

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6775498号
(P6775498)

(45) 発行日 令和2年10月28日(2020.10.28)

(24) 登録日 令和2年10月8日(2020.10.8)

(51) Int.Cl.	F I	
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00	1 O 1
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50	P
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 1 A
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

請求項の数 17 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-520426 (P2017-520426)	(73) 特許権者	515185843
(86) (22) 出願日	平成27年10月15日 (2015.10.15)		エコール・シュペリユール・ドゥ・フィシ
(65) 公表番号	特表2017-532560 (P2017-532560A)		ック・エ・ドゥ・シミール・アンデュストリ
(43) 公表日	平成29年11月2日 (2017.11.2)		エル・ドゥ・ラ・ヴィル・ドゥ・パリ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/073942		フランス・F-75005・パリ・リュ・
(87) 国際公開番号	W02016/059182		ヴォ克蘭・1 O
(87) 国際公開日	平成28年4月21日 (2016.4.21)	(74) 代理人	100108453
審査請求日	平成30年7月26日 (2018.7.26)		弁理士 村山 靖彦
(31) 優先権主張番号	1459903	(74) 代理人	100110364
(32) 優先日	平成26年10月15日 (2014.10.15)		弁理士 実広 信哉
(33) 優先権主張国・地域又は機関	フランス (FR)	(74) 代理人	100133400
前置審査			弁理士 阿部 達彦
		(72) 発明者	アンドリュウ・デイヴィッド・グリフィス
			フランス・75005・パリ・リュ・ミル
			ベル・2 ビス
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 液滴の内容物を分析する方法及び関連装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程：

- キャリア流体（8）に含有される複数の液滴（6）を提供する工程であって、液滴（6）のうち少なくとも1個が、主軸（X）に沿って長尺物を画定する、粒子（12）の少なくとも1個の凝集体（10）を含み、少なくとも特定の液滴（6）が、凝集体（10）に結合できる少なくとも1個の標的要素（37）を含有する、工程を含む、液滴の内容物を分析するための方法において、

凝集体（10）上への標的要素（37）の付着に特有の物理的パラメータを測定する測定工程を含み、

前記測定工程は、液滴（6）内に位置する複数の点における局所的な物理的パラメータの測定を含み、

粒子の各凝集体は、主軸 X に沿って配向された柱を含み、

前記粒子は磁性粒子であることを特徴とする方法。

【請求項 2】

測定工程が、液滴（6）内部で測定された値の積分値の決定を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

液滴（6）を提供する工程が、

- 液滴（6）を形成するための流体塊（86）中での粒子（12）の分散、次いで

- 液滴（３２）の形態の流体塊（８６）の分散、
- 主軸に沿って長尺物を画定する、粒子の少なくとも１個の凝集体の各液滴中での形成

を含み、粒子（１２）の凝集体（１０）が分散後に各液滴（６）中で形成される、請求項１又は２に記載の方法。

【請求項４】

標的要素（３７）が、タンパク質、抗体、ペプチド、ＤＮＡ又はＲＮＡ断片、代謝産物、イオン、脂質、及び細胞によって産生されうる生体分子により形成される群から選択される要素である、請求項１から３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５】

少なくとも特定の液滴（６）が、標的要素（３７）を産生しうる産生実体（９０）を含み、産生実体（９０）が、細胞及び*in vitro*発現系によって形成される群から選択される、請求項１から４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６】

粒子（１２）が超常磁性粒子である、請求項１から５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７】

測定工程の前に、凝集体の主軸（Ｘ）を検出軸（Ｄ）に沿って配向させる工程を含む、請求項１から６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８】

各測定において異なる検出軸に沿って凝集体の主軸（Ｘ）を配向させるための工程を有する、複数の測定工程を含む、請求項１から７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９】

測定工程が、液滴の循環を伴わずに、マイクロ流体チャンバー内で実施される、請求項１から８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１０】

- 液滴を循環させるためのアセンブリ（２２）及び検出領域（２６）を含むデバイスの提供、

- 検出領域（２６）に向けた液滴の輸送

を含み、液滴（６）内部の測定が検出領域（２６）において実行される、請求項１から９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１１】

- 液滴を循環させるためのアセンブリ（２２）及び複数の分類領域（９４、９６）を含むデバイス、並びに液滴又は液滴の一部分を分類領域（９４、９６）に向けて選択的に誘導するための手段（９８）の提供、

- 液滴（６）又は液滴の一部分の分類に関する決定であって、複数の分類領域（９４、９６）の中から１つの分類領域を選択的に選び出すことからなる決定、

- 決定工程中に選択された液滴（６）の分類領域に向けた、液滴（６）、液滴の一部分のそれぞれの輸送

を含む、請求項１から１０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２】

少なくとも１個の液滴が、少なくとも１個の標的要素（３７）、標的要素（３７）との複合体を形成することができる少なくとも１個の第１のシグナリング実体（３４）、及び標的要素（３７）との複合体を形成することができる少なくとも１個の別個の第２のシグナリング実体（３４）を含み、方法が、凝集体（１０）上に再局在化したシグナリング実体（３４）のそれぞれの濃度を示す信号の測定を含む、請求項１から１１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３】

少なくとも１個の液滴が少なくとも１個の標的要素（３７）、標的要素（３７）との複合体を形成することができる少なくとも１個のシグナリング実体（３４）、及び標的要素（３７）との複合体を形成することができる少なくとも１個の定量化実体を含み、方法が

10

20

30

40

50

- 、
- 凝集体（１０）上に再局在化したシグナリング実体（３４）の濃度を表す信号の測定、
 - 凝集体（１０）上に再局在化した定量化実体の濃度を表す信号の測定、
 - 再局在化したシグナリング実体（３４）の信号の、再局在化した定量化実体の信号に対する比率からの、標的要素（３７）とシグナリング実体（３４）との解離定数の決定を含む、請求項１から１２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４】

少なくとも特定の液滴（６）が産生実体（９０）を含み、産生実体（９０）が、標的要素（３７）となる少なくとも１個の抗体を産生しうる細胞であり、方法が、少なくとも１種の抗原に対する産生実体（９０）により産生される抗体の親和度を決定する工程を含み、決定工程後に液滴を選別する工程を含む、請求項１３に記載の方法。

10

【請求項１５】

少なくとも１個の液滴が少なくとも２個の別個のシグナリング実体（３４）を含み、両方のシグナリング実体（３４）のそれぞれが、凝集体（１０）上で別個の標的要素（３７）との複合体を形成することができ、方法が、再局在化したシグナリング実体（３４）のそれぞれの濃度を表す信号の測定を含む、請求項１から１４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６】

少なくとも特定の液滴（６）が産生実体（９０）を含み、産生実体（９０）が、１種又は複数の種類のタンパク質を産生しうる細胞であり、各タンパク質が別個の標的要素（３７）であり、再局在化したシグナリング実体（３４）のそれぞれの濃度を表す信号の測定が、前記種類のタンパク質の定量化を可能にする、請求項１５に記載の方法。

20

【請求項１７】

- キャリア流体（８）に含有される複数の液滴（６）を提供するためのアセンブリであって、液滴（６）のうち少なくとも１個が、主軸（Ｘ）に沿って長尺物を画定する、粒子（１２）の少なくとも１個の凝集体（１０）を含む、アセンブリを備える、液滴の含有物を分析するための装置において、

凝集体（１０）上への標的要素（３７）の結合に特有の物理的パラメータを測定するためのアセンブリを備え、

30

- 液滴を循環させるためのアセンブリ（２２）、
- 液滴の分類を決定するためのアセンブリ、
- 分類決定に従って液滴を選別するためのアセンブリ

を更に備え、

前記凝集体（１０）上への標的要素（３７）の結合に特有の物理的パラメータを測定するためのアセンブリは、液滴（６）内に位置する複数の点における物理的パラメータを局所的に測定するように構成されており、

前記粒子は磁性粒子であることを特徴とする装置。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

40

【０００１】

本発明は、以下の工程：

- キャリア流体（carrier fluid）に含有される複数の液滴を提供する工程であって、液滴のうち少なくとも１個が、主軸に沿って長尺物（elongated object）を画定する、粒子の少なくとも１個の凝集体を含み、少なくとも特定の液滴が、凝集体に結合できる少なくとも１個の標的要素（target element）を含有する、工程を含む、液滴の含有物を分析するための方法に関する。

【背景技術】**【０００２】**

50

このような方法は、例えば、液滴中に分散した目的分子のスクリーニングを行うためのものである。特に、本方法は、特定の標的要素を含む液滴を決定し、更には選択するためのものであり、この標的要素は化学反応又は生物学的反応から生じうる。

【0003】

特に、液滴の測定及びその後の選択は、生成物の濃度又は結合活性度 (connecting activity) に基づいてもよい。

【0004】

文献WO2009/011808A1は、液滴中のタンパク質を付着させる活性度を決定するための方法を記載している。

【0005】

Nature Protocols誌に2013年4月4日にオンライン発表されたMazutisらの刊行物「Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics」は、この原理を例示している。

【0006】

マウスハイブリドーマは、抗マウス抗体で覆われたビーズを含む液滴内にカプセル化される。ハイブリドーマは抗体を分泌する。フルオロフォアとカップリングした二次抗体により、分泌抗体の存在を明らかにすることが可能になる。二次抗体の分布は、分泌抗体が存在しない場合、液滴中で均質であるが、抗体が存在する場合、ビーズ上に再局在化する。

【0007】

したがって、本方法は、特定の細胞の活性度を決定する上で非常に選択性が高い。

【0008】

一方で、このような方法には様々な欠点がある。細胞及びビーズを区画化するための方法は無作為である。液滴中のビーズの数は、ポアソン分布法則により推定されることがある。また、液滴内の細胞の数も、独立のポアソン分布法則によって推定されることがある。ビーズ及び液滴の初期濃度は、液滴1個当たり平均して1個の細胞及び1個のビーズを有するように調整される。したがって、液滴の一部のみが、実施される分析の目的となる。

【0009】

更に、相当なサイズを有する、液滴1個当たり単一のビーズの存在は、本方法の分解能にとって好ましくない。実際、二次抗体はビーズの表面全体に分布する。したがって、本方法のダイナミックレンジは、ビーズ1個当たりの利用可能な外部表面積によって制限される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】WO2009/011808A1

【特許文献2】米国特許第2010/0105112号

【特許文献3】PCT/FR2009/051396

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Mazutisら、「Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics」、Nature Protocols、2013年4月4日オンライン発表

【非特許文献2】Brandon J DeKoskyら、「High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire」、Nature Biotechnology、31巻、166~169頁、2013年発行

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の目的は、既存の方法よりも信頼性が高く、より高感度な分析方法を提供することである。

【0013】

このために、本発明の目的は、凝集体上への標的要素の付着に特有の物理的パラメータを測定するための測定工程を含むことを特徴とする、前述の種類の方法である。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明による方法は、個別に又は技術的に可能なすべての組合せに従って選択される、以下の特徴のうち1つ又は複数を含んでもよい。

- 粒子が磁性粒子であり、有利には常磁性粒子であり、好ましくは超常磁性粒子である；

- 液滴を提供する工程が、

- 液滴を形成するための流体塊 (mass of fluid) 中での粒子の分散、次いで

- 液滴の形態の流体塊の分散、

- 主軸に沿って長尺物を画定する、粒子の少なくとも1個の凝集体の各液滴中での形成

を含み、粒子の凝集体が分散後に各液滴中で形成される；

- 標的要素が、タンパク質、抗体、ペプチド、DNA又はRNA断片、代謝産物、鉄イオン、脂質、及び細胞によって産生されうる生体分子によって形成される群から選択される要素である；

- 少なくとも1個の液滴が、標的要素を産生しうる産生実体 (productive entity) を含み、産生実体が、好ましくは細胞又はin vitro発現系によって形成される群から選択される；

- 測定工程が、液滴内に位置する複数の点における局所的な物理的パラメータの測定を含み、液滴内部で測定された値の積分値の決定を好ましくは含む；

- 方法が、測定工程の前に、凝集体の主軸を検出軸に沿って配向させる工程を含む；

- 方法が、各測定において異なる検出軸に沿って凝集体の主軸を配向させる工程を有する、複数の測定工程を含む；

- 測定工程が、液滴の循環を伴わずに、マイクロ流体チャンバー内で実施される；

- 方法が、

- 液滴を循環させるためのアセンブリ及び検出領域を含むデバイスの提供、

- 検出領域に向けた液滴の輸送

を含み、液滴内部の測定が検出領域において実行される；

- 方法が、

- 液滴を循環させるためのアセンブリ及び複数の分類領域を含むデバイス、並びに液滴又は液滴の一部分を分類領域に向けて選択的に誘導するための手段の提供、

- 液滴又は液滴の一部分に対する分類決定であって、複数の分類領域から1つの分類領域を選択的に選び出すことからなる決定、

- 決定工程中に選択された液滴の分類領域に向けた、液滴、特に液滴の一部分の輸送

を含む；

- 少なくとも1個の液滴が、少なくとも1個の標的要素、標的要素との複合体を形成することができる少なくとも1個の第1のシグナリング実体 (signaling entity)、及び標的要素との複合体を形成することができる少なくとも1個の別個の第2のシグナリング実体を含み、方法が、凝集体上に再局在化したシグナリング実体のそれぞれの濃度を示す信号の測定を含む；

10

20

30

40

50

- 少なくとも１個の液滴が、少なくとも１個の標的要素、標的要素との複合体を形成することができる少なくとも１個のシグナリング実体が、及び標的要素との複合体を形成することができる少なくとも１個の定量化実体 (q u a n t i f i c a t i o n e n t i t y) を含み、方法が、

- 凝集体上に再局在化したシグナリング実体の濃度を表す信号の測定、
 - 凝集体上に再局在化した定量化実体の濃度を表す信号の測定、
 - 再局在化したシグナリング実体の信号の、再局在化した定量化実体の信号に対する比率からの、標的要素とシグナリング実体との解離定数の決定を含む；

- 少なくとも特定の液滴が産生実体を含み、産生実体が、標的要素となる少なくとも１個の抗体を産生しうる細胞であり、方法が、少なくとも１種の抗原に対する産生実体により産生される抗体の親和度を決定する工程を含み、好ましくは、決定工程後に液滴を選別する工程を含む；

- 少なくとも１個の液滴が少なくとも２個の別個のシグナリング実体を含み、２個のシグナリング実体のそれぞれが、凝集体上で別個の標的要素との複合体を形成することができ、方法が、再局在化したシグナリング実体のそれぞれの濃度を示す信号の測定を含む；

- 少なくとも特定の液滴が産生実体を含み、産生実体が、１種又は複数の種類のタンパク質を産生しうる細胞であり、各タンパク質が別個の標的要素であり、再局在化したシグナリング実体のそれぞれの濃度を示す信号の測定が、前記種類のタンパク質の定量化を可能にする；

- 物理的パラメータの測定が蛍光測定である；
 - 液滴のうち少なくとも１個が、標的要素を分泌できる細胞を含み、方法が、標的要素が細胞によって液滴中に分泌されるインキュベーション工程を含む；
 - 液滴のうち少なくとも１個が細胞を含み、方法が細胞溶解のための工程を含む；
 - 液滴のうち少なくとも１個が、標的要素を発現できる i n v i t r o 翻訳系を含む；

- 方法が、液滴のうち少なくとも１個における凝集体から離れて位置する第１の点において局所的に、物理的パラメータを測定し、同じ液滴内の凝集体の近傍にある第２の点において局所的に、同じ物理的パラメータを測定する工程を含む；

- 粒子の最大寸法が、液滴の直径の５０％未満である；
 - 液滴が、少なくとも１個のシグナリング実体を含有し、物理的パラメータの測定が、液滴内での、又は凝集体に対するシグナリング実体の位置に依存する；

- 産生実体が、タンパク質、ペプチド、ＤＮＡ又はＲＮＡ断片、代謝産物、イオン、脂質及び細胞によって産生されうる生体分子により形成される群から選択される複数の標的要素を産生する；

- 方法が、産生実体の少なくとも１個の特性を決定する工程を含む；
 - 分類を決定する工程が、測定工程の後に行われる；
 - 液滴が超常磁性粒子を含有し、液滴又は液滴の一部分が、磁力、電界、誘電泳動、電気合体 (e l e c t r o c o a l e s c e n c e) 、又は表面弾性波の中から選択された誘導手段により、分類領域に向けて誘導される；

