <i>Immunogenetics</i> , 44(5): 323-330	
Rb	Dosaka-Akita ら、(1997) <i>Cancer</i> , 79(7): 1329-1337	30
RCAS1	Sonoda ら、(1996) <i>Cancer</i> , 77(8): 1501-1509.	
SART-1	Kikuchi ら、(1999) <i>Int J Cancer</i> , 81(3): 459-466	
SSX 遺伝子 ファミリー	Gure ら、(1997) <i>Int J Cancer</i> , 72(6): 965-971	
STAT3	Bromberg ら、(1999) <i>Cell</i> , 98(3): 295-303	
STn (ムチン関連)	Sandmaier ら、(1999) <i>J Immunother.</i> , 22(1): 54-66	40
TAG-72	Kuroki ら、(1990) <i>Cancer Res.</i> , 50(16): 4872-4879	
TGF- $\alpha$	Imanishi ら、(1989) <i>Br J Cancer</i> , 59(5): 761-765	
TGF- $\beta$	Picon ら、(1998) <i>Cancer Epidemiol Biomarkers Prev</i> , 7(6): 497-504	

【表 5 E】

サイモシンβ15	Bao ら、(1996) <i>Nature Medicine</i> . 2(12), 1322-1328	
IFN-α	Moradi ら、(1993) <i>Cancer</i> , 72(8): 2433-2440	
TPA	Maulard ら、(1994) <i>Cancer</i> , 73(2): 394-398	
TPI	Nishida ら、(1984) <i>Cancer Res</i> 44(8): 3324-9	
TRP-2	Parkhurst ら、(1998) <i>Cancer Res.</i> , 58(21) 4895-4901	10
チロシナーゼ	Kirkin ら、(1998) <i>APMIS</i> , 106(7): 665-679	
VEGF	Hyodo ら、(1998) <i>Eur J Cancer</i> , 34(13): 2041-2045	
ZAG	Sanchez ら、(1999) <i>Science</i> , 283(5409): 1914-1919	
p16INK4	Quelle ら、(1995) <i>Oncogene</i> Aug. 17, 1995; 11(4): 635-645	
グルタチオン S-トランスフェラー ゼ	Hengstler ら、(1998) <i>Recent Results Cancer Res.</i> , 154: 47-85	20

## 【 0 3 6 6 】

上記を考慮すると、特定の実施形態において、本明細書に記載されるイムノPCRカートリッジは、ウイルス抗原、細菌抗原、プリオン、寄生虫抗原、マイコトキシン、藻類抗原、真菌抗原、癌マーカー及び薬剤耐性遺伝子産物からなる群から選択される検体に結合する捕捉抗体及び検出抗体を含むことができる。特定の実施形態において、捕捉抗体及び検出抗体は、B型肝炎表面抗原、C型肝炎表面抗原、ウシヘルペスウイルス抗原、ノロウイルスカプシド、ロタウイルス、広東住血線虫、ハンタウイルス属タンパク質、鳥インフルエンザウイルス抗原、HIV-1抗原及びH5N1抗原からなる群から選択されるウイルス抗原と結合する抗体である。特定の実施形態において、捕捉抗体及び検出抗体は、ウシPRP及びヒト脳PRPからなる群から選択されるプリオンと結合する抗体である。特定の実施形態において、捕捉抗体及び検出抗体は、C.difficile抗原、C.difficile Toxin A、C.difficile Toxin B、P.piscidia、大腸菌抗原、Bacteroides fragilis、BoNT/A、Streptococcus pyogenes群A、Staphylococcus aureus、Y.pestis抗原及びM. tuberculosis抗原からなる群から選択される細菌抗原又は細菌毒素と結合する抗体である。特定の実施形態において、捕捉抗体及び検出抗体は、志賀毒素2、ボツリヌス菌ニューロトキシンA、Staphylococcalのエンテロトキシン、Bacillus thurigiensis毒素、C.difficile毒素A及びC.difficile毒素Bからなる群から選択される細菌毒素と結合する抗体である。特定の実施形態において、捕捉抗体及び検出抗体は、薬剤耐性遺伝子によりコードされるポリペプチド(例えば、p糖タンパク質、OleCポリペプチド、mbcFポリペプチド、MsrAポリペプチド、bexAポリペプチド、bexBポリペプチド、kpsTポリペプチド、kpsMポリペプチド等の薬剤耐性ポリペプチド)と結合する抗体である。特定の実施形態において、捕捉抗体及び検出抗体は、Staphylococcus aureus (MRSA)、Burkholderia cepacian、Pseudomonas aeruginosa、Clostridium difficile、Klebsiella pneumoniae、Escherichia coli (E. coli)、Acinetobacter baumannii、Mycobacterium tuberculosis、Neisseria gonorrhoeae、及び/又はStreptococcus pyogenesの薬剤耐性株、又は、これらの株の薬剤抵抗性遺伝子によりコードされるポリペプチドに結合する抗体である。

## 【 0 3 6 7 】

10

20

30

40

50

特定の実施形態において、本明細書に記載されるイムノPCRカートリッジは、炎症反応(例えば宿主応答炎症)のマーカーを含む検体に結合する捕捉抗体及び検出抗体を含むことができる。かかるマーカーとしては、限定されないが、IL-8、カルプロテクチン及びラクトフェリンが挙げられる。

【0368】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるイムノPCRカートリッジは、癌マーカーを含む検体に結合する捕捉抗体及び検出抗体を含むことができる。かかるマーカーとしては、Table 5(表5)に示される癌マーカーが挙げられるが、これらに限定されない。

【0369】

各種実施形態において、本明細書に記載のカートリッジが、(1つ又は複数の、ポリペプチドであってもよくなくてもよい標的検体の)イムノPCR分析及び(カートリッジ内のイムノPCRシグナルDNA以外の1つ又は複数の標的核酸の)核酸分析の両方を可能にするため、第1にイムノPCRの標的のアッセイを行い、次に関連する核酸に関する反射アッセイを行うか、又は、第1に核酸標的のアッセイを行い、次に関連する標的検体に関する反射イムノPCRアッセイを行うことが可能である。

10

【0370】

したがって、例えば、イムノPCRアッセイが生物の病原性株に特徴的な抗原(例えば癌マーカー)を目的とする場合、核酸分析は、(例えば検証のために)そのマーカーをコードする核酸、又は薬剤耐性遺伝子若しくはマーカーをコードする核酸を目的とさせることにより、第1に病原体を同定し、第2にその病原体の薬剤耐性の状態を決定することが可能となる。逆に、特定の実施形態において、イムノPCR及び核酸分析のこれらの役割は逆転しう

20

【0371】

イムノPCRアッセイが炎症反応のマーカー(例えばIL-8、カルプロテクチン、ラクトフェリン等)を目的とする場合、核酸分析は、(例えば検証のために)そのマーカーをコードする核酸を目的とさせることができる。

【0372】

同様に、イムノPCRアッセイが癌細胞に特徴的な抗原を目的とする場合、核酸分析は、(例えば検証のため、Table 5(表5)に示すマーカーを参照)そのマーカーをコードする核酸、又は薬剤耐性遺伝子若しくはマーカーをコードする核酸を目的とさせることにより、第1に癌を同定し、次にその癌の状態を同定し、化学療法プロトコルを通知することが可能となる。逆に、特定の実施形態において、イムノPCR及び核酸分析のこれらの役割は逆転しう

30

【0373】

他の例において、イムノPCRは、微生物により産生される毒素を同定するために用いることができ、核酸分析は、毒素を産生する微生物又は株を特異的に同定するために用いることができる。逆に、特定の実施形態において、イムノPCR及び核酸分析のこれらの役割は逆転しう

【0374】

各種実施形態において、イムノPCRカートリッジは、ウイルス抗原、細菌抗原、プリオン、寄生虫抗原、マイコトキシン及び癌細胞由来の検体からなる群から選択される検体又は検体の断片をコードする核酸を検出及び/又は定量するためのプライマー及びプローブを更に含む。特定の実施形態において、イムノPCRカートリッジは、B型肝炎表面抗原、C型肝炎表面抗原、ウシヘルペスウイルス抗原、ノロウイルスカプシド、ロタウイルス、広東住血線虫、ハンタウイルス属タンパク質、鳥インフルエンザウイルス抗原、HIV-1抗原及びH5N1抗原からなる群から選択されるウイルス抗原又はそれらの断片をコードする核酸を検出及び/又は定量するためのプライマー及びプローブを更に含む。特定の実施形態において、イムノPCRカートリッジは、C.difficile抗原、C.difficile Toxin A、C.difficile Toxin B、P.piscidia、大腸菌抗原、Bacteroides fragilis、BoNT/A、Streptococcus pyogenes群A、Staphylococcus aureus、Y.pestis抗原及びM. tuberculosis抗原からなる

