

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-501704

(P2017-501704A)

(43) 公表日 平成29年1月19日(2017.1.19)

(51) Int. Cl.			F I			テーマコード (参考)		
C 1 2 N	11/04	(2006.01)	C 1 2 N	11/04		4 B 0 2 9		
C 1 2 N	9/96	(2006.01)	C 1 2 N	9/96		4 B 0 3 3		
G O 1 N	33/531	(2006.01)	G O 1 N	33/531	Z	4 B 0 5 0		
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/00	A			

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2016-540631 (P2016-540631)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月5日 (2014.12.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年8月9日 (2016.8.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/076725
 (87) 国際公開番号 W02015/096967
 (87) 国際公開日 平成27年7月2日 (2015.7.2)
 (31) 優先権主張番号 14/140, 127
 (32) 優先日 平成25年12月24日 (2013.12.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 390041542
 ゼネラル・エレクトリック・カンパニイ
 アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 2 3
 4 5、スケネクタダイ、リバーロード、1
 番
 (74) 代理人 100137545
 弁理士 荒川 聡志
 (74) 代理人 100105588
 弁理士 小倉 博
 (74) 代理人 100129779
 弁理士 黒川 俊久
 (74) 代理人 100113974
 弁理士 田中 拓人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質の安定化及び保存のための静電紡糸繊維

(57) 【要約】

関心下の試薬の可溶調合物をナノスケール繊維媒体内に作製する静電紡糸のアプローチを開示する。一実施形態では、ナノスケール繊維は、室温で長期間にわたって保存するため等、関心下の生物学的薬剤の組み込み及び安定化を行うことができる。一実施例において、繊維は連続的に製造され、急速に溶解する。

【選択図】 図 1

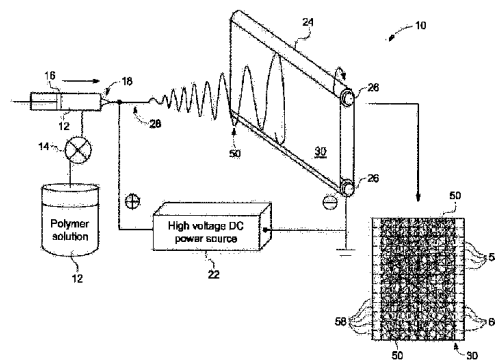


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 以上の繊維を含む生化学的保存媒体であって、1 以上の繊維がナノスケール乃至マイクロスケールの直径を有し、1 種以上の生物活性成分を含んでいる、生化学的保存媒体。

【請求項 2】

1 以上の繊維が堆積する支持層をさらに備える、請求項 1 に記載の生化学的保存媒体。

【請求項 3】

支持層は、疎水性材料、親水性材料、硝酸セルロース膜、セルロース膜、酢酸セルロース膜、再生セルロース膜、硝酸セルロース混合エステル膜、ポリエーテルスルホン膜、ナイロン膜、ポリオレフィン膜、ポリエステル膜、ポリカーボネート膜、ポリプロピレン膜、二フッ化ポリビニリデン膜、ポリエチレン膜、ポリスチレン膜、ポリウレタン膜、ポリフェニレンオキシド膜、四フッ化エチレン・六フッ化プロピレン共重合体膜、ガラス繊維基板の 1 以上又は上記の膜もしくは基板の 2 以上の組合せを含む、請求項 2 に記載の生化学的保存媒体。

10

【請求項 4】

1 以上の繊維が約 10 nm ~ 2000 nm の直径を有する、請求項 1 に記載の生化学的保存媒体。

【請求項 5】

1 以上の繊維が水溶液に可溶である、請求項 1 に記載の生化学的保存媒体。

【請求項 6】

1 種以上の生物活性成分が 1 種以上のタンパク質を含む、請求項 1 に記載の生化学的保存媒体。

20

【請求項 7】

1 種以上のタンパク質が酵素又は抗体を含み、酵素又は抗体は 1 以上の繊維が溶解しても生物活性を維持する、請求項 6 に記載の生化学的保存媒体。

【請求項 8】

繊維は炭水化物、安定化因子又はヌクレオチドの 1 つ以上を含む、請求項 1 に記載の生化学的保存媒体。

【請求項 9】

炭水化物はポリスクロース、メレジトース、スクロース、トレハロース又はソルビトールの 1 つ以上を含む、請求項 8 に記載の生化学的保存媒体。

30

【請求項 10】

安定化因子は、アルブミン、ポリエチレングリコール又はポリビニルアルコールの 1 つ以上を含む、請求項 8 に記載の生化学的保存媒体。

【請求項 11】

1 種以上の生物活性成分は、不安定な小分子、dNTP 類、rNTP 類、洗剤、塩、2 価カチオン、緩衝分子、プライマ、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD)、色素結合エステル又は標識分子の 1 つ以上を含む、請求項 1 に記載の生化学的保存媒体。