- 液滴の一部分が磁力によって抽出され、抽出部分が、副液滴を形成し、凝集体を含有する。

【 ０ ０ １ ５ 】

本発明の目的はまた、

- キャリア流体に含有される複数の液滴を提供するためのアセンブリであって、液滴のうち少なくとも一個が、主軸に沿って長尺物を画定する、粒子の少なくとも１個の凝集体を含むアセンブリ

を備える、液滴の内容物を分析するための装置において、凝集体上への標的要素の付着に特有の物理的パラメータを測定するためのアセンブリを備え、好ましくは、

10

20

30

40

50

- 液滴を循環させるためのアセンブリ、
- 液滴の分類を決定するためのアセンブリ、
- 分類決定に従って液滴を選別するためのアセンブリ

を更に備えることを特徴とする装置である。

【0016】

単に一例として示された以下の説明を読み、添付図面を参照することで、本発明をよりよく理解することができるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】本発明による第1の分析装置の標的要素の略図である。

10

【図2】第1の装置を用いた方法工程 (method step) の略図である。

【図3】本発明による方法工程中の、本発明による第2の装置の一部分の写真である。

【図4】本発明による方法工程中の、本発明による第2の装置の一部分の写真である。

【図5】本発明による方法工程中の、本発明による第2の装置の一部分の写真である。

【図6】本発明による方法工程中の、本発明による第2の装置の一部分の写真である。

【図7】本発明による第3の装置の略図である。

【図8】本発明による第4の装置の略図である。

【図9】第1の装置を用いた方法工程の略図である。

【図10】本方法による解離定数 (dissociation coefficient) K_d の決定を示す図である。

20

【図11】液滴を生成するためのデバイスを示す図である。

【図12】液滴を生成するためのデバイスを示す図である。

【図13】液滴を離隔 (spacing apart) し測定を行うためのアセンブリを示す図である。

【図14】液滴を離隔し測定を行うためのアセンブリを示す図である。

【図15】二次元の読み取りを行うためのアセンブリを示す図である。

【図16】二次元の読み取りを行うためのセンブリを示す図である。

【図17】実施例3を示す図である。

【図18】実施例3を示す図である。

【図19】実施例3を示す図である。

30

【図20】実施例4を示す図である。

【図21】実施例4を示す図である。

【図22】実施例5を示す図である。

【図23】実施例5を示す図である。

【図24】一方法を適用する工程中の液滴の略図である。

【図25】実施例6を示す図である。

【図26】実施例7を示す図である。

【図27】実施例7を示す図である。

【図28】実施例7を示す図である。

【図29】実施例8を示す図である。

40

【図30】実施例8を示す図である。

【図31】実施例9を示す図である。

【図32】実施例9を示す図である。

【図33】実施例10を示す図である。

【図34】実施例10を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明による液滴の内容物を分析するための第1の装置を図1に示す。

【0019】

装置1は、キャリア流体8に含有される複数の液滴6を提供するためのアセンブリ4を

50

含み、液滴 6 の少なくとも一部は、主軸 X に従って長尺物を画定する、粒子 1 2 の少なくとも 1 個の凝集体 1 0 含む。

【 0 0 2 0 】

装置 1 は、液滴中の物理的パラメータの測定するためのアセンブリ 1 4 を更に含む。

【 0 0 2 1 】

測定アセンブリ 1 4 は、例えば、液滴のうち少なくとも 1 個における凝集体 1 0 から離れて位置する第 1 の点 1 6 における局所的な、物理的パラメータの測定、及び同じ液滴内の凝集体 1 0 の近傍にある第 2 の点 1 8 における局所的な、同じ物理的パラメータの測定を実施することができる。

【 0 0 2 2 】

10

装置 1 はまた、循環アセンブリ 2 2、循環導管 2 4 及び検出領域 2 6 を含むデバイス 2 0 を備える。

【 0 0 2 3 】

循環アセンブリ 2 2 は、導管 2 4 内のキャリア液 8 において各液滴 6 を連続的な液滴の列として循環させることができる。

【 0 0 2 4 】

供給アセンブリ 4 は、装填アセンブリ 2 8 及び凝集アセンブリ 3 0 を備える。供給アセンブリ 4 は、離隔アセンブリ 3 1 を更に備える。

【 0 0 2 5 】

装填アセンブリ 2 8 は、粒子 1 2 の分散体を含む複数の初期液滴 3 2 を提供することができ、初期液滴 3 2 の少なくとも 1 個は少なくとも 1 個の標的要素 3 7 を更に含む。

20

【 0 0 2 6 】

離隔アセンブリ 3 1 は、液滴の列から 2 個の連続する液滴 6 を離間すること、即ち、2 個の連続する液滴の間の距離を大きくすることができる。例えば、離隔アセンブリ 3 1 は、キャリア流体入口 8 を備える。離隔アセンブリの例は図 1 3 及び図 1 4 に示される。

【 0 0 2 7 】

キャリア流体 8 は、2 個の連続する液滴 6 を液滴の列から分離して、それら液滴の接触を防ぐことができる。或いは、液滴 6 の分離は、機械デバイスによって実行される。

【 0 0 2 8 】

液滴 6 及びキャリア流体 8 の内相を形成する流体は、実質的に非混和性である。例えば、液滴 6 は水性内相を含み、キャリア流体 8 は有機相又は油相である。

30

【 0 0 2 9 】

キャリア流体 8 は有利にはフッ素化オイルである。

【 0 0 3 0 】

キャリア流体 8 又は液滴の内相を形成する流体は、例えば米国特許第 2 0 1 0 / 0 1 0 5 1 1 2 号に記載されているような、接触した 2 個の液滴 6 の融合を防ぐことができる界面活性剤、又は更に Rain Dance Technologies 社製界面活性剤 EA を有利には含む。

【 0 0 3 1 】

「実質的に非混和性である」とは、一般に、2 5 及び周囲圧力にて測定された、キャリア流体 8 中で液滴を形成する流体の溶解度が、1 % 未満であることを意味する。

40

【 0 0 3 2 】

液滴 6 のサイズは、例えば $1\ \mu\text{m} \sim 1000\ \mu\text{m}$ の間に含まれる。

【 0 0 3 3 】

液滴 6 の容積は、有利には 0 . 1 ピコリットル ~ 1 マイクロリットルの間に含まれる。

【 0 0 3 4 】

提供された液滴 6 は実質的に単分散する。実質的に単分散するとは、液滴 6 の多分散度が 5 % 未満であることを意味する。

【 0 0 3 5 】

図示された例では、液滴 6 は球形である。或いは、液滴 6 は、導管 2 4 の循環軸 Y に沿

50

って細長い形状になる。或いは、液滴 6 は、循環軸 Y に垂直な軸に沿って平らにされた円盤 (puck) の形状である。

【0036】

各初期液滴 32 は、ベース流体 (base fluid)、ベース流体中の固体粒子 12 の分散体、及び複数のシグナリング実体 34 を含む。更に、少なくとも 1 個の初期液滴 32 は、少なくとも 1 個の標的要素 37 を含む。

【0037】

粒子 12 は、細長い形状の凝集体 10 を形成するためのものである。例えば、粒子 12 は、磁場を印加すると磁気モーメントを獲得する超常磁性粒子である。超常磁性は、強磁性又はフェリ磁性材料が小粒子又はナノ粒子の形態にあるとき、それらの材料に現れる挙動である。十分に小さいサイズの粒子では、温度の影響下で磁化の向きが自然に反転することがある。本明細書における「磁性粒子」という用語は、超常磁性粒子を指す。

10

【0038】

磁性粒子 12 は、例えば、Dynal 社 (Life Technologies 社)、Ademtech 社又は Miltenyi 社によって提供される粒子の中から選択される。

【0039】

粒子 12 は例えばナノメートル単位である。したがって、粒子 12 の最大寸法は $1\text{ }\mu\text{m}$ 未満であり、例えば、 $50\sim 1,000\text{ nm}$ の間に含まれる。粒子 12 は有利には実質的に単分散する。例えば、粒子 12 の最大寸法間の変動は厳密に 10% 未満である。液滴 6 中の粒子 12 のサイズ及び数は、所望の数の凝集体を形成するように選択される。粒子 12 の最大寸法サイズは、液滴 6 の直径の 50% 未満である。

20

【0040】

粒子 12 の濃度によって、コロイド安定性が得られる。

【0041】

液滴 6 中の粒子 12 の濃度は、粒子 12 が液滴 6 の容積の 0.1~5% の間、例えば 1.7% となるものである。

【0042】

一例において、33 ピコリットルの各液滴 6 は、平均して、 300 nm の直径を有する粒子 12 を 500 個含有する。

30

【0043】

粒子 12 は最初に、初期液滴 32 中で均質な分散体を形成する。これらは、初期液滴 32 の容積中に実質的に均一に分布している。したがって、粒子 12 の濃度は、初期液滴 32 の全体にわたって均質になる。

【0044】

粒子 12 は、表面材料からなる生体分子の結合を可能にする表面を有利には有する。例えば、粒子 12 は、COOH 又は NH_2 官能基を有するポリマーで覆われる。

【0045】

有利には、この表面材料はまた、液滴中での粒子 12 の自然凝集を制限できる。

【0046】

更に、前記表面材料は、例えば、凝集体における 1 個のビーズの材料とその隣接ビーズの材料との間の非特異的結合により、凝集体 10 の安定性を有利には促進できる。

40

【0047】

粒子 12 は有利には官能化される。このことは、粒子 12 の表面材料が官能性要素を含むことを特に意味する。

【0048】

図示された例では、官能性要素として、捕捉要素 36 を含む。捕捉要素 36 は、例えば、標的要素 37 を捕捉することができる。捕捉要素 36 は、標的要素 37 を介してシグナリング実体 34 に間接的に結合することができる。或いは、捕捉要素は、シグナリング実体 34 に直接結合することができる。

50

【0049】

例えば、粒子12上の捕捉要素36はプロテインGであり、標的要素37はプロテインGに結合できる抗体であり、シグナリング実体 (s i g n a l e n t i t y) 34は抗体によって認識される抗原であり、抗原は抗体に結合することができる。

【0050】

凝集アセンブリ30は、主軸Xに沿った粒子12の凝集体を生成することができる。

【0051】

凝集アセンブリ30は、例えば、導管24の両側に位置する2個の磁石38を含む。磁場の向きは循環軸Yに対して平行ではなく、有利には循環軸Yに対して垂直である。凝集アセンブリ30は、各液滴6内に細長い凝集体を形成することを可能にする。

10

【0052】

一実施形態において、磁石38は永久磁石である。

【0053】

或いは、凝集アセンブリ30は非永久磁石を備える。

【0054】

或いは、凝集アセンブリ30は、特定の液滴においてのみ細長い凝集体10を生成するために、活性モードから非活性モードに切り替えることができる。

【0055】

例えば、粒子12の各凝集体10は、主軸Xに沿って配向された柱 (c o l u m n) を含む。柱の高さは、液滴6の直径の50%~100%の間に有利には含まれる。柱の幅は、例えば柱の高さの60%未満である。

20

【0056】

更に、凝集アセンブリ30は、例えば、凝集体を優先軸 (p r e f e r e n t i a l a x i s) に沿って配向させることができる。図示された例では、凝集体12の軸Xは、循環導管24内の液滴6の循環軸Yに対して垂直になっている。

【0057】

測定アセンブリ14は、例えば、循環軸Yに対して垂直の又は傾斜した軸X'に沿って延びる線に沿って、蛍光強度を光学的に測定することができるレーザー線を含む。

【0058】

測定アセンブリ14は、検出領域26において液滴内の測定を実施することができる。

30

【0059】

レーザー線の軸X'は、検出領域26内の凝集体Xの軸に対して有利には平行である。

【0060】

キャリア流体8の流量が一定である場合、レーザー線によって得られる信号の経時的測定値 (m e a s u r e m e n t o v e r t i m e) は、レーザー線の前を通過する液滴6の空間走査に対応する。これにより、連続的に複数の測定点、特に、凝集体10から離れて位置する少なくとも1個の第1の測定点16、及び凝集体10の近傍において凝集体10のより近くに位置する第2の測定点18を得ることが可能になる。

【0061】

実際には、測定アセンブリ14に面した漸進的通過の間に、液滴6の長手方向寸法にわたって、複数の連続的測定点が取られる。

40

【0062】

図1及び図2に示される例では、シグナリング実体34は蛍光性である。

【0063】

循環導管24は、供給アセンブリ4から測定アセンブリ14への循環方向において循環軸Yに沿った液滴6、32の循環を可能にするためのものである。

【0064】

循環導管24は1mm以下の内径を有利には有する。

【0065】

循環導管24は、循環軸Yに沿って細長くなっている。循環導管24は、円形又は楕円

50

形のような丸い輪郭を有する交差断面、長方形の輪郭などの多角形の導管による交差断面を有する。

【 0 0 6 6 】

循環導管 2 4 は、例えば、測定アセンブリ 1 4 による光学パラメータの測定を可能にする半透明材料で画定される。或いは、循環導管 2 4 は、検出領域 2 6 内に少なくとも 1 つの透明測定窓を画定する。

【 0 0 6 7 】

循環導管 2 4 の壁は、キャリア流体 8 に対して不浸透性である。

【 0 0 6 8 】

例えば、循環導管 2 4 は、有利には 1 m m 未満の内部寸法を有する毛管内に画定される。或いは、循環導管 2 4 は、マイクロ流体チップ内に画定される。

【 0 0 6 9 】

液滴を循環させるためのアセンブリ 2 2 は、導管 2 4 内で液滴 6、3 2 を循環方向に 1 個ずつ移動させるためのものである。

【 0 0 7 0 】

循環アセンブリ 2 2 は、例えば、キャリア流体 8 に制御流量を適用することが可能なシリンジポンプを備える。或いは、循環アセンブリ 2 2 は、圧力制御器を備える。

【 0 0 7 1 】

次に、第 1 の装置 1 に適用される本発明による第 1 の分析方法について説明する。

【 0 0 7 2 】

前述した装置 1 が提供される。前述のような初期液滴 3 2 は、キャリア流体 8 中に調製される。

【 0 0 7 3 】

好ましくは、粒子 1 2 は各初期液滴 3 2 中で均質に分散される。初期液滴 3 2 に対する個々の粒子 1 2 の小さなサイズを考慮すると、各初期液滴 3 2 は、例えば 1 0 個を超える多数の個々の粒子 1 2 を含有する。粒子 1 2 を 1 個も含まない初期液滴 3 2 を得る確率は、非常に低いか、又は 0 である。

【 0 0 7 4 】

好ましくは、標的要素 3 7 及びシグナリング実体 3 4 は、各初期液滴 3 2 内に均質に分散する。

【 0 0 7 5 】

初期液滴 3 2 内には、特定の親和性を有する要素間に結合が形成される。

【 0 0 7 6 】

一例において、各標的要素 3 7 は、シグナリング実体 3 4 及び捕捉要素 3 6 に結合される。シグナリング実体 3 4 は、このようにして粒子 1 2 上に再局在化する。

【 0 0 7 7 】

以下において、「再局在化した」実体とは、凝集体 1 0 に結合する実体を意味する。

【 0 0 7 8 】

初期液滴 3 2 は、循環アセンブリ 2 2 によって導管 2 4 内でキャリア流体 8 と一緒に循環する。

【 0 0 7 9 】

少なくとも 1 個の初期液滴 3 2 は、凝集アセンブリ 3 0 に導かれる。主軸 X に沿って長尺物を画定する、粒子 1 2 の凝集体 1 0 は、凝集アセンブリ 3 0 によって初期液滴 3 2 内で形成される。

【 0 0 8 0 】

好ましくは、粒子 1 2 が磁性粒子である場合、粒子 1 2 は凝集アセンブリ 3 0 の各磁石 3 8 の前を通過する間に主軸 X に沿って整列する。

【 0 0 8 1 】

長尺物を含む液滴 6 は、検出領域 2 6 へと運ばれる。物理的パラメータは、測定アセンブリ 1 4 によって、液滴 6 のうち少なくとも 1 個における少なくとも 1 個の第 1 の点 1 6

10

20

30

40

50

にて局所的に測定される。

【 0 0 8 2 】

特定の用途では、物理的パラメータは、測定アセンブリ 1 4 によって、液滴 6 のうち少なくとも 1 個における少なくとも 1 個の第 1 の点 1 6 において局所的に測定され、同じ物理的パラメータが、測定アセンブリ 1 4 によって、同じ液滴 6 における凝集体 1 0 近傍の少なくとも 1 個の第 2 の点 1 8 において局所的に測定される。

