(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2016-509471
(P2016-509471A)
(43)公表日　平成28年3月31日(2016.3.31)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12M 1/00	(2006.01)	C12M	1/00	ZNAA	4B024
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	M	4B029
G01N 33/545	(2006.01)	G01N	33/53	D	4B063
G01N 33/547	(2006.01)	G01N	33/545	A	
C12Q 1/68	(2006.01)	G01N	33/547		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 64 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-548022 (P2015-548022)
(86)(22)出願日　平成25年12月13日 (2013.12.13)
(85)翻訳文提出日　平成27年7月28日 (2015.7.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2013/075187
(87)国際公開番号　WO2014/093934
(87)国際公開日　平成26年6月19日 (2014.6.19)
(31)優先権主張番号　61/737,237
(32)優先日　平成24年12月14日 (2012.12.14)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　515160703
マインデラ　コーポレイション
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４３０１，　パロ　アルト，　ハイ　ストリート　２４６８
(71)出願人　501244222
ザ　スクリプス　リサーチ　インスティテュート
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９２０３７，　ラ　ホヤ，　ノース　トーリー　パインズ　ロード　１０５５０
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】バイオマーカーの検出および収集のための方法およびデバイス

(57)【要約】
本発明は、被験体から分子バイオマーカーをｉｎ　ｓｉｔｕで検出および捕捉するためのデバイスおよび方法を提供する。具体的には、デバイスは、対象とする１または複数のバイオマーカーに特異的なプローブを付着させたマイクロニードルのアレイを含有する。デバイスは、被験体の体内（例えば、組織、血流）のバイオマーカーの検出において、被験体に直接使用する（例えば、皮膚穿刺を介して）ことができる。第１のマイクロニードルを含むデバイスであって、前記第１のマイクロニードルを、第１のバイオマーカーに特異的な第１のプローブへと共有結合または非共有結合により付着させたデバイス。

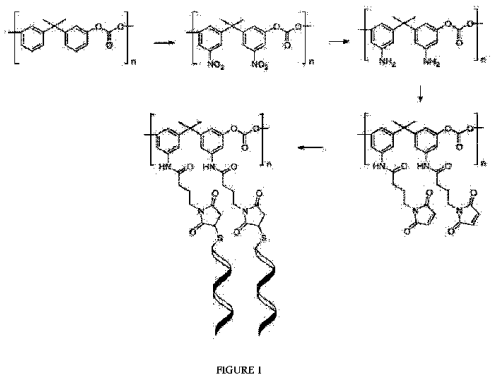


FIGURE 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
第１のマイクロニードルを含むデバイスであって、前記第１のマイクロニードルを、第１のバイオマーカーに特異的な第１のプローブへと共有結合または非共有結合により付着させたデバイス。
【請求項２】
前記第１のバイオマーカーが、ポリヌクレオチドであり、前記第１のプローブが、前記第１のバイオマーカーと相補的なポリヌクレオチドである、請求項１に記載のデバイス。
【請求項３】
前記第１のバイオマーカーが、ポリペプチドである、請求項１に記載のデバイス。
【請求項４】
前記第１のプローブが、前記第１のバイオマーカーに特異的な抗体である、請求項１に記載のデバイス。
【請求項５】
第２のバイオマーカーに特異的な第２のプローブをさらに含み、前記第２のプローブが、前記第１のプローブと異なる、請求項１に記載のデバイス。
【請求項６】
前記第２のプローブを、前記第１のマイクロニードルへと共有結合または非共有結合により付着させた、請求項５に記載のデバイス。
【請求項７】
前記第２のプローブを、第２のマイクロニードルへと共有結合または非共有結合により付着させた、請求項５に記載のデバイス。
【請求項８】
前記第２のバイオマーカーが、ポリヌクレオチドであり、前記第２のプローブが、前記第２のバイオマーカーと相補的なポリヌクレオチドである、請求項５に記載のデバイス。
【請求項９】
前記第１のプローブが、第１のヌクレオチド多型に特異的に結合し、前記第２のプローブが、第２のヌクレオチド多型に特異的に結合する、請求項５に記載のデバイス。
【請求項１０】
前記第２のバイオマーカーが、ポリペプチドである、請求項５に記載のデバイス。
【請求項１１】
前記第１のプローブおよび前記第２のプローブが、各々が同じバイオマーカーの異なるエピトープに特異的な異なる抗体である、請求項５に記載のデバイス。
【請求項１２】
前記第１のプローブを、複数のマイクロニードルへと付着させた、請求項１に記載のデバイス。
【請求項１３】
前記第１のマイクロニードルが、ポリマー、金属、またはセラミックを含む、請求項１に記載のデバイス。
【請求項１４】
前記第１のマイクロニードルが、ポリマーを含む、請求項１に記載のデバイス。
【請求項１５】
前記第１のプローブを、リンカーを介して、前記第１のマイクロニードルへと付着させた、請求項１に記載のデバイス。
【請求項１６】
前記リンカーが、チオール／アミノ二官能性リンカーである、請求項１５に記載のデバイス。
【請求項１７】
前記リンカーが、ポリ（エチレングリコール）リンカーである、請求項１５に記載のデバイス。