【請求項 12】

1 以上の繊維は室温で 1 週間以上安定である、請求項 1 に記載の生化学的保存媒体。

40

【請求項 13】

繊維は、事前に設定される反応に用いるのに適した、所定量の 1 種以上の生物活性成分に対応する、請求項 1 に記載の生化学的保存媒体。

【請求項 14】

生物活性組成物を安定化させる方法であって、
1 種以上の生体分子を含む溶液を押出部品に供給する工程と、
溶液を押出部品から排出する工程と、
排出した溶液に静電荷を印加しながら、コレクタ表面に逆の電荷を印加する工程と、
排出して帯電した溶液から形成される 1 以上の繊維を、コレクタ表面上に非バッチプロセ

50

スで捕集する工程であって、繊維がナノメートル乃至マイクロメートルで測定される直径を有する、工程とを含む方法。

【請求項 15】

溶液は水溶液である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

コレクタ表面は基板を含み、基板は、疎水性材料、親水性材料、硝酸セルロース膜、セルロース膜、酢酸セルロース膜、再生セルロース膜、硝酸セルロース混合エステル膜、ポリエーテルスルホン膜、ナイロン膜、ポリオレフィン膜、ポリエステル膜、ポリカーボネート膜、ポリプロピレン膜、ニフッ化ポリビニリデン膜、ポリエチレン膜、ポリスチレン膜、ポリウレタン膜、ポリフェニレンオキシド膜、四フッ化エチレン・六フッ化プロピレン共重合体膜、ガラス繊維基板の 1 以上又は上記の膜もしくは基板の 2 以上の組合せを含む、請求項 14 に記載の方法。

10

【請求項 17】

捕集される繊維を有する基板のより小さい小片を形成するために、捕集される繊維が基板上に堆積した状態で基板を加工する工程を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

基板の小片を後の利用のために室温で保管する工程を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

1 以上の繊維が連続処理で捕集される、請求項 15 に記載の方法。

20

【請求項 20】

安定化された生化学活性成分を使用する方法であって、所定量の静電紡糸繊維を選択する工程であって、静電紡糸繊維は約 10 nm ~ 約 2000 nm の直径を有し、繊維は安定化された生物活性成分を含む、工程と、繊維を水性環境に添加する工程であって、繊維は水性環境に溶解して水溶液を形成する、工程と、安定化された生物活性成分が関与する生化学反応に水溶液を使用する工程とを含む、方法。

【請求項 21】

安定化された生化学活性成分はポリメラーゼであり、生物学的反応は核酸増幅反応である、請求項 20 に記載の方法。

30

【請求項 22】

安定化された生物活性成分は抗体であり、生化学反応が免疫学的反応である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

繊維に被覆される紙基材を使用前に室温で 1 週間以上保存する工程を含む、請求項 20 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書中に開示される内容は、概して生物学的及び化学的処理に用いられる材料及び試薬の保存に関する。

40

【背景技術】

【0002】

生物活性物質は、実験や分析に関わる多様な局面で用いられうる。しかし、一般に、保存特性を改善するように処理もしくは調製しないかぎり、かかる生物活性物質は保管寿命が比較的短いことがある。

【0003】

例えば、生物試薬の安定化と保存についてはさまざまなアプローチが知られている。かかるアプローチのひとつに、タンパク質を液体状態にして低温（例えば -20 ~ 8）

50

で保存するというものがある。例えば、一部の生物試薬は、4℃又は-20℃もの低温に維持された50%グリセリン溶液内に保存しうる。或いは、一部の生物試薬は、-20℃以下等の温度で冷凍して保存されうる。明らかに、いずれの保存法も、試薬の生物活性を長期にわたって維持するために冷却処理を必要とする。

【0004】

このほか、生物試薬は凍結乾燥形態で保存しうる。この場合、試薬を高真空中で凍結させることによって乾燥させる。かかる凍結乾燥状態の試薬は、低温又は室温で保存しうる。しかし、凍結乾燥物の作製に用いるプロセスは、複雑かつ時間のかかるものでありうる。特に、生体酵素混合物を凍結乾燥した固形物、薄膜、ビーズ又は球体の製造に用いられるかかるプロセスの一部はバッチプロセスでありえ、生成物を連続的に製造することができない。方法によっては冷凍溶液の脱水を行うものがあり、その場合、複雑なフリーズドライ法が必要になる。さらに、かかる手法では、ビーズ径等、所望の製作公差を実現もしくは維持することが困難でありうる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】米国特許出願公開第2012/160255号明細書

【発明の概要】

【0006】

一実施形態では生化学的保存媒体が開示される。生化学的保存媒体は1以上の繊維を含む。この1以上の繊維はナノスケール乃至マイクロスケールの直径を有し、1種以上の生物活性成分を含む。

【0007】

さらなる実施形態では、生物活性組成物を安定化させる方法が開示される。この方法は、1種以上の生体分子を含む溶液を押し出部に供給する作用を含む。この溶液は押し出部から排出される。排出した溶液に静電荷を印加しながら、コレクタ表面に逆の電荷を印加する。排出して帯電させた溶液から形成される1以上の繊維をコレクタ表面上に捕集する。この方法は非バッチプロセスとすることができる。繊維は、ナノメートル乃至マイクロメートルで測定される直径を有する。