【 0 0 8 3 】

図 2 は、例として、異なる液滴 6 について得られた異なる測定値を示している。グラフは、レーザー線によって経時的に測定された蛍光強度を示している。

【 0 0 8 4 】

蛍光強度は、シグナリング実体 3 4 の波長特性の範囲内で測定されている。この例では、蛍光強度は、粒子 1 2 の波長特性の範囲内で更に測定されており、粒子 1 2 は蛍光性である。したがって、凝集体 1 0 をより容易に位置づけることができる。

【 0 0 8 5 】

レーザー線上で測定されたシグナリング実体 3 4 の蛍光に対応する蛍光強度 4 0 は、図 2 において、異なる液滴 6 ごとに点線で示されている。

【 0 0 8 6 】

粒子 1 2 の蛍光に対応する蛍光強度 4 1 は、図 2 において、異なる液滴 6 ごとに実線で示されている。

【 0 0 8 7 】

測定工程は、液滴内に位置する複数の点において局所的に物理的パラメータを決定することを含む。測定工程は、複数の点における測定値の累積、例えば液滴 6 内での測定値の積分の決定を更に有利には含む。

【 0 0 8 8 】

図示された第 1 の液滴 4 2 は、異なるシグナリング実体 3 4 が粒子 1 2 上に再局在化していない液滴 6 である。シグナリング実体 3 4 の分布は、液滴 6 内で均質になっている。蛍光強度信号は、プラトー 4 4 として測定される。

【 0 0 8 9 】

図示された第 2 の液滴 4 8 は、シグナリング実体 3 4 の一部が粒子 1 2 上に再局在化した液滴 6 である。実際には、これらのシグナリング実体 3 4 は、捕捉要素 3 6 によって捕捉された標的要素 3 7 に結合している。この場合、凝集体 1 0 の近傍での蛍光強度は、液滴 6 の残り部分よりも顕著である。プラトー 5 2 に加えてピーク 5 0 を有する蛍光強度信号が測定されている。

【 0 0 9 0 】

凝集体 1 0 から遊離しているシグナリング実体 3 4 が少ないため、第 2 の液滴 4 8 のプラトー 5 2 の高さは、第 1 の液滴 4 2 のプラトー 4 4 の高さよりも低くなっている。

【 0 0 9 1 】

図示された第 3 の液滴 5 6 は、シグナリング実体 3 4 の大部分が凝集体上に再局在化した液滴である。蛍光強度信号は、ピーク 5 8 及びプラトー 5 9 を有する。より多くのシグナリング実体 3 4 が粒子 1 2 によって捕捉され、したがって、凝集体 1 0 の近傍に位置しているため、測定されたピーク 5 8 の高さは、第 2 の液滴 4 8 において測定されたピーク 5 0 の高さよりも高くなっている。

【 0 0 9 2 】

図 9 は、再局在化したシグナリング実体 3 4 の濃度を推定する上で有用なパラメータの選択を示している。

【 0 0 9 3 】

時間 t に対する信号 S を示す図 9 には、より高い信号ピークを有する、（左側及び右側の）1つのピーク又は2つのピーク（凝集体）を含有する、3個の液滴が示されている。有用なパラメータは、所定の閾値を基準とする信号の積分値（ I_{nt} ）が計算される、信号の極大値（ Max として示す）でありうる。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 4 】

第 1 の方法は、各液滴 6 における信号の極大値 (M a x)、即ち凝集体上に再局在化した信号ピークの高さによって、この濃度を推定することからなる。

【 0 0 9 5 】

より精密な第 2 の方法は、例えば図 9 に示すように、各液滴 6 について、ユーザーによって設定された閾値を超えた信号の積分値 (I n t) を計算することからなる。この方法は、実施例 3 で説明するように、信号の分散を制限する上でより興味深いことが明らかになりうる。

【 0 0 9 6 】

これらの信号処理方法はともに、リアルタイムで実行することができる。

10

【 0 0 9 7 】

他の方法、例えばこれらのアプローチの組合せは、例えば再局在化したシグナリング実体 3 4 及び再局在化していないシグナリング実体 3 4 両方の測定に適用することができる。

【 0 0 9 8 】

本発明は、液滴 6 中の標的要素 3 7 の濃度の測定を更に可能にする。

【 0 0 9 9 】

これを行うための単純なケースは、以下の条件：

- 捕捉要素 3 6 が、標的要素の少なくとも 9 0 % 超、有利には全体を凝集体上に捕捉するのに十分な量存在し、標的要素 3 7 に対する十分な親和性を有し；
- シグナリング実体 3 4 の濃度が標的要素 3 7 の濃度よりも大きく、シグナリング実体 3 4 と標的要素 3 7 との間の解離定数 K_d が標的要素 3 7 の濃度よりも小さく、有利には 1 0 倍超である、という条件に当てはまる場合である。これは、典型的には、サブナノモルの K_d を有するモノクローナル抗体のような最適な用量の試薬が使用されるケース、及び実施例 5 に示されるように、1 ナノモル濃度超の標的要素 3 7 の濃度を検出することが意図されるケースである。

20

【 0 1 0 0 】

「ナノモル濃度」は、1 ナノモル / L に等しいという意味である。

【 0 1 0 1 】

これらの特定の条件下において、各標的要素 3 7 の存在により、捕捉要素 3 6 - 標的要素 3 7 - シグナリング実体 3 4 複合体の形成がもたらされる。したがって、標的要素 3 7 の濃度は、凝集体 1 0 に再局在化したシグナリング実体 3 4 の信号に比例する。その他の条件は、定量化の達成を可能にし、捕捉要素 3 6、又は標的要素 3 7 に対するシグナリング実体 3 4 の濃度及び親和性を変更することにより当業者には明らかであろう。

30

【 0 1 0 2 】

図 3 ~ 図 6 は、本発明による第 2 の装置 6 0 の一部分を示す。

【 0 1 0 3 】

この第 2 の装置 6 0 は、デバイス 2 0 がチャンバー 6 2 を備える点で第 1 の装置 1 と異なる。チャンバー 6 2 は、複数の循環路 6 4 及び複数の分離パッド 6 6 を含む。

【 0 1 0 4 】

その他のチャンバーもありうる。一代替例において、チャンバーは、文献 P C T / F R 2 0 0 9 / 0 5 1 3 9 6 に記載され、図 1 5 及び図 1 6 に示される、分離パッドを含まない。

40

【 0 1 0 5 】

チャンバー 6 2 は、凝集工程又は配向工程中、及び測定工程中に、キャリア流体 8 中の複数の液滴 6 を貯蔵するためのものである。

【 0 1 0 6 】

第 2 の装置 6 0 の測定アセンブリは、チャンバー 6 2 内に存在する複数の液滴 6 の物理的パラメータを同時に測定できる点で、第 1 の装置 1 の測定アセンブリ 1 4 と異なる。

【 0 1 0 7 】

50

図 3 は、キャリア流体 8 中の初期液滴 3 2 を含有するチャンバー 6 2 を示す。磁性粒子 1 2 の分散体を目視できる。

【 0 1 0 8 】

図 4 は、液滴中で凝集体 1 0 が形成された後の同じチャンバー 6 2 を示す。複数の細長い凝集体が各液滴 6 内に形成されている。

【 0 1 0 9 】

図 5 は、同じデバイス 6 0 内の、細長い凝集体 1 0 を有する複数の液滴 6 を示す。液滴 6 の性質及び量は、液滴 1 個当たり単一の細長い凝集体 1 0 のみが存在するように調整されている。液滴 6 当たり単一の凝集体 1 0 が存在することにより測定が容易になる。

【 0 1 1 0 】

図 6 は、同じ検出軸 D に沿って凝集体を配向させる工程の後の同じチャンバー 6 2 を示す。

【 0 1 1 1 】

この第 2 の装置 6 0 からの本発明による分析方法は、例えば、液滴 6 が検出器の前を循環することによってではなく、チャンバー 6 2 全体を同時に測定することによって、測定が複数の液滴 6 に対して同時に行われるという点で、前述の方法と異なる。

【 0 1 1 2 】

この方法はまた、測定工程の前に、検出軸 D に沿って凝集体 1 0 の主軸 X を配向させる工程を含むという点でも異なる。

【 0 1 1 3 】

有利には、可変方位 (variable orientation) の磁場を印加することにより、検出軸を増加することができる。このアプローチは、液滴中の他の非磁性物体からの凝集体 1 0 の識別、又は渦流信号の低減が可能であるという利点を有する。例えば、バックグラウンド蛍光ノイズを低減することができる。例えば、異なる軸に沿った検出は、凝集体 1 0 上でのシグナリング実体 3 4 の再局在化を、液滴 6 内の別の物体、例えば細胞上でのシグナリング実体 3 4 の再局在化から区別することを可能にする。

【 0 1 1 4 】

この概念の実現は、第 1 の方位 D 1 に沿って凝集体 1 0 の主軸 X を整列させるために磁場 B 1 を印加し、次いで、D 1 に対して垂直な第 2 の方位 D 2 に沿って凝集体 1 0 の主軸 X を整列させるために、B 1 に対して垂直な磁場 B 2 を印加することからなる。

【 0 1 1 5 】

本発明による第 3 の装置 7 0 を図 7 に示す。

【 0 1 1 6 】

この第 3 の装置 7 0 は、分類アセンブリ 7 2 を更に備える点で第 1 の装置 1 と異なる。

【 0 1 1 7 】

更に、第 3 の装置 7 0 は、装填アセンブリ 2 8 が、内相入口領域 7 4 並びにキャリア流体入口領域 7 6 及び連結領域 (junction area) 7 8 を含むという点で、第 1 の装置 1 と異なる。装填アセンブリ 2 8 は、インキュベーション領域 7 9 を更に含む。

【 0 1 1 8 】

内相入口領域 7 4 は、第 1 の入口導管 8 0、第 2 の入口導管 8 2、及び合流導管 (joint flow conduit) 8 4 を備える。

【 0 1 1 9 】

第 1 の入口導管 8 0 は、液滴の内相の一部を形成することを意図とした第 1 の流体塊 8 6 を導入することを意図するものである。この例では、第 1 の内部流体塊は、粒子 1 2 及び複数のシグナリング実体 3 4 を含んでいる。

【 0 1 2 0 】

第 2 の入口導管 8 2 は、液滴内相の一部を形成するための第 2 の流体塊 8 8 の入口となるためのものである。この例では、第 2 の内部流体塊は、標的要素 3 7 の産生実体 9 0 の懸濁液を含む。産生実体 9 0 は、例えば細胞 9 0 である。

【 0 1 2 1 】

10

20

30

40

50

細胞 9 0 は、有利には、標的要素 3 7 を分泌できる細胞である。特に、特定の細胞 9 0 は、ハイブリドーマ又は形質細胞のような、抗体分泌細胞である。分泌抗体は、粒子 1 2 の捕捉要素 3 6 とシグナリング実体 3 4 両方によって認識される。

【 0 1 2 2 】

液滴 6 内でのこれらの標的要素 3 7 の存在により、凝集体 1 0 上でのシグナリング実体 3 4 の再局在化が可能になる。

【 0 1 2 3 】

第 2 の流体塊中の細胞 9 0 の濃度は、有利には液滴の相当な部分が 1 個の細胞 9 0 のみを含有する、例えば液滴の 1 0 % 超が 1 個の細胞 9 0 を含有することになる。

【 0 1 2 4 】

合流導管 8 4 は、内相を形成するための流体塊 8 6、8 8 両方の配給を可能にする。

【 0 1 2 5 】

キャリア流体入口領域 7 6 は、キャリア流体 8 の入口となるためのものである。図示された例では、キャリア流体 8 は、2 つの入口導管 9 2 を通って流入する。

【 0 1 2 6 】

連結領域 7 8 は、キャリア流体入口領域 7 6 と内相入口領域 7 4 とを連結する。特に、連結領域は、合流導管 8 4 をキャリア流体入口導管 9 2 に連結する。

【 0 1 2 7 】

連結領域 7 8 は、初期液滴 3 2 を形成することができる。本明細書に図示された連結領域 7 8 は、流体力学的集束連結部 (hydrodynamic focusing junction) である。流体力学的集束連結部の例は、図 1 1 及び図 1 2 に示される。或いは、初期液滴 3 2 は、T 形連結部において形成される。

【 0 1 2 8 】

流体塊 8 6 と流体塊 8 8 との混合物を含む初期液滴 3 2 が形成される。初期液滴 3 2 は、粒子 1 2 及びシグナリング実体 3 4 の分散体を含む。

【 0 1 2 9 】

少なくとも特定の初期液滴 3 2 は、細胞 9 0 を更に含む。

【 0 1 3 0 】

インキュベーション領域 7 9 は、連結領域 7 8 の下流に位置する。インキュベーション領域は、細胞 9 0 による標的要素 3 7 の分泌を可能にするためのものである。或いは、細胞 9 0 は、インキュベーション領域 7 9 内で溶解され、標的要素 3 7 が放出されるためのものである。

【 0 1 3 1 】

或いは、インキュベーションは、デバイス 2 0 の外部で実行される。

【 0 1 3 2 】

第 3 の装置 7 0 はまた、デバイス 2 0 が、複数の分類領域 9 4、9 6、及び液滴又は液滴の一部分を分類領域 9 4、9 6 に向けて選択的に誘導するための手段 9 8 を更に含むという点でも異なる。

【 0 1 3 3 】

分類領域 9 4、9 6 は、検出領域 2 6 の下流に位置する。導管 2 4 は、2 つの出口導管 1 0 2、1 0 4 においてフォーク 1 0 0 を備える。第 1 の分類領域 9 4 は、第 1 の液滴群 1 0 6 を受け取るための第 1 の出口導管 1 0 2 を備える。第 2 の分類領域 9 6 は、第 2 の液滴群 1 0 8 を受け取るための第 2 の出口導管 1 0 4 を備える。或いは、デバイス 2 0 は、選別基準の数に応じて、より多くの分類領域 9 4、9 6 を備える。

【 0 1 3 4 】

選択的に液滴を誘導するための手段 9 8 は、例えば、磁力によって 1 個の液滴 6 を分類領域 9 4、9 6 へと誘導することができる。

【 0 1 3 5 】

或いは、液滴 6 は電極によって誘導される。

【 0 1 3 6 】

10

20

30

40

50

例えば、液滴は、誘電泳動によって、流れによる電気合体によって、又は弾性表面波（S A W）によって、分類領域へと誘導される。

【 0 1 3 7 】

次に、本発明による第 3 の装置 7 0 による分析方法について説明する。

【 0 1 3 8 】

前述の装置 7 0 が提供される。磁性粒子 1 2 及びシグナリング実体 3 4 の懸濁液が調製され、第 1 の入口導管 8 0 に注入される。

【 0 1 3 9 】

細胞 9 0 の懸濁液が調製され、第 2 の入口導管 8 2 に注入される。

【 0 1 4 0 】

キャリア流体 8 が提供され、キャリア流体入口導管 9 2 に注入される。

【 0 1 4 1 】

流体 8 6、8 8 は、循環アセンブリ 2 2 によって動き始める。初期液滴 3 2 は、連結領域 7 8 において形成される。

【 0 1 4 2 】

この方法は、区画化された細胞 9 0 が、標的要素 3 7、例えば分析されるタンパク質が分泌されるインキュベーション工程を更に含む。

【 0 1 4 3 】

或いは、この方法は、標的要素 3 7、例えば細胞質外で分析されるタンパク質の放出を可能にする細胞溶解工程を含む。

【 0 1 4 4 】

これらの溶解又はインキュベーション工程は、デバイス 2 0 のインキュベーション領域 7 9 内で実行される。

【 0 1 4 5 】

或いは、これらの工程は、デバイス 2 0 の外部で実行される。

【 0 1 4 6 】

凝集体 1 0 の形成工程及び測定工程は、第 1 の装置 1 による分析方法と同様である。

【 0 1 4 7 】

この方法は、測定工程の後に分析工程が続くという点で異なっている。分析工程は、所定の基準に従って液滴 6 が群 1 0 6、1 0 8 のいずれに属するかを決定し、測定工程の後に液滴 6 ごとに分類決定を行うことを可能にする。

【 0 1 4 8 】

分類決定に従い、液滴 6 は、誘導手段 9 8 により分類領域 9 4、9 6 のいずれかに誘導される。

【 0 1 4 9 】

図 7 に示される例では、強い蛍光強度信号の大部分が凝集体 1 0 の近傍に局在化した液滴 1 0 6 が、第 1 の分類領域 9 4 に誘導される。第 1 の群 1 0 6 の液滴は、例えば図 2 における第 3 の液滴 5 6 に対応する。

【 0 1 5 0 】

これらの液滴 1 0 6 は、例えば目的のタンパク質を生成できる細胞 9 0 を含有する。液滴 1 0 6 は任意に回収され、その内容物が他の技術により分析されるか、又は細胞 9 0 が再び培養にかけられる。

