

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5999776号
(P5999776)

(45) 発行日 平成28年9月28日 (2016. 9. 28)

(24) 登録日 平成28年9月9日 (2016. 9. 9)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/48 (2006. 01)

GO 1 N 33/48 B

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/48 K

GO 1 N 33/569 (2006. 01)

GO 1 N 33/48 D

GO 1 N 33/53 D

GO 1 N 33/569 B

請求項の数 42 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2013-528815 (P2013-528815)
 (86) (22) 出願日 平成23年9月15日 (2011. 9. 15)
 (65) 公表番号 特表2013-538355 (P2013-538355A)
 (43) 公表日 平成25年10月10日 (2013. 10. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2011/054035
 (87) 国際公開番号 W02012/035508
 (87) 国際公開日 平成24年3月22日 (2012. 3. 22)
 審査請求日 平成26年5月22日 (2014. 5. 22)
 (31) 優先権主張番号 01207/11
 (32) 優先日 平成23年7月20日 (2011. 7. 20)
 (33) 優先権主張国 スイス (CH)
 (31) 優先権主張番号 02041/10
 (32) 優先日 平成22年12月7日 (2010. 12. 7)
 (33) 優先権主張国 スイス (CH)

(73) 特許権者 515169371
 デビオファーマ インターナショナル ソ
 シエテ アノニム
 DEB I O P H A R M I N T E R N A T
 I O N A L S A
 スイス連邦 1006 ローザンヌ, シュ
 マン メシドール 5-7, “フォーラム
 アブレードウマン”
 (74) 代理人 110001302
 特許業務法人北青山インターナショナル
 (72) 発明者 リダー, アマル
 スイス連邦 セアシュール 1022 シャバ
 ンヌーレネン, シュマン ド ラ ムーラ
 ン 28

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液成分を含むフィブリノゲン含有サンプルからターゲット分子又は粒子を分離する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

フィブリノゲンを含む液体サンプルを処理して当該サンプルからターゲット分子又は粒子を分離し濃縮する方法において：

a . 前記サンプルにトロンビン又はトロンビン様酵素を加えることによってフィブリンネットワークに前記ターゲット分子又は粒子を捕獲して、前記サンプル中に含まれるフィブリノゲンを少なくとも部分的にフィブリンに変換して、前記フィブリンネットワークを形成するステップと；

b . 前記フィブリンネットワークを退縮させて、フィブリンクロットを形成するステップと；

c . 前記フィブリンクロットを周辺サンプル培地から分離するステップと；
 を具えることを特徴とする方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法において、前記サンプル中の前記フィブリノゲンの濃度が少なくとも $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ であることを特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法において、前記サンプル中のトロンビン又はトロンビン様酵素の濃度が、サンプル 1 ml 当たり 0.01 乃至 10 IU であることを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の方法において、前記サンプルが更に、クロット因子 XIII を含むこ

とを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の方法において、前記サンプルが更にカルシウムを含むことを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の方法において、前記サンプルが更に、G D T A、E D T A、及びクエン酸からなる群から選択されたキレート剤を含むことを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の方法において、前記サンプルが更に、活性化血小板細胞あるいは活性化血小板細胞溶解物を含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法において、前記血小板が、アデノシンジホスフェートと、コラーゲンとからなる群から選択された血小板アゴニストで活性化されることを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の方法において、前記退縮ステップ (b) が更に、前記フィブリンネットワークに捕獲され、磁場にさらされた磁気粒子によって強化されることを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法において、前記磁気粒子がフィブリノゲン / フィブリン結合部分で被覆されていることを特徴とする方法。

20

【請求項 11】

請求項 1 に記載の方法において、前記ステップ (b) で形成したクロットが最初のサンプル量の $1 / 10$ より小さいサイズであることを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の方法が更に、前記フィブリンクロットを溶解させて前記ターゲット分子又は粒子を回復させるステップを具えることを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法において、前記クロットを溶解させるステップが繊維素溶解剤を用いて行われることを特徴とする方法。

30

【請求項 14】

請求項 12 に記載の方法において、前記溶解ステップが、細胞崩壊酵素、プロテアーゼ及び核酸分解酵素からなる群から選択された成分を用いることを特徴とする方法。

【請求項 15】

請求項 12 に記載の方法において、前記溶解ステップが、洗浄剤の使用を含むことを特徴とする方法。

【請求項 16】

請求項 1 に記載の方法において、前記サンプルが血液サンプルであることを特徴とする方法。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の方法において、前記血液サンプルが、全血、多血小板血漿、少血小板血漿、及びセラムからなる群から選択されることを特徴とする方法。

40

【請求項 18】

請求項 16 に記載の方法において、前記血液サンプルが、血液サンプルをフィブリノゲン欠落サンプルと組み合わせることで得た人工的に合成した血液サンプルであることを特徴とする方法。

【請求項 19】

請求項 16 に記載の方法において、前記血液サンプルが、クロット因子をフィブリノゲン欠落サンプルと組み合わせて得た人工的に合成した血液サンプルであることを特徴とする方法。

50

【請求項 20】

請求項 19 に記載の方法において、前記クロット因子がフィブリノゲンであることを特徴とする方法。

【請求項 21】

請求項 1 に記載の方法において、ステップ (a) における捕獲が、前記フィブリンネットワークで前記ターゲット粒子又は分子をサイズで捕獲することによって行われることを特徴とする方法。

【請求項 22】

請求項 1 に記載の方法において、ステップ (a) における捕獲が、前記フィブリンネットワークにおける前記ターゲット粒子の親和性で捕獲することによって行われることを特徴とする方法。

10

【請求項 23】

請求項 22 に記載の方法において、前記ターゲット分子又は粒子のフィブリノゲン又はフィブリンに対する天然の親和性によって化学的捕獲を実現することを特徴とする方法。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の方法において、前記化学的捕獲が、(i) フィブリン/フィブリノゲン結合部分と、(ii) 前記ターゲット分子又は粒子に対する物質捕捉部分と、からできた分子を具えることを特徴とする方法。

【請求項 25】

請求項 23 に記載の方法において、前記フィブリノゲンが、前記ターゲット分子又は粒子に対する捕捉部分ドメインを有するフィブリノゲン融合タンパク質であることを特徴とする方法。

20

【請求項 26】

請求項 24 に記載の方法において、フィブリン/フィブリノゲン結合部分が、トロンビン、フィブロネクチン、細菌性フィブリノゲン結合タンパク質、組織型プラスミノゲン活性化剤、インテグリンからなる群、及びこの群のいずれかの員から抽出した部分から選択されることを特徴とする方法。

【請求項 27】

請求項 24 及び 25 に記載の方法において、前記ターゲット分子又は粒子に対する物質捕捉部分が、抗体、核酸、前記ターゲット分子又は粒子を特に認識するように設計されたアプタマーからなる群から選択されることを特徴とする方法。

30

【請求項 28】

サンプルからターゲット分子又は粒子を分離するサンプル捕集デバイスにおいて、(i) 識別コードと、(ii) 前記サンプルを収容する容器と、(iii) 当該容器の中の乾燥試薬製剤と、を具え、

前記デバイスが、前記サンプル由来及び/又は人工的に加えられたフィブリノゲンの存在下で、前記デバイス中のトロンビン又はトロンビン様酵素を前記サンプルに加えたときに前記ターゲット分子又は粒子を分離可能な方法で捕獲するフィブリンクロットを形成するよう使用可能であり、

前記製剤が、トロンビン又はトロンビン様酵素を含むことを特徴とするデバイス。

40

【請求項 29】

請求項 28 に記載のデバイスにおいて、前記サンプル容器の容量が 0.1 乃至 20 ml であることを特徴とするデバイス。

【請求項 30】

請求項 28 又は 29 に記載のデバイスにおいて、前記サンプル中のフィブリノゲンの濃度が 0.1 乃至 10 mg/ml であることを特徴とするデバイス。

【請求項 31】

請求項 28 乃至 30 のいずれか一項に記載のデバイスにおいて、前記フィブリノゲンが前記サンプルに対して天然であることを特徴とするデバイス。

【請求項 32】

50

請求項 2 8 乃至 3 0 のいずれか一項に記載のデバイスにおいて、前記サンプルがデバイスに捕集される前に、前記フィブリノゲンが最初から前記デバイス中に含まれていることを特徴とするデバイス。

【請求項 3 3】

請求項 2 8 乃至 3 2 のいずれか一項に記載のデバイスにおいて、前記製剤が、さらに、フィブリノゲンを含むことを特徴とするデバイス。

【請求項 3 4】

請求項 2 8 乃至 3 3 のいずれか一項に記載のデバイスにおいて、前記トロンビン又はトロンビン様酵素が、凍結乾燥させた形で前記デバイス内に含まれることを特徴とするデバイス。

10

【請求項 3 5】

請求項 2 8 乃至 3 4 のいずれか一項に記載のデバイスが更に、カルシウム、キレート剤、活性化血小板血細胞、又は活性化血小板細胞溶解物、及び因子 X I I I からなる群から選択された添加剤を含むことを特徴とするデバイス。

【請求項 3 6】

請求項 2 8 乃至 3 5 のいずれか一項に記載のデバイスが更に、磁気粒子を含むことを特徴とするデバイス。

【請求項 3 7】

請求項 3 6 に記載のデバイスにおいて、前記磁気粒子がフィブリノゲン/フィブリン結合部分で被覆されていることを特徴とするデバイス。

20

【請求項 3 8】

請求項 3 7 に記載のデバイスが更に、(I) フィブリン/フィブリノゲン結合部分と、(I I) 前記ターゲット分子又は粒子に対する物質捕獲部分と、を有する分子を具えることを特徴とするデバイス。