【請求項１８】
前記第１のマイクロニードルが、基材上に形成されている、請求項１に記載のデバイス。
【請求項１９】
前記第１のバイオマーカーおよび前記第２のバイオマーカーを増幅および同定するための区画をさらに含む、請求項１に記載のデバイス。
【請求項２０】
複数のマイクロニードルを含むデバイスであって、前記複数のマイクロニードルが、バイオマーカーに特異的な少なくとも１つのプローブへと共有結合または非共有結合により付着させた、少なくとも１つのマイクロニードルを含み、前記バイオマーカーが、皮膚または眼の状態を指し示すデバイス。
【請求項２１】
前記バイオマーカーが、皮膚の状態を指し示す、請求項２０に記載のデバイス。
【請求項２２】
前記皮膚の状態が、皮膚がんである、請求項２１に記載のデバイス。
【請求項２３】
前記バイオマーカーが、眼の状態を指し示す、請求項２０に記載のデバイス。
【請求項２４】
前記眼の状態が、眼の炎症または眼のがんである、請求項２１に記載のデバイス。
【請求項２５】
前記バイオマーカーが、ポリヌクレオチドであり、前記少なくとも１つのプローブが、前記バイオマーカーと相補的である、請求項２０に記載のデバイス。
【請求項２６】
前記少なくとも１つのプローブが、同じバイオマーカーの異なるヌクレオチド多型に特異的な異なるポリヌクレオチドプローブを含む、請求項２５に記載のデバイス。
【請求項２７】
前記バイオマーカーが、ペプチドまたはポリペプチドであり、前記少なくとも１つのプローブが、前記バイオマーカーに特異的な抗体である、請求項２０に記載のデバイス。
【請求項２８】
前記少なくとも１つのプローブが、同じバイオマーカーの異なるエピトープに特異的な異なる抗体を含む、請求項２７に記載のデバイス。
【請求項２９】
複数の異なるバイオマーカーに特異的な複数のプローブを含み、前記複数のプローブを、同じまたは異なるマイクロニードルへと付着させた、請求項２０に記載のデバイス。
【請求項３０】
少なくとも２つの異なるプローブを、同じマイクロニードルへと付着させた、請求項２９に記載のデバイス。
【請求項３１】
特異的なバイオマーカーに対する、少なくとも２つの同一なプローブを含み、前記少なくとも２つの同一なプローブを、１または複数のマイクロニードルへと付着させた、請求項２０に記載のデバイス。
【請求項３２】
前記マイクロニードルが、ポリマー、金属、またはセラミックを含む、請求項２０に記載のデバイス。
【請求項３３】
前記マイクロニードルが、ポリマーを含む、請求項３２に記載のデバイス。
【請求項３４】
前記プローブを、リンカーを介して、前記マイクロニードルへと付着させた、請求項２０に記載のデバイス。
【請求項３５】