【 0 1 5 1 】

異なる信号、特に液滴 1 0 8 における実質的に均質な信号が測定された液滴 1 0 8 は、別の分類領域 9 6 へと誘導される。第 2 の群の液滴 1 0 8 は、例えば、細胞 9 0 を含有しない液滴、及び十分な量及び質でタンパク質を産生しない細胞 9 0 を含有する液滴を含む。

【 0 1 5 2 】

本発明による第 4 の装置 1 2 0 を図 8 に示す。この装置 1 2 0 は、抽出アセンブリ 1 2 2 を更に備えるという点で第 1 の装置 1 と異なる。

10

20

30

40

50

【0153】

抽出アセンブリ122は、液滴6を、2種の抽出液滴124、126、即ち主液滴124と副液滴126に分離することができ、副液滴126は凝集体10を含む。

【0154】

有利には、粒子12は磁性であり、抽出アセンブリ122は抽出を行うために磁力を印加することができる。

【0155】

更に、第4の装置120は、抽出アセンブリ122の下流に、本発明による第3の装置70と同様の分類アセンブリ72を備え、副液滴126を主液滴124から分離することを可能にしている。

10

【0156】

一代替例において、分類アセンブリ及び抽出アセンブリは同じものである。

【0157】

このような装置120は、細長い凝集体10による選択的捕捉を実現する上で特に有用である。粒子12によって捕捉される標的要素37は、選択された液滴の回収後に溶離されるためのものである。

【0158】

本発明による第5の装置は、追加の注入デバイス及び第2の検出領域を備える点で、第1の装置と異なる。追加の注入デバイスは、検出後に、液滴に要素を添加することができる。

20

【0159】

追加の注入デバイスは、例えば、液滴を融合させるためのデバイス、又はピコ注射 (picoinjection) のためのデバイスである。

【0160】

この第5の装置からの本発明による分析方法は、測定工程後の注入工程、及び注入工程後の測定工程を含む。

【0161】

例えば、シグナリング実体34は蛍光性であり、追加の注入工程中に、非蛍光性の追加の実体が添加される。追加の実体は、その蛍光性を除き、シグナリング実体34と同じ特性を有する。例えば、追加の実体は、標的要素37に対して、シグナリング実体34と同じ親和性を有する。第1の測定工程中に、蛍光性シグナリング実体34の捕捉レベルが決定される。注入後、追加の実体及びシグナリング実体34は、凝集体10近傍での標的要素37への結合について競合する。

30

【0162】

第2の測定は、特定の時間後に実行され、蛍光性シグナリング実体34の放出率を決定し、したがって、シグナリング実体34と標的要素37との間の結合の解離定数 K_{off} を決定することを可能にする。

【0163】

液滴のサイズに比べて小さいサイズの粒子12の分散体を使用することにより、液滴6中の粒子12の均質分布が確保され、したがって各液滴6中に相当なサイズの凝集体10が形成されることがほぼ確実になる。

40

【0164】

全体として、この方法は、液滴中の検体を定量化し、用量決定 (dosing) を可能にする。細長い凝集体10の形成は、単一のビーズをカプセル化するMazutisら (Nat prot 2013) に記載の試験と比較して、より良好な信号対ノイズ比及びより大きな動的間隔を得ることを可能にする。実際に、シグナリング実体34により生成される信号は、表面積が等しい球体の幅よりも小さい幅に集中する。したがって、図2に示されるピークの高さは、再局在化した同数のシグナリング実体34では、単一のビーズの場合よりも高くなる。

【0165】

50

この方法は、多くの生物学的分析方法で使用することができる。

【0166】

本発明による方法は、多くの種類の検体、生体分子、ポリペプチド、タンパク質、代謝産物、核酸、細胞、細胞小器官、微小粒子及びナノ粒子、ポリマー、コロイド、病原体、食品化合物、環境試料に適用することができる。

【0167】

本発明による装置は、1つの技術要素 (technological brick) として、より複雑なデバイス、特に高流量スクリーニングデバイス、オンチップ実験具 (on-chip laboratory)、実験室用計器、ロボット又はその他のデバイス内の「ポイントオブケア (point of care)」デバイスに組み込むことができる。

10

【0168】

更に、本発明による方法は、診断、薬物の発見、標的の発見、薬物の鑑定を可能にする複雑な手順に組み込むことができる。

【0169】

更に、本発明によるマイクロ流体システム及び本発明による方法は、他の種類のマイクロ流体部品に組み合わせるか含めてもよく、最先端技術において公知となっている他のマイクロ流体機能と組み合わせるか含めてもよい。

【0170】

更に、使用される試料のサイズが小さいため、本発明は、細胞試験、特に単一細胞のスクリーニング、及びデジタル生物学での用途において特に注目される。

20

【0171】

デジタルとは、化学的又は生物学的対象物の単一コピーに対して生物学的操作が実行され、そのような生物学的対象物のセットに対して実行された操作との対照として、各単一コピーに対する操作の結果を独立させることができることを意味する。

【0172】

生物学的又は化学的対象物とは、任意の分子状、超分子結晶性 (supramolecular crystalline)、コロイド状、細胞状、細胞下 (subcell) の対象物、例えば、限定されるものではないが、細胞、細胞小器官、ウイルス、変性天然DNA (modified natural DNA) 又は人工DNA、RNA又はその他の核酸、タンパク質、糖タンパク質、強力なタンパク質 (forceful proteins)、人工又は天然タンパク質、脂質、リン脂質、有機分子、有機金属分子、高分子、単離結晶、量子ドット又は量子点、ナノ粒子、小胞、マイクロカプセル及びその他の実体を意味する。

30

【0173】

本発明は、各種光学的方法、特に光学検出方法と組み合わせたとき、更に特に有用になりうる。

【0174】

本方法は、例えば、溶液中に存在する標的要素37を決定すること、即ち、溶液中の標的要素37の濃度を決定し、粒子12上又は液滴6内に存在する別の種に対する標的要素37の親和性特性を確立することを可能にする。

40

【0175】

本発明はまた、標的要素37とシグナリング実体34との間の解離定数 K_d の測定も可能にする。

【0176】

この場合、液滴6は、シグナリング実体34とは異なる蛍光性を有する定量化実体を更に含む。

【0177】

より具体的には、要素A (標的要素37) と要素B (シグナリング実体34) との間に於ける対A : Bの解離定数 K_d の定義は、

50

$$K_d = [A_{free}] [B_{free}] / [A : B]$$

式中、

$[A_{free}]$ は、溶液中で B に結合していない A の濃度であり、

$[B_{free}]$ は、溶液中で A に結合していない B の濃度であり、

$[A : B]$ は、溶液中の複合体 A : B の濃度であり、A は B に結合している。

種 A の全濃度は、

$$[A_{total}] = [A_{free}] + [A : B]$$

である。

種 B の全濃度は、

$$[B_{total}] = [B_{free}] + [A : B]$$

10

である。

【0178】

液滴 6 内のシグナリング実体 34 の濃度 $[B_{total}]$ は、ユーザーによって選択され、既知である。

【0179】

濃度 $[A_{total}]$ は、例えば、A が、液滴 6 内にカプセル化された細胞 90 により分泌される標的要素 37 である場合、先験的に既知ではない場合がある。

【0180】

本発明は、シグナリング実体 34 に対する、凝集体上に再局在化された複合体 $[A : B]$ の濃度を測定すること可能にする。

20

【0181】

この測定により、別のシグナリング実体 34 である定量化実体を介して A の定量化が達成される、制御濃度条件下での A と B との間の解離定数 K_d を推定することができる。

【0182】

これを行うための単純なケースは、以下の条件：

- 捕捉要素 36 が、標的要素 37 の 90 % 超、凝集体 10 上の A、有利には全体を捕捉するのに十分な量存在し、標的要素 37 に対する十分な親和性を有し、
- シグナリング実体 34 の濃度が標的要素 37 の濃度よりも大きく、
- A を定量化するために使用される定量化実体の濃度が標的要素 37 の濃度よりも大きく、定量化実体と標的要素 37 との間の解離定数が標的要素 37 の濃度よりも小さく、有利には 10 倍超である、

という条件に当てはまる場合である。

30

【0183】

特定の条件、即ち各標的要素 37 の存在は、捕捉要素 36 - 標的要素 37 - 定量化実体複合体の形成、及び / 又は捕捉要素 36 - 標的要素 37 - シグナリング実体 34 により形成される複合体の形成をもたらす。

【0184】

捕捉要素 36 - 標的要素 37 - シグナリング実体 34 複合体の数は、以下の式：

【0185】

【数 1】

40

$$K_d = A * \frac{B}{[A:B]} = (A_{total} - [A:B]) * (B_{total} - [A:B]) / [A:B]$$

【0186】

即ち、

【0187】

【数 2】

$$[A:B] = (A_{total} + B_{total} + K_d - \sqrt{(A_{total} + B_{total} + K_d)^2 - 4 * A_{total} B_{total}}) / 2$$

【0188】

を通して、標的要素 37 のシグナリング実体 34 に対する K_d に直接関連する。

【0189】

B_{total} が設定され、 A_{total} の変動性は無視することができ、 $[A:B] / A_{total}$ 比の単独の測定値から K_d を推定することができるという条件が存在する。したがって、 $A_{total} < B_{total}$ である場合、 $[A:B] / A_{total}$ は、

【0190】

【数 3】

$$\frac{1}{1 + K_d / B_{total}}$$

【0191】

の優れた近似となる。

【0192】

図 10 は、 A_{total} / B_{total} 比の異なる値に対する $\log K_d$ の関数として、 $[A:B] / A_{total}$ 比のシミュレーションを表している。

【0193】

前述の特定のケースにおいて、 $A:B$ 複合体に対応するシグナリング実体 34 の信号の、 A_{total} に対応する定量化実体の信号に対する比率により、 $[A:B] / A_{total}$ 比を評価することが可能であるため、 $[A:B] / A_{total}$ 比を介して K_d を扱えることは、高流速測定 of 明白な利点を表している。

【0194】

この比率は、液滴に関して実時間で取得することができ、 K_d に従って液滴を選別する基準となる。

【0195】

この方法は、各種シグナリング実体 34 に対する標的要素 37 の特異性、又は各種シグナリング実体 34 に対する捕捉要素 36 によって設定される分子又は分子会合体の特異性を決定するために適用可能である。この場合、Southall のシグナリング実体 34 として、例えば、異なる色のフルオロフォアにより標識された分子が、液滴 6 に注入される。例えば異なる波長の蛍光を取得することによって、各シグナリング実体 34 に対して生成された信号を同時に記録することが可能である。したがって、どのシグナリング実体 34 が凝集体 10 上に局在化しているかを決定し、それらを定量化することが可能となる。

【0196】

例えば、捕捉要素 36 は、細胞 90 によって分泌された抗体 37 を捕捉するプロテイン G であり、シグナリング実体 34 は、異なる色のフルオロフォアでそれぞれ標識される、異なる動物種の同種抗原である。この例では、各シグナリング実体 34 に対する信号の同時測定は、抗体である標的要素 37 が、ある動物種に対して特異的である（単一色で観察されるピーク）か、特異的でない（複数の色で観察されるピーク）かを決定することを可能にする。

【0197】

別の例では、粒子 12 は、相補的ヌクレオチド配列を捕捉できるヌクレオチド配列で覆われている。

【0198】

或いは、標的要素 37 は、細胞を含まないが *in vitro* 翻訳系を含む液滴 6 内で産生されるタンパク質である。

【0199】

この方法は、親和性分析及び標識生成物の定量化を行うのに有用である。例えば、標的要素が GFP のような蛍光タンパク質を含む融合タンパク質である場合がある。

【0200】

この方法は、目的の特性を有する液滴の選別、捕捉及び抽出を更に可能にする。

【0201】

一例において、この方法はサンドイッチの形成を含み、標的要素 37 は、一方では粒子 12 の捕捉要素 36 に結合し、他方ではシグナリング実体 34 に結合し、シグナリング実体 34 は蛍光性である。

10

【0202】

一例において、捕捉要素 36 は抗体である。

【0203】

一例において、シグナリング実体 34 は抗体である。

【0204】

一例において、標的要素 37 はタンパク質である。

【0205】

或いは、標的要素 37 は抗体又は抗体断片である。

【0206】

20

特定の例において、標的要素 37 は抗体であり、捕捉要素 36 は、プロテイン G、若しくはプロテイン A 又は抗体と結合する別のタンパク質、例えばプロテイン A / G 若しくはプロテイン L である。

【0207】

特定の例において、標的要素 37 は抗体であり、捕捉要素 36 は抗体である。

【0208】

一例において、標的要素 37 は抗体であり、捕捉要素 36 は抗体によって認識される抗原である。

【0209】

別の例において、標的要素 37 は抗体であり、シグナリング実体 34 は抗原である。

30

【0210】

別の例において、捕捉要素 36 は互いに同一ではない複数の捕捉分子からなり、標的実体 37 は互いに同一ではない複数の分子からなる。

【0211】

別の例では、分子的性質の異なるいくつかの標的要素 37 の存在を検出するために、又は同じ標的要素 37 上の異なる結合部位の存在を検出し、特徴付けるために、捕捉要素 36 - 標的要素 37 対又は捕捉要素 36 - 標的要素 37 - シグナリング実体 34 トリプレット (triplet) を、同時に分析してもよい。

【0212】

例えば、図 24 における液滴に示されているように、液滴は、性質の異なる複数の標的要素 37 a、37 b、及びそれぞれ標的要素 37 a、37 b のいずれかと複合体を形成することができる複数のシグナリング実体 34 a、34 b を含む。凝集体 10 の特定の粒子 12 は、第 1 の標的要素 37 a の捕捉に適合した捕捉要素 36 a を含み、他の粒子は、第 2 の標的要素 37 b の捕捉に適合した別の捕捉要素 36 b を含む。

40

【0213】

一例において、この方法は、測定された親和性に従って、抗体を分泌する不死化細胞を選択することを可能にする。次いで、選別された細胞は再び培養にかけられる。

【0214】

別の例において、この方法は、抗体の遺伝子配列を検索する前に、測定された親和性に従って、抗体を分泌する非不死化細胞を選択することを可能にする。

50

【 0 2 1 5 】

別の例において、この方法は、血液中に存在する異なる種類の細胞によって分泌されたサイトカインを定量化することを可能にする。

【 0 2 1 6 】

特定の用途において、粒子 1 2 の凝集は可逆的である。

【 0 2 1 7 】

特定の場合において、標的要素 3 7 の存在は、凝集を不可逆にし、凝集アセンブリ 3 0 における形成時に凝集体 1 0 を固化させる。したがって、凝集体 1 0 は、標的要素 3 7 を含有する液滴 6 中にのみ、安定的に先在する。標的要素 3 7 を含有しない液滴では、凝集体 1 0 が読み取り領域 2 6 に入っていない限り、粒子 1 2 凝集の可逆性により、凝集体 1 0 は溶解する。選択された磁化及びフルイディクスの条件において、凝集体 1 0 は、この前凝集 (p r e - a g g r e g a t i o n) が存在する場合にのみ、自身を形成し配向させることが可能になる。前凝集は、シグナリング実体 3 4 を介さない方法により、閾値要素 (t h r e s h o l d e l e m e n t) 3 7 を含有する液滴に、図 2 に従うピークの取得を限定する。

10

【 0 2 1 8 】

この方法は、産生された抗体の親和性の測定を実施することにより、抗体産生細胞をスクリーニングすることに特に適用可能である。例えば、細胞が、抗体を産生できる細胞 B である場合、少なくとも 1 種の抗原に対するこの抗体の親和度は、本発明の方法によって決定される。また、液滴は、決定された親和度に従って、本発明の方法により選別される。

20

【 0 2 1 9 】

別の用途において、この方法は、白血球の異種集団による 1 種又は複数のサイトカインの分泌を分析することを可能にする。例えば、細胞が 1 種又は複数の種類のサイトカインを産生し得る細胞である場合、サイトカインは、本発明の方法によって定量化される。分析の結果は、潜在的な診断上の価値を有する、細胞の状態に関する一片の情報である。

【 0 2 2 0 】

この方法の適用例を以下に説明する。

【 0 2 2 1 】

以下の実施例の手順は、

30

- 粒子 1 2、シグナリング実体 3 4 及び標的要素又は有利には液滴中で標的要素を生成しうる系を含有する、複数の水溶液の調製、液滴生成チップの入口での水溶液の注入、
- 試験の全試薬を含む液滴の生成、
- 液滴を含有する溶液のインキュベーション、
- 本発明によるデバイス (2 種類のデバイスが以下の実施例 1 及び 2 に記載されている) への液滴の注入、
- 試験の結果の測定、
- 任意に測定値に応じた液滴の選別