【請求項 3 9】

請求項 2 8 乃至 3 8 のいずれか一項に記載のデバイスにおいて、前記サンプル中のフィブリノゲンが遺伝子組み換えフィブリノゲンであることを特徴とするデバイス。

【請求項 4 0】

請求項 3 9 に記載のデバイスにおいて、前記サンプル中のフィブリノゲンが、前記ターゲット分子又は粒子に対する捕捉部分ドメインを有するフィブリノゲン融合タンパク質であることを特徴とするデバイス。

30

【請求項 4 1】

請求項 2 8 乃至 4 0 のいずれか一項に記載のデバイスにおいて、ターゲット分子又は粒子が、細菌、ウイルス、イースト、タンパク質、ペプチド、及び/又は核酸を具えることを特徴とするデバイス。

【請求項 4 2】

請求項 1 乃至 2 7 のいずれか一項に記載の方法において、ターゲット分子又は粒子が、細菌、ウイルス、イースト、タンパク質、ペプチド、及び/又は核酸を具えることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明はターゲット分子又は粒子をサンプルから分離するサンプル処理方法に関する。特に、本発明はターゲット分子又は粒子をその検出と分析を行う前にフィブリノゲンタンパク質を含有するサンプルから効果的に分離し濃縮できるサンプル調整手順に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

生物学的検定では、ターゲット分子、粒子、又は検体を種々のサンプルから抽出し、濃縮し、純化する能力(すなわち、サンプル調整)が、重要なステップを意味し、有効なターゲット検出および分析を行うための必須のステップとして、課題となっている。サンプ

50

ル調整ステップは、検出限界、再現性、粒子又は検体とその他の成分との干渉という点で、生物学的検定における主な律速段階である。現在のサンプル調整手順は、通常、冗長な手動でのあるいは複雑なロボットでのピペットステップがあり、このステップには長時間の遠心分離が含まれる。これらの手順は、遅く、コストと労働力がかかるばかりでなく、高価な有害な化学物質の廃棄を行う必要があり、研究スタッフに健康上のリスクを与えている。更に、サンプル調整のワークフロー、特に分子ターゲットの新世代に関するワークフローは、更に複雑なものになってきており、多様の解決策が提供されている。現在は、サンプル調整に関する様々なかつ独自の解決策が、サンプル型とターゲットの各々について使用されている。装着が容易で、自動化がしやすく、試薬が溶けやすく、操作時間が最小である、複数のサンプル及びターゲットに適用できる標準的なサンプル調整ワークフローの解決策を提供するには、生命科学と診断環境において未だに解決できていない要件が残っている。更に、サンプルワークフロー方法論の標準化は、主に規制のある診断環境において、主要要件である。

10

【0003】

サンプル調整の複雑さを典型的に示すものは、複合血液培地からのターゲット分子又は粒子の検出である。特に複雑なのは、血液から伝染性因子（細菌、菌類）を低検出レベルで検出することである。臨床レベルでは、血液感染（すなわち、敗血症）の検出は、血液中の細菌感染に対する炎症反応によって生じる深刻な病状の原因であるため特に重要である。敗血症は、実際、集中治療室におけるもっとも高頻度の死因である。更に、血液からの微生物の検出不良、感染性因子の同定ミス又は同定の遅れ、及び／又は、抗生物質感受性試験の欠落又は遅れによって、適切な診断範囲がなく経験的にのみ、多くの抗生物質治療モダリティが開始されている。敗血症を初期発見する診断、迅速な微生物の同定、及び抗生物質感受性テストと適切な患者管理の医学的必要性は、ほとんど満たされていない。微生物（例えば、院内感染微生物）の耐性発現が増加すると、迅速かつ正確な敗血症診断用の新規な方法論は、罹患率と死亡率を下げるのに非常に重要である。最後に、敗血症感染の別の源は、輸血である。血液、血液成分、及び血液派生物から微生物を有効に検出することは、コンタミネーションを防止するために非常に重要である。

20

【0004】

血液培養ビン又は血液寒天培養としての血液培養の使用は、未だに、菌血症と敗血症の患者の感染因子を検出し同定するルーチンの選択法（最高水準）である。

30

【0005】

血液中の細菌性細胞の検出における主たる問題は、細胞数の検出能力が、ミリメートルあたり1コロニー形成単位（CFU）と低いことである。この文脈において、この桁での検出レベルで処理しなければならない血液量は、数ミリリットル（5乃至10ml）の血液検体からなるものでなくてはならない。「乾草の中から針を探す」、すなわち、血液感染症の診断における難問は、生細菌から特定の感染症バイオマーカーを抽出及び精製できる、効率がよく装着が容易な技術の可用性か、あるいは、核酸の遺伝的内容に基づくものとなるであろう。

【0006】

例えば、国際特許出願WO95/15397号及びWO2009/015484号に報告されているように、多機能遠心分離またはフィルトレーション方法論を特定の細胞壁／膜溶解ステップと組み合わせて使用して、血液サンプル及び体液からのターゲット微生物を濃縮するようにしている。濃縮効率が低いことは別にして、このような遠心分離方法論のもう一つの制限は、ルーチンの自動実験分析ワークフローと互換性がないことである。この遠心分離のプロセス制限を克服するために、ターゲット微生物と逆方向の親和基で被覆した磁気粒子を導入した。粒子の磁力の利用により、粒子表面のターゲットを捕捉し、血液からターゲットを容易に分離することができる。しかしながら、生細菌を捕捉するための磁気ビーズ上に親和基を広く塗布することに主たる不利益がある。まず、病原微生物の分布は、グラム陰性及びグラム陽性の細菌及び様々な菌種の長いリストからなる。全クラスの細菌をカバーする入手可能で一般的な親和基はない。また、このような細菌の多く

40

50

は、カプセル化されており、血液中におけるこれらの細菌の生存と分布が容易になる現象が起きる。第2に、微生物は血流の中を常に自由に浮遊しているわけではなく、血液細胞並びに血小板に結合あるいはこれらから隔絶されている。例えば、黄色ブドウ球菌の場合、血小板との相互作用と血小板による更なる細菌の隔絶が、細菌が宿主防御システムを回避する重要な毒性因子となる。

【0007】

血液サンプルから生微生物を直接的に濃縮することの代替は、分子バイオマーカ（特定の核酸遺伝子配列）の使用と、PCR（ポリメラーゼ鎖反応）といった即時の連続核酸増幅技術からなる。この方法は、より迅速な結果をもたらす新しい可能性を開くものである。しかしながら、検出レベル（感度）は、培地ベース法のレベルより低いことがある。分子方法の制限のある感度は、主に、血液細胞中の真核細胞（白血球細胞）からの高バックグラウンドDNAに関係している。PCRベースの方法の感度は、血液サンプルから真核細胞核酸を取り出すことによって、あるいは、特に、微生物（原核細胞）DNAを濃縮することによって高くすることができる。この見方では、EP-A-1,400,589号は、血液溶解物から原核細胞DNAを分離する方法を開示しており、この方法は、原核細胞DNAを少なくとも一タンパク質又はポリペプチドと特定結合させ、このように形成した複合体を分離するステップを具える。同じ範囲で、EP-A-1,861,495号は、更により多くの真核細胞を含む混合サンプル中の微生物細胞から核酸を特別に単離する方法を記載している。この発明は、全血中の一又は複数のカオトロピック剤及び/又は一又は複数の界面活性剤の存在下で核酸を分解させて、ヌクレアーゼ、特にDNA分解ヌクレアーゼを使用して血液溶解物から真核細胞核酸を取り出すことを開示している。両方法共に、複雑なプロトコルと時間のかかる処理ステップ、すなわち、生成した細菌核酸を得る前に半日かかるステップによって、制限されている。更に、これらの方法は、100 CFU/mlの検出制限があり、これは、定義によれば10 ml体積中の1 CFUである血液培地法の感度より、非常に低い。

【0008】

最先端の核酸検出方法の上述した制限とは別に、細菌と一般菌類を検出する分子法の妥当性は疑問である。実際、血液中を循環するDNAの検出は、生微生物を検出する血液培地法に必ずしも関連しない。このような相関を維持するために、いくつかのアプローチが、陽性血液培養から開始する分子ベースの方法を用いた感染性因子の同定を提案している。しかしながら、時間のかかる培地法が必要なため、このようなアプローチの臨床的妥当性には制限が残っている。分子法は、大部分のケースで細菌の抗菌薬感受性スペクトラムに関する情報を提供していないため、この問題はより重要である。後者は、未だ、伝統的な培地によるアプローチに頼っている。

【0009】

これらの欠点を知ったうえで、迅速で高い信頼性をもって血液中の微生物を検出し同定できる新規な方法の開発が、非常に重要な問題として残っている。更に、ここに提供した血液中の感染性因子の検出は、サンプル調整手順の複雑さと、一般的にバイオアッセイ、特に医療診断におけるその重要性を示す典型的な例である。食物サンプル、臨床サンプル、環境サンプル、あるいは実験サンプルといった様々なサンプル中のターゲット分子又は粒子の存在を決定する分析の重要性は高まっている。

【発明の概要】

【0010】

本発明は、サンプル調整方法と、周辺複合液体培地からターゲット分子又は粒子を有効に分離するプロセスに関する。この方法によれば、更に、調整した干渉培地中で、好ましくは初期サンプル体積の少なくとも1/10の体積に濃縮されたターゲットを回復させることができる。更に、ここに開示した方法の利点は、初期サンプル体積の1/100乃至1/1000濃縮倍率に届く能力である。このように濃縮されたターゲットは、その後、非常に容易に、更なる精製ステップに進み、及び/又は、最先端の方法論を用いて直接的に分析することができる。