【0008】

追加的な実施形態では、安定化された生物活性成分を使用する方法が開示される。この方法は、所定量の静電紡糸繊維を選択する作用を含む。静電紡糸繊維は、約10nm~約2000nmの直径を有する。この繊維は、安定化された生物活性成分を含有する。この繊維は、表面積対体積の比が非常に大きい。この繊維は水性環境に添加される。この繊維は水性環境に溶解して水溶液を形成する。この水溶液は、安定化された生物活性成分が関与する生物学的反応において使用される。

【0009】

本発明のこれら及び他の特徴、態様及び効果は、添付の図面を参照しながら以下の詳細な説明を読むことによってさらによく理解されるだろう。図中、同じ参照符号は同じ要素を表す。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】本開示の諸態様に関わる、生体材料を用いた安定化繊維の作製に好適な静電紡糸（エレクトロスピンニング）システムの一例を示す図である。

【図2】図1のシステム向けの第1のパラメータ群のもとで70% Ficoll（登録商標）PM400の水溶液を用いて作製した安定化繊維の走査型電子顕微鏡写真である。

【図3】図1のシステム向けの第2のパラメータ群のもとで70% Ficoll（登録商標）PM400の水溶液を用いて作製したナノスケール繊維の走査型電子顕微鏡写真である。

【図4】図1のシステム向けの第3のパラメータ群のもとで70% Ficoll（登録商

10

20

30

40

50

標) PM400の水溶液を用いて作製したナノスケール繊維の走査型電子顕微鏡写真である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本開示のアプローチは、関心下の生物試薬（並びに添加される組成物もしくは防腐剤がある場合はそれらも）を含有するナノスケール繊維の作製に好適な静電紡糸手法を用いた、生体サンプル及び生物試薬（例えば、酵素、抗体、増殖因子等）の貯蔵に関する。

【0012】

本明細書にいう生化学的保存媒体とは、タンパク質試薬を活性化状態で保存するための形態である。保存の条件は媒体の形態によって異なる。従来より、タンパク質等の生物試薬は、試薬の安定性及び機能を維持するために低温で保存される。或いは、凍結乾燥生成物を作製する既存の手法を用いれば、タンパク質等の生物試薬の室温保存も可能でありうる。室温調合物は、関心下のタンパク質及び1つ以上の安定化因子をととも含みうる。かかる調合物に含まれるタンパク質安定化因子の例として、ポリスクロースの調合物（例えば、Ficoll（登録商標）PM70、Ficoll（登録商標）PM400（70～400の重合化スクロース単位を含みうる）、並びに任意数のスクロースの繰り返し単位で構成されるその他のポリマー）、メレジトース、トレハロース、スクロース、ソルビトール、ウシ血清アルブミン、ポリエチレングリコール及びポリビニルアルコールが挙げられるが、これらには限定されない。

10

【0013】

そのような従来のアプローチのひとつでは、タンパク質と安定化因子のこの組合せに対し、液体窒素中での凍結工程とそれに続く乾燥工程、すなわちフリーズドライ処理を行う。この処理により、調合物は、凍結乾燥形態において室温で保存可能となる。例えば、ある従来のアプローチでは、バッチ型プロセスにおいて酵素混合物の小滴（例えば20マイクロリットル（ μl ）の小滴）を液体窒素に滴下しうる。バッチ処理の一環として、この混合物のいくつかの小滴又はある体積を液体窒素に滴下した後、真空濾過処理を実施してこのバッチプロセスの生成物（例えば、所望の酵素混合物の凍結乾燥ビーズ）を収集しうる。次に、凍結乾燥した組成物を使用前もしくは使用中に再水和しうる。一例として、かかるプロセスを採用すれば、核酸増幅に用いる酵素をいつでも持ち出し可能な形で室温保存できうる。そのため、技術者は所望の酵素調合物を必要に応じて反応に、或いは所望の反応を自動的に行うシステムに、添加できるようになる。

20

30

【0014】

しかし、わかるだろうが、かかるプロセスは実施する工程の数や種類の面で複雑になって望ましくないことがある。さらに、製造の観点からみても、かかるバッチ型プロセスは、処理に要する時間の長さや、バッチ処理に伴うその他の制約によって、望ましくないことがある。