を含む。

【 0 2 2 2 】

40

[実施例 1]

タイプ 1 の液滴生成及び液滴測定用デバイス

区画化とも呼ばれる、液滴の生成は、試薬溶液及び試料溶液をチップ上で混合した後に行う。

【 0 2 2 3 】

試薬及び試料の変質を避けるために、区画化まで溶液を氷中に保存する。

【 0 2 2 4 】

区画化を開始する直前に、鉱油 (S i g m a A l d r i c h 社、 # 3 3 0 7 6 0) を満たした 1 m L の H a m i l t o n 社製シリンジに接続したタンクへと、試薬溶液を吸引する。

50

【0225】

スクリーニング対象試料を、区画化の直前に希釈標準溶液 (work solution) と混合し、次に、予めフッ素化オイル (3M社、NOVEC HFE-7500) を満たしたガラスバイアルに移し、バイアルを氷上で4℃に維持する。

【0226】

有利にはPTFE製の内径0.3mmキャピラリー (Fischer社販売、#11919445) により、バイアル及び試薬溶液のタンクを液滴形成用デバイスに接続することを可能にする。

【0227】

これらの溶液の両方を、液滴形成用チップに注入し、両溶液のそれぞれの等容積を含む液滴の生成を可能にする。

10

【0228】

液滴の容積は、フッ素化オイルの流量に基づいてユーザーが選択する。有利には、液滴の容積は33ピコリットルである。フッ素化オイルはキャリア流体8となる。キャリア流体8は液滴を含むエマルションの連続相を形成する。

【0229】

試験試薬の溶液とスクリーニング対象試験試料の溶液とを、同じ流速で、有利には各溶液について200マイクロリットル/時間で、チップに注入する。流速は、標準シリンジポンプシステム、例えばCetoni社製neMESYSポンプによって、又は圧力制御ポンプ、例えばFluigent社によって市販されているシステムによって、向上する。

20

【0230】

液滴は、図11及び図12に示される流体力学的集束連結部において生成される。ここで、外相は、2質量%/容積の界面活性剤 (例えば、2つのペルフルオロポリエーテル (PFPE) 尾部 (分子量約6,000 g/mol) 及び1つのPEG頭部 (約600 g/mol) を含むトリブロックコポリマー (three-block copolymer)) を添加した、フッ素化オイル (3M社、NOVEC HFE-7500) である。

【0231】

図11及び図12は、他の試薬と混合された磁性ビーズを含有する流れと、右側に位置する流体力学的集束連結部における液滴形成前の試料を含有する流れとを混合することを可能にする流れ集束デバイス (flow focusing device) を表している。図11において、磁性粒子の直径は500nmであり、図12において、磁性粒子の直径は200nmである。

30

【0232】

第2の工程は収集工程である。有利にはリング形磁石 (Amazing magnets社製H250H-DM) により発生させた磁場の下で4℃に維持したバイアルにより、液滴の収集を可能にする。短いキャピラリーにより、バイアルをチップに接続することを可能にする。理想的には、出力キャピラリーは20cm未満であり、有利には10cmである。

【0233】

有利には37℃にて20~90分間、磁場下で、液滴がインキュベートされるように設定するが、時間及びインキュベーション温度は、実施される分析、並びに産生実体90の種類及び調査される標的要素37の種類に依存する。

40

【0234】

インキュベーションの後に、エマルションを含有するバイアルを移し、常に磁場下で4℃に維持する。

【0235】

第1のタイプのデバイスは、図1に記載された本発明によるデバイスである。

【0236】

液滴を含有するバイアルは再注入のためにチップに接続され、バイアルは、一方ではチ

50

ップに接続され、他方では、圧力システム、加圧ポンプ又はシリンジ及びそのポンプに接続されて、循環アセンブリ 22 を形成する。

【0237】

離隔アセンブリ 31 は、チップに接続された 2 つのオイル入口を含む。これらの入口は、図 13 に示すように、エマルションの液滴を離隔することを可能にするオイル、有利にはフッ素化オイルを注入するためのものである。

【0238】

離隔オイルの流速は、有利にはそれぞれ 300 マイクロリットル / 時間に設定し、循環アセンブリの流速は、有利には 50 マイクロリットル / 時間に設定し、流速及び液滴の再注入周波数を調整して 250 ~ 1,000 Hz の間に含まれる周波数が得られるようにする。

10

【0239】

一对の永久磁石 38、有利には K & J Magnetic 社提供の #BC 14 - N52 を、主チャンネル 24 周囲のチップの両側に配置した。これらの磁石 38 は、液滴再注入の際にビーズ凝集体を発生させ配向させるためのものである。

【0240】

液滴の分析及び選別のために、設備、例えばレーザー又は光電子増倍管を制御するためのソフトウェアを作製した。選別システムは、実時間で信号の分析を実施するために FPG A カードを必要とする。

【0241】

20

離隔アセンブリ通過後、滴下 1 個ごとに測定を行い、図 14 に示された読み取り領域の後で、これらの液滴を選別して所望の出口に向けることができる。

【0242】

選別及び回収が所望される場合、選別液滴及び非選別エマルションを氷上に収集し、標準的手順により液滴の内容物を回収する。

【0243】

[実施例 2]

タイプ 2 の液滴測定用デバイス

第 2 タイプの測定デバイスは、二次元平面内で生成された液滴を貯蔵するためのチャンバーである。この例には、そのようなチャンバーを作製するための 2 つの可能な選択肢がある。

30

【0244】

第 1 の選択肢は、PDMS における従来の微細製造によって作製されたチャンバーであり、図 3 ~ 図 6 に示されるような、チャンバーの崩壊を避けるために規則的に配置されたピラーを有利には含む。

【0245】

第 2 の選択肢は、図 14 及び図 16 に示されるような、発明 PCT / FR 2009 / 051396 によるガラスチャンバーである。有利には、このアプローチは、液滴を変形させることなく長期間 (1 時間超) にわたって液滴のインキュベーションを行うことを可能性にする。したがって、液滴形成後、そのようなチャンバー内に液滴を直接収集してもよい。

40

【0246】

図 15 及び図 16 は、本発明による二次元の読み出しデバイスの例を示しており、ここでは、ガラスチャンバー内で、チャンバーの一方の側に位置する永久磁石によって磁場が処理される。

【0247】

以下の実施例に関する一般事項

以下の実施例では、液滴の調製は、

- 以下の実施例において、粒子 12、シグナリング実体 34 を含有する「試薬溶液」、及び標的要素を含有する「スクリーニング対象試料溶液」と称される、2 種の水溶液を

50

調製すること、

- 液滴を生成するためにチップ入口に両方の水溶液を注入すること、
- 両方の溶液のそれぞれの等容積を含む液滴を生成すること、
- タイプ1のデバイス内で液滴を測定すること、
- 任意に液滴を選別すること（実施例4）

を含む。

【0248】

両方の水溶液の調製について一般的に説明し、この標準的手順との相違点について必要に応じて実施例の中で言及する。

【0249】

10

a) 試薬溶液の調製

この溶液に含まれる要素は、液滴生成前における試薬の凝集を避けるために、有利には互いに不活性である。

【0250】

この第1の水溶液は、

- ここでは捕捉要素36、ここではプロテインGにより官能化されたコロイド状磁性粒子である粒子12、及び
- ここでは蛍光で標識された抗原、例えばフルオロフォアAlexafluor488で標識された抗原であるシグナリング実体34、
- 液滴6の検出を可能性にする着色剤、例えばスルホローダミンB、
- ここでは蛍光性である抗体、例えばフルオロフォアAlexafluor647で標識された抗マウスモノクローナル抗体の断片を定量化するための実体、
- 希釈標準溶液

20

を含有する。

【0251】

各試薬の濃度については、各実施例に関して詳述する。

【0252】

これらの試薬は、希釈標準溶液と称する溶液で希釈する。希釈標準溶液は、例えば、

- Percoll (Sigma Aldrich社により提供) 30 v/v %、
- NaCl 50 mM、
- pH 7.4のHEPES緩衝液25 mM、
- Life Technologies社により提供されるPluronic F-68 0.1 v/v %、
- Thermo Scientific社製Super Low IgG血清5 v/v %

30

を含む。

【0253】

この容量の希釈標準溶液に対し、Life Technologies社により提供されるGlutaMAX（登録商標）を補充したRPMI-1640を最後に添加し、最終容量を得る。

40

【0254】

使用前に磁性コロイド状粒子12を処理する。粒子12は、貯蔵溶液中のChemiclell社により提供される粒子(ScreenMAG)又はAdemtech社により提供される粒子(Bio-Adembeads)である。これらの粒子を、貯蔵溶液を抑制するために磁性担体(magnetic support)上に保持するが、10 w/w %、有利には粒子の初期容積の10倍にて、過量のPluronic F-127 (Sigma Aldrich社)中に懸濁させ、室温で30分間インキュベートする。

【0255】

この処理の後、磁性コロイド状粒子12をPBSで2回洗浄し、希釈標準溶液中に懸濁させる。

50

【0256】

有利には、希釈標準溶液中に懸濁した粒子12は、試験試薬を添加する前に10分間超音波処理に供する。

【0257】

蛍光試薬を使用前に処理する。蛍光試薬は、例えば、シグナリング要素34、液滴の検出着色剤及び定量化試薬である。少なくとも12, 000 G、4にて5分間、蛍光試薬を遠心分離した後、試薬の凝集体の痕跡を抑制する。

【0258】

b)スクリーニング対象試料溶液の調製

スクリーニング対象試料溶液は、

- 捕捉要素36によって捕捉可能な標的要素37、
- 又はインキュベーション段階において液滴中でこの標的要素37を合成できる産生実体90（この系は、例えば、細胞、又はDNA若しくは*in vitro*発現系であってもよい。この場合、標的要素37は、スクリーニング対象試料溶液中に予め存在してはいない。）

- 希釈標準溶液を含む。

【0259】

使用される細胞の濃度は、所望される液滴の大きさに依存する。有利には、液滴1個当たりの細胞の濃度は、液滴1個当たり細胞0.3個である。液滴33ピコリットルを含むエマルションは、1ミリリットル当たり 30×10^6 個超の液滴を含有する。33ピコリットルの液滴の場合、液滴1個当たり0.3個の細胞を有するためには、概算して、スクリーニング対象試料溶液中で1ミリリットル当たり 18×10^6 個の細胞という濃度（液滴に対して2倍の濃度）が必要となる。

【0260】

両方の水溶液は50/50の比で1個の液滴中に混合されるため、スクリーニング試料溶液中の細胞濃度は最終濃度の2倍になることに留意すべきである。

【0261】

細胞調製手順は、細胞の種類及び実験の目的に依存する。

【0262】

[実施例3]

抗原に対するモノクローナル抗体の親和度の定量化及び測定。

この実施例では、標的要素37は、スクリーニング対象溶液に既に含有されている抗体であり、この実施例は細胞には当てはまらない。

【0263】

この実施例の目的は、複数の色を用いた結合試験の可能性を実証することである。別の目的は、別の信号により再局在化信号を正規化する可能性を実証することである。これにより、再局在化抗体（定量化実体）に対する軽鎖結合のためのタンパク質の信号による正規化を可能にすることで、抗原（シグナリング実体）の局在化信号から K_d を評価することが可能になる。

【0264】

この実験において、液滴の容量は33ピコリットルである。

【0265】

スクリーニング対象試料溶液は、30 v/v %のPercoll、0.1 v/v %のPluronic F-68 HEPES 18 mMを補充した2 mM GlutaMAX添加RPMI-1640中に希釈した、異なる濃度の抗hTNF α モノクローナル抗体（Sigma Aldrich社により提供されるT6817）を含有する。

【0266】

スクリーニング対象試料溶液中の抗hTNF α モノクローナル抗体の濃度は、0 nM、10 nM、25 nM又は50 nMである。

【0267】

試薬溶液は以下の試薬：

- 磁性粒子 8.33 v/v % (Ademtech社 #0433)、
- Fab-DL650 抗マウス Fab'2 (定量化実体) 200 nM、
- hTNF α -AF488 (シグナリング実体) 100 nM、
- スルホローダミン B (液滴標識用) 1 μ m

を含有する。

【0268】

抗体 Fab-DL650 断片を、DyLight-650 (Abcam社により市販される、ab98760) と接合したヤギ F(ab')₂ 抗マウス IgG (Fab')₂ から調製し、パパインで分解し、プロテイン G のカラムで精製する。

10

【0269】

この溶液に対し、30 v/v % の Percoll、0.1 v/v % の Pluronic F-68 及び HEPES 18 mM を補充した RPMI-1640 及び 2 mM の Glutamax を最後に添加した。

【0270】

この溶液により、抗原-AF488 50 nM、Fab-DL650 100 nM、及び抗原に対するモノクローナル抗体それぞれ 0 nM、5 nM、12.5 nM 又は 25 nM を含有する、4 つの異なるエマルションを得ることが可能になる。

【0271】

次いで、タイプ 1 のデバイスにより液滴を分析する。

20

【0272】

この実験により、図 17 に示されるように、二次試薬の 2 つの蛍光読取り値を用いて液滴中の柱における磁性粒子に対する結合試験を実施することの可能性を示すことが可能になる。更に、このアプローチは、抗原の結合信号と抗原捕捉に關与する抗体の量とを相関させることによって、結合親和性を特徴づけることを可能にする。実際に、抗体の濃度とは独立のパラメータを分析から抽出してもよい。

【0273】

図 17 は、2 つの色により液滴の軌跡 (trail) を表した実時間蛍光測定値を示し、一方がシグナリング実体 34 (複合体 AB、図 17 の薄い灰色) に対応し、一方が定量化実体 (化合物 A、濃い灰色) に対応し、A の量を 0 nM から 25 nM に増加させた場合を示している。図 18 は、この実験に対応する二次元グラフであり、ここで、各点は、横座標に定量化実体の色についての液滴の蛍光極大値、縦座標にシグナリング実体 34 についての蛍光極大値を示している。図 19 は、同じ液滴のセットについて二次元グラフを表し、ここで、各点は、横座標に定量化実体の色についての積分値、縦座標にシグナリング実体 34 についての積分値を示している。

30

【0274】

「極大」信号間の関係は、($R^2 = 0.79$ の線形回帰によって示唆される) データ点の分散にもかかわらず、とりわけ液滴全体にわたる凝集体の形状及び位置の変動により、全体として線形となることがわかる。「積分」信号間の関係は、より良好な R^2 ($R^2 = 0.90$) を有する線形回帰によって特徴づけられ、点の分散ははるかに小さく、上述のように AB/A 比から Kd を推定することを可能にすることがわかる。

40

【0275】

[実施例 4]

ハイブリドーマが分泌する抗体の親和度に従った、単一細胞の尺度におけるハイブリドーマの選別。

この実験の目的は、実施例 3 と同様の試薬及びアプローチを使用することにより、分泌されるモノクローナル抗体の結合親和度に従う抗体産生細胞のスクリーニングを実証することである。特に、2 種類のハイブリドーマ：抗 TNF アルファ (25H12 株) 抗体を分泌するハイブリドーマと抗 c-Myc 抗体 (9E10 株) とを区別し選別することが可

50

能であることがわかっている。

【0276】

この実施例では、親和度を推定するだけでなく、更にその親和度に従って細胞を選別する。

【0277】

この実験において、液滴の容積は33ピコリットルである。

【0278】

スクリーニング対象試料溶液は、実施例1に記載の希釈標準溶液中に懸濁された、 1.3×10^6 個のハイブリドーマ9E10細胞及び 4.5×10^6 個のハイブリドーマ25H12細胞を含有する。

10

【0279】

試薬溶液は、希釈標準溶液中に懸濁した以下の試薬：

- 磁性粒子 (Ademtech社 #0433) 8.33 v/v %、
- 抗体 - DL650抗マウスFab'2断片 (定量化実体) 100 nM、
- hTNF α - AF488 (シグナリング実体) 100 nM、
- スルホローダミンB 2 μ m

を含有する。

【0280】

これにより、50 nMのhTNF α - AF488、50 nMのFab - DL650、及び25H12ハイブリドーマのhTNF α に対して又は9E10ハイブリドーマのc - M y cに対して抗体を分泌するハイブリドーマ単一細胞を含むエマルジョンを得る。25H12細胞は細胞の25%を占め、9E10細胞は細胞の75%を占める。