前記リンカーが、チオール／アミノ二官能性リンカーである、請求項３４に記載のデバイス。
【請求項３６】
前記リンカーが、ポリ（エチレングリコール）リンカーである、請求項３４に記載のデバイス。
【請求項３７】
前記複数のマイクロニードルが、基材上に形成されている、請求項２０に記載のデバイス。
【請求項３８】
ｉｎ　ｓｉｔｕで前記プローブにより捕捉された前記バイオマーカーを増幅および同定するための区画をさらに含む、請求項２０に記載のデバイス。
【請求項３９】
複数のマイクロニードルを含むデバイスであって、前記複数のマイクロニードルが、バイオマーカーに特異的なプローブへと共有結合または非共有結合により付着させた、少なくとも１つのマイクロニードルを含み、前記プローブが、前記プローブが前記バイオマーカーを検出すると光学シグナルを発するセンサーを含むデバイス。
【請求項４０】
前記プローブの前記光学シグナルが、前記プローブが前記バイオマーカーを検出すると増大する、請求項３９に記載のデバイス。
【請求項４１】
前記プローブの前記光学シグナルが、前記プローブが前記バイオマーカーを検出すると低下する、請求項３９に記載のデバイス。
【請求項４２】
前記バイオマーカーが、ポリヌクレオチドであり、前記プローブが、前記バイオマーカーと相補的なポリヌクレオチドである、請求項３９に記載のデバイス。
【請求項４３】
前記プローブが、同じバイオマーカーの異なるヌクレオチド多型に特異的な異なるポリヌクレオチドプローブである、請求項４２に記載のデバイス。
【請求項４４】
前記バイオマーカーが、ペプチドまたはポリペプチドであり、前記プローブが、前記バイオマーカーに特異的な抗体である、請求項３９に記載のデバイス。
【請求項４５】
前記プローブが、同じバイオマーカーの異なるエピトープに特異的な異なる抗体である、請求項４４に記載のデバイス。
【請求項４６】
複数の異なるバイオマーカーに特異的な複数のプローブを含み、前記複数のプローブを、同じまたは異なるマイクロニードルへと付着させた、請求項３９に記載のデバイス。
【請求項４７】
少なくとも２つの異なるプローブを、同じマイクロニードルへと付着させた、請求項３９に記載のデバイス。
【請求項４８】
特異的なバイオマーカーに対する、少なくとも２つの同一なプローブを含み、同一なプローブを、１または複数のマイクロニードルへと付着させた、請求項３９に記載のデバイス。
【請求項４９】
前記マイクロニードルが、ポリマー、金属、またはセラミックから作製された、請求項３９に記載のデバイス。
【請求項５０】
前記マイクロニードルが、ポリマーを含む、請求項４９に記載のデバイス。
【請求項５１】