【0015】

これらのアプローチに対し、本明細書中で論じるように、本開示のアプローチは、フリーズドライ工程を行わずに、しかもバッチ処理に限定されることなく、タンパク質又は他の生物試薬の保存に使用されうる。本開示のアプローチは、上記プロセスの代わりに静電紡糸処理を用い、関心下の試薬の可溶調合物をナノスケール乃至マイクロスケールの繊維の形態で作製する。この形態により、保存を目的としてタンパク質（又は他の好適な生物試薬）をカプセル化し、タンパク質を室温で安定化することができる。このプロセスの効果として、繊維直径の一樣性が非常に高く、かつ水中に入れると溶解する静電紡糸生成物が挙げられるが、これらには限定されない。その溶解時間は、実施形態の内容に応じて、10分未満、1分未満、10秒未満又は2秒未満である。特に、繊維の細さに伴う大きな表面積により、繊維は水性緩衝液等の緩衝液に極めて短時間で溶解できる。ただし、一部の事例には、いまだに有機溶液が使用されるものがある。繊維の内部には安定化されたタンパク質（又は他の生物試薬）が存在するが、繊維の溶解時には生物活性を維持したまま溶け出す。静電紡糸処理は連続的に（すなわち、バッチプロセス以外の形で）実施するこ

40

50

ともでき、有機溶媒ではなく主に水溶液を使用する。

【0016】

本明細書中で論じるように、静電紡糸は、液体組成物又は溶液から非常に微細な繊維（例えば、マイクロスケール又はナノスケール）を作製する過程に電荷を利用する手法である。静電紡糸処理は高温を必要としないため、複雑な分子や巨大な分子（例えば、生体サンプル内もしくは生物試薬内に存在しうるタンパク質や他の分子）を含有する繊維の製造に特に適している。

【0017】

静電紡糸は、一般に、電圧を使用することで液体媒体の一部（例えば、液滴や小滴）を帯電させる。このとき、発生する静電力は液体媒体による表面張力に打ち勝ち、液体媒体を引き延ばして微細な流れを形成する。特に、ある閾値を超えると、帯電した液体媒体の流れが液体表面から引き出される。液体のこの流れは移動中に乾燥し、静電荷は液体流の表面に移動する。この電荷移動を受け、ジェット流の一部は（例えば、流れの湾曲部やねじれ部分において）静電力によって互いに反発しうる。こうした箇所は蛇行もしくは波形の運動において互いに反発するため、液体流を引き延ばすように作用する（したがって、これが静電紡糸における「紡糸」の局面となる）。液体流のこの自己反発と伸長は、生じる乾燥繊維がコレクタ上に堆積して層を形成するまで継続しうる。なお、コレクタは残留静電荷を接地する働きをする。

【0018】

生じる繊維は大きさと厚さが実質的に一様であり、いくつかの実施形態では、ナノメートルレベルの直径（例えば、約10nm～約2000nmの直径）を有する。すなわちナノ繊維である。本明細書では、この方法によって製造され、直径がナノメートル乃至マイクロメートルのレベル（スケール）で測定される繊維を、ナノスケール繊維と呼ぶ。かかる繊維の寸法（直径を含む）は、多様なファクタによって決まりうる。これには例えば、針の太さと装置の流量（後述）、捕捉基板もしくはコレクタの性質、使用する電荷密度、コレクタまでの流れの移動距離、電場の強さ、さらには液体混合物もしくは溶液の組成及び液体混合物もしくは溶液の特性が挙げられる。例えば、繊維寸法を決定しうる、液体混合物もしくは溶液の組成の特性として、含まれる分子の分子量、溶媒もしくは共溶媒の有無及び/又は各成分の濃度が挙げられる。同様に、粘度、表面張力、導電率、揮発性等の液体混合物もしくは溶液の特性も、繊維寸法を決定しうる。

【0019】

本明細書中で論じるように、本開示のアプローチでは、静電紡糸を用いてナノスケール繊維に組み込まれる生物活性分子の安定化を行う。ナノスケール繊維の形でいったん安定化されると、生物活性分子は室温、例えば50°F～90°Fの間（例えば70°F）で保存しうる。一例として、ある研究では、ナノスケール繊維内に静電紡糸される抗体は、本明細書中で論じるように、室温で30日を超える期間（例えば34日）にわたって生物活性を維持した。このことを念頭に置くと、本開示の静電紡糸アプローチにとって好適な生物活性分子又はかかる分子の混合物の例として、酵素混合物（ポリメラーゼを含む）と抗体、糖類（例えば、メレジットース、ポリスクロース、スクロース、ポリエチレングリコール、ソルビトール等）、ヌクレオチド又はそのようなヌクレオチドの鎖、などが挙げられるが、これらには限定されない。さらに、いくつかの実例において、高分子溶液12の成分は、不安定な小分子、dNTP類、rNTP類、安定化因子（例えば、アルブミン、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、デンプン、糖）、洗剤、塩、2価カチオン、緩衝剤分子、プライマ、フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）、色素結合エステル、標識分子等を含みうるが、これらには限定されない。

【0020】

上記を念頭に置いて図1を参照すると、本開示のアプローチに用いるのに好適な静電紡糸システム10の一例が開示されている。図示した例において、1種以上の生体分子（例えば、1種類又は複数種類のタンパク質）の高分子溶液12（例えば、水性高分子溶液）

10

20

30

40

50

が、アクセス可能な容器もしくは器に入れて供給されている。高分子溶液 12 を、シリンジ 16 又は高分子溶液を好適な流量で押し出しもしくは排出可能なその他の好適な装置に供給するのにポンプ 14 を用いてもよい。図示したシリンジ 16 の例において、高分子溶液 12 はある決まった流量で針 18 又は先端から排出されうる。