20

【0281】

抗原を緑、定量化実体を赤として、異なる蛍光チャネルについて、蛍光を測定する。この実施例において関係する信号は、蛍光極大値である。有意な緑色及び赤色の蛍光信号を示す液滴を選別し、収集する。

【0282】

Mazutisら (Nat prot 2013) に記載されるように、選別し収集した液滴を破壊し、細胞を回収する。

【0283】

30

次いで、選別液滴から又は非選別エマルジョンから抽出された細胞の溶液に対して実時間PCRを実行し、2種類の制限酵素を使用してPCR産物を分解する。BamHI酵素は、9E10細胞由来のDNA c上に制限部位を有し、KpnI酵素は、25H12由来のDNA c上に制限部位を有する。分解産物を電気泳動によって分析する。図20及び図21を参照すると、本方法は、デバイスによるスクリーニング後に25H12細胞の濃縮を可能にすることがわかる。

【0284】

したがって、本発明は、シグナリング実体を認識する抗体を分泌する単一細胞を高流速で特異的に選択することを可能にする。

【0285】

40

図20及び図21は、本発明によるハイブリドーマの選別を示している。図20は、二次元のグラフを表し、ここで、各点は、横座標にシグナリング実体の色についての液滴の蛍光極大値、縦座標に定量化実体についての蛍光極大値を示している。黒い枠は、選別を実行するために選択された値の範囲を示す。

【0286】

図21は、実時間PCRによる分析及びBamHIによる酵素分解 (左側の4列の組) 又はKpnI (右側の4列の組) による酵素分解を示したものであり、純粋なハイブリドーマ25H12 (抗TNFアルファ) 及び9E10 (抗cMy c) のDNAから (各組の最初の2列)、25/75混合物において (各組の3番目の列)、並びに最後にTNFアルファを認識するためのバイオテストを用いて、本発明によりこの混合物を濃縮した後 (

50

各組の4番目の列)である。選別後の25H12細胞において約20倍の濃縮が存在する。

【0287】

[実施例5]

単一細胞の尺度において分泌されたサイトカインの定量化。

この実施例の目的は、サンドイッチ免疫学的試験の包括的アプローチを用いて、単一細胞の尺度において分泌されたサイトカインを検出及び定量する可能性を実証することである。この実施例では、捕捉要素36はストレプトアビジンに結合したビオチン化抗体であり、シグナリング実体34は蛍光検出抗体である。

【0288】

粒子をストレプトアビジンで官能化し、捕捉抗体をビオチン化する。捕捉抗体を粒子上にカップリングさせるために別の方法を使用することも可能である。

【0289】

カップリング方法は共有結合又は非共有結合である。重要な基準は、シグナリング実体が粒子の表面に直接捕捉されないことである。

【0290】

ここでは、本発明により、及びタイプ1の測定デバイスを用いて、単一細胞の尺度において、炎症又は感染の多くの場合におけるバイオマーカーサイトカインであるガンマ-インターフェロン(IFN γ)の分泌を定量化するための方法を示す。このような生物学的アッセイは、機能的免疫学的試験の範囲内で、患者の免疫系の操作を試験するために使用されることがある。そのような試験では、免疫細胞が刺激され、そのサイトカイン分泌が測定される。

【0291】

この実施例では、25~40pLの容量で、液的中の組換えIFN γ をアッセイする可能性を実証した。

【0292】

ただし、このアッセイは、個々にカプセル化された細胞に使用するという目的を有しており、これを行うための一般的手順を以下で説明する。

【0293】

各液滴は、免疫サンドイッチ系に必要な全ての要素を含有し、サンドイッチは、例えば、ストレプトアビジンで覆われた磁性蛍光ビーズ、ビオチン化抗体及び蛍光抗体からなる。両方の種類の抗体が、IFN γ の2つの異なるエピトープに向けられる。

【0294】

希釈標準溶液は、ある培養培地及び細胞活性化体(cell activator)(例えば、マイトジェン、抗原)を含有する。

【0295】

細胞及び免疫試験サンドイッチ系を液滴内にカプセル化した後に、エマルションをインキュベートする。磁場の作用下において、液滴内で粒子を配向させ、柱を形成する。ストレプトアビジン-ビオチン系による捕捉抗体の非共有結合の場合、捕捉抗体上に位置する複数のビオチンを介してビーズを架橋することによって、柱へのビーズの凝集を不可逆にする。

【0296】

インキュベーションにより分泌を可能にし、任意に分子同士の結合を可能にする。インキュベーション後、本発明によるタイプ1のデバイスにより液滴を分析する。

【0297】

細胞を含む液滴は、活性化信号に応答せず、ガンマインターフェロンを一切分泌せず、液滴全体内に蛍光抗体を含む。ガンマインターフェロンを分泌する液滴は、ビーズのストレプトアビジン表面上に再局在化したビオチン化捕捉抗体-IFN γ -蛍光検出抗体サンドイッチを有する。したがって、これらの液滴内で、凝集体における再局在化蛍光を測定する。

10

20

30

40

50

【0298】

ガンマイインターフェロンがより多く分泌されるほど、粒子ライン上の蛍光はより多くなり、蛍光ピーク及び/又は蛍光信号の積分値はより大きくなる。したがって、これにより、刺激された細胞によって分泌されたガンマイインターフェロンの定量化が可能になる。

【0299】

この実施例では、以下の試薬を使用することにより、本発明によるガンマイインターフェロンの検出及び定量化のための試験を実施することが可能であることを示した。

【0300】

試薬溶液：

- ビオチン化捕捉抗体 (Mabtech社 7-B6-1) 200 nM
- フィコエリトリン (PE) (Miltenyi社 45-15) で標識した検出抗体 (シグナリング実体) 200 nM
- 希釈標準溶液: Percoll (Sigma社) 30% / Pluronic F-68 (LifeTech社) 1% / PBS (Sigma社) 69%。

10

【0301】

スクリーニング対象溶液：

- 組換え IFN γ 1B (Miltenyi社) 0又は20又は200 nM
- 磁性ビーズ screenMAG/R ストレプトアビジン 0.5 μ m (Chemical社) (エマルジョン 120 μ l で 20 μ l)。

20

【0302】

実施例1及び3のいずれかと同様のデバイスを使用して、流れに作用させることにより、3種のスクリーニング対象溶液から液滴を生成し、IFN γ 濃度ごとに異なるサイズが得られるようにする(ただし、所望の最終濃度を得るために、水溶液の2つの注入流を常に等しく保つ)。液滴は、0 nMのIFN γ では約25 pL、最終10 nMでは31 pL、及び最終100 nMでは38 pLである。オレンジ色の検出抗体の再局在化を測定するために、液滴のこれら3つの集団を混合し、インキュベートし、分析する。この手順は実施例3のものと同様である。2個の蛍光チャンネル: 検出抗体 (PMT3) のオレンジ色、ビーズ (PMT4) の赤色について蛍光を測定する。この実施例において考慮する信号は、蛍光極大値である。

【0303】

磁性ビーズのラインの形成又は配向が不十分な場合に対応する、PMT4 (ビーズ) 上の値が低い (PMT4 < 0.34) 液滴は分析から除外した。

30

【0304】

残りの液滴の分析は、液滴の3つの集団をサイズ及び検出抗体信号 (PMT3) により区別することが可能であることを示しており、このことは、図22及び図23に示すように、液滴中のIFN γ を定量化する可能性を実証している。

【0305】

分析は、PMT3及びPMT4の信号間に直線関係があることも示しており、このことは、磁性ビーズ当たりの検出抗体の量が一定であること、及びシグナリング実体信号 (PMT3) の変動は凝集体の形状の変動に直接相関することを示唆している。

40

【0306】

図22及び図23は、本発明によるマイクロ流体液滴中のサイトカイン (ガンマイインターフェロン、IFN γ) の検出及び定量化を示す。図22では、0、10又は100 nMのIFN γ を含有する液滴の3つの集団が、そのサイズ (幅) に対して、検出抗体に対応するオレンジ色の極大蛍光 (PMT3) に従って表されている。液滴の3つの集団は、ビーズに対応する赤色の極大蛍光 (PMT4) に対して、オレンジ色の極大蛍光 (PMT3) に従って、図23に示されている。

【0307】

[実施例6]

一次細胞が分泌する抗体の結合活性に従った、単一細胞の尺度における、一次細胞、より

50

具体的にはBリンパ球（形質細胞）の選別。

この実験の目的は、実施例3と同様の試薬及びアプローチを使用することにより、分泌されるモノクローナル抗体の結合活性に従う、抗体を産生する一次細胞のスクリーニングを実証することである。特に、Bリンパ球が分泌するモノクローナル抗体の結合活性に従って、Bリンパ球を区別し選別することが可能であることを示す。

【0308】

Bリンパ球をマウスの脾臓から予め抽出し、標準手順（Pan B kit II # 130-104-443、Miltenyi Biotec社）に従って精製する。この実施例において、捕捉要素36は、ピオチン化抗原、より具体的には「TTピオチン」であり、例えばThermoFisher社から提供される標準キットの標識手順により、予めピオチンで官能化された、破傷風トキソイドタンパク質（protein Tetanus Toxoid）である。この実施例では、標的抗原に対する抗体の結合活性のみが観察されるが、加えて、それらの抗体の結合活性に従って細胞が選別される。

【0309】

この実験において、液滴の容積は40ピコリットルである。

【0310】

この実験において、希釈標準溶液は、

- Super Low IgG血清（#SH30898.03、Thermo Scientific社）5v/v%、
- pH7.4のHEPES緩衝液25mM、
- Life Technologies社により提供されるPluronic F-68 0.1v/v%、
- 抗生物質 - 抗真菌剤（#15240、ThermoFisher社）1v/v%を含む。

【0311】

この容量の希釈標準溶液に対し、Life Technologies社により提供されるDMEM-F12を最後に添加し、最終容量を得る。

【0312】

生成後、分析及びスクリーニングの前に、2種のエマルションを生成し、共通化した。大部分のエマルション（約10百万個の液滴）は、スクリーニング対象細胞及び検出試薬からなる。約100万個の液滴を含む、いわゆる陰性対照エマルションである第2のエマルションは、検出試薬のみからなる。2種のエマルションは、2種の異なる濃度のオレンジ色フルオロフォア、スルホローダミンBの使用によって区別可能である。

【0313】

スクリーニング対象試料溶液は、実施例1に記載されているように、希釈標準溶液中に懸濁された 6×10^6 個の精製一次細胞を含有する。

【0314】

試薬溶液は、希釈標準溶液中に懸濁した以下の試薬：

- ストレプトアビジン磁性粒子（Ademtech社#0433）33.33v/v%、
- ウサギFab'2抗Fcマウス（anti-Fc mouse）AF647、JacksonIR社#315-606-146（定量化実体）200nM、
- TTピオチン（捕捉要素36）100nM、
- スルホローダミンB（Sigma Aldrich社#S1402）0.8又は1.6又は2.4µM

を含有する。

【0315】

これにより、50nMのピオチン化抗原（TTピオチン）、100nMのウサギFab'2抗FcマウスAF647、及び抗原（破傷風トキソイド）に向けられる抗体を分泌する又は分泌しない独自の一次細胞を含むエマルションを得る。

【0316】

定量化実体について赤色の蛍光を測定した。この実施例において考慮する信号は、蛍光極大値である。強い赤色蛍光信号を有し、適当なサイズを有し、一次細胞のエマルジョン（スルホローダミン B の弱いオレンジ色蛍光）に由来する液滴を選別し、収集し、破壊し、次いで実施例 4 のように細胞を回収する。

【0317】

図 25 は、定量化実体のチャンネル上で測定された蛍光信号についてカウントされた液滴数のヒストグラムを表す。横座標は、定量化実体の色の蛍光極大値を表し、縦座標は、この蛍光値において測定された液滴数に対する底 10 の対数を表す。スクリーニング対象一次細胞のエマルジョンについて得られた値を黒い実線でプロットしている。陰性対照エマルジョンについて得られた値を灰色の点線でプロットしている。黒丸の点の垂直線は、それを超える液滴が選別で選択される閾値を示す。

10

【0318】

次に、選別液滴又は非選別細胞から抽出された細胞の溶液に対して、即ち、精製（Milltenyi 社製キット）の後、マイクロ流体スクリーニングの前に、ELISpot を実施した。ELISpot によって分析された細胞を、抗体の分泌及び抗 T T 抗体の分泌について試験する。

【0319】

選別された一次細胞及び精製されているが選別されていない一次細胞の ELISpot による分析を実施する。マウス IgG ELISpot[®] B A S I C キット（Mabtech 社 # 3825 - 2 A）に記載の手順を使用して、2 種の標識について分析を実施した。第 1 の抗体、いわゆる IgG については、「トータル Ig ELISpot（Total Ig ELISpot）」手順を使用し、抗体分泌細胞の数を検出することを可能にする。第 2 の抗体、いわゆる T T については、「抗原特異的 Ig ELISpot、プロトコール II」手順を使用し、抗原 T T に対する結合活性を有する抗体分泌細胞の数を検出することを可能にする。

20

【0320】

下記の式に従って濃縮係数 η を計算した。式中、 $N_{+,0}$ は選別前の陽性細胞の数、 $N_{+,1}$ は選別後の陽性細胞の数、 $N_{-,0}$ 及び $N_{-,1}$ はそれぞれ選別前及び選別後の陰性細胞の値である。

30

【0321】

【数 4】

$$\eta = \frac{N_{+,1}}{N_{-,1}} \bigg/ \frac{N_{+,0}}{N_{-,0}}$$

【0322】

実験では、5,000 個の非選別細胞について、T T に対する 51 個の陽性細胞及び 4,949 個の陰性細胞が得られ、1,000 個の選別細胞について、T T に対する 132 個の陽性細胞及び 868 個の陰性細胞が得られる。

40

【0323】

本実験は、選別後に T T に対する結合活性を有する細胞の分泌において、約 15 倍という濃縮係数 η を示し、これらの細胞は、検出された抗体分泌細胞の 93% に相当する。

【0324】

ELISpot 試験は、本方法により、デバイスを用いたスクリーニングの前に一次細胞の濃縮が可能であることを示すことを可能にしている。

【0325】

したがって、本発明は、捕捉要素を認識する抗体を分泌する単一次細胞の高流速での特異的選択を可能にする。

50

【0326】

[実施例7]

モノクローナル抗体の定量化及び2Dチャンバーにおけるその抗原との結合の検出。

この実施例では、標的要素37は、スクリーニング対象溶液に既に含有されている抗体であり、この実施例は細胞には当てはまらない。

【0327】

この実施例の目的は、タイプ60のデバイス、即ち、液滴が単一の層に二次元的に分布するチャンバーにおいて、所与の抗原に対するモノクローナル抗体の濃度に従って計量的反応を測定する可能性を実証することである。この実施例において、シグナリング実体は、蛍光抗原、より具体的には「TT-AF488」であり、例えばThermoFisher社により提供される標準キットの標識手順により、AlexaFlour-488フルオロフォアを用いて予めビオチンで官能化された、破傷風トキソイドタンパク質である。この実施例において、液滴の柱を形成するために使用される磁性粒子は、捕捉実体、ここでは、「CaptureSelect(商標)ビオチン抗LCカッパー(マウス)コンジュゲート(Biotin Anti-LC-kappa (murine) conjugate)」(ThermoFisher社#7103152500)の飽和度により標識される。

10

【0328】

この実験において、液滴の容量は40ピコリットルである。

【0329】

20

この実験において、希釈標準溶液は、

- Super Low IgG血清(#SH30898.03、Thermo Scientific社)5v/v%、
 - pH7.4のHEPES緩衝液25mM、
 - Life Technologies社により提供されるPluronic F-68 0.1v/v%、
- を含む。

【0330】

この容量の希釈標準溶液に対し、Life Technologies社により提供されるフェノールレッドなしのDMEM-F12を最後に添加し、最終容量を得る。

30

【0331】

試薬溶液は、希釈標準溶液中に懸濁した以下の試薬：

- 捕捉実体の飽和度により予め標識された、ストレプトアビジン磁性粒子(Ademtech社#0433)33.33v/v%、
 - ウサギFab'2抗FCマウスAF647、JacksonIR社#315-606-146(定量化実体)150nM、
 - TT-AF488(捕捉実体)50nM、
 - スルホローダミンB(Sigma Aldrich社#S1402)0.8又は1.6又は2.4μM
- を含有する。