40

50

群から選択される細菌抗原又は細菌毒素又はそれらの断片をコードする核酸を検出及び/又は定量するためのプライマー及びプローブを更に含む。特定の実施形態において、イムノPCRカートリッジは、志賀毒素2、ボツリヌス菌ニューロトキシンA、Staphylococcalのエンテロトキシン、Bacillus thurigiensis毒素、C.difficile毒素A及びC.difficile毒素Bからなる群から選択される細菌毒素又はそれらの断片をコードする核酸を検出及び/又は定量するためのプライマー及びプローブを更に含む。特定の実施形態において、イムノPCRカートリッジは、薬剤耐性遺伝子により発現するポリペプチド(例えば、MRP、p糖タンパク質、OleCポリペプチド、mbcFポリペプチド、MsrAポリペプチド、bexAポリペプチド、bexBポリペプチド、kpsTポリペプチド、kpsMポリペプチド等の薬剤耐性ポリペプチド)をコードする核酸を検出及び/又は定量するためのプライマー及びプローブを更に含む。

10

**【0375】**

上記の各種の検体及び「反射」アッセイは例示的なものであり、また非限定的なものである。本明細書において提供される教示に鑑み、多くの他のアッセイ標的及びアッセイの組合せが、当業者により理解されるであろう。

**【0376】**

キット

各種実施形態において、本明細書に記載される方法の実施のためのキットが提供される。例示の実施形態において、キットは、本明細書に記載されるイムノPCRを実施するように構成される1つ又は複数のカートリッジを備える。特定の実施形態において、キットは、本明細書に記載される核酸サンプルを調製し、分析するように構成される第2のカートリッジ(例えばGENEXPERT(登録商標)カートリッジ)を更に備える。各種実施形態において、キットは、本明細書に記載されるイムノPCR、並びに本明細書に記載される更なる核酸増幅を実施するように構成されるカートリッジを備える。

20

**【0377】**

特定の実施形態において、キット内のカートリッジには、生物学的な、環境由来の、医療用の、又は患者由来の材料を含むサンプルがロードされるように構成される。各種実施形態において、キットには、キットに提供されるカートリッジ用のサンプルを得及び/又は調製するための1つ又は複数の機器及び/又は装置を更に提供することができる。特定の実施形態において、キットは、表面物質、土壌、水、植生及び産業サンプルからなる群から選択される環境サンプルを含むサンプルを得及び/又は調製するための1つ又は複数の器具及び/又は装置を備える。特定の実施形態において、キットは、培養物、血液、唾液、脳脊髄液、尿、便、気管支吸引液、胸膜液、気管液、乳汁、リンパ液、痰、精液、ニードル吸引液、パンチ生検、外科的生検、低温保存された切片、FFPE切片等からなる群から選択される生体サンプルを得及び/又は調製するための1つ又は複数の器具及び/又は装置を備える。特定の実施形態において、キットは、肉、食肉加工品、鳥肉又は鳥肉製品、牛乳又は乳製品、及び作物、及び有機廃棄物からなる群から選択される食品又は農業サンプルを含むサンプルを得及び/又は調製するための1つ又は複数の器具及び/又は装置を備える。

30

**【0378】**

特定の実施形態において、更にキットが、本明細書に記載される核酸サンプルを調製し、分析するように構成される第2のカートリッジ(例えばGENEXPERT(登録商標)カートリッジ)を備える場合、又は、キットが、本明細書に記載されるイムノPCR、及び本明細書に記載される更なる核酸増幅を行うように構成されるカートリッジを備える場合、キットは、核酸サンプルを処理し、調製するための試薬を更に含むことができる。かかる試薬は、例えば国際公開第2014/052551号パンフレット、国際出願第PCT/US16/41917号等で説明されるような溶解溶液を含むことができる。特定の実施形態において、キットは、プロテインAを含む容器、及び/又はエタノールを含む容器を含み、及び/又は、キットは、DNA調製用のカラムを含む。

40

**【0379】**

特定の実施形態において、キットは、イムノPCRのためのカートリッジの使用、又はイ

50

ムノPCR及び更なる核酸分析のためのカートリッジの使用を教示する説明書を含む。サンプル調製カートリッジ(例えばPCT出願第PCT/US16/37422)がキットに含まれる場合、キットは、サンプル調製カートリッジの使用及び操作を教示する説明書を更に含むことができる。

#### 【0380】

上記のキットの説明書には、典型的には取り扱い説明が記載された印刷物が含まれるが、かかるものに限定されない。かかる取り扱い説明を記録し、エンドユーザーにそれらを表示できるいかなる媒体も、本発明に含まれる。かかる媒体には、電子的記憶媒体(例えば磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ)、光学式媒体(例えばCD-ROM)等が含まれるが、これらに限定されない。かかる媒体には、かかる取り扱い説明を提供するためのインターネットサイトへのアドレスが含まれうる。

10

#### 【実施例】

#### 【0381】

以下の実施例において本発明を例示するが、特許請求された本発明を限定するものではない。

#### 【0382】

##### (実施例1)

##### カートリッジベースのイムノPCR

本実施例の1つの目的は、イムノ-PCR単独に、又は核酸増幅(例えばDNA又はRNAのqPCR)との組合せで、Cepheid社製のGENEXPERT(登録商標)カートリッジ又は同様のカートリッジの使用を広げることである。転写と翻訳のパターンが必ずしも正に相関しなかったため、核酸分析に加えてGENEXPERT(登録商標)カートリッジを使用したイムノPCRによるポリペプチドの検出を行う能力により、顕著な有用性がもたらされると考えられる。ポリペプチドのアッセイ、またその次の、例えば、対応する核酸のアッセイにサンプルを反射させること、又は、逆に、標的核酸のアッセイ、またその次の、例えば、対応するポリペプチドのアッセイにサンプルを反射させること、ができる能力は、目的の標的検体の検出可能性を増加させる。かかるシステムは、病原体(例えば細菌、ウイルス、原生動物病原体等)細菌毒素、環境汚染物質の検出及び/又は定量、薬剤耐性を示す細菌及び細胞(例えば癌細胞)の同定、プリオンに「感染」した動物、食品及び患者等の検出に非常に適する。

20

#### 【0383】

モデル系としてGENEXPERT(登録商標)カートリッジを用い、クロストリジウム-ディフィシル(*Clostridium difficile*)毒素BのイムノPCR検出を行った。本実施の1つの目的は、約60分未満の時間内における、約2.5~約1,000ng/mLの範囲の濃度のC.difficile毒素Bの検出、及び当該濃度範囲にわたる不正確性を約15%未満にすることである。

30

#### 【0384】

クロストリジウム・ディフィシルは、クロストリジウム・ディフィシル関連の下痢(CDAD)、抗生物質関連の下痢及び偽膜性腸炎(PMC)の原因である。これらの障害において、典型的に抗生物質使用の結果として、クロストリジウム・ディフィシルの大腸内での増殖が過剰となる。クリンダマイシン及び広宿主域セファロsporinは、CDAD及びPMCと最も関連性が高いことが知られているが、ほとんど全ての抗菌物質が原因となりうる。疾患は、毒素A及び/又はBの産生に関連する。その治療では、典型的には関連する抗菌物質の使用停止、並びに、症状が続く場合には活性メトロニダゾール、バンコマイシン又はフィダキノマイシンの経口投与及び経管内投与を行う。経口剤を投与できない場合、静脈内へのメトロニダゾールが使われうる。近年、CDADは高い罹病率及び死亡率を伴う重篤な形態が見られるが、これはクロストリジウム・ディフィシルの流行性毒素高産生株(NAP1株)によって生じることが知られている。単離された多くの毒素高産生株はまた、2つの毒素遺伝子を有し、またキノロンに対する耐性を有する。

40

#### 【0385】

伝統的に、診断は、1)臨床的及び疫学的特徴、2)培養(労働集約的で、時間がかかる)、3)細胞毒性アッセイ(労働集約的で、時間がかかる)及び4)トキシン検出イムノアッセイ(

50

感度が不十分)に依存するものであった。

【0386】

本明細書に記載されるカートリッジベースのイムノPCRは、無症候性コロニー形成の迅速検出、活性感染の確認を容易にし、特に、対応する核酸分析の反射を用いるとき、過剰診断を減らすことができる。