前記プローブを、リンカーを介して、前記マイクロニードルへと付着させた、請求項３９に記載のデバイス。
【請求項５２】
前記リンカーが、チオール／アミノ二官能性リンカーである、請求項５１に記載のデバイス。
【請求項５３】
前記リンカーが、ポリ（エチレングリコール）リンカーである、請求項５１に記載のデバイス。
【請求項５４】
ｉｎ　ｓｉｔｕで前記プローブにより捕捉された前記バイオマーカーを増幅および同定するための区画をさらに含む、請求項３９に記載のデバイス。
【請求項５５】
（ａ）複数のマイクロニードルを含むデバイスであって、前記複数のマイクロニードルが、バイオマーカーに特異的な第１のプローブへと共有結合または非共有結合により付着させた、少なくとも１つのマイクロニードルを含むデバイスと、
（ｂ）ポリメラーゼ連鎖反応のための試薬のセットと
を含むキット。
【請求項５６】
少なくとも１つのマイクロニードルを、異なるバイオマーカーに特異的な第２のプローブへと共有結合または非共有結合により付着させた、請求項５５に記載のキット。
【請求項５７】
ホルダーをさらに含む、請求項５５に記載のキット。
【請求項５８】
前記バイオマーカーが、ポリヌクレオチドであり、前記プローブが、前記バイオマーカーと相補的なポリヌクレオチドである、請求項５５に記載のキット。
【請求項５９】
前記プローブが、同じバイオマーカーの異なるヌクレオチド多型に特異的な異なるポリヌクレオチドプローブである、請求項５８に記載のキット。
【請求項６０】
前記試薬のセットが、ポリメラーゼ酵素、緩衝液、および対照試料を含む、請求項５５に記載のキット。
【請求項６１】
その使用のための指示書をさらに含む、請求項５５に記載のキット。
【請求項６２】
複数の異なるバイオマーカーに特異的な複数のプローブを含み、前記複数のプローブを、同じまたは異なるマイクロニードルへと付着させた、請求項５５に記載のキット。
【請求項６３】
少なくとも２つの異なるプローブを、同じマイクロニードルへと付着させた、請求項６２に記載のキット。
【請求項６４】
特異的なバイオマーカーに対する、少なくとも２つの同一なプローブをさらに含み、同一なプローブを、１または複数のマイクロニードルへと付着させた、請求項５５に記載のキット。
【請求項６５】
前記マイクロニードルが、ポリマー、金属、またはセラミックから作製された、請求項５５に記載のキット。
【請求項６６】
前記マイクロニードルが、ポリマーを含む、請求項６５に記載のキット。
【請求項６７】
前記プローブを、リンカーを介して、前記マイクロニードルへと付着させた、請求項５

５に記載のキット。
【請求項６８】
前記リンカーが、チオール／アミノ二官能性リンカーである、請求項６７に記載のキット。
【請求項６９】
前記リンカーが、ポリ（エチレングリコール）リンカーである、請求項６７に記載のキット。
【請求項７０】
ｉｎ　ｓｉｔｕで前記プローブにより捕捉された前記バイオマーカーを増幅および同定するための区画をさらに含む、請求項５５に記載のキット。
【請求項７１】
前記プローブが、前記プローブが前記バイオマーカーを検出すると視覚的シグナルを発するセンサーを含む、請求項５５に記載のキット。
【請求項７２】
生体試料との接触により、皮膚の状態に由来する１または複数のバイオマーカーを検出または抽出する、請求項５５に記載のキット。
【請求項７３】
生体試料との接触により、眼の状態に由来する１または複数のバイオマーカーを検出または抽出する、請求項５５に記載のキット。
【請求項７４】
前記試薬のセットが、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応用である、請求項５５に記載のキット。
【請求項７５】
被験体におけるｉｎ　ｓｉｔｕの組織または生体試料から１または複数のバイオマーカーを検出するための方法であって、（ａ）マイクロニードルを、前記被験体の組織または生体試料と接触させることであって、前記マイクロニードルを、プローブのセットへと付着させており、前記プローブが、前記１または複数のバイオマーカーにｉｎ　ｓｉｔｕで結合することと、（ｂ）前記プローブに結合した前記１または複数のバイオマーカーを検出することとを含む方法。
【請求項７６】
前記１または複数のバイオマーカーが、ポリヌクレオチドであり、前記プローブが、前記バイオマーカーと相補的なポリヌクレオチドである、請求項７５に記載の方法。
【請求項７７】
前記プローブが、同じバイオマーカーの異なるヌクレオチド多型に特異的な異なるポリヌクレオチドプローブである、請求項７６に記載の方法。
【請求項７８】
前記１または複数のバイオマーカーが、ペプチドまたはポリペプチドであり、前記プローブが、前記バイオマーカーに特異的な抗体である、請求項７５に記載の方法。
【請求項７９】
前記プローブが、同じバイオマーカーの異なるエピトープに特異的な異なる抗体である、請求項７８に記載の方法。
【請求項８０】
複数の異なるバイオマーカーに特異的な複数のプローブを含み、前記複数のプローブを、同じまたは異なるマイクロニードルへと付着させた、請求項７５に記載の方法。
【請求項８１】
少なくとも２つの異なるプローブを、同じマイクロニードルへと付着させた、請求項８０に記載の方法。
【請求項８２】
特異的なバイオマーカーに対する、少なくとも２つの同一なプローブを含み、同一なプローブを、１または複数のマイクロニードルへと付着させた、請求項７５に記載の方法。