40

【0332】

これにより、蛍光抗原(TT-AF488)25nM、定量化実体(ウサギFab'2抗FCマウスAF647)75nM、及び以下の値：0、4.2、12.5、20.8、42(図S7bのみ)、62.5、83.3、125、208、250(図S7bのみ)を含む濃度域における、抗原(TT7)に対する結合活性を有する、モノクローナル抗体を含むエマルションを得る。抗TT抗体、いわゆるTT7は、Brandon J DeKoskyらの論文、表題「High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire」、Nature Biotechnology、31巻、166~169頁、2013年発行において発表された配

50

列からの組換えタンパク質の発現により得た。

【0333】

測定された複数のエマルションは、一定範囲の濃度のオレンジフルオロフォア、スルホローダミンBを使用することによって区別できる。収集された測定値は同時に得られたものではなかった。

【0334】

図26は、この実施例で使用した第2の装置60のタイプの測定デバイスを表す。2枚のガラススライド間に高さ40 μm のチャンバーが作製されている。入口及び出口は上部ガラススライド上に作製され、それぞれに接続キャピラリーに接続するための標準コネクタが設けられている。

10

【0335】

この実験により、図27に示されるように、二次試薬の2つの蛍光読取り値を用いて液滴中の柱における磁性粒子に対する結合試験を行うことの可能性を示すことが可能になる。モノクローナル抗体が存在しない場合、シグナリング実体(図27A)及び定量化実体(図27B)の分散蛍光が観察される。逆に、抗原(TT7)に対する結合活性を有するモノクローナル抗体50 nMが存在する場合、シグナリング実体(図27C)及び定量化実体(図27D)の蛍光の再局在化が観察される。

【0336】

図28は、標的要素(抗体TT7)の濃度(単位:ナノモル濃度)に従った、定量化実体の再局在化信号と分散化信号との比(図28A)、及びシグナリング実体の再局在化信号と分散化信号との比(図28B)を表す滴定曲線である。

20

【0337】

[実施例8]

2Dチャンバーにおける抗原に対するモノクローナル抗体の親和度の測定。

この実施例は、抗原の親和度範囲を表す複数の別個の標的要素37が測定されることを除き、すべての点において実施例7と同様である。

【0338】

この実施例の目的は、タイプ60のデバイス、即ち、液滴が単一の層に二次元的に分布するチャンバー内で、所与の抗原に対するモノクローナル抗体の親和度を測定する可能性を実証することである。

30

【0339】

ビーズの柱上に固定された抗体に結合した蛍光抗原の濃度測定、及びビーズ柱上に捕捉された抗体の濃度の同時測定から、解離定数 K_d を評価した。

【0340】

この実験に使用された抗TT抗体、いわゆるTT4、TT7及びTT10は、Brandon J. DeKoskyらの論文、表題「High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire」、Nature Biotechnology、31巻、166~169頁、2013年発行において発表された配列からの組換えタンパク質の発現により得た。

40

【0341】

線形回帰により、3種の抗体のそれぞれについて、定量化実体の信号に対するシグナリング実体信号の比を得るために、複数の別個のエマルションにおいて3種の抗体ごとに異なる濃度を使用した。より具体的にはTT10抗体については0 nM、5 nM及び10 nM、TT4抗体については0 nM、2.5 nM及び10 nM、並びにTT7抗体については0 nM、5 nM、10 nM、15 nM及び25 nMであった。

【0342】

この実験により、図29及び図30に示されているように、定量化実体の信号に対するシグナリング実体信号の比と、選択された標的要素の解離定数とを相関させることの可能性を示すことが可能になる。

50

【0343】

図29は、この実験において試験した3種のモノクローナル抗体、TT4、TT7及びTT10について、定量化実体の再局在化信号と分散信号との比を横座標に表し、シグナリング実体の再局在化信号と分散信号との比を縦座標に表したグラフである。

【0344】

図30は、表面プラズモン共鳴（SPR）によって得られた3種のモノクローナル抗体の解離定数を横座標に表し、定量化実体信号に対するシグナリング実体信号の比を縦座標に表したグラフである。

【0345】

[実施例9]

2Dチャンバー内での一次細胞によるモノクローナル抗体の分泌の動態的及び定量的測定。

10

この実施例は、標的要素37が一次細胞によって分泌されるモノクローナル抗体であること及びこの分泌が動態的に測定されることを除き、すべての点において実施例8と同様である。

【0346】

この実施例の目的は、所与の抗原について、タイプ60のデバイスにおいて液滴内に単離される単一次細胞によって生成されるモノクローナル抗体の分泌動態及び親和性を同時測定する可能性を実証することである。

【0347】

実施例6と同様に、Bリンパ球をマウスの脾臓から予め抽出し、標準手順（Pan B kit II #130-104-443、Miltenyi Biotec社）に従って精製した。

20

【0348】

図31は、単一細胞の尺度における、液滴の分散信号に対する磁性ビーズラインの再局在化信号の比対時間（分）の時間依存性変化を表すグラフである。更に、滴定曲線（実施例7の図28a）により、測定された信号とモノクローナル抗体濃度とを相関させることが可能である。この濃度を図30に示す。

【0349】

図32は、 $n = 25$ の別個の一次細胞について、単一細胞の尺度における、液滴の分散信号に対する磁性ビーズラインの再局在化信号の比対時間（分）の時間依存性変化を表すグラフである。図32は、一次細胞の不均質性を示している。

30

【0350】

[実施例10]

液滴内の磁性ビーズの凝集体の数、形状及び安定性。

この実施例において、標的要素37は、ビオチン化蛍光分子、例えばシグナリング実体の役割をも有しスクリーニング対象溶液に既に含有されている、AF546-ビオチン（ThermoFisher社#S11225）である。この実施例は細胞には一切当てはまらない。

【0351】

この実施例の目的は、横断的に結合する分子（transverse binding molecule）の使用により、磁性ビーズの凝集体のラインを安定させ、液滴内の単一性（singularity）を確保することの可能性を実証することである。この実験の場合、横断的に結合する分子として、異なる濃度の多重ビオチン化（multiply biotinylated）タンパク質である、ビオチンBSA（Sigma Aldrich社#A8549）を使用することを示す。使用するビオチンBSAは、アルブミン1モル当たり8～16モルのビオチンを有する。

40

【0352】

この実験において、液滴の容量は40ピコリットルである。

【0353】

50

この実験において、希釈標準溶液は、

- Super Low IgG血清（#SH30898.03、Thermo Scientific社）50 v / v %、
- pH 7.4のHEPES緩衝液25 mM、
- Life Technologies社より提供されるPluronic F-68 0.1 v / v %、
- 抗生物質 - 抗真菌剤（#15240、ThermoFisher社）1 v / v %を含む。

【0354】

この容量の希釈標準溶液に対し、Life Technologies社により提供されるDMEM-F12を最後に添加し、最終容量を得る。

10

【0355】

この実験のために生成した7種のエマルションは、希釈標準溶液中に懸濁させた以下の試薬：

- 最終濃度100 nMのAF546 - ビオチン（シグナリング実体）、
- 標準量の1倍、2倍又は3倍の33.33 v / v %の磁性粒子ストレプトアビジン（Ademtech社#0433）、
- Dy-649（Dyomics社）50、100、200、400、800又は1,600 nM、
- 0対1、5若しくは1.25対1、又は100対1の可変比のビオチンBSAと磁性ビーズ、即ち0、0.5、2.5、5又は15 nMの濃度のビオチンBSAを含有する。

20

【0356】

実施例「C」に記載されているように、基準エマルション、いわゆる「VHHライン」を生成する。「VHHライン」エマルションの場合、磁性ビーズラインの安定性は、標的要素（抗体）と捕捉実体（「Capture Select（商標）ビオチン抗LCカップー（マウス）コンジュゲート」ThermoFisher社#7103152500）との間の横断的結合によって得られる。なぜなら、同じ標的要素（抗体）が2個の捕捉実体に結合できるためである。

【0357】

30

図33は、異なる実験条件に従った、磁性ビーズラインの形状比（format ratio）を表すグラフであり、各場合が顕微鏡画像によって示されている。

【0358】

図34は、異なる実験条件に従った、磁性ビーズラインの単一性又は複数性を表すグラフである。

【0359】

この実験により、図33及び図34に示されているように、液滴ごとの磁性ビーズラインの数及び幾何学的形状を安定させることの可能性を示すことが可能になる。

【符号の説明】

【0360】

40

- 1 装置
- 4 供給アセンブリ
- 6 液滴
- 8 キャリア流体
- 10 凝集物
- 10 凝集体
- 12 粒子
- 14 測定アセンブリ
- 16 測定点
- 18 測定点

50

2 0	デバイス	
2 2	循環アセンブリ	
2 4	循環導管	
2 4	導管	
2 6	検出領域	
2 8	装填アセンブリ	
3 0	凝集アセンブリ	
3 1	離隔アセンブリ	
3 2	初期液滴	
3 4	シグナリング実体	10
3 4 a	シグナリング実体	
3 4 b	シグナリング実体	
3 6	捕捉要素	
3 6 a	捕捉要素	
3 6 b	捕捉要素	
3 7	標的要素	
3 7 a	標的要素	
3 7 b	標的要素	
3 8	永久磁石	
4 0	蛍光強度	20
4 1	蛍光強度	
4 2	液滴	
4 4	プラトー	
4 8	液滴	
5 0	ピーク	
5 2	プラトー	
5 6	液滴	
5 8	ピーク	
5 9	プラトー	
6 0	装置	30
6 0	デバイス	
6 2	チャンバー	
6 4	循環路	
6 6	分離パッド	
7 0	装置	
7 2	分類アセンブリ	
7 4	内相入口領域	
7 6	キャリア流体入口領域	
7 8	連結領域	
7 9	インキュベーション領域	40
8 0	入口導管	
8 2	入口導管	
8 4	合流導管	
8 6	流体塊	
8 8	流体	
8 8	流体塊	
9 0	細胞	
9 0	産生実体	
9 2	キャリア流体入口導管	
9 4	分類領域	50

- 9 6 分類領域
- 9 8 誘導手段
- 1 0 0 フォーク
- 1 0 2 出口導管
- 1 0 4 出口導管
- 1 0 6 第 1 の液滴群
- 1 0 8 第 2 の液滴群
- 1 2 0 装置
- 1 2 2 抽出アセンブリ
- 1 2 4 主液滴
- 1 2 6 副液滴

10

【図 1】

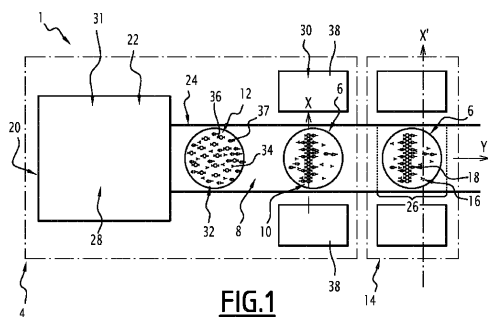


FIG.1

【図 3】

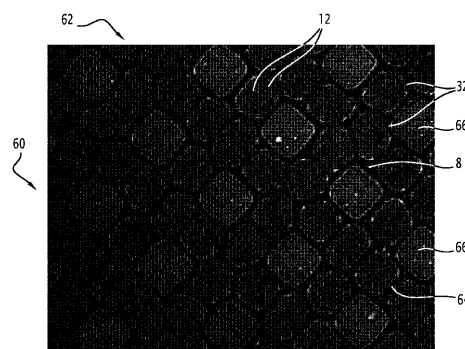


FIG.3

【図 2】

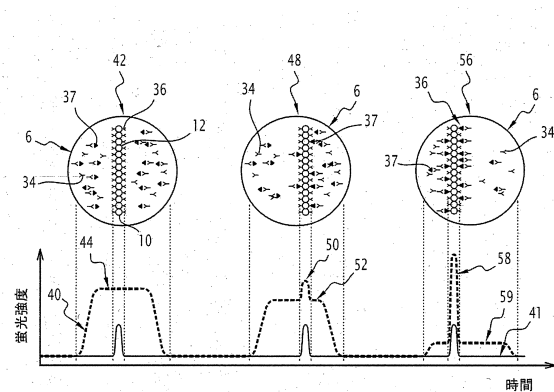


FIG.2

【図 4】

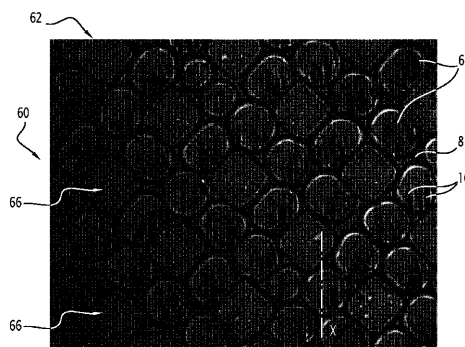
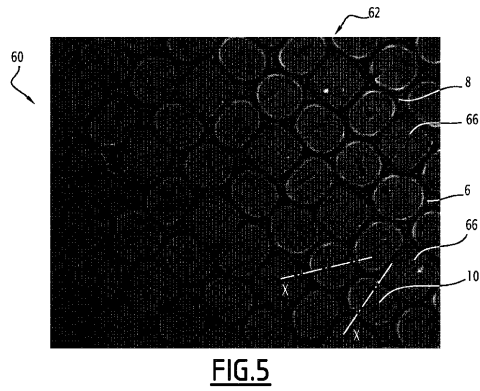
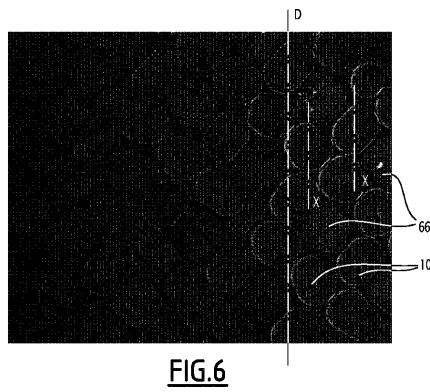


FIG.4

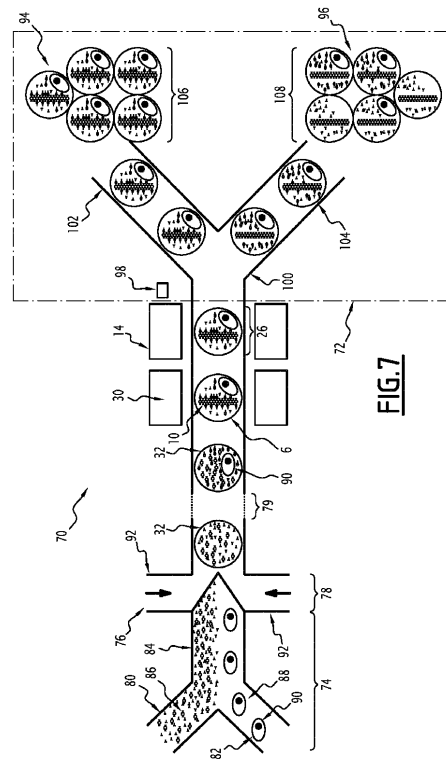
【図 5】



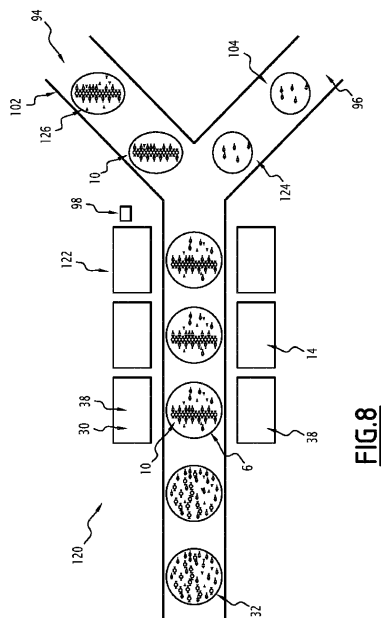
【図 6】



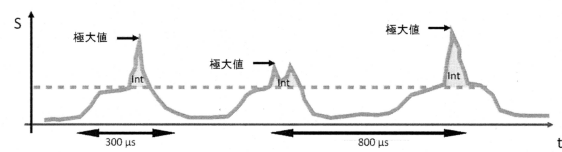
【図 7】



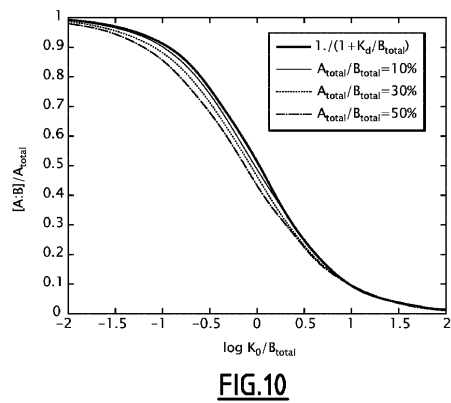
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【図 1 1】