【0387】

便サンプル、固体、半固体又は液体を利用する。固体及び半固体サンプルの場合、無菌スワブ(例えばPur-Wraps(Puritan Medical社製))を使用して、試料でスワブを直径約3mmで等しく被覆する。液体糞便の試料の場合、スワブを少なくとも10秒間、試料中に入れるか、又は処理用のサンプルの約50~300 $\mu$ Lを使用する。サンプル付きのスワブ又は液体糞便サンプルを、サンプル抽出/希釈試薬(限定されないが、PBS(pH 7.5)中に、0.5%のマウス血清、0.1%のCHAPS、1mMのEDTA、防腐剤としての0.09%のアジ化ナトリウム又は0.02%のチメロサルを含有)100~1,000 $\mu$ Lに移す。希釈したサンプルを約10秒間十分にボルテックスする。サンプルは、最大5分間、1,000~5,000rpmで遠心分離して固体分を除去するか、又は、カートリッジのサンプル濾過用の漏斗に挿入された任意のプレフィルター又は繊維プラグを有するカートリッジのサンプルチャンバー(図5Bのチャンバー3)へ移すことができる。希釈したサンプルを2~8 $^{\circ}$ Cで約72時間保存するか、又は、より長い期間-20 $^{\circ}$ Cで保存する。C.diff.の毒素Bを含む試験サンプル。

10

【0388】

捕捉抗体(BBI溶液からのマウスモノクローナル抗毒素B抗体)を、アビジンコンジュゲートした粒子(各種実施形態として、ラテックス粒子(Spherotech社製)、シリカ粒子(Bangs Lab社製)、及び親水性疎水性磁性粒子(Dynal, ThermoFisher社製))に、NHS-PEG12-ビオチンを介するビオチン/アビジン相互作用(スペースアーム56 (ThermoFisher社)、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを用い、リジンを介する捕捉抗体とのコンジュゲート)を使用して付着させた。粒子は、約1 $\mu$ m~約2.9 $\mu$ mのサイズ範囲である。

20

【0389】

検出抗体(BBI溶液からのマウスモノクローナル抗毒素B抗体)を、抗体のリジンとNHSエステルとのコンジュゲートにより、C12リンカー(Innova Biosciencesキット)を介して、シグナルDNA(配列番号4、以下のTable 6(表6)参照)に付着させ、抗体との付着及びグリカン構造の末端シアリン酸の過ヨウ素酸酸化による反応性アルデヒドの形成、シグナルDNA鑄型の1 $^{\circ}$ アミンとの還元的アミノ化による安定なコンジュゲート(2 $^{\circ}$ アミン結合)の形成を行った。図示するイムノコンジュゲートは、このコンジュゲート型シグナルDNAを形成し、これを図9において略図で示す。

30

【0390】

PCR増幅及びシグナルDNAの検出に使用されるプライマー及びプローブを、以下のTable 6(表6)において示す。

【0391】

【表 6】

Table 6. *C.difficile* 毒素 B の検出に用いるプライマー、プローブ及びシグナル DNA

名称	配列	配列番号
フォワード及びリバース TAQMAN(登録商標)プライマー:		
im001FwdV5	5'-TGTGGTCTATGTCGTCGTT-3'	1
im001RevV4	5'-TAGGAATTCTACGCCTCGAG-3'	2
Taqman プローブ		
Im001CF4_Q38v4*	5'-(CF4-3)(CL4)CGC TAG TAG TTC CTG GGC TGC A(CDQ38)-3'	3
検出抗体にコンジュゲートするシグナル DNA 鋳型:**		
	5'-NH <sub>2</sub> -(C12 スペーサー)-TGT GGT CTA TGT CGT CGT TCG CTA GTA GTT CCT GGG CTG CAC TCG AGGCGTAGAATTCCTAC-FAM-3'	4
* CF4-3=フルオロフォア CF4-3、CDQ38=クエンチャー、及び CL4=炭素リンカー **3' FAM を使用して、抗 FITC アルカリ性ホスファターゼコンジュゲートを用いる従来の ELISA マイクロタイタープレートフォーマットのトラブルシューティングを可能にした。		

10

20

## 【 0 3 9 2 】

GENEXPERT(登録商標)カートリッジに用いられるPCRマスターミックスの組成は、50mMのKCL、6mMのMgCl<sub>2</sub>、200 μMのdNTPs、0.5U/ μLのPheonix Taq(Enzymatics社製)、0.25 μMのプライマー及びプローブ(Table 6(表6)に示す)、1Mのベタイン、10mMの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.2%のTween 20、0.2mg/mLのBSA及び25mMのHEPES(pH 8.2)とした。

## 【 0 3 9 3 】

1つの例示的实施形態において、GENEXPERT(登録商標)カートリッジをTable 7(表7)に示すように構成し、図6Aに示す。

30

## 【 0 3 9 4 】

## 【表7】

Table 7. バイオマーカー測定用の GENEXPERT(登録商標)カートリッジの使用のためのチャンバーの内容物を示す一例示的实施形態

チャンバー#	チャンバー内容物	初期体積 ( $\mu\text{L}$ )
1	洗浄チャンバー	0
2	IC 洗浄バッファー: PBS(pH 7.25)、 $100 \mu\text{g/mL}$ サケ精子 DNA、 $25 \mu\text{g/mL}$ ヤギ免疫グロブリン G、0.5%カゼイン、0.05% F68	1500
3*	サンプル受容チャンバー: ユーザーが添加した糞便サンプルの上清 (PBS(pH 7.5)、0.5%のマウス血清、0.1%の CHAPS、1mM の EDTA、0.09%の $\text{NaN}_3$ 中)	600
4	検出抗体-DNA コンジュゲート (PBS(pH 7.25)、1.0%のカゼイン、 $150 \mu\text{g/mL}$ サケ精子 DNA、 $50 \mu\text{g/mL}$ ヤギ免疫グロブリン G、0.1%の F68 中)。任意にビーズとして提供される。	50
5	洗浄バッファー: PBS(pH 7.25)、0.1%の Tween 20	1500
6	粒子-SA/Ne-ビオチン捕捉抗体 (PBS(pH 7.25)、1%のカゼイン、0.1%の F68)。任意に、ビーズ-ビーズとして提供される。	50
7	PCR マスターミックス、ビーズとして任意に提供されるプローブ/プライマー。	75
8	廃液受容チャンバー	0
9	サンプル溶出液チャンバー	0
10	50 mM Tris-HCL	200
11	65 mM KOH	100

\*ユーザーによりサンプルをチャンバー3 に添加。試験では糞便サンプルを使用して実施したが、他のサンプルを容易に利用することができる。

10

20

30

40

## 【0395】

ローディングの後、カートリッジを処理装置(例えば図8C参照)に配置された反応モジュール(例えば図8A参照)に設置し、イムノPCRの操作を行った。表に示すシグナルDNAシグナルDNA、プライマー及びプローブを使用したシグナルDNAの検出の際の熱サイクリングパラメーターを以下のTable 8(表8)に示す。

## 【0396】

50

【表 8】

Table 8.熱サイクリングパラメータ

サイクル	温度及び時間
1 サイクル	96°C、15 秒
40 サイクル	96°C、5 秒 66°C、6 秒 72°C、10 秒

10

## 【0397】

前述のカートリッジベースのイムノPCRは例示的なものであり、また非限定的である。更に考えられる他のパリエーションとしては、特にストレプトアビジン/ビオチンを経た連結の代わりに粒子に対する(例えば炭水化物、リジン又はシステインによる)捕捉抗体の共有結合、切断可能なリンカー(例えば塩基不安定リンカー、酸不安定リンカー、ジスルフィドリンカー及び制限酵素部位)による検出抗体のシグナルDNAへの結合、並びに各種のグリココンジュゲーション方法(例えばシスジオールの過ヨウ素酸ソーダ酸化(ガラクトース又はシアリン酸)、又は、1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ(Gal T)及び2,6-シアリルトランスフェラーゼ(Sial T)の混合物によるグリカン構造のリモデリング及びそれに続くコンジュゲーションのためのシアリン酸の穏やかな酸化、等が挙げられる。