【 0 0 1 1 】

ここに開示したサンプル調整方法は、特に、様々なサンプル源と、広い体積スペクトラムとともに使用するように構成されている。更に、本発明による分離によれば、サイズ及び/又は親和性を選択して複合サンプル容量からターゲット粒子又は分子を特別にあるいは特別でなく分離することができる。

【 0 0 1 2 】

したがって、本発明は、事実上どのようなタイプのサンプル及びターゲットにも広く使用できるという利点を提供するサンプル調整方法を開示している。

【 0 0 1 3 】

ここに開示される方法に基づいて、本発明は更に、手動で非常に容易に使用でき、本サンプル調整方法を通常の研究ワークフローに容易に一体化させた最先端の自動システムに一体化できるサンプル捕集デバイスを開示している。

10

【 0 0 1 4 】

開示したサンプル調整方法の技術的ベースは、細菌又は菌類の粒子などのターゲット微生物を、通常、トロンビン酵素を用いて血液サンプルを制御して凝固させて、迅速に退縮させて血液コンテナに小さなペレットを形成するフィブリンネットワーク内にターゲット粒子を捕獲することによって、フィブリノゲンを制御され標準化された方法でフィブリンに変換して、血液サンプルから効率よく分離する可能性についての発明者の観察に基づく。ペレットが形成されるので、周辺血液サンプルを移し替えることができ、この小さなペレット内に捕獲されたターゲットを分離することができる。第2のステップでは、ペレットを溶解させて干渉液中の少量の調整したフィブリントラップからターゲットを回復させることができる。このプロセスによれば、最小サイズのペレットがキーファクターであり、開示した方法の濃縮率を決定するので、制御が必要である。

20

【 0 0 1 5 】

したがって、血液サンプルによって、全血液、多血小板血漿、及び少血小板血漿又は血清を意味する。本発明による血液は、代用血液又は血液成分、血液添加物あるいは血液機能を模したその他の成分からなる人工合成サンプルも意味することは明らかである。このような血液成分の典型的な例であって、通常輸血に使用されているものには、血小板濃縮物、赤血球（ヘモグロビン）濃縮物、代用血清又は血漿（体積拡張剤としても知られている）がある。例えば敗血症サンプルなどの臨床ケースにおける、複合血液サンプル又は代用血液などの、血液サンプルが凝固因子（主にフィブリノゲン）を欠く場合、フィブリノゲンを含む凝固因子を血液サンプルに必須成分として加えることによってこの欠落を補って、本発明によるターゲット粒子又は分子を分離することができる。

30

【 0 0 1 6 】

本発明は好ましくは、血液サンプルから微生物又は感染性分子又は粒子を分離する方法を開示しているが、当業者には、ここに述べる血液サンプルは、上述した制御された凝固プロセスの一部である血液構成成分を含む複合サンプルも意味すると認識される。

【 0 0 1 7 】

したがって、一般的に、本発明はフィブリノゲンタンパク質を含むサンプルからターゲット粒子又は分子を捕獲によって分離し濃縮する方法を開示している。第1のステップで、フィブリンネットワーク中のターゲット分子又は粒子を、サンプル中に含まれるフィブリノゲンをフィブリンに少なくとも部分的に変換してフィブリンネットワークを形成する。第2のステップでは、このようにして形成したフィブリンネットワークがフィブリクロットを形成し、周辺のサンプル培地から分離される。

40

【 0 0 1 8 】

一の実施例では、本発明による分離が、サイズを選択することによりターゲット粒子を捕獲することで行われる。この捕獲プロセスでは、フィブリンネットワーク細孔のサイズが特に重要である。より小さい細孔サイズが、実際に、大腸菌（ $2\text{ }\mu\text{m}$ ）や、クラミジア（ $0.3\text{ }\mu\text{m}$ ）、あるいはウィルスなどの小さな感染性微生物のより効果的な捕獲につながる。この点に関して、サンプルpHやイオン強度、サンプル中のカルシウム濃度、フィ

50

ブリノゲン、トロンビン濃度といったパラメータを調整することで捕獲するフィブリンネットワークの制御が行われる。

【0019】

一の実施例では、本発明の分離は、フィブリンネットワーク中のターゲット粒子の親和性捕獲によって行う。発明者は、黄色ブドウ球菌などの細菌性粒子が、フィブリノゲン/フィブリン分子に対して親和性が強く、これが本発明の方法によって、この分子の分離と濃縮をより容易にする（強化する）ことを観察した。細菌性粒子の親和性相互作用を模することによって、本発明は、天然の及び誘発した親和性相互作用を用いて、フィブリノゲン含有サンプルからターゲットを分離することを開示している。

【0020】

本発明の好ましい実施例にかかる誘発親和性分離は、ターゲット分子又は粒子に対する捕捉部分ドメインを具えるフィブリノゲン融合タンパク質からなるフィブリノゲン組み換えタンパク質で実現される。別の実施例では、化学的捕獲が、黄色ブドウ球菌フィブリノゲン結合タンパク質などのフィブリン/フィブリノゲン結合部分と、ターゲット分子又は粒子に対する抗体などの物質補足部分によって確実に行われる。

【0021】

したがって、フィブリンネットワークにおけるサイズ捕獲、並びに特定の親和性結合反応を用いて、生物サンプル中の広い範囲のターゲット物質を定量又は単離することができる。ターゲット物質の例には、細胞、細胞成分、細胞亜種（真核細胞と原核細胞）、細菌、ウイルス、寄生虫、抗原、特定の抗体、毒素、タンパク質、核酸シーケンス、その他、

【0022】

ここで意味するフィブリノゲンは、したがって、例えば、ヒトの血液又は脊椎動物の血液など、あらゆる血液源から取得した天然フィブリノゲンである。本発明にかかるフィブリノゲンは、例えば、天然フィブリノゲンを新規な親和性機能を有する新しい分子を得るように、別の分子と組み合わせて得た合成分子であってもよい。好ましい実施例では、このように組み合わせた分子は、フィブリノゲン分子を別の分子と共有結合させることによって得られる。別の実施例では、このように組み合わせた分子が、最新の組み換えタンパク質合成技術によって作った融合タンパク質である。

【0023】

ここで意味するフィブリノゲンは、フィブリノゲンの全結晶構造を有するように修飾した合成フィブリノゲン分子であってもよい。好ましい実施例では、この合成フィブリノゲン分子は、様々な構造、サイズ、成分、及び親和活性を有するように修飾された分子である。特に、本発明のフィブリノゲンは、トロンビンによる開裂活性（ポリマー化）が現れており、ターゲット粒子又は分子に所定の親和性結合反応を有する、単純構造の分子（複雑で大きい天然フィブリノゲン分子ではなく）であることが望ましい。

【0024】

したがって、本発明は、ターゲット粒子又は分子を捕獲又は捕捉するピークルとして、フィブリノゲン又はフィブリノゲン修飾タンパク質を使用することを開示している。このフィブリノゲン又はフィブリノゲン修飾タンパク質をトロンビンに露出させると、フィブリノゲン分子が開裂し、フィブリンに変換される。フィブリン粒子は、次いで、自己ポリマー化して、小さなクロットを形成し、そこにターゲットが捕獲され、サンプル液量からターゲットの分離が行われる。提案されている方法によれば、例えば磁気粒子や、その他の「固体表面」ベースの技術といった最先端技術に比較して、多大なアドバンテージがある。本発明は、分子レベルで生じるので、ターゲットとフィブリノゲンピークルとの間の反応が非常に早く、効果的であり、表面ベースのアッセイに特有の非特定結合の問題がなくなる。

【0025】

このことに基づいて、また特定の使用において、本発明は、感染血液サンプルから無傷の微生物を効果的に分離し濃縮する溶液を提供する方法を提供している。この達成可能な

10

20

30

40

50

目標は、大量の血液から微量の微生物を分離することであり、その後、次の処理ステップに適合する少量のパuffaに濃縮できるようにすることである。本発明のもう一つの達成可能な目標は、従来の特別な技術で続いて検出し分析できる無傷の微生物を血液サンプルから分離することである。むしろ、達成すると、この方法は、高速培地法や、迅速かつより感度の高い分子ベースのアッセイを用いて、血流感染の迅速かつ有効な検出と診断に多くの可能性を開く。

【0026】

したがって、上述の記載から、本発明のフィブリノゲンは、サンプル（すなわち、全血サンプル）に天然のものであっても、このサンプルに人工的に加えるようにしてもよいことは明らかである。

10

【0027】

このことに基づいて、また特定の使用において、本発明は、合成サンプルからターゲット分子又は粒子を分離する方法を提供する。この方法は：

（a）サンプルにフィブリノゲンを加えるステップと；

（b）このサンプルに加えたフィブリノゲンをフィブリンに変換してフィブリンネットワークを形成することによって、フィブリンネットワーク内にターゲット分子又は粒子を捕獲するステップと；

（c）このフィブリンネットワークを取り出してフィブリンクロットを形成するステップと；

（d）周辺サンプル培地からこのフィブリンクロットを分離するステップと；
を具える。

20

【0028】

本発明による合成サンプルには、血液、血液派生物、あるいは血液成分サンプルが含まれるが、例えば、限定することなく、臨床サンプル（尿、唾液、綿棒検体等）、食物サンプル、環境サンプルといったフィブリノゲンを含まないサンプルであってもよい。