【0021】

図示した例には、高電圧（例えば、5 kV ~ 50 kV）直流電源 22 も備わっている。電源 22 は、高分子溶液 12 がシリンジの先端 18 から排出されるときに静電荷を与え、コレクタ 24 の表面には逆の電荷を与えるように作用する。コレクタ 24 の表面にはナノスケール繊維 50 が最終的に堆積することになる。図示した例において、コレクタ 24 は接地され、さらに、連続的に平行移動もしくはそれ以外の仕方でも移動しうる表面を有する。その移動は 1 つ以上の回転円柱 26 等による。それにより、表面に堆積するナノスケール繊維 50 の連続的捕集が促進される。特に、一実施形態では、コレクタ 24 は連続供給される基板材料 30 のロールでありうる。これは、後続処理のためにナノスケール繊維 50 が堆積して捕集される連続堆積面の役割を果たしうる。繊維捕集に好適な基板材料の例として、親水面、疎水面、両親媒性面、硝酸セルロース膜、セルロース膜、酢酸セルロース膜、再生セルロース膜、硝酸セルロース混合エステル膜、ポリエーテルスルホン膜、ナイロン膜、ポリオレフィン膜、ポリエステル膜、ポリカーボネート膜、ポリプロピレン膜、二フッ化ポリビニリデン膜、ポリエチレン膜、ポリスチレン膜、ポリウレタン膜、ポリフェニレンオキシド膜、四フッ化エチレン・六フッ化プロピレン共重合体膜、ガラス繊維基板及び / 又は上記膜の 2 種類以上の組合せが挙げられるが、これらには限定されない。いくつかの実施形態では、繊維は使用のために器に捕集されるのに対し、別の実施形態では、繊維は使用のためにさらに加工され、より小さい小片とされる。

10

20

30

【0022】

高分子溶液 12 は、初めに、印加される静電力にตอบสนองして、シリンジ 16 の先端 18 から帯電流れ 28 として噴出する。流れ 28 は移動中に乾燥し、静電荷は流れ 28 の表面に移動する。これが生じると、流れ 28 に関わる電流のタイプは、当初のオーミック電流から対流電流へと移り変わる。この変化が生じると、既述のように、流れ 28 の湾曲部やねじれ部分の表面電荷によって斥力が生じ、流れ 28 は伸長もしくは波打ちうる。対応する液体が蒸発し、流れ 28 が液体から固体の繊維 50 に変わると、所望の繊維 50 が最終的に得られうる。本明細書中で論じるように、繊維 50 はナノスケールの寸法を有しえ、コレクタ 24（ここでは連続供給される基板材料 30 のロール又はシート）上に捕集される。わかるように、繊維 50 は捕集基板 30 上に一様に堆積してもいいし、捕集基板 30 上のある特定位置に堆積する、或いは繊維 50 の堆積層に定期的な中断を設ける等、非一様に堆積してもよい。中断を設ける場合、製造工程の一環として、基板をある所定の間隔で分割することができる。

40

40

【0023】

基板 30 は、静電紡糸繊維 50（1 種以上の生体分子で形成される）が基板 30 の表面に堆積した状態で定期的に回収されうる。図示した例において、表面に繊維 50 を有する基板 30 を、室温等での出荷及び / 又は保存に適した、破線 60 で示す、より小さい繊維被覆の小片 58（例えば、正方形又は円形）に加工（例えば、切断、スライス、打ち抜き等）しうる。例えば、関心下の 1 以上の生物活性分子で形成される繊維 50 の 1 回の適用量や使用量に見合うよう、小片 58 を繊維 50 の堆積厚さに基づいて寸法決め及び切断しうる。或いは、基板 30 とは別に梱包又は保管を行うために繊維 50 を基板 30 から取り外しうる。例えば、繊維 50 は堆積後に基板 30 の全体又は一部から取り外しうる。次に、取り外した繊維 50 を、ばら保管容器（例えば、ガラスバイアルやガラス瓶等の非反応性容器）又は使い捨て型もしくは再使用型パッケージ（1 つ 1 つが、ある所与のタイプの 1 回の反応に使用される量の繊維 50 に対応した、プリスタ包装もしくは立体パッケージ等）に、質量又は体積を基準に分配されうる。

【0024】

例えば、ポリメラーゼ混合物から形成される、十分な量の繊維 50 を、パッケージもし

50

くは保管容器に入れて供給してもいいし、基板の小片 5 8 に載った状態で供給してもいいし、或いは 1 回の PCR (又は他の核酸増幅) 操作のために反応混合物に添加する、もしくは反応混合物の形成に使用してもよい。したがって、実用上、核酸増幅を行うユーザは、あらかじめ測定した量の繊維 5 0 を、単独で、もしくは事前に切断した基板 3 0 の小片 5 8 に載せた状態で、水溶液又は既存の反応溶液に添加することが考えられる。繊維 5 0 は急速 (例えば 2 秒以内) に溶解して溶液に溶け込む、もしくは溶液を形成する。次に、増幅を行うサンプルとともにこの溶液を所望の増幅操作に使用しうる。