20

## 【0398】

各種のブロッキング剤を用いて、例えば非特異的結合を防止又は低減することも検討中である。かかるブロッキング剤の例としては、限定されないが、各種ポリマー、又は界面活性剤、又は炭水化物(例えばPEG、プルロニックF68/F108/F127(好ましくはF68)、PVP、Biolipidure 802(NOF America社製)、Tween 20又は80、TEGME(トリ(エチレングリコール)モノエチルエーテル)、TEG(テトラエチレングリコール)等)、及び/又は各種タンパク質/界面活性剤/多糖(例えばカゼイン、BSA、ヤギ免疫グロブリンG、ウシ免疫グロブリンG、Stabilcoat(ThermoFisher社製)、イオタカラギーナン、デキストラン硫酸、マウス血清等)、ニシン又はサケ精子DNA等が挙げられる。

30

## 【0399】

また、抗体の直接のコンジュゲーションのための粒子の修飾が、レビュー中である。特定の実施形態において、かかる修飾は、例えば抗体を直接付着させるための、又はリンカー付着のための通常の官能性基(カルボキシレート、アルデヒド、ヒドラジド、アミド、アジド等)を利用する。特定の実施形態において、親水性スパーサーアームの使用も考えられる。かかるスパーサー/リンカーは、PEG等の部分、及び/又はホスホリルコリン親水性ペンダント基を含むポリマー等を含む。

40

## 【0400】

本明細書に記載される実施例及び実施形態は、例示のみを目的とするものであり、それを踏まえた各種の修飾又は変更は当業者に自明であり、またそれらも本願発明の趣旨及び本願に添付の特許請求項の範囲内に含まれる。本明細書において引用される全ての刊行物、特許及び特許出願は、全ての目的において、それらの全開示内容を参照により本明細書に組み込む。

## 【0401】

(実施例2)

カートリッジベースのイムノPCR: ヒトIL-8及びClostridium difficile毒素Bの検出

50

本試験は、カートリッジベースの免疫PCRを使用したヒトインターロイキン-8(IL-8)及びClostridium difficileの毒素Bの検出を例示し、このフォーマットを使用して得られた結果を、手動フォーマットを使用して得られたそれらと比較するものである。

#### 【0402】

##### 材料及び方法

##### 捕捉抗体のビオチン化

10倍過剰のEZ-LINK(商標)NHS-PEG12-ビオチン(Thermo Fisher社)により、DMSO中の修飾試薬の250mMのストック液を使用してマウス抗C.Difficile毒素B(BBI溶液)モノクローナル抗体(0.5mg、PBS(pH 7.2)、0.1%の $\text{NaN}_3$ )をビオチン化した。反応液を30分間室温でインキュベートした。反応混合液を脱塩し、ZEBA(商標)脱塩スピンカラム(MWCO 30kDa、Thermo Fisher社製)を使用してPBS(pH 7.4)及び0.09%の $\text{NaN}_3$ へとバッファー交換した。A280測定により定量を行い、更なる精製なしで使用した。マウスモノクローナル抗ヒトIL-8抗体(BD Biosciences社製)のビオチン化は、20倍過剰のビオチン化試薬により上記の通りに行い、VIVASPIN(登録商標)500(50kDaのMWCO(Sartorius社製))濃縮器を使用して脱塩し、バッファー交換及び濃縮を行った。

10

#### 【0403】

マウス抗C.Difficile毒素Bモノクローナル抗体はまた、粒子1mg当たり抗体20~30 $\mu\text{g}$ で、EDAC/Sulfo-NHSカップリングを介して、カルボキシル修飾ラテックス粒子(Thermo Fisher社製)に直接コンジュゲーションすることもできる。簡潔には、カルボキシレート粒子を、室温で40分間、Sulfo-NHSとカルボン酸エステルの20:1の比、及びEDACとカルボキシレートの2.5:1の比を有する活性化/カップリングバッファー(MESバッファー、pH 6.0)において活性化した。反応副産物を遠心分離により除去し、活性化粒子を活性化/カップリングバッファーで一度洗浄した。抗体のコンジュゲーションの際、粒子を活性化/カップリングバッファーで再懸濁し、4~6秒、10%振幅で超音波処理し、更に捕捉抗体を添加した。0.2~0.3mg/mLの抗体との抗体コンジュゲーションの間の最終的粒子濃度は2%(w/v)であった。コンジュゲーションを2~8 で一晩行った。エタノールアミン30 $\mu\text{L}$ により反応をクエンチし、PBS(pH 7.43)、0.1%のトリトンX-100により粒子を6回洗浄し、そのうち最初の2回の洗浄サイクルでは、20%振幅で2~3回の超音波処理した。粒子に共有結合した抗体の量を、Micro BCAアッセイ(Thermo Fisher社製)を使用して推定した。

20

#### 【0404】

##### 検出抗体とDNAとのコンジュゲーション

##### 抗ヒトIL-8検出抗体の調製

マウス抗ヒトIL-8モノクローナル抗体のDNAとのコンジュゲートは、利用できる抗体表面のリジンとのTHUNDER-LINK(登録商標) Oligoコンジュゲーションシステム(Innova Biosciences社製)を使用して行った。簡潔には、抗体100 $\mu\text{g}$ を室温で45分間、活性化試薬により活性化し、付属品の洗浄バッファーで平衡化したPD-10カラムを使用して脱塩した。

30

#### 【0405】

製造業者のプロトコルに従い、一級アミンで5'末端を、FAM(Integrated DNA Technologies社製、Table 9(表9))で3'末端を誘導体化し、DNA鋳型を活性化した。簡潔には、鋳型のストック液を、付属の洗浄バッファーで100 $\mu\text{M}$ に希釈し、活性化試薬に添加し、室温で35分間反応させた。洗浄バッファーで平衡化したPD-10カラムを使用し、混合液を脱塩した。

40

#### 【0406】

活性化抗体に3倍過剰の活性化鋳型を混合し、室温で1.5時間反応させ、抗体-DNAコンジュゲートを生成した。コンジュゲートClean Up試薬600 $\mu\text{L}$ を混合物に添加し、30分間氷上でインキュベートし、15,000 $\times\text{g}$ で5分間遠心分離し、コンジュゲートペレットを単離した。コンジュゲートをPBS(pH 7.2、0.09%の $\text{NaN}_3$ )で再懸濁した。Bradfordアッセイを使用して定量を行った。

#### 【0407】

##### 抗C.diff毒素B検出抗体の調製

50

マウス抗C.Diff毒素Bモノクローナル抗体とDNAとのコンジュゲートの形成は、抗体とDNA鋳型との間でビスアリアルヒドラゾン結合を形成させることによって行った。Im001\_NH2 DNA鋳型(Table 9(表9))を、1.7nmol/ODとなるよう修飾バッファー(0.1Mのリン酸バッファー、pH 8.0、0.15MのNaCl)で再懸濁した。DMF中のスクシンイミジル4-ホルミル安息香酸(SFB、TriLink Biotechnologies社製)を過剰にアミノ化鋳型に添加し、室温で2.5時間、600rpmで混合した。アルデヒド修飾鋳型を2回脱塩し、1,500×gで2分間、ZEBA(商標)スピンカラムを使用して、コンジュゲーションバッファー(0.1Mのリン酸塩、pH 6.0、0.15MのNaCl)へとバッファー交換した。

【0408】

抗体516 µgを、ZEBA(商標)スピンカラムを使用して修飾バッファーに交換し、280nmの吸光度測定の結果、2.5mg/mLの濃度であった。12当量のDMF中のスクシンイミジル4-ヒドラジノニコチン酸アセトンヒドラゾン(SANH、TriLink Biotechnologies社製)を抗体に添加し、室温で2.5時間、600rpmで混合した。ZEBA(商標)スピンカラムを用い、修飾抗体を脱塩して、コンジュゲーションバッファーに交換した。Bradfordアッセイを使用して修飾抗体の濃度を測定した。

10

【0409】

4 で一晩、ヒドラゾン修飾抗体と過剰量のアルデヒド修飾DNAテンプレートとを混合することにより、抗体-DNAコンジュゲートを形成させた。得られたコンジュゲートを、0.75 mL/分のPBS(pH 7.3)のアイソクラチック勾配にて、サイズ排除(Superdex 200 Increase 10/300、GE Healthcare社製)により精製した。抗体-DNAコンジュゲートを、50kDaのMWCOのVIVASPIN(登録商標)500遠心濃縮器を使用して濃縮した。MICRO BCA(商標)アッセイ(Thermo Fisher社製)を使用し、コンジュゲート濃度を3.5mg/mLと決定した。