【0029】

したがって、本発明は更に、サンプルからターゲット分子又は粒子を分離するサンプル捕集デバイスを開示しており、これは：（i）識別コードと；（ii）このサンプルを入れる容器と；（iii）この容器に入れたフィブリノゲンを含むサンプルを具える。このデバイスは、サンプルがこのデバイス中でトロンビン又はトロンビン様酵素に露出した時にターゲット分子又は粒子を分離可能に捕獲するフィブリンクロットを形成するように操作できる。

30

【0030】

本発明によるデバイスは、例えば病原性粒子（細菌、ウィルス、他）あるいはターゲット分子（DNA、RNA、又はタンパク質、他）などのターゲット粒子又は分子の存在を後に調べる必要がある流体サンプルを受けると設計された標準反応チューブ又はリザーバであってもよい。本発明のデバイスは更に、上述したフィブリンクロットの形成とターゲットの分離を引き出す安定した試薬配合を具えている。好ましくは、このデバイスは、フィブリノゲン分子などのクロット因子と、トロンビン酵素などの凝固促進剤を含む、保存された安定試薬配合を含む反応領域を具える。このようなデバイスによれば、テストキット中の感染物質、毒素、核酸、及びタンパク質などのターゲットを、どのような複雑な生物学的サンプルからでも非常に少ないコピー数で、定量的に単離及び検出することができる。ここに開示したデバイスによれば、サンプルを捕集し、同時にこのサンプルからターゲット粒子又は分子を効率よく分離し濃縮することができ、これによって、必要なサンプル処理ステップが非常に簡単になり、更に、潜在的な感染リスクと、汚染のリスクを低減することになる。

40

【0031】

このように、本発明の主たる態様は、フィブリノゲン含有サンプルからターゲット分子又は粒子を分離する方法に関し、独立請求項1によって達成される。

【0032】

50

このように、本発明の主たる態様は、サンプルからターゲット分子又は粒子を分離するサンプル捕集デバイスに関し、独立請求項36によって達成される。

【0033】

様々な実施例が従属請求項に記載されている。これらの請求項及び請求項のすべての組み合わせの主題は、この明細書に引用によって組み込まれており、請求項が削除された場合でも、この開示の一部を成すものである。

【図面の簡単な説明】

【0034】

本発明の目的及び特徴は、特許請求の範囲に詳細に記載されている。本発明は、その構成と動作の両方に関して、更なる目的と利点とともに、添付図面に関連して以下の説明を参照することによって、最もよく理解することができる。

【図1】図1は、凝固プロセス(<http://en.wikipedia.org/wiki/Coagulation>参照)と本発明の主目的を達成するために使用できるフィブリノゲンのフィブリンへの変換を示す図である。

【図2】図2は、フィブリノゲン(1)含有サンプルをトロンビンに露出させたときの、フィブリンネットワーク(3)におけるターゲット分子又は粒子(2)の捕獲メカニズムを示す図である。

【図3】図3は、フィブリノゲン含有サンプルをトロンビンに露出させたときの、フィブリンネットワークにおけるターゲット分子又は粒子の親和性捕獲に関する様々な実施例を示す図であり：(a)フィブリノゲン/フィブリン(1)へ結合する部分(4)を有するターゲット(2)の天然親和性；(b)ターゲット(2)に対向し、フィブリン/フィブリノゲン(1)結合部分(4)を有する物質捕捉(5)を介する親和性捕捉；(c)ターゲット(2)に対向する捕捉部分ドメイン(7)を有するフィブリノゲン(1)融合タンパク質を介する親和性捕捉；である。

【図4】図4は、図3(b)に示す親和性捕獲の変形例を示す図であり、ここで親和性捕捉がターゲット(2)に対向し、フィブリン(3)結合部分(4')を有する物質捕捉(5)を介して行われる。好ましい実施例では、この部分(4')のフィブリンに対する親和性が、サンプルをトロンビンに露出させるステップ後にのみ、活性フォーム(4)に変形される。

【図5】図5は、ターゲットの分離から検出までの、全アッセイ処理を示す図であり、ここでは、フィブリノゲン(1)含有サンプル中のターゲット(2)が、フィブリン/フィブリノゲン結合部分(4)を含む物質捕捉(5)と、検出ラベル(9)を含む物質ラベリング(8)に露出される。トロンビンに露出されると、複合ターゲット/物質捕捉/物質ラベリングが、取り出したフィブリンクロット内で分離される。ターゲットの検出は、クロット濃縮の上で直接に実行される。

【図6】図6は、サンプル捕集デバイスの動作を示す図である。本発明によれば、このデバイスは、当該デバイス中でサンプルをトロンビン又はトロンビン様酵素に露出させたときに、ターゲット分子又は粒子を分離して捕獲するフィブリンクロットを形成するように動作する。

【発明を実施するための形態】

【0035】

本発明の一実施例によれば、ターゲット分子又は粒子を血液サンプルから分離する方法であって：

(a)サンプルに含まれるフィブリノゲンを少なくとも部分的にフィブリンに変換してフィブリンネットワークを形成することによって、フィブリンネットワーク内にターゲット分子又は粒子を捕獲するステップと；

(b)このフィブリンネットワークを取り出して、フィブリンクロットを形成するステップと；

(c)このフィブリンクロットを周辺サンプル培地から分離するステップと；
を具える。

【 0 0 3 6 】

したがって、血液サンプルによって、全血、多血小板血漿、少血小板血漿を意味する。血液サンプルは、唾液を意味することもあり、この場合、フィブリノゲンをサンプルに加えて、本発明にかかる分離メカニズムが働くようにする必要がある。本発明にかかる血液は、血液代替物、あるいは、血液成分、血液添加物、あるいは血液の機能を模したその他の成分からなる人工的に合成したサンプルを意味することもある。このような血液成分の典型的な例であり、輸血によく用いられる例は、血小板濃縮物、赤血球（ヘモグロビン）濃縮物、唾液、血漿代替物（血漿増量剤）を含む。例えば、敗血症サンプル、合成血液サンプル、あるいは血液代替物などの臨床ケースにおける場合など、血液サンプルにクロット因子（主にフィブリノゲン）が不足している場合、この不足は、フィブリノゲンを含むクロット因子を、本発明によるターゲット粒子又は分子を分離することができるようにする必須成分として血液サンプルに加えることによって、補填することができる。

10

【 0 0 3 7 】

同じ精神で、本発明の血液サンプルは、血液サンプルをフィブリノゲン欠落サンプルと組み合わせることによって得られる人工的に合成した血液サンプルを意味することもある。このようなフィブリノゲン欠落サンプルには、生物化学的サンプル、臨床サンプル、食物サンプル、環境サンプルなどどのような源からのサンプルが含まれてもよい。特に、本発明の血液サンプルの用語は、少なくともフィブリノゲンを含むクロット因子をフィブリノゲンが欠落しているサンプルに組み合わせることによって人工的に構成した血液サンプルにも及ぶ。

20

【 0 0 3 8 】

ここで、一般的に使用されている「フィブリンネットワーク」は、トロンビン酵素に露出させたときにフィブリノゲンが開裂し、フィブリンに変換されるプロセスの生成物を意味する。フィブリノゲンがフィブリンに変換されると、フィブリンモノマーが互いに近づいて非二重結合架橋三次元ポリマーネットワークを形成する自己ポリマー化ステップが生じる。更に、凝固因子XIIIの存在下では、フィブリンネットワークが因子XIIIaによって架橋され、トランスグルタミナーゼが因子XIIIのトロンビンによって活性化される。その他のトランスグルタミナーゼが存在し、共有結合の架橋及びグラフティングに関連してフィブリンネットワークを形成することができる。

30

【 0 0 3 9 】

ここで一般的に使用されている「クロット形成と収縮」は、所定時間経過後にクロットを形成するためのフィブリンマトリックスの観察された引き込みを意味する。このクロットのサイズは、所定の条件下では、時間が経つにつれてクロットから水分が抜けることによって小さくなる（すなわち、クロット退縮）。当然、このクロット退縮は、クロットのフィブリンメッシュに捕獲された活性血小板から多数の凝固因子を放出することによって誘発される。

【 0 0 4 0 】

フィブリンネットワークを形成するには、フィブリノゲン溶液及び/又はトロンビン溶液の濃縮物が、形成したネットワークの密度、クロット形成、最終フィブリンマトリックスの架橋及び速度に大きく影響する。通常、トロンビンとフィブリノゲンの量が少なくなると、架橋プロセスが遅くなり、密度が低いネットワークを伴うフィブリンクロットの形成に寄与する。したがって、トロンビンとフィブリノゲンの量の比率を制御することで、フィブリンネットワークの密度と最終クロットのサイズを制御して形成することができる。更に、トロンビンとフィブリノゲンの量の比率は、ターゲットの捕捉により適している密度の低いネットワークを有するフィブリンマトリックスを提供する。更に、トロンビン量のフィブリノゲン量に対する比率は、より小さいサイズの退縮フィブリンクロットを提供して、分離したターゲット粒子又は分子の濃縮倍率を高くすることができる。