【 0 0 2 5 】

生体材料を対象とした、かかる新規の保存形態 (すなわち、静電紡糸ナノスケール繊維) によってメリットを享受しうる用途として、核酸増幅操作 (例えば、従来の、等温、遺伝子等) や、操作の過程に酵素、抗体又はその他のタンパク質混合物が添加されうるイムノアッセイ操作 (例えば、側方流動分析、酵素免疫測定、ウェスタンブロット分析、等) が挙げられるが、これらには限定されない。一例として、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) システムで用いるのに好適な酵素混合物は、本明細書に記載する静電紡糸アプローチと繊維利用の保存方法を用いることで、室温保存に対して安定化されうる。この例では、静電紡糸繊維のサンプルを、水及び DNA サンプルとともにシステムに添加することで、かかる反応の実施を促進しうる。同様に、さまざまなタイプの分析及び検査操作に用いるのに好適な酵素又は抗体混合物は、保存及び検査キットもしくはシステムとともに使用するために、静電紡糸しうる。このとき、静電紡糸繊維は水及びサンプルと組合せることで所望の分析もしくは検査を実現しうる。

10

20

【実施例】

【 0 0 2 6 】

上記を念頭に置き、本開示のアプローチが一連の研究において実施された。ある研究において、タンパク質安定化因子 Ficoll (登録商標) PM 4 0 0 を含む水溶液を静電紡糸し、構造及び寸法が一樣なナノスケール繊維 5 0 を作製した。この例では溶液中の Ficoll (登録商標) PM 4 0 0 の静電紡糸について記載するが、かかるナノスケール繊維 5 0 には、他のタンパク質安定化因子及び/又はタンパク質 (或いは本明細書中に記載するような、関心下の他の分子) を組み込んで、室温保存に好適な新しい保存媒体を提供してもよい。

30

【 0 0 2 7 】

この例では、70% Ficoll (登録商標) PM 4 0 0 の水溶液を調製し、図 1 に示すような静電紡糸処理を施した。この処理を、表 1 に示す異なる静電紡糸設定パラメータを用いて繰り返した。

【 0 0 2 8 】

【表 1】

表 1

	到達距離	電圧	流量
1	15cm	18kV	0.15ml/h
2	25cm	25kV	0.25ml/h
3	35cm	18kV	0.25ml/h

40

表中、到達距離は先端 1 8 からコレクタ 2 4 までの距離、電圧は直流電源 2 2 によって印加される電圧、流量は高分子溶液 1 2 が先端 1 8 を通ってシリンジ 1 6 から排出されるとききの流量である。

50

【 0 0 2 9 】

上記の設定並びに高分子溶液 1 2 として 7 0 % F i c o l l (登録商標) P M 4 0 0 の水溶液を用い、ナノスケール繊維 5 0 を作製して捕集した。図 2 ~ 図 4 を参照すると、捕集した繊維 5 0 を走査型電子顕微鏡を用いて異なる 2 通りの倍率で撮影した。図 2 は、表 1 の第 1 列の設定を用いて作製した繊維 5 0 の写真である。図 3 は、表 1 の第 2 列の設定を用いて作製した繊維 5 0 の写真である。図 4 は、表 1 の第 3 列の設定を用いて作製した繊維 5 0 の写真である。図からわかるように、F i c o l l (登録商標) P M 4 0 0 を用いて得られる繊維 5 0 は直径が 5 μ m 未満である。

【 0 0 3 0 】

別の研究では、F i c o l l (登録商標) P M 4 0 0、F i c o l l (登録商標) P M 7 0、ウシ血清アルブミン (B S A) 及び T a q ポリメラーゼの調合物を用いてナノスケール繊維が作製された。この調合物から作製されたナノスケール繊維は、室温で 7 日間にわたって保存された後も酵素活性を維持することが明らかになった。

10

【 0 0 3 1 】

本発明の技術的効果には、関心下の生物学的組成物 (酵素混合物、抗体混合物、核酸混合物等を含む) の静電紡糸繊維、並びにかかる繊維の製造が含まれる。いくつかの実施形態では、技術的効果には、保存及び / 又は標準化された反応での使用、に適した寸法を有する繊維被覆基板の製造が含まれる。或いは、別の実施形態では、技術的効果は、保存及び / 又は標準化された反応での使用、を目的に提供される、捕集基板上にない (例えば、捕集基板から取り外された) 静電紡糸繊維の製造が含まれる。本明細書で論じるようなやり方で作製される静電紡糸繊維は、直径が実質的に一様であり、極めて急速 (例えば 2 秒以内) に水に溶解する。本明細書で論じる静電紡糸繊維はバッチプロセスで製造されるのではなく、連続的に製造される。さらに、本明細書で論じる静電紡糸繊維は、フリーズドライバッチプロセス等のフリーズドライ処理を用いて製造されることがない。