20

【0410】

【表9】

Table 9. DNA 鋳型

名称	配列	配列番号
Im001_NH <sub>2</sub>	5'-NH <sub>2</sub> -C12- TGT GGT CTA TGT CGT CGT TCG CTA GTA GTT CCT GGG CTG CAC TCG AGG CGT AGA ATT CCT AC-3'	5
Im001_NH <sub>2</sub> _FAM	5'-NH <sub>2</sub> -C12- TGT GGT CTA TGT CGT CGT TCG CTA GTA GTT CCT GGG CTG CAC TCG AGG CGT AGA ATT CCT AC-FAM-3'	6

30

【0411】

フィルタープレートを使用した粒子ベースのイムノ-PCR(iPCR)アッセイ  
捕捉粒子の調製

40

ビオチン化抗体(4 µg/mL)を、アッセイ希釈液(PBS(pH 7.4)、1%のカゼイン及び1%のBSA)中、 $2 \times 10^9$  粒子/mLの濃度の1 µmのストレプトアビジンコートされたラテックスマイクロスフェア(Spherotech社製)に、室温で1時間混合しながら固定化した。抗体固定化ビーズ懸濁液を、1mLのPBST(PBS(pH 7.3)、0.1%のTween 20)又はPBS-TX(0.1%のトリトンX-100)で5回洗浄した。洗浄の間、粒子を9,000×gで4分間遠心分離して回収した。抗体固定化ビーズを、37 °C、600rpmで2時間混合しながら、STABILCOAT(登録商標)Plus Microarray Stabilizer(Surmodics社製)でブロッキングし、使用まで4 °Cで保存した。使用前に、粒子をPBS(pH 7.3)で1回洗浄し、アッセイ希釈液で約 $2.8 \times 10^9$  粒子/mLの実用濃度に調整した。

【0412】

50

## C.diff毒素B及びヒトIL-8のフィルタープレートアッセイ

1. アッセイ希釈液を使用して、C.Difficile毒素B(Enzo Life Sciences社製)の0~1,600ng/mLの範囲の10倍希釈系列を調製した。アッセイ希釈液を0ng/mLとして使用した。
2. アッセイ希釈液を使用して、ヒトIL-8(Perpotech社製)の0~10,000pg/mLの範囲の5倍希釈系列を調製した。アッセイ希釈液を0 pg/mLとして使用した。
3. 使用前に1時間、室温で、アッセイ希釈液150 µLを使用して、0.45 µmの孔サイズを有する96ウェルPCF(ポリカーボネート)フィルタープレート(Millipore Sigma社製)を予め湿らせ、表面をブロッキングした。MULTISCREEN(商標)Vacuum Manifold(Millipore Sigma社製)を使用して、7''Hgの真空による真空濾過を行い、希釈液を除去した。

## 4. 毒素Bアッセイ

- a. 75 µLのアッセイ希釈液を全てのウェルに添加した。
- b. 実用濃度(約 $2.8 \times 10^9$ 粒子/mL)の粒子25 µLを全てのウェルに添加した。
- c. 各連続希釈された毒素Bを25 µL、適切なウェルに添加した。アッセイ希釈液を0対照として使用した。アッセイを2回実施した。
- d. プレートを密封し、650rpmで5分間振とう機で振とうした。反応液を6~7''Hgで濾過した。
- e. 反応液をPBST 200 µLで10回洗浄した。
- f. 抗C.Diff毒素B抗体-DNAコンジュゲート(0.5 µg/mL)100 µLを全てのウェルに添加した。
- g. プレートを密封し、650rpmで5分間振とう機で振とうした。反応液を6~7''Hgで濾過した。
- h. 反応液をPBST 200 µLで10回洗浄した。
- i. 65 µLの25mMのKOHを各ウェルに添加し、プレートを密封し、650rpmで5分間振とう機で振とうした。
- j. 70 µLの50mMのトリス-Cl(pH 7.0)を各ウェルに添加し、6~7''Hgの真空によりソリッドボトム96ウェルプレートに溶出液を回収した。

## 5. IL-8アッセイ

- a. 50 µLのアッセイ希釈液を全てのウェルに添加した。
- b. 実用濃度(約 $2.8 \times 10^9$ 粒子/mL)の粒子25 µLを全てのウェルに添加した。
- c. 各連続希釈された毒素Bを25 µL、適切なウェルに添加した。アッセイ希釈液を0対照として使用した。アッセイを2回実施した。
- d. プレートを密封し、650rpmで10分間振とう機で振とうした。反応液を6~7''Hgで濾過した。
- e. 反応液をPBST 250 µLで5回洗浄した。
- f. 抗ヒトIL-8抗体-DNAコンジュゲート(30ng/mL)100 µLを全てのウェルに添加した。
- g. プレートを密封し、650rpmで10分間振とう機で振とうした。反応液を6~7''Hgで濾過した。
- h. 反応液をPBST 225 µLで9回洗浄した。
- i. 65 µLの25mMのKOHを各ウェルに添加し、プレートを密封し、650rpmで5分間振とう機で振とうした。
- j. 70 µLの50mMのトリス-Cl(pH 7.0)を各ウェルに添加し、6~7''Hgの真空によりソリッドボトム96ウェルプレートに溶出液を回収した。

## 6. PCRによる検出

- a. アッセイ溶出液2 µLを96ウェルPCRプレートに添加した。次に、0.2mg/mLのBSA、0.2%のTween 20、0.4mMのマグネシウム(全2.4mMの $Mg^{2+}$ )、200 µMのdNTP、0.5 µMのFwdプライマー、1.0 µMのRevプライマー及び0.35 µMのプロープ(Table 2(表2))を補充した1x GCバッファ中のPheonix Hot Start Taqポリメラーゼ(Enzymatics社)2ユニットを含むPCRマスター混合物18 µLを添加した。
- b. Table 10(表10)に列挙されるプロトコルに従い、二段階PCRを行った。

【 0 4 1 3 】

10

20

30

40

50

【表 10】

Table 10. PCR プライマー、プローブ及び PCR プロトコル

名称	配列	配列番号
Fwd プライマー	5'-GGTCTATGTCGTCGTTTCG-3'	7
Rev プライマー	5'-AGGAATTCTACGCCTCGA-3'	8
プローブ	CF4-3-(CL4)CTAGTAGTTCCTGGGCTGCAC-CDQ38	9
PCR プロトコル	95°Cで30秒、95°Cで10秒及び64°Cで35秒の35サイクル	

10

## 【0414】

GeneXpertカートリッジを使用した自動イムノPCRアッセイ:

図11は、自動アッセイプロセスの概要を表す。図12は、カートリッジチャンバー(CH)の割り当て、試薬及び初期体積を示す。ガラス繊維フィルターを備え、0.7µmの孔サイズを有するカートリッジA<sup>+</sup>に、アッセイ用試薬を分配した。

20

## 【0415】

## 1. 自動毒素Bアッセイ

## カートリッジのプライミング

- a. 500 µLのPBST(CH2)を用いて、直接フィルター流路を満たし、CH8に送達させた。

## 毒素Bの捕捉

- b. C.Diff毒素Bの標準25 µLをCH3から吸引し、CH4内の捕捉粒子に送達する。  
 c. CH3において、5分間、サンプルを142秒で2回混合しながら、捕捉粒子とインキュベートする。  
 d. 粒子に固定された毒素Bをフィルターに移動させるため、125 µLのCH3内容物を、CH3からフィルター流路を通じてCH8に移動させる。  
 e. CH2からCH3までPBSTを200 µL移動させてCH3を洗浄し、次にCH3内容物を、フィルター流路を通じてCH8へ移動させる。  
 f. CH2からフィルター流路を通じてCH8までPBSTを移動させることにより、粒子に固定化された毒素BをPBSTの250 µLアリコートで10回洗浄する。

30

## 毒素Bの検出

- g. 検出において、アッセイ希釈液(CH1)75 µLをフィルター流路を通じて吸引し、CH10へ送達し、毒素Bを担持させた粒子を、抗C.Diff毒素B-DNAコンジュゲートへと移動させる。  
 h. CH10において、5分間、サンプルを142秒で2回混合しながら、粒子とインキュベートする。  
 i. 固定された免疫複合体をフィルターに移動させるため、100 µLのCH10内容物を、CH10からフィルター流路を通じてCH8に移動させる。  
 j. CH5からCH10までPBSTを200 µL移動させてCH10を洗浄し、次にCH10内容物を、フィルター流路を通じてCH8へ移動させる。  
 k. CH5からフィルター流路を通じてCH8までPBSTを移動させることにより、固定化された免疫複合体をPBSTの250 µLアリコートで10回洗浄する。