40

【 0 0 4 1 】

本発明の基本的なメカニズムは、フィブリノゲンをフィブリンに変換することが、ターゲット粒子又は分子を捕捉するであろうネットワークの役割をするフィブリンネットワー

50

クの形成を促すことである。所望の効果を得るためには、前記フィブリンネットワーク形成の制御が特に重要である。この点に関して、重要な凝固因子としてのトロンビン及びフィブリノゲンの濃縮が、フィブリン捕獲ネットワークの形成と、続く、本発明によるクロットの生成と分離において重要である。実際、高濃度のトロンビンとフィブリノゲンによって、非常に密度の高いフィブリンネットワークと、あまり所望されない大きなクロットサイズを引き出す。しかしながら、発見は、トロンビンとフィブリノゲンのより低い濃度が、サンプル容器又はコンテナにおける小さいベレット形成に対して迅速に退縮する緩和フィブリンネットワークの形成を促すことである。この退縮の間に、フィブリンネットワークがサンプル値からターゲット粒子又は分子を捕獲して、これによって、その濃度と前記サンプルからの分離を引き起こす。

10

【0042】

サンプル含有フィブリノゲンからターゲット粒子又は分子を有効に捕獲し分離する所望の影響に達するには、サンプル中のフィブリノゲンの濃度が好ましくは、少なくとも $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。好ましい実施例では、サンプル中のフィブリノゲンの濃度が $10 \text{ mg}/\text{ml}$ 乃至 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。上記の範囲を超えてより高い濃度を使用することもできるが、より高密度のフィブリンマトリックスとより大きな退縮クロットサイズとなる。サイズ選択又はサイズ捕獲によってターゲット粒子を分離する場合は、比較的高濃度のフィブリノゲンを用いることが特に適している。ターゲット粒子のサイズが小さいほど、要求されるフィブリノゲン濃度が高くなる。しかしながら、より高い濃度のフィブリノゲンを用いたダウンサイズは、より大きいクロットサイズを形成することになり、結果としてターゲット粒子の濃縮率が低くなる。したがって、実際にサイズ選択又はサイズ捕獲の場合は、フィブリノゲン濃度は、最大捕捉効率に届くように、そして同時により低いクロットサイズになるように、最適化しなければならない。

20

【0043】

上述の記載から、本発明のフィブリノゲンは、サンプル（例えば、血液サンプル）由来のものであってもよく、サンプルに人工的に加えたものであってもよい。好ましい実施例では、例えば、全血の場合、上記サンプルが天然フィブリノゲンであっても、フィブリノゲンを加えるようにしてもよい。このことは、例えば、このようなサンプルで生じることがある天然フィブリノゲンのフィブリノゲン不足又は濃度の変化を補償するという利点となる。別の好ましい実施例では、血液サンプルに加えたフィブリノゲン（天然フィブリノゲン濃度が所望の濃度である場合でも）は、検討しているサンプルと異なる検体の血液源からのものである。例えば、ヒトの全血サンプルを使用する場合、この実施例によれば、子牛、羊、フクロネズミ、ニワトリなど別の脊椎動物からとったフィブリノゲンをヒトのサンプルに加えることができる。フィブリノゲン/トロンビン反応が検体特有の反応であるという事実を用いて、異なるフィブリノゲン源を、天然フィブリノゲンを含むサンプルへの添加物として用いることによる所望の効果により、特に加えたフィブリノゲン（好ましくは、関連する検体のトロンビンで活性化した）を用いて、分離プロセスにおける天然フィブリノゲン干渉を防止し（最小限にして）、ターゲット分離が行われるためである。このことは、特に、ターゲットの分離プロセスのより効果的な制御を行う場合に利点があり、天然フィブリノゲン変異体に頼らないようにする。同じ考え方で、別の実施例では、加えたフィブリノゲンが、使用する血液サンプルの内因性トロンビンによって開裂しないように特に設計された遺伝子組み換えフィブリノゲンタンパク質である。

30

40

【0044】

フィブリノゲンを含むサンプルからターゲット粒子又は分子を効率よく捕獲し、分離する所望の効果は、したがって、サンプルをトロンビン又はトロンビン様酵素にさらすことによって達成できる。この点に関して、このトロンビンは外因性（サンプルに人工的に加えた）又は内因性（すでにサンプルの一部である）トロンビン又はトロンビン様酵素であってもよい。したがって、トロンビンは活性体であっても、図1に示すような因子Xなどの凝固因子の活性化によって生じたものであってもよい。このトロンビン及び/又は凝固因子の源は、ヒト、動物、あるいは昆虫の源であってもよい。このように、トロンビン様

50

酵素によっては、外部血液源から得たセリン・プロテアーゼ族を意味し、これはからフィブリンに変換する能力を持つ。このような酵素はこの分野でよく知られており、通常、蛇毒から得るか、組み換え型で産生される。

【0045】

好ましい実施例では、トロンビン濃度が0.01乃至10 I.U./mlであり、好ましくは、0.1乃至2 I.U./mlの範囲である。実際は、所望のフィブリンネットワーク構造とクロットサイズを得るには、トロンビン又はトロンビン様酵素の品質をデバイス内のフィブリノゲン濃度に対応して調整するべきである。この点に関して、トロンビンの量は、フィブリノゲン1mg当たり20 I.U.トロンビンより少ないことが好ましく、好ましくはフィブリノゲン1mg当たり0.01乃至10 I.U.の範囲であり、より好ましくはフィブリノゲン1mg当たり0.1乃至1 I.U.の範囲である。

10

【0046】

好ましい実施例では、サンプルからターゲット分子又は粒子を捕獲するためにフィブリンネットワーク構造を制御するために、カルシウム濃度を調整するようにしてもよい。実際には、これは、試験を行うサンプルにカルシウムイオン源を加えることによって行われる。カルシウムイオン源は、好ましくは塩化カルシウム(CaCl_2)であり、好ましくは、サンプル量1ml当たり1乃至10mgの濃度範囲であり、より好ましくは、サンプル量1ml当たり4乃至7mgの濃度範囲であり、最も好ましくは、サンプル量1ml当たり5乃至6mgの濃度範囲である。血液サンプル中には、例えば、自然にカルシウムが存在しており、このカルシウム濃度の調整は、GDTA、EDTA及びクエン酸塩からなる群から選択されたカルシウムキレート剤を更に加えることによって行うことができる。

20

【0047】

好ましい実施例では、サンプルからターゲット分子又は粒子を捕獲するためにフィブリンネットワーク構造を制御するのに、この方法が、サンプルにクロット因子XIIIを加えるステップを具える。クロット因子XIIIは、トロンビンで活性化された後、フィブリンマトリックス架橋形成を触媒する酵素である。このステップは、更に、フィブリンネットワーク構造を安定化させ、クロット退縮を速め、フィブリン気孔率を調整する。不活性又は活性(XIIIa)型でこのような因子XIIIを加えてもよく、あるいは、サンプル量1ml当たり0.5乃至100 I.U.の濃度範囲、より好ましくはサンプル量1ml当たり1乃至60 I.U.の濃度範囲、最も好ましくはサンプル量1ml当たり1乃至10 I.U.の濃度範囲のフィブリノゲン添加剤で調整することができる。

30

【0048】

上述したことから、本発明に係る方法の達成できる主な目的は試験を行っているサンプルからターゲット粒子又は分子を効率よく濃縮することであるといえる。濃縮因子あるいは濃縮率は、実際はクロットサイズによって決まる。したがって、好ましい実施例では、形成したクロットのサイズが初期のサンプルサイズの少なくとも1/3であり、好ましくはこのクロットサイズが初期のサンプルサイズの1/10より小さい。更に、本発明の好ましい実施例では、このクロットが退縮し、更に、初期サンプル量の1/50乃至1/1000の値に届くサイズの小さなペレットを形成する。

【0049】

退縮率をより高めるためには、すでに上述したように、フィブリノゲンとトロンビンの濃度が重要なファクターとなる。カルシウム濃度や、クロット因子XIIIなどの添加剤といった、その他のパラメータは、クロットサイズに影響する。しかし、実際には、クロットは、サンプル中の活性化した血小板細胞又は活性化した血小板細胞溶解物の存在下で更に退縮する。血液サンプルに天然に存在する、あるいは血液成分サンプル中の添加物である場合、血小板の活性化は、アデノシン・ジホスフェート(ADP)とコラーゲンからなる群から選択された血小板アゴニストで達成される。

40

【0050】

このように、本発明は、サンプルを含むフィブリノゲンからターゲット分子又は粒子を分離する方法を開示しており、この方法は、サンプルを活性化した血小板細胞又は血小板

50

細胞溶解物にさらすステップを具える。好ましい実施例では、この活性化した血小板細胞又は血小板細胞溶解物は、サンプル中に天然に存在し、あるいはサンプルに人工的に加えることができる。血小板の活性化は、好ましくは、 1 mM 乃至 $1\text{ }\mu\text{ M}$ 、好ましくは $100\text{ }\mu\text{ M}$ 乃至 $10\text{ }\mu\text{ M}$ の濃度のADPによって行うことができる。

【0051】

より高い退縮率を得るために、好ましい実施例では、フィブリンネットワークに捕捉された磁気粒子を退縮手段として用いて、クロットサイズを圧縮し、したがって小さくしている。実際は、磁気粒子を用いて、退縮するフィブリンクロット中で血小板が自然に果たす役割を模倣する。この退縮は、フィブリンクロット内に捕捉された磁気粒子を、外部の磁力にあてることによって行われる。したがって、この磁気粒子は、フィブリンネットワークの気孔率に比べてより粒子のサイズが大きいため、フィブリンクロット内に捕捉される。好ましい実施例では、磁気粒子は、この粒子がフィブリノゲン/フィブリンに対して持っている親和性相互作用によって、フィブリンクロット内に捕捉される。このことは、トロンビン、クロット因子XIII、細菌性フィブリノゲン結合タンパク質、及び組織プラスミノゲン活性剤(t-PA)からなる群から選択できるフィブリノゲン/フィブリン結合部分で被覆された磁気粒子を用いて行われる。