20

【 0 0 3 2 】

本明細書は、最良の形態を含む例を用いて本発明を開示している。また、装置もしくはシステムの作製と使用、並びに内包される方法の実施を含め、当業者が本発明を実施できるように書かれている。本発明の特許可能範囲は特許請求の範囲によって規定されるとともに、当業者が想到する他の例を含みうる。そのような他の例は、特許請求の範囲の文言とは異なる構造要素を有する場合、或いは特許請求の範囲の文言と大差のない等価な構造要素を有する場合に、特許請求の範囲の範囲内にあるものと考えられる。

30

【 図 1 】

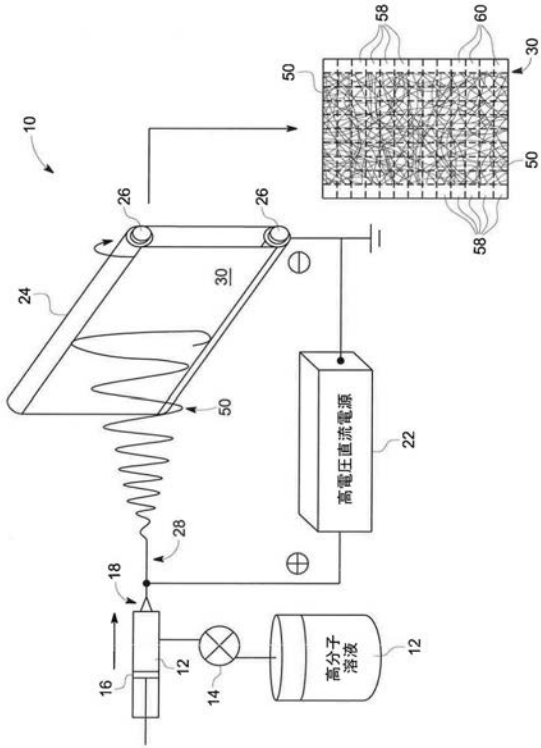


FIG. 1

【 図 2 】

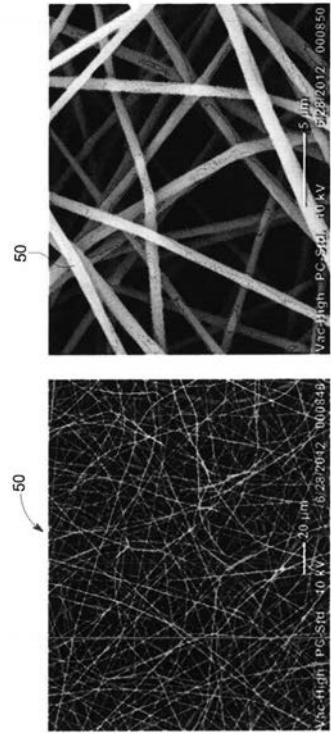


FIG. 2

【 図 3 】

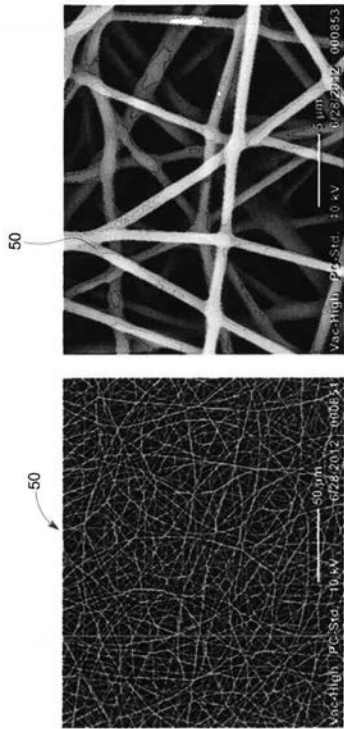


FIG. 3

【 図 4 】

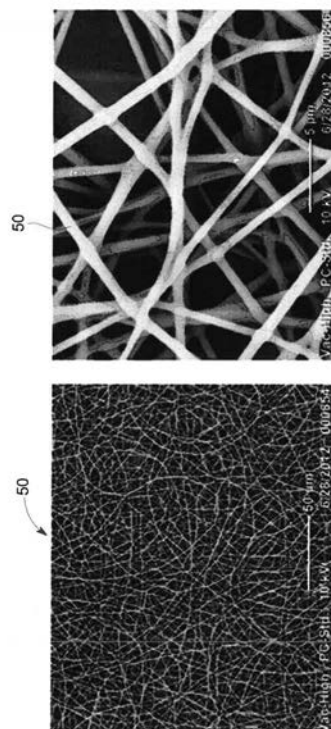


FIG. 4

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/076725

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/543 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N D01F		
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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MANIS ASHLEY E ET AL: "Electrospun nitrocellulose and nylon: Design and fabrication of novel high performance platforms for protein blotting applications", JOURNAL OF BIOLOGICAL ENGINEERING, BIOMED CENTRAL LTD, LO, vol. 1, no. 1, 10 October 2007 (2007-10-10), page 2, XP021031057, ISSN: 1754-1611, DOI: 10.1186/1754-1611-1-2	1-4,6, 8-14,16, 19
Y	abstract page 7, right-hand column, paragraph 2 - paragraph 3; figures 1,6 page 2, right-hand column, paragraph 3 - paragraph 4 ----- -/--	5,7
<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 30 January 2015		Date of mailing of the international search report 09/02/2015
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 Fleitmann, J