40

## 免疫複合体の破壊及び中和

- l. KOHの65 µLをCH11から吸引し、免疫複合体を固定化した粒子を含むフィルターを通じてCH9に分配し、2回混合する。  
 m. シリンジに、KOHの15 µLをCH9から吸引し、シリンジ15 µL、フィルター領域40 µL

50

及びCH9 10 µLのように3つの空間での液体含量のバランスを維持する。

n. フィルター領域において、免疫複合体を担持する粒子を、15秒、40%振幅で超音波処理し、混合し、更に60秒待機する工程に供する。プロセスをもう1度繰り返し、KOHへの免疫複合体の曝露時間を計2分間とする。(注:溶出は超音波処理の有無にかかわらず2~5分間実施できる)

o. トリスCl 70 µLを、CH6からフィルター流路を通じてCH9まで移動させ、溶出したDNA鋳型を中和した。

PCRの調製及び検出

p. 8 µLのサンプルをCH9からCH7まで移動させ、PCRマスターミックスと一回混合させる。CH7は、0.2mg/mLのBSA、0.2%のTween 20、0.4mMのマグネシウム(全2.4mMのMg<sup>2+</sup>)、200 µMのdNTP、0.5 µMのFwdプライマー、1.0 µMのRevプライマー及び0.35 µMのプロープ(Table 2(表2))を補充した1x GCバッファー中のPheonix Hot Start Taqポリメラーゼ(Enzymatics社)6.4ユニットを含むPCRマスター混合物72 µLを含む。

q. PCR混合物70 µLをPCR反応チューブに吸引する。

r. Table 10(表10)に記載されるプロトコルに従い、PCRを行う。Taqmanプロープを調製するため、専用のフルオロフォア及びクエンチャーを使用する。プロープの加水分解から発生する放出シグナルは、620~645nmの間で検出される。

【0416】

結果

ヒトIL-8のiPCR投与量反応性は、組換えサイトカインの5倍希釈系列(10,000~0.64pg/mL)と、2回の測定とを組み合わせることにより確立した。結果を図13に示す。ダイナミックレンジ(80~10,000pg/mL)及び検出限界(80pg/mL)は、粒子表面と抗ヒトIL8-DNA検出コンジュゲートとの非特異的相互作用により制限される。内部アッセイ精度CVは4%であり、投与量3.2~10,000pg/mLの範囲で許容できる能力を表すものである。アッセイの高い不正確性(%CV>10)は、低濃度及び濃度ゼロの投与量、0.64pg/mL及び0pg/mLで生じる(Table 11(表11))。

【0417】

【表11】

Table 11. ヒトIL-8の平均Ct及びアッセイの不正確性

[IL-8](pg/mL)	Ave, Ct	SD	%CV
0	21.4	2.79	13.1
1	22.1	2.27	10.3
3.2	22.3	0.59	2.6
16	21.1	0.50	2.4
80	19.7	0.10	0.5
400	17.6	0.16	0.9
2,000	15.2	0.60	4.0
10,000	14.3	0.53	3.7

【0418】

C.Diff毒素BのiPCRによる手動フィルタープレートアッセイは、0.16ng/mLの検出限界にて、1,600~0.0016ng/mLの10倍希釈系列において、4%の内部アッセイCVを示した(図14及びTable 12(表12))。比較として、GENEXPERT(登録商標)カートリッジを使用するアッセイの自動化では、アッセイ範囲にわたり高い不正確性(最大14%のCV)を示した(Table 4(表4))。検出限界は、反復する不正確性のため1,000倍低下した。自動カートリッジ流体プロトコルに対する更なる改善が、アッセイの不正確性を低下させ、アッセイ感度を上昇させると予想される。

10

20

30

40

50

【 0 4 1 9 】

【 表 1 2 】

Table 12. *C.difficile* 毒素 B の平均 Ct 及びアッセイの不正確性

[毒素 B] (ng/ml)	手動			自動		
	Ave. Ct	SD	%Cv	Ave. Ct	SD	%Cv
0	24.9	0.24	1.0	24	3.2	12.4
0.0016	24.9	0.25	1.0	N/A	N/A	N/A
0.016	24.7	0.63	2.5	23.7	2.1	8.9
0.16	24.0	0.14	0.6	22.1	1.1	5.0
1.6	21.5	0.06	0.3	19.8	2.7	13.6
16	18.3	0.22	1.2	19.3	1.4	7.3
160	15.6	0.61	3.9	14.8	1.2	0.6
1600	13.2	0.28	2.1	13.4	1.4	1.5

10

【 0 4 2 0 】

*C.Difficile*毒素BのイムノPCRアッセイを、自動アッセイとフィルタープレートアッセイとで性能を比較するため、毒素Bをアッセイ希釈液(PBS、1%のBSA、0.05%のNaN<sub>3</sub>、pH 7.4)に添加し、10倍連続希釈し、各フォーマットでアッセイを行ったところ、いずれも結果が出るまで1時間を要した。両方のフォーマット共に、希釈範囲全体にわたり<10%の%CVとなった(Table 13(表13))。

20

【 0 4 2 1 】

【 表 1 3 】

Table 13. *C.difficile* 毒素 B の、自動及び手動アッセイにおける不正確性

[毒素 B] (ng/ml)	手動		自動	
	Ave. Ct	%CV	Ave. Ct	%CV
0	29.7±1.1	3.8	22.1±1.2	5.5
0.0025	28.3±1.6	5.7	N/A	
0.025	28.3±0.81	2.8	21.1±1.6	7.6
0.25	27.0±0.41	1.5	23.2±0.57	2.4
2.5	22.9±0.07	0.3	21.9±0.31	1.4
25	18.4±0.47	2.5	18.8±0.40	2.1
250	15.6±0.12	0.8	16.7±0.26	1.6
2500	15.0±0.18	1.2	15.7±0.21	1.4

30

40

【 0 4 2 2 】

4パラメーターロジスティックフィットを用いて用量反応曲線を作成し、その際、プロットされた濃度の逆推定を用いて、上限値の定量(ULOQ)及び下限値の定量(LLOQ)を算出した。標準偏差の3倍を、それぞれ95%の信頼水準を使用したLLOQ又はULOQ算出における平均Ct値に減算又は加算した。図15は、2つの方法における、フィットさせた用量反応曲線を表す。手動プロセスと比較し、自動プロセスではLODの65倍の低下が見られたが、自動プロセスにおけるLLOQ(32.5ng/mL)は未だ臨床的に適切であり、*C.Difficile*感染患者の治療法選択をサポートするのに十分である。