【0052】

ターゲット分子又は粒子を更に濃縮するために、本発明は更に、これらのターゲットをフィブリンネットワークで捕捉するのに親和性捕捉を使用することを開示している。親和性捕捉を用いることの利点は：(1)サイズによる捕捉ではフィブリンネットワークで捕捉することが難しい、あるいは捕捉できない小さなターゲットを捕捉する；(2)親和性捕捉では、効率の良い捕捉収率を達成するのに必要なフィブリノゲン濃度がより低いので、高レベルのターゲット濃度(すなわち、非常に小さいクロット、あるいは、むしろペレット)となる。実際、親和性捕捉では、初期サンプル量の $1/50$ 以下の濃縮率、好ましくは $1/100$ 乃至 $1/1000$ になることが期待できる。サンプル量が大きい(例えば、 3 乃至 10 ml)の場合は、濃縮率は、むしろ初期サンプル量の $1/1000$ より小さい。

【0053】

図3(a)に示すように、好ましい第1の実施例では、フィブリノゲン/フィブリン(1)への結合部分(4)を有するターゲット(2)の天然の親和性によって、親和性捕捉が行われている。このような親和性捕捉の典型的な例は、タンパク質クランプ因子A(ClfA)を結合した表面フィブリノゲンを介してフィブリノゲン/フィブリンに有効な親和性を有する、黄色ブドウ球菌の捕捉である。国際特許出願WO2011/007,004号により一般的かつ詳細に述べられているように、ブドウ球菌、連鎖球菌、及び腸球菌は、フィブリノゲンを含むタンパク質に結合することによって感染を緩和できる付着因子と呼ばれるタンパク質を運ぶ。血液の場合、本発明の方法の別の利点は、血液細胞の天然の親和性を利用して、懸濁液中に赤血球を実質的に保持しながら、小さいフィブリンペレット中の白血球と血小板を更に沈殿させることである。このことは、微生物は血液サンプル中に常に自由に浮遊しているわけではなく、むしろ白血球や赤血球に付着しているか、あるいは分画されているので、特に重要である。例えば、黄色ブドウ球菌の場合は、細菌が宿主防衛を避けるため、血小板中の相互作用とその後の分画及び細菌生存が病原性に寄与する。天然の親和性捕捉は、電荷の相互作用によりフィブリンに強力に結合している核酸などの小さい分子の捕捉に用いることもできる。細菌性粒子については、このような分子がフィブリノゲン/フィブリンに直接的な相互作用親和性を有するので、天然の親和性を小さいタンパク質分子にまで及ぼすことができる。

【0054】

好ましい実施例では、天然の親和性分離プロセスを、様々な検体からのフィブリノゲンを用いて適応させている。例えば、ヒト由来のフィブリノゲンに代えて羊由来のフィブリノゲンは、黄色ブドウ球菌の捕捉率を下げる。これは、羊由来のフィブリノゲンは黄色ブドウ球菌に対する結合親和性が低いためである。同様に、サンプル中に使用しているフィ

10

20

30

40

50

ブリノゲンは、所定のターゲット又はターゲット群に対するフィブリノゲンの天然親和性捕獲を強化するあるいは禁止するように設計された遺伝子組み換えあるいは修飾フィブリノゲンであってもよい。

【0055】

親和性捕捉の第2実施例を図3(b)に示す。このように、親和性は、ターゲット(2)に対する物質-捕捉(5)を用いて実現し、フィブリノゲン/フィブリン(1)結合部分(4)を有する。ターゲットにタグをつける媒介手段として物質-捕捉を使用することは、フィブリノゲン/フィブリンに対するターゲットが天然の親和性を有していない場合に好ましい。この典型的な例は、ほとんどの場合フィブリノゲン/フィブリンに対する天然の親和性がないグラム-陰性種の捕捉である。これは、例えば、フィブリノゲン結合部分 10
を有するグラム-陰性種の抗体を用いることによって実現できる。更に、間接的な親和性捕捉が、ターゲット細胞、細胞成分、細胞垂集団(真核性と原核性の両方)、細菌、ウイルス、パラサイト、抗原、特定の抗体、毒素、タンパク質、核酸シーケンスなどを含むが、それに限定されないターゲット粒子又は分子に及ぶ。これを実現するには、ターゲット分子又は粒子の方向にある物質捕捉部分が、このターゲット分子又は粒子を特別に認識するように設計された抗体、核酸、アプタマーからなる群から選択される。更に、この物質捕捉部分は、トロンピン、フィブロネクチン、細菌性フィブリノゲン結合タンパク質、組織型プラスミノゲン活性剤、インテグリン、これらのいずれかの員から取り出した部分 20
からなる群から選択されたフィブリノゲン/フィブリン-結合部分と結合あるいは組み合わせることができ。好ましい実施例では、このフィブリン/フィブリノゲン-結合部分と物質捕捉部分が共有結合している。

【0056】

親和性捕捉の第3実施例が、図3(c)に記載されている。このように、親和性は、フィブリノゲン(1)融合タンパク質をターゲット(2)に対する捕捉部分ドメイン(7)とともに用いて認識される。融合フィブリノゲンタンパク質の使用は、フィブリノゲン分子中の直接的な親和性捕捉の選択性を組み合わせるという利点がある。この視点においては、フィブリノゲン分子は、捕捉して、一群のターゲット又は特定群のターゲットを分離するのにぴったりであるか、あるいは特別に設計することができる。更に、フィブリノゲン遺伝子組み換え又は修飾タンパク質は、自然の相互作用を防止する、及び/又は特定のサンプルタイプ内の分子又は粒子に対する特定の相互作用を強化するように設計すること 30
ができる。更に、別の実施例では、フィブリノゲン融合タンパク質が更に、分解部位を具えている。これは、以下に説明するように、溶解ステップの間にフィブリンネットワークから結合したターゲット分子又は粒子を回復させるのにとくに有益である。好ましい実施例では、分解部位は酵素によるあるいは加水分解による分解サイトである。最も好ましい実施例では、この分解部位が酵素による分解部位であり、これは、プラスミンと、マトリクス・メタロプロテイナーゼからなる群から選択された酵素によって開裂する。

【0057】

好ましい実施例では、図4に示すように、親和性捕捉が、ターゲット(2)に対向する物質-捕捉(5)を介して行われる。これは、フィブリン結合部分のような組織型プラスミノゲン活性剤を使用するフィブリノゲンに対する親和性を持たない、特別なフィブリン 40
(3)結合部分(4')を有する。好ましい実施例では、この部分(4')のフィブリンに対する親和性は、フィブリン結合部分として因子XIIIを使用する場合と同様に、サンプルをトロンピンに露出させた後にのみ、活性型(4)に転換される。

【0058】

使用に際して、本発明は、ターゲット分子又は粒子を分離して濃縮する方法のみならず、図5に示すようにターゲットを検出するステップも含む。この点に関して、アッセイ工程が、フィブリンクロット内でターゲットを捕捉し分離するステップであって、続いて、クロットの濃縮物内で直接ターゲットを検出するステップを含む。これは、例えば、サンプルを含むフィブリノゲン(1)を、フィブリン/フィブリノゲン結合部分(4)を含む物質-捕捉(5)と、検出標識(9)を含む物質-標識(8)に露出させることによって 50

、達成される。これによって、「ターゲット／物質 - 捕捉／物質 - 標識」のフォーメーションができる。トロンピンに露出させると、この複合「ターゲット／物質 - 捕捉／物質 - 標識」が、退縮フィブリンクロット（３）内で分離される。ターゲットの検出は、例えば、フィブリンクロットを標識（８）励起源（１０）に露出させて、検出信号（１１）を発することによって、クロット濃縮物上で直接行われる。一般的には、検出方法は、使用した標識に依存し、よく知られている検出方法である、蛍光、発光、ＳＥＲＳ（表面増感ラマン分光法）及びラマン分光法を適用できる。

【００５９】

ペレット形成とターゲット分離の後に、好ましい実施例では、調整した緩衝溶液にフィブリンクロット又はペレットを懸濁させ、次いで、このクロットをかき回して（すなわち、溶かして）フィブリンクロットから分離したターゲットを回復させる。調整緩衝液の典型的な例は、低張緩衝液、ブラズミンなどの繊維素溶解と組み合わせた洗浄剤及び／又はプロティナーゼＫ、プロナーゼ、メタロプロテナーゼなどのタンパク質分解試薬を含む緩衝剤である。このような溶解ステップは、更に、ブラズミノゲン又はブラズミノゲン活性剤などのクロット溶解強化材を加えることによって改善される。好ましい実施例では、この溶解ステップは更に、核酸分解酵素の使用を含むものでもよい。

【００６０】

本発明を実装するために、本発明の第２の態様はサンプルからターゲット分子又は粒子を分離するサンプル捕集デバイスに関し、このデバイスは：（ｉ）識別コード；（ｉｉ）サンプルを収納する容器であって、サンプルを受けるチューブの形であってもよい容器；及び（ｉｉｉ）この容器中のフィブリノゲン含有サンプル；を具え、このデバイスは、デバイス内でトロンピン又はトロンピン様酵素にサンプルを露出させたときに、ターゲット分子又は粒子を独立して捕獲するフィブリンクロットを形成するよう作動するデバイスである。