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/076725

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012/160255 A1 (GHANAVI JALALEDDIN [IR]) 28 June 2012 (2012-06-28)	1-19
A	paragraph [0080] - paragraph [0092]; claims 1-15; figure 2; examples 2-4 -----	20-23
X	CN 101 275 291 A (UNIV SOOCHOW [CN]) 1 October 2008 (2008-10-01)	1-4,6, 8-11,14, 19
Y	examples 1-2 -----	5,7
Y	US 2007/112446 A1 (DEVEAUX ROBERT C [CA] ET AL) 17 May 2007 (2007-05-17) page 20, line 19; figures 8a,8b,6a-d -----	5,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/076725

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012160255	A1	28-06-2012	NONE

CN 101275291	A	01-10-2008	NONE

US 2007112446	A1	17-05-2007	NONE

フロントページの続き

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

(72) 発明者 リ, ビン

アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ビルディング・ケイ1-3エイ59
、ワン・リサーチ・サークル、グローバル・リサーチゼネラル・エレクトリック・カンパニー

(72) 発明者 ムーア, デイヴィッド・ロジャー

アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ビルディング・ケイ1-3エイ59
、ワン・リサーチ・サークル、グローバル・リサーチゼネラル・エレクトリック・カンパニー

(72) 発明者 アルパーツ, ウィリアム・クリストファー

アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ビルディング・ケイ1-3エイ59
、ワン・リサーチ・サークル、グローバル・リサーチゼネラル・エレクトリック・カンパニー

(72) 発明者 ネルソン, ジョン・リチャード

アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ビルディング・ケイ1-3エイ59
、ワン・リサーチ・サークル、グローバル・リサーチゼネラル・エレクトリック・カンパニー

F ターム(参考) 4B029 AA07 AA23 BB20

4B033 NA25 NB65 NC06 ND05 ND06 ND20 NF04

4B050 CC07 GG10 HH02 KK02 KK08 KK14 KK19 KK20 LL03 LL10

专利名称(译)	静电纺丝纤维，用于蛋白质稳定和保存		
公开(公告)号	JP2017501704A	公开(公告)日	2017-01-19
申请号	JP2016540631	申请日	2014-12-05
[标]申请(专利权)人(译)	通用电气公司		
申请(专利权)人(译)	通用电气公司		
[标]发明人	リビン ムーアデイヴィッドロジャー アルバーツウィリアムクリストファー ネルソンジョンリチャード		
发明人	リ,ビン ムーア,デイヴィッド・ロジャー アルバーツ,ウィリアム・クリストファー ネルソン,ジョン・リチャード		
IPC分类号	C12N11/04 C12N9/96 G01N33/531 C12M1/00		
CPC分类号	G01N33/54346 G01N33/54393 C12Q1/6806		
FI分类号	C12N11/04 C12N9/96 G01N33/531.Z C12M1/00.A		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB20 4B033/NA25 4B033/NB65 4B033/NC06 4B033/ND05 4B033/ND06 4B033/ND20 4B033/NF04 4B050/CC07 4B050/GG10 4B050/HH02 4B050/KK02 4B050/KK08 4B050/KK14 4B050/KK19 4B050/KK20 4B050/LL03 4B050/LL10		
代理人(译)	小仓 博 田中 拓人		
优先权	14/140127 2013-12-24 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种用于在纳米级纤维介质中制备目标试剂的可溶性试剂的电纺方法。在一实施方案中，纳米级纤维能够掺入并稳定感兴趣的生物试剂，例如用于在室温下长期保存。在一示例中，纤维被连续地制造并且迅速地熔化。 [选型图]图1

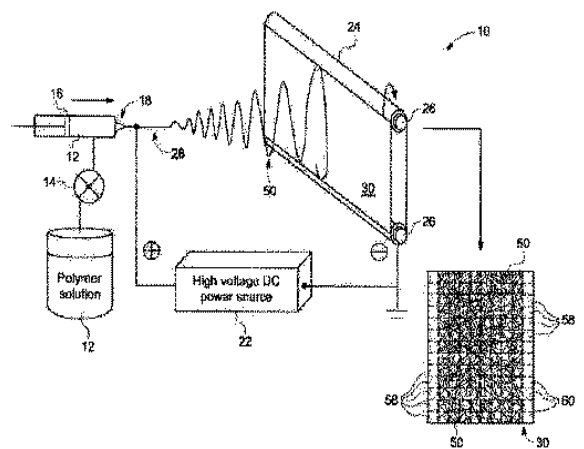


FIG. 1