50

【 図 1 】

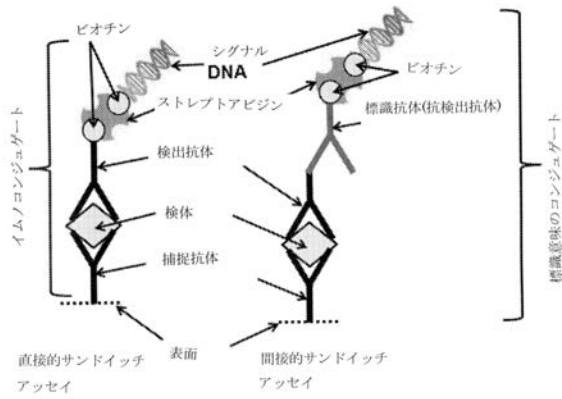


Fig. 1

【 図 2 】

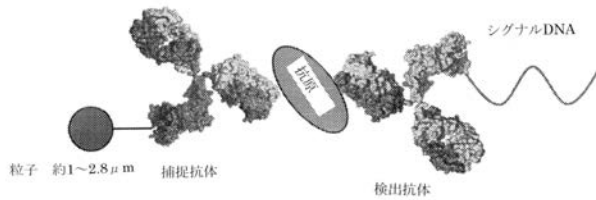


Fig. 2

【 図 3 】

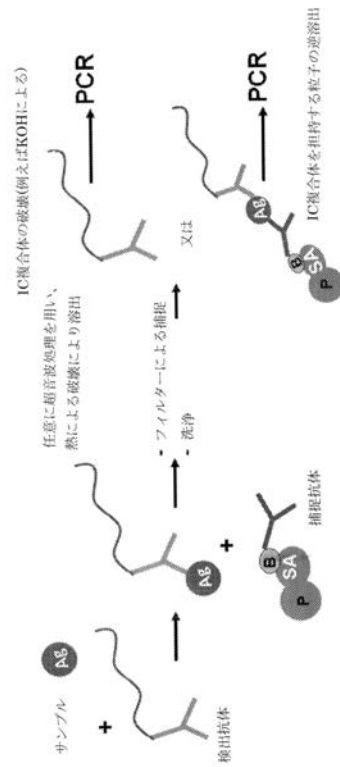


Fig. 3

【 図 4 】

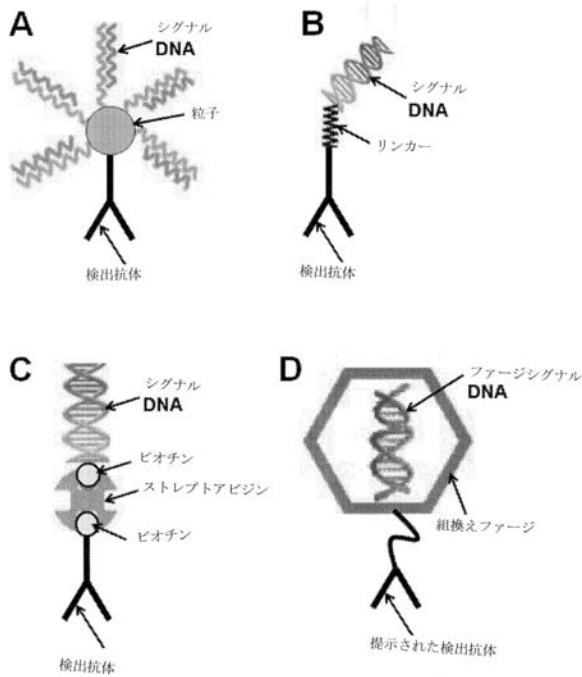


Fig. 4

【 図 5 A 】

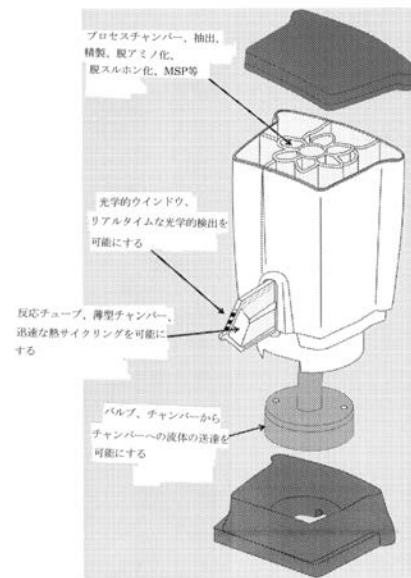


Fig. 5A

【 図 5 B 】

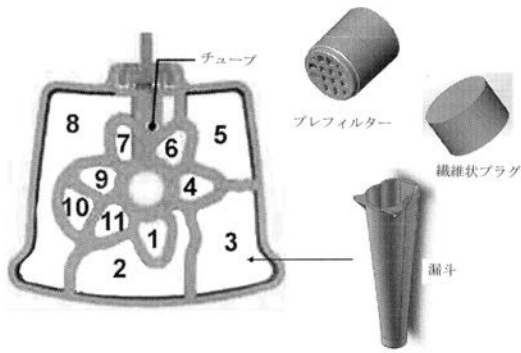


Fig. 5B

【 図 6 A 】

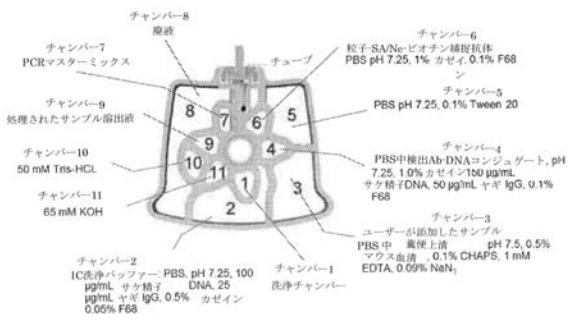


Fig. 6A

【 図 6 B 】

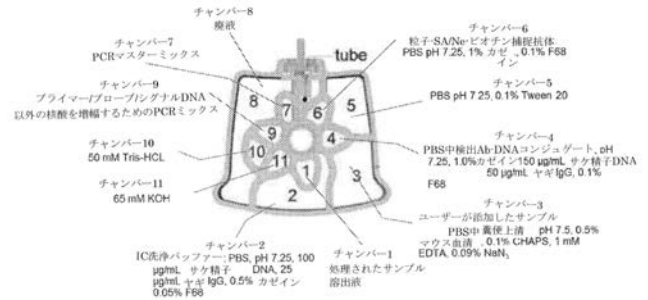


Fig. 6B

【 図 7 】

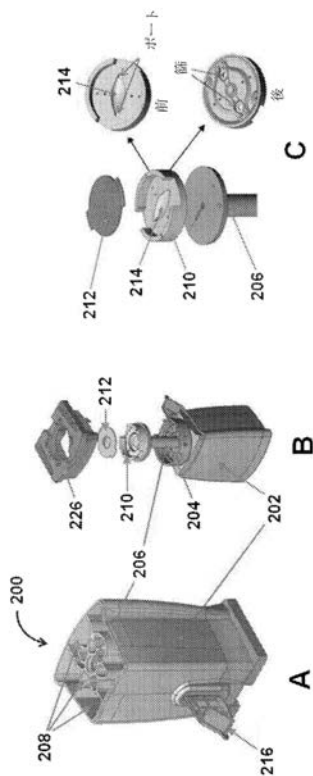


Fig. 7

【 図 8 A 】

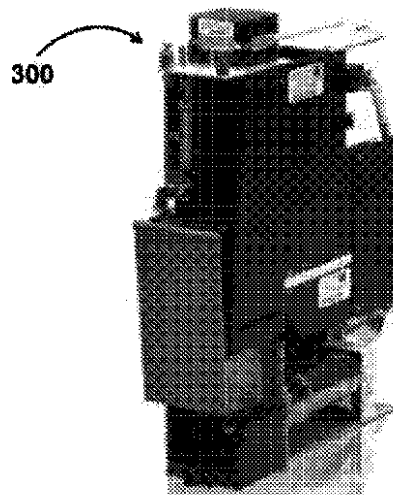


Fig. 8A

【 図 8 B 】

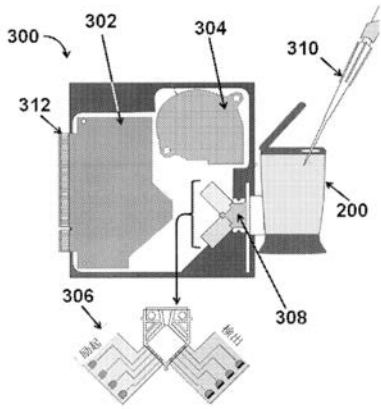


Fig. 8B

【 図 8 C 】

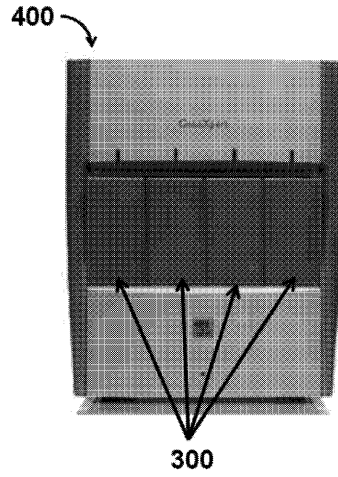


Fig. 8C

【 図 9 】

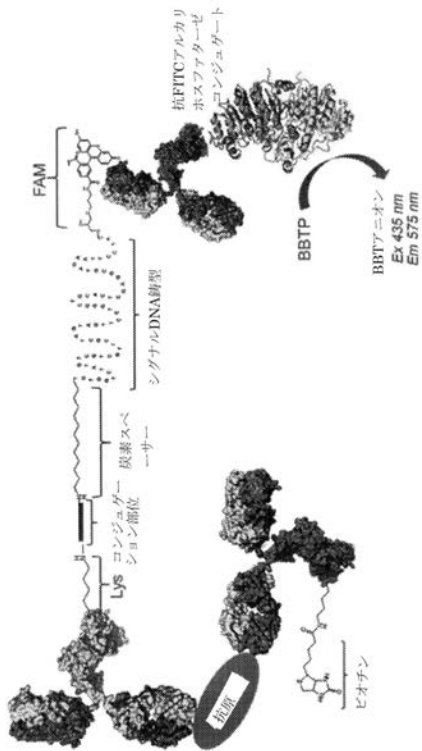


Fig. 9

【 図 10 】



Fig. 10A

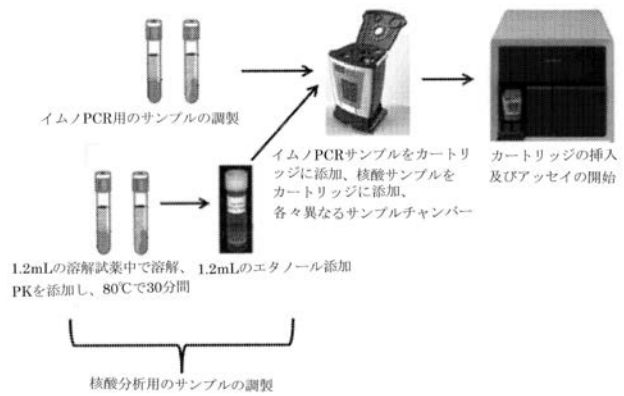


Fig. 10B

【 図 1 1 】

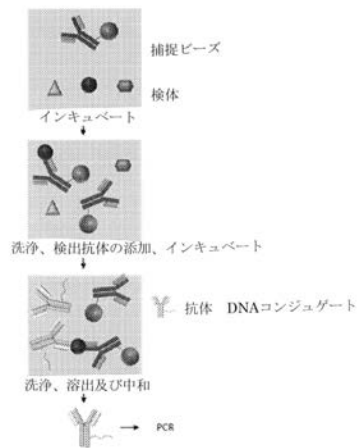


Fig. 11

【 図 1 2 】



Fig. 12

【 図 1 3 】

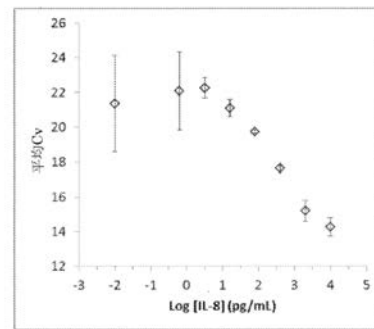


Fig. 13

【 図 1 4 】

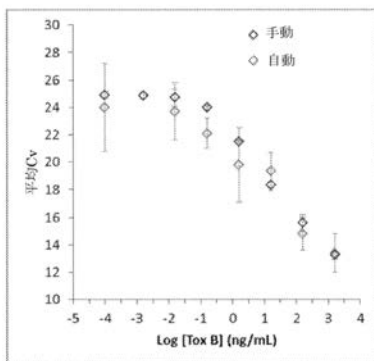


Fig. 14

【 図 1 5 】

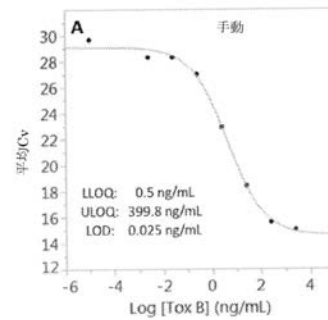


Fig. 15A

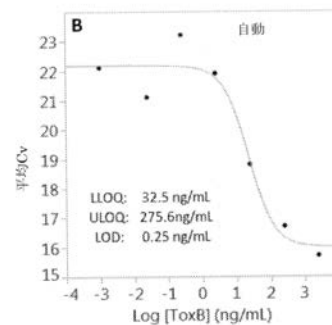


Fig. 15B

【配列表】

2020503857000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/065653
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12Q1/6804 G01N33/53 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) C12Q		
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, BIOSIS, EMBASE, 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.
X	WO 2006/121997 A2 (IDAHO TECHNOLOGY INC [US]; RIRIE KRIK M [US]; RASMUSSEN RANDY P [US];) 16 November 2006 (2006-11-16) figures 1,11-13 examples 2-4	1-27
X	JP 2012 255664 A (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORP) 27 December 2012 (2012-12-27) the whole document	1-6, 12-16, 25-27
A	CN 102 994 638 A (SHENZHEN DAKWE BIOENGINEERING CO LTD) 27 March 2013 (2013-03-27) the whole document	1-27
	----- -/--	
<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		Date of mailing of the international search report
14 March 2018		21/03/2018
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  Covone-van Hees, M

2

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/US2017/065653

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/175856 A1 (MESO SCALE TECHNOLOGIES LLC [US]) 19 November 2015 (2015-11-19) figures	1-27
	-----	
A	WO 2008/012550 A2 (DIAGNOSTICS FOR THE REAL WORLD [US]; LEE HELEN HWAI-AN [GB]; DINEVA MA) 31 January 2008 (2008-01-31) figure 1	1-27