【００６１】

したがって、サンプル容器の容量は、０．１乃至１００ｍｌの間、好ましくは０．１乃至１０ｍｌの間である。サンプル中のフィブリノゲンの濃度は、好ましくは少なくとも０．１μｇ／ｍｌである。好ましい実施例では、サンプル中のフィブリノゲンの濃度は、０．１乃至１００ｍｇ／ｍｌの間であり、最も好ましくは、１０ｍｇ／ｍｌ乃至１０μｇ／ｍｌの間である。

【００６２】

したがって、このデバイスは更に、添加剤としてトロンピン又はトロンピン酵素を含む。この点に関して、トロンピン濃度は、サンプルの０．０１乃至１０Ｉ．Ｕ／ｍｌであり、好ましくはサンプルの０．１乃至２Ｉ．Ｕ／ｍｌである。実際には、トロンピン又はトロンピン様酵素の量は、デバイス中のフィブリノゲン濃度に対応して調整して、所望のフィブリンネットワーク構造とクロットサイズを得るようにしなくてはならない。この点に関して、トロンピンの量は、好ましくはフィブリノゲン１ｍｇ当たり２０Ｉ．Ｕトロンピンより少なく、好ましくは、フィブリノゲン１ｍｇ当たり０．０１乃至１０Ｉ．Ｕトロンピンの間、より好ましくは、フィブリノゲン１ｍｇ当たり０．１乃至１Ｉ．Ｕトロンピンの間である。

【００６３】

例えば、全血の血液サンプルの場合、本発明にかかるサンプル捕集デバイスは、更に、サンプル中に内生トロンピンの発生を促進する凝固剤を含む。このような促進剤は、例えば、カオリン、セライト、珪藻シリカ、グラスファイバなどのパウダー状あるいは繊維状のケイ酸化合物、炭酸カルシウム、硫酸カルシウムなどの微粉末状のカルシウム化合物、蛇毒由来のトロンピン様物質、及び凝固を促進する血液クロット因子を活性化するポリフェノールからなる群から選択することができる。更に、これらの凝固促進剤は、例えば、個別に、あるいは組み合わせてサンプルに加える、又は、サンプル容器の壁内部に被覆することができる。内生トロンピン促進剤の量とプロセスは、凝固プロセスを調整し、小さいフィブリンクロットサイズとするように調整しなければならない。

【 0 0 6 4 】

更に、本発明のデバイスは、カルシウム、キレート剤、活性血小板細胞、又は活性血小板細胞溶解物とファクターⅩⅠⅠⅠからなる群から選択された添加物を含んでいてもよい。したがって、サンプル捕集デバイスは更に、付加磁気粒子を含むものでもよい。好ましい実施例では、デバイス中のこの磁気粒子は、トロンビン、フィブロンectin、細菌性フィブリノゲン結合タンパク質、組織型プラスミノゲン活性剤からなる群から選択されたフィブリン/フィブリノゲン結合部分、及びこの群のいずれかの員由来のインテグリン及び部分で被膜されている。好ましい実施例では、このフィブリン/フィブリノゲン結合部分と磁気粒子が共有結合している。

【 0 0 6 5 】

更に、本発明のデバイスは：(Ⅰ)フィブリン/フィブリノゲン結合部分と、(ⅠⅠ)ターゲット分子又は粒子に対する物質捕捉部分と、を有する分子を含む添加剤を有していてもよい。したがって、このターゲット分子又は粒子に対する物質捕捉部分は、抗体、核酸、及びこのターゲット分子又は粒子を特に認識するように設計されたアプタマーからなる群から選択することができる。更に、この物質捕捉部分は、トロンビン、フィブロンectin、細菌性フィブリノゲン結合タンパク質、組織型プラスミノゲン活性剤からなる群から選択されたフィブリン/フィブリノゲン結合部分、及びこの群のいずれかの員由来のインテグリン及び部分と結合させる又は組み合わせることができる。好ましい実施例では、このフィブリン/フィブリノゲン結合部分と物質捕捉部分が共有結合している。

【 0 0 6 6 】

更に、本発明のデバイスは、フィブリノゲン遺伝子組み換え又は変性タンパク質を含む添加剤を含むものでもよい。このような遺伝子組み換えあるいは変性フィブリノゲンタンパク質は、特に、デバイス内で使用する際に、遺伝子組み換えフィブリノゲンタンパク質をサンプル中の特定のターゲット分子又は粒子と親和性相互作用を強化又は阻害するように、特に設計することができる。好ましい実施例では、デバイス内で使用している遺伝子組み換えタンパク質が、ターゲット分子又は粒子に対する捕捉部分ドメインを有するフィブリノゲン融合タンパク質である。別の実施例では、このフィブリノゲン融合タンパク質が更に、分解部位を含む。これは、以下に述べるように、溶解ステップの間に結合したターゲット分子又は粒子をフィブリンネットワークから捕集するのにとくに有益である。好ましい実施例では、この分解部位は、酵素による分解部位、又は加水分解による分解部位である。最も好ましい実施例では、この分解部位が酵素による分解部位であり、これは、プラスミンと、マトリックスメタロプロテイナーゼからなる群から選択された酵素によって開裂する。

【 0 0 6 7 】

実際は、上述した添加物のすべては、サンプルを捕集した後にサンプルに加えることができるか、あるいは、すでにデバイスに組み込まれている。後者の場合、この添加物は、水性緩衝液中で溶解させて一体化させることができる。好ましくは、この緩衝液は、水、好ましくは40 mM濃度の塩化カルシウム、及び好ましくは75 mM濃度の塩化ナトリウムを含み、好ましくはpH 7.3である。好ましい実施例では、この添加物は、凍結乾燥させた形でデバイス内に含めることができる。これは、デバイスの使用前に、あるいはデバイス内にサンプルを導入するときに凍結乾燥させることができる。

【 0 0 6 8 】

ここに開示したサンプル捕集デバイスでは、作動時に、小さなフィブリンクロットができて、そこにターゲット粒子又は分子が捕獲される。濃縮ファクター又は速度は、特に、このクロットのサイズによって決まる。したがって、最初のサンプルサイズの少なくとも1/3のクロットを形成するデバイスの構成と設計であり、好ましくはクロットサイズは、最初のサンプル量の少なくとも1/10である。更に、本発明の好ましい実施例では、このクロットは、初期のサンプル量の1/50乃至1/1000に届くサイズの小さなペレットを更に形成する。

【 0 0 6 9 】

本発明のサンプル捕集デバイスを用いて、ターゲット細胞、細胞部分、細胞亜集団（真核及び原核）、細菌、ウィルス、パラサイト、抗原、特定抗体、毒素、タンパク質、核酸シーケンス、などからなる群から選択することができるターゲット分子又は粒子を分離し濃縮することができる。

【 0 0 7 0 】

本発明のサンプル捕集デバイスを用いて、上記に定義した様々なサンプルからターゲット分子又は粒子を分離して濃縮することができる。一般的に、これには、全血、血液製剤、血液成分、クロット因子添加剤を伴う複合サンプルが含まれる。この点に関して、ここに述べたサンプルは、食物サンプル、臨床サンプル、環境サンプル、および実験サンプルを含めて、試験が必要なあらゆるタイプのサンプルを意味する。

10

【 0 0 7 1 】

実際、デバイス内の識別コードは、例えば、バーコード、デバイスの色、サイズ、および形状であってもよい。このような識別コードは、使用を意図したデバイスとアプリケーションの基準又は表示に使用することができる。本発明のデバイスは、実際、デバイスの構成部品、デバイスを使用するサンプルタイプ、および／又は分離が必要なターゲットによって区別することができる。

【 0 0 7 2 】

図 6 は、本発明によるデバイスを用いたサンプル処理の一例を示す。このデバイスは、閉塞キャップと識別コードを有する標準反応管でもよい。このデバイスは、例えば、病原性粒子又は分子（バクテリア、ウィルスなど）又はターゲット分子（DNA、RNA、又はタンパク質など）のターゲット粒子又は分子の存在を試験する必要がある、流体サンプルを受けように構成されている。本発明のデバイスは、更に、フィブリンクロットの形成とターゲットの分離を起こす安定した試薬処方を含む。デバイス内のサンプル捕集時に、フィブリノゲン分子がまず管内のターゲットと反応する。第 2 ステップにおいて、フィブリノゲンがフィブリンに変換され、フィブリンネットワーク中でターゲットのポリマー化と捕獲を促す。フィブリンネットワークは、第 3 ステップで、血液容器内で小さなペレットを形成するように反応する。ペレットが形成されると、周辺サンプルを移し替えて、小さいペレット中に捕獲されたターゲットの分離を促す。最終ステップにおいて、ペレットを溶解させて、少量の調整した緩衝液中でフィブリン捕獲からターゲットを回復させる。例えば、サンプル移送中にターゲット捕獲／ペレット形成ステップが閉じた管内で行われ一方、最新の液体操作自動システムを用いて、ペレットの分離と溶解を容易に行うことができる。このプロセスでは、ここに開示したデバイスがサンプルを捕集して、同時に、サンプルからターゲット粒子又は分子を効果的に分離し濃縮させ、必要なサンプル処理ステップを非常に簡単なものにするとともに、更に、潜在的な感染リスク又は汚染リスクを低減する。

20

30

【 0 0 7 3 】

実施例 1

血液成分サンプルからの黄色ブドウ球菌（SA）の捕捉：

多血小板血漿（PRP）サンプル。500 μ l のクエン酸 PRP サンプルを 100 CFU の SA 菌でスパイクする。濃度 10 U . I . / ml のトロンビン 5 μ l を加えてインキュベートし、スモールサイズのペレット（10 乃至 20 μ l サイズ）を形成した。このように形成したペレットを 100 μ l の溶解緩衝液（0 . 0 1 % サポニン、0 . 0 5 % ツイーン（Tween）、及び 0 . 0 5 % トリトン X）で溶解させ、5 μ l のプロティナーゼ K（10 U . I . / ml）によって、溶解緩衝液中で最初にスパイクした SA 菌の 90 乃至 100 % を回復させる。