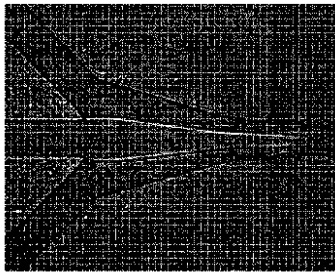


FIG.11

【図 1 2】

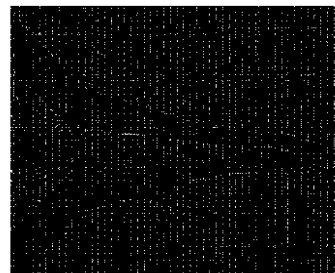


FIG.12

【図 1 3】

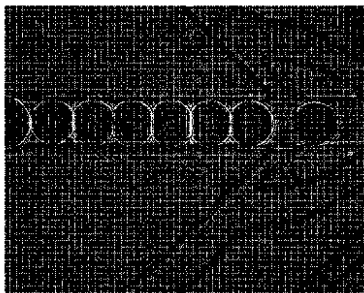


FIG.13

【図 1 4】

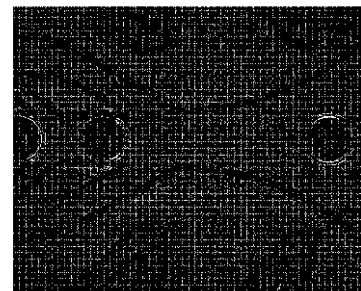
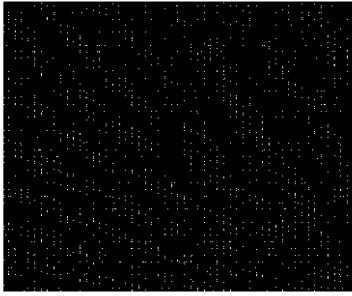


FIG.14

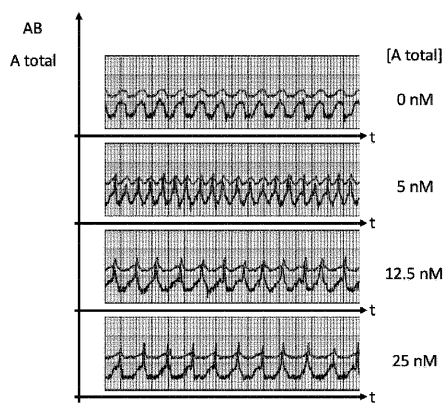
【図 15】

FIG.15

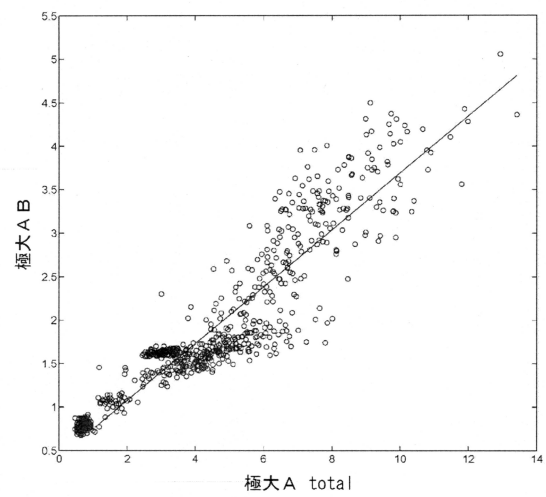
【図 16】

FIG.16

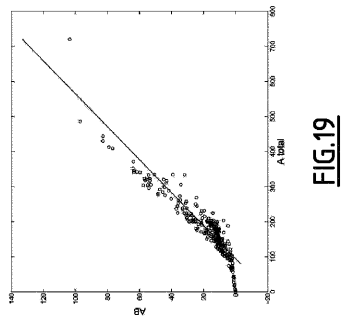
【図 17】

FIG.17

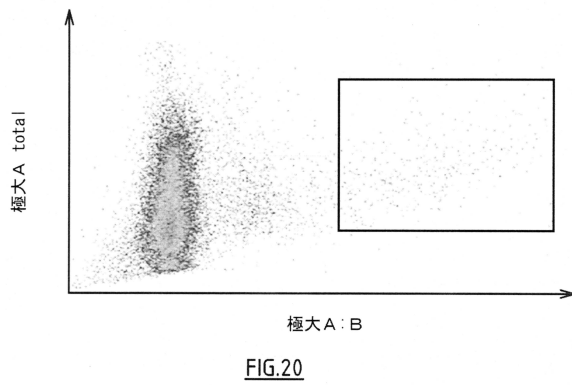
【図 18】

FIG.18

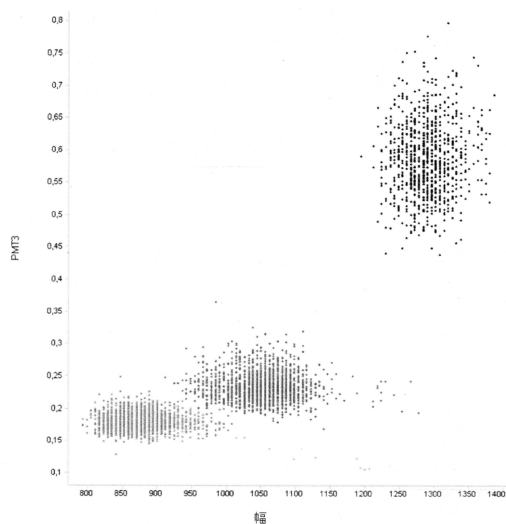
【図 19】



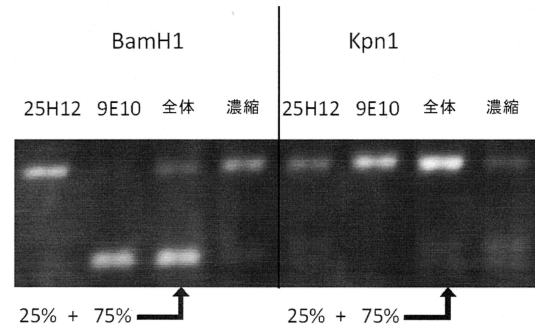
【図 20】



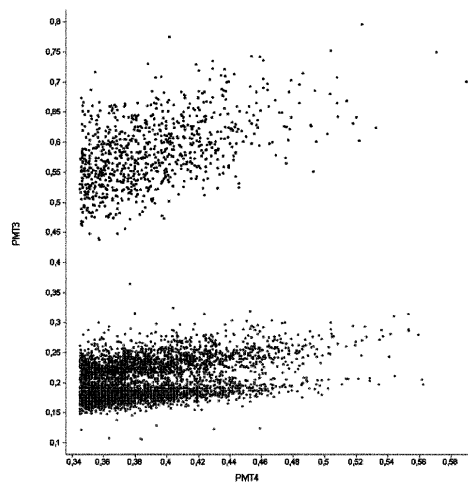
【図 22】



【図 21】



【図 23】



【図 24】

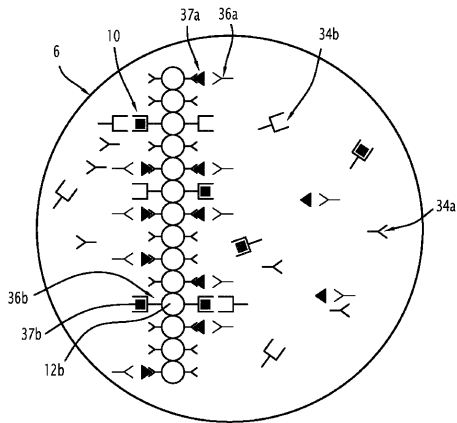


FIG.24

【図 25】

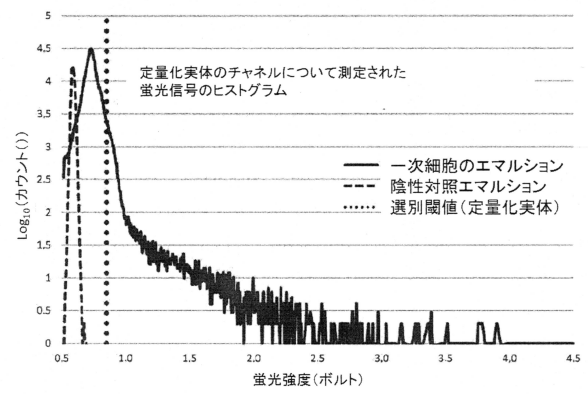


FIG.25

【図 26】

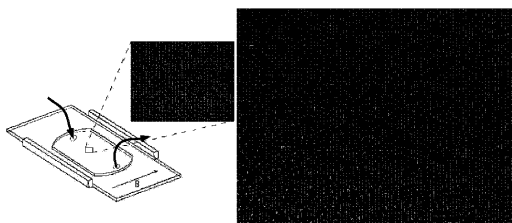
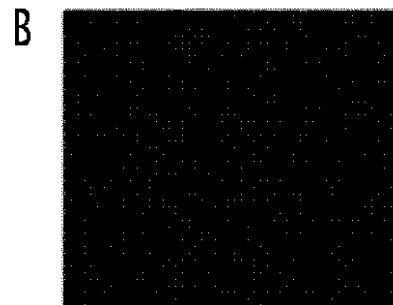
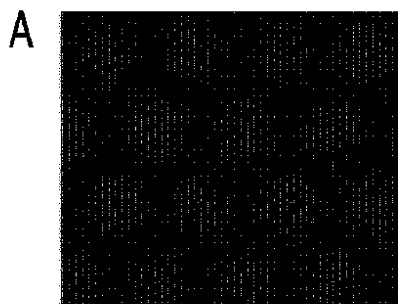


FIG.26

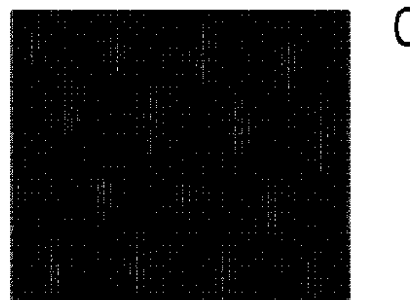
【図 27 B】



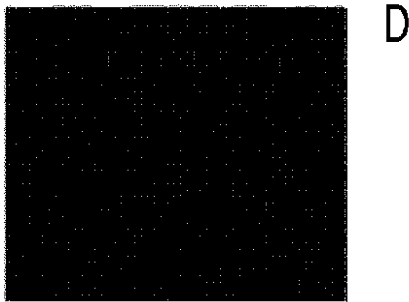
【図 27 A】



【図 27 C】



【図 27 D】



【図 28】

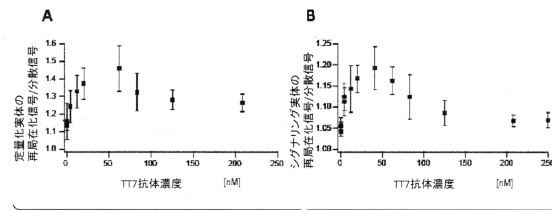


FIG.28

【図 29】

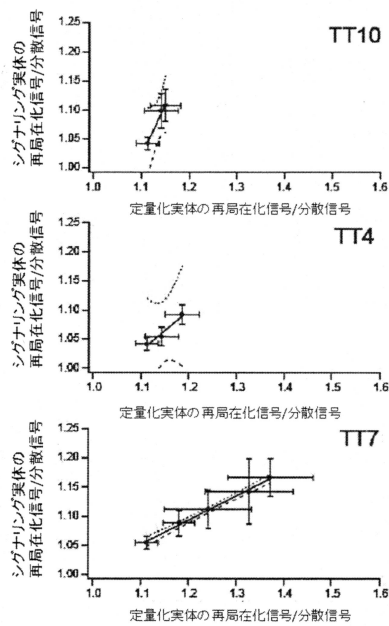


FIG.29

【図 30】

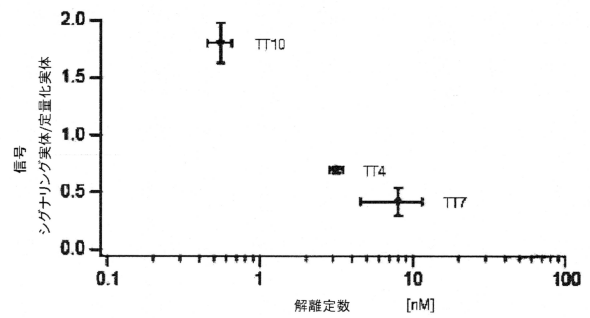


FIG.30

【図 3 1】

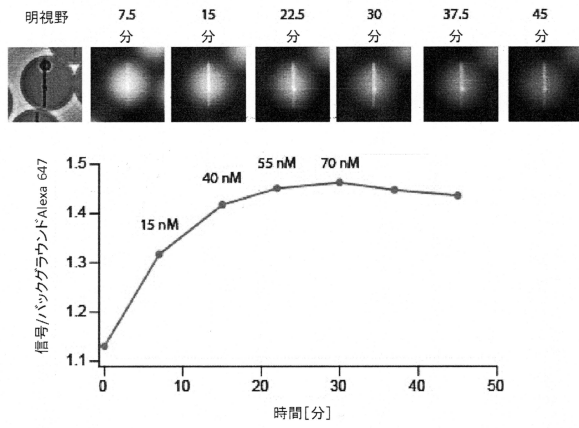


FIG.31

【図 3 2】

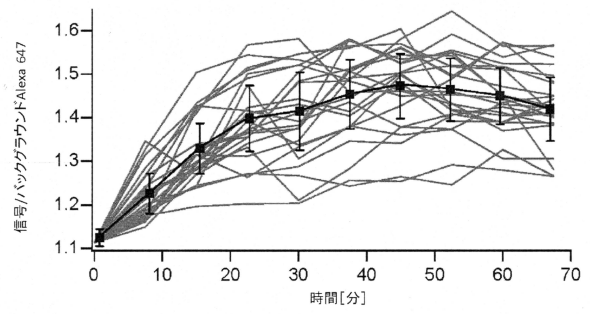


FIG.32

【図 3 3】

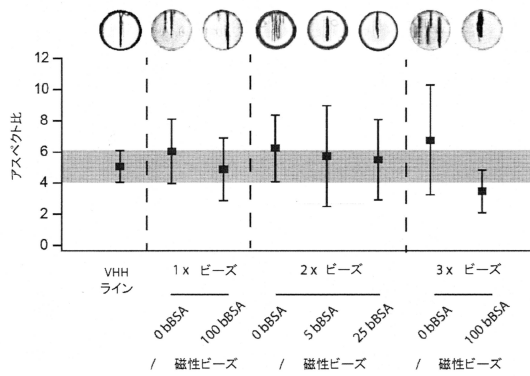


FIG.33

【図 3 4】

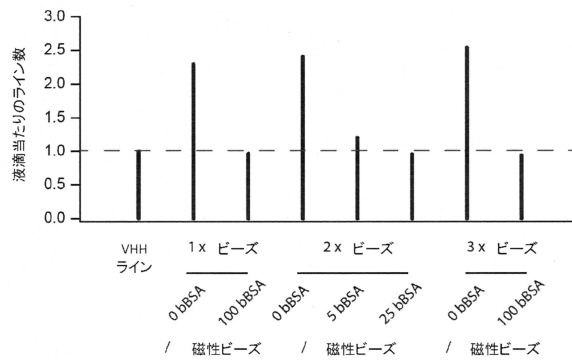


FIG.34

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/68 (2018.01) C 1 2 Q 1/68

- (72)発明者 ラファイエル・クレマン・リ・ミン・ドアノー
フランス・75005・パリ・リュ・ラセペード・4
- (72)発明者 クレマン・ニザク
フランス・75011・パリ・リュ・オベルカンフ・57
- (72)発明者 フィリップ・チ・タン・ゲ
フランス・94160・サン・マンデ・アヴニユ・ドゥ・パリ・67
- (72)発明者 ジャン・マリー・ピエール・ボドリー
フランス・75011・パリ・リュ・サン・タンブロワーズ・31
- (72)発明者 エロディ・ミシェル・クリスティーヌ・ブリヤン・リツレー
フランス・78000・ヴェルサイユ・アヴニユ・ドゥ・パリ・30
- (72)発明者 アレクセイ・ゴードイナ
フランス・92600・アニエール・シュル・セヌ・リュ・エミール・アジエ・4

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 国際公開第2013/041983(WO,A1)
中国特許出願公開第103930210(CN,A)
米国特許出願公開第2011/0275063(US,A1)
特開2009-192398(JP,A)
米国特許出願公開第2011/0188717(US,A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)
G01N 33/48-33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)