	-----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/065653

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006121997 A2	16-11-2006	AU 2006244187 A1	16-11-2006
		CA 2607661 A1	16-11-2006
		CA 2970005 A1	16-11-2006
		EP 1920070 A2	14-05-2008
		JP 5432522 B2	05-03-2014
		JP 2008539757 A	20-11-2008
		US 2010105029 A1	29-04-2010
		US 2013157349 A1	20-06-2013
		US 2015099291 A1	09-04-2015
		WO 2006121997 A2	16-11-2006
JP 2012255664 A	27-12-2012	JP 5852334 B2	03-02-2016
		JP 2012255664 A	27-12-2012
CN 102994638 A	27-03-2013	CN 102994638 A	27-03-2013
		HK 1183064 A1	08-08-2014
WO 2015175856 A1	19-11-2015	AU 2015259048 A1	01-12-2016
		CA 2948547 A1	19-11-2015
		CN 106796218 A	31-05-2017
		EP 3143401 A1	22-03-2017
		JP 2017521644 A	03-08-2017
		KR 20170036659 A	03-04-2017
		US 2017089892 A1	30-03-2017
		WO 2015175856 A1	19-11-2015
WO 2008012550 A2	31-01-2008	EP 2049261 A2	22-04-2009
		US 2010028204 A1	04-02-2010
		US 2018036726 A1	08-02-2018
		WO 2008012550 A2	31-01-2008

## フロントページの続き

(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, JO, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. ブルロニック
2. T W E E N

(72)発明者 ダニエル・クレメンス

アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 4 0 8 9 ・サニーベール・カリピアン・ドライブ・9 0 4  
Fターム(参考) 4B029 AA23 BB02 CC01 FA15 GB10  
4B063 QA01 QQ06 QQ42 QQ52 QR32 QR48 QR62 QS25 QS35 QX02

## 【要約の続き】

プローブを含むチャンバーを備える。

专利名称(译)	自动反应盒中的集成免疫pcr和核酸分析		
公开(公告)号	<a href="#">JP2020503857A</a>	公开(公告)日	2020-02-06
申请号	JP2019531192	申请日	2017-12-11
[标]申请(专利权)人(译)	塞弗德公司		
申请(专利权)人(译)	造父		
[标]发明人	ダニエルクレメンス		
发明人	カーラ・マリア・マクダウエル・ブキャナン ダニエル・クレメンス		
IPC分类号	C12M1/00 G01N33/53 C12Q1/6855 C12Q1/686 C12N15/09		
CPC分类号	B01L3/502715 B01L3/502761 B01L7/52 B01L2200/028 B01L2200/0621 B01L2200/0647 B01L2200/16 B01L2300/0681 B01L2300/0819 C12Q1/6804 G01N33/54313 C12Q2531/113 C12Q2563/179 C12Q2565/629 C07K16/12 C12Q1/686 C12Q1/6883 C12Q2600/112 C12Q2600/16 G01N33/54366 G01N33/57488 G01N2800/00		
FI分类号	C12M1/00.ZNA.A G01N33/53.M C12Q1/6855.Z C12Q1/686.Z C12N15/09.Z		
F-TERM分类号	4B029/AA23 4B029/BB02 4B029/CC01 4B029/FA15 4B029/GB10 4B063/QA01 4B063/QQ06 4B063 /QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS35 4B063/QX02		
代理人(译)	村山彦 安倍晋三龙彦		
优先权	62/433155 2016-12-12 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

在各种实施方案中，提供了使用免疫PCR和任选地扩增核酸检测和/或定量靶分析物的方法。在某些实施方案中，该方法利用药筒进行免疫PCR，检测和/或定量一种或多种靶分析物，以及任选地检测和/或定量核酸，所述盒包括样品接收室，包含用作过滤器和/或DNA结合剂的基质材料的室，温度控制的通道或室，以及用于进行免疫PCR的多种试剂和/或缓冲剂。包含与要检测的分析物结合的捕获抗体的腔室，多个腔室包含检测抗体的腔室，并且检测抗体直接或间接发出信号 可选地连接到DNA，多个小室，多个小室包含PCR主混合物 杆设置有含有引物用于扩增全部或信号的DNA区域的腔室，所述多个室包括含有一个探针，用于检测所有或信号DNA区域的腔室。

Fig. 3