40

【 0 0 7 4 】

実施例 2

血液成分サンプルからの黄色ブドウ球菌（SA）の捕捉：

少血小板血漿（PPP）サンプル。500 μ l のクエン酸 PPP サンプルを 100 CFU の SA 菌でスパイクして、例 1 と同じプロトコルで処理する。同じ回復パフォーマンス

50

スが得られる。しかし、P R Pの場合に比べると、フィブリンクロットが大きい。この差は、P P Pサンプルの場合、フィブリンクロットの退縮が低いためである。この退縮は、P R Pサンプル中に存在する血小板細胞によってむしろ確実になる。

【 0 0 7 5 】

実施例 3

血液成分サンプルからの黄色ブドウ球菌 (S A) の捕捉 :

セラムサンプル。5 0 0 μ l のクエン酸セラムを 1 0 0 C F U の S A 菌でスパイクして、例 1 と同じプロトコルで処理する。この場合、セラムサンプル中にフィブリノゲンがないため、クロット/ペレットは形成されない。1 . 2 5 m g のヒトフィブリノゲンをセラムサンプルに加えることによって、フィブリンクロットを形成することができ、これによって、セラムサンプルから S A 菌を分離する。

【 0 0 7 6 】

実施例 4

グラム陽性細菌及び菌類を全血から捕捉 :

1 0 0 C F U の微生物でスパイクした 4 m l の全血からの回復。

微生物 株 / 種	収率
S . p y o g e n e s M 5 7	8 5 %
C . a l b i c a n s	9 2 %
M R S E	8 3 %
E . f a e c a l i s	7 0 %

【 0 0 7 7 】

実施例 5

複合サンプルからのバクテリアの特定の捕捉 :

1 m l の複合 P B S サンプルを、サンプル中の様々な濃度のフィブリノゲンで黄色ブドウ球菌 (S A) (1 0 0 0 C F U / m l) 又はシトロバクターフロインディ (1 8 0 0 0 C F U / m l) をスパイクする。

フィブリノゲン (mg/ml)	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.08
ペレット量 (濃縮度)	~200 μ l (1/5)					<1 μ l (1/1000)
収率 MRSA MW2 in % (1000 cfu/ml)	100	100	100	100	100	100
シトロバクターフロインディ in % (1800 CFU/ml)	48	44	34.7	7.6	0	0

フィブリノゲン濃度を低くすることによって、ペレットサイズ (すなわち、濃縮度) が下がり、フィブリンネットワークの気孔サイズが下がる。このような条件で、S A 捕獲率は非常に効率が良いが、C . フロインディ捕獲率は大きく下がる。この捕獲効率の差は、S A バクテリアはフィブリノゲンに対して強い天然の親和性を持つが (C 1 f A 表面タンパク質を通して)、C . フロインディはこのような親和性に欠けることに起因する。

【 0 0 7 8 】

実施例 6

複合サンプルからの特定のバクテリアの捕獲 :

例 5 と同じ条件で、更に、ブドウ球菌 C 1 f A タンパク質で標識したグラム陰性脂質 A 表面タンパク質に対する抗体をサンプルに加えた変形を行ったサンプルとして、1 m l の複合 P B S 中の C . フロインディを用いた。この条件では、図 3 (b) に示すように、抗体が C . フロインディと結合して、フィブリノゲンに対して効率よく結合し、その後、フィブリンペレット中で効果的に分離する (ほぼ 1 0 0 %) 。

【 0 0 7 9 】

上述の好ましい実施例の様々な変形、変更を、当業者は、本発明の範囲と精神から外れることなく作ることができる。したがって、特許請求の範囲内で、本発明は、特にここで説明したように実施することができる。

【 図 1 】

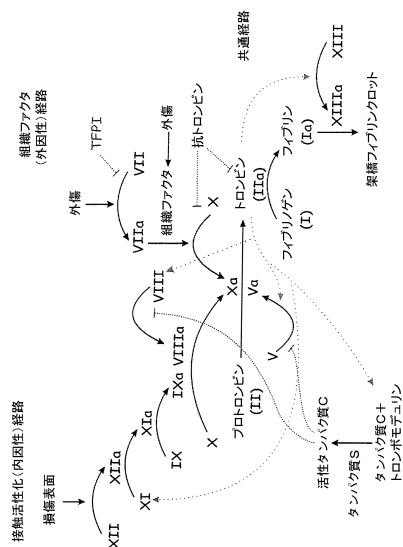


Figure 1

【 図 2 】

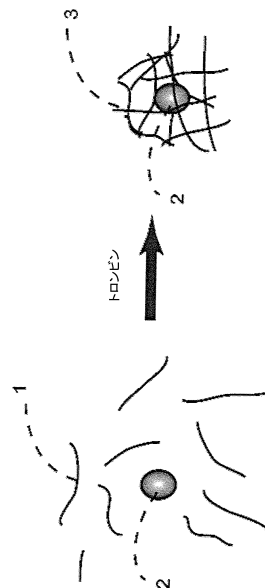


Figure 2

【図 3】

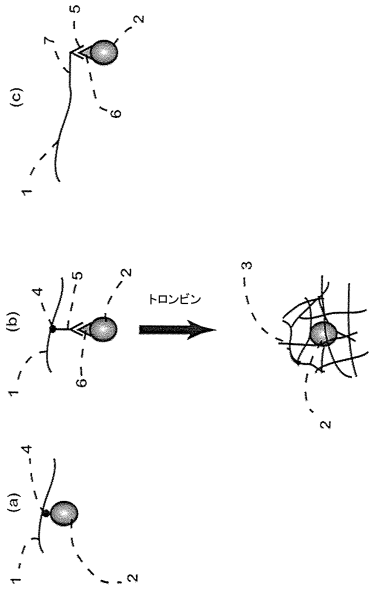


Figure 3

【図 4】

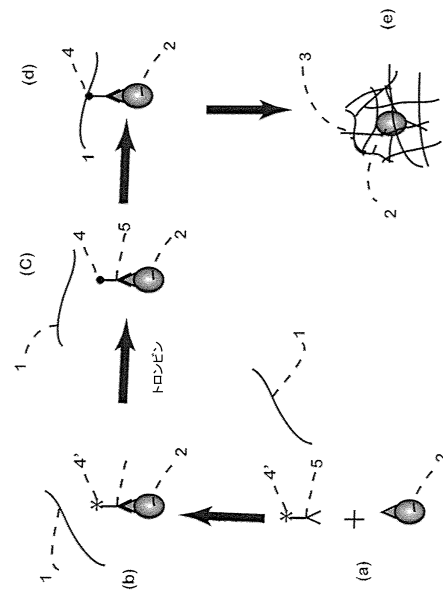


Figure 4

【図 5】

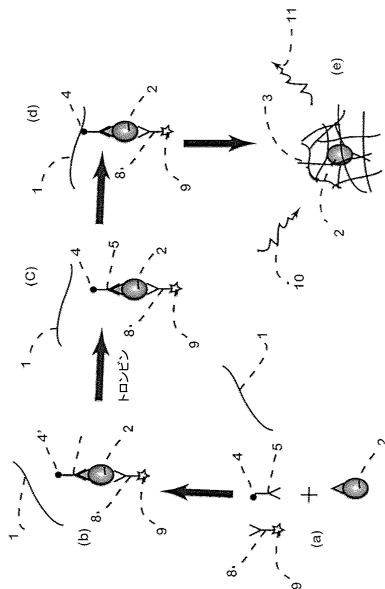


Figure 5

【図 6】

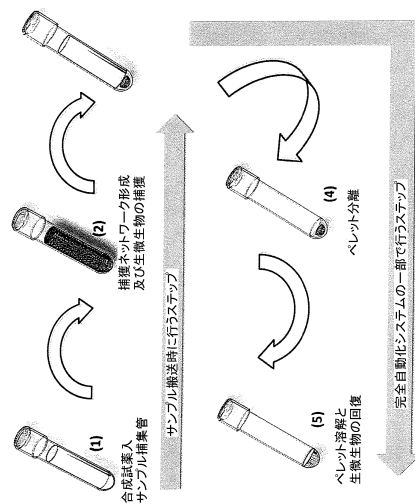


Figure 6

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 01478/10

(32)優先日 平成22年9月15日(2010.9.15)

(33)優先権主張国 スイス(CH)

(72)発明者 メルモ, ニコラ

スイス連邦 セアシュ - 1164 ビュシーヨン, ルート デ デュー コミューン 19

(72)発明者 フランソワ, パトリス

フランス共和国 エフ - 74960 クラン - ジェヴリエ, アレ デ コルティス, 13

(72)発明者 ラザレヴィチ, ウラディミール

スイス連邦 セアシュ - 1020 ルナン, アヴェニュー ド プレフォイー 38

(72)発明者 シュレンゼル, ジャック

スイス連邦 セアシュ - 1208 ジュネーヴ, シュマン ド トゥリピエ 1

審査官 伊藤 裕美

(56)参考文献 特表2007-502618(JP, A)

特表2009-502166(JP, A)

特表2007-517227(JP, A)

特表平08-500488(JP, A)

特表2000-504416(JP, A)

特表2005-528097(JP, A)

特表2010-526319(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)