【請求項８３】
前記マイクロニードルが、ポリマー、金属、またはセラミックを含む、請求項７５に記載の方法。
【請求項８４】
前記マイクロニードルが、ポリマーを含む、請求項８３に記載の方法。
【請求項８５】
前記プローブを、リンカーを介して、前記マイクロニードルへと付着させた、請求項７５に記載の方法。
【請求項８６】
前記リンカーが、チオール／アミノ二官能性リンカーである、請求項８５に記載の方法。
【請求項８７】
前記リンカーが、ポリ（エチレングリコール）リンカーである、請求項８５に記載の方法。
【請求項８８】
前記検出することが、前記１または複数のバイオマーカーを、検出可能な標識と接触させることを含む、請求項７５に記載の方法。
【請求項８９】
前記検出可能な標識が、フルオロフォアである、請求項８８に記載の方法。
【請求項９０】
前記検出することが、前記バイオマーカーを増幅することを含む、請求項７５に記載の方法。
【請求項９１】
前記マイクロニードル上の前記プローブに結合した前記バイオマーカーが、ポリメラーゼ連鎖反応により検出される、請求項７５に記載の方法。
【請求項９２】
前記マイクロニードル上の前記プローブに結合した前記バイオマーカーが、ポリヌクレオチドでタグ付けされた二次抗体および前記ポリヌクレオチドタグのＰＣＲ増幅により検出される、請求項７５に記載の方法。
【請求項９３】
前記バイオマーカーが、低分子または代謝産物であり、前記プローブが、前記バイオマーカーに特異的なリガンドである、請求項７５に記載の方法。
【請求項９４】
被験体におけるｉｎ　ｓｉｔｕの組織または生体試料から１または複数のバイオマーカーを検出するための方法であって、（ａ）マイクロニードルデバイスを、前記被験体の組織または生体試料と接触させることであって、前記マイクロニードルデバイスが、前記１または複数のバイオマーカーに特異的な１または複数のプローブを含み、少なくとも１つのプローブが、前記プローブが前記バイオマーカーを検出すると視覚的シグナルを発するセンサーを含むことと、（ｂ）前記視覚的シグナルに基づき、バイオマーカーを検出することとを含む方法。
【請求項９５】
前記１または複数のバイオマーカーが、ポリヌクレオチドであり、前記プローブが、前記バイオマーカーと相補的なポリヌクレオチドである、請求項９４に記載の方法。
【請求項９６】
前記プローブが、同じバイオマーカーの異なるヌクレオチド多型に特異的な異なるポリヌクレオチドプローブである、請求項９５に記載の方法。
【請求項９７】
前記１または複数のバイオマーカーが、ペプチドまたはポリペプチドであり、前記プローブが、前記バイオマーカーに特異的な抗体である、請求項９４に記載の方法。
【請求項９８】

前記プローブが、同じバイオマーカーの異なるエピトープに特異的な異なる抗体である、請求項９６に記載の方法。
【請求項９９】
複数の異なるバイオマーカーに特異的な複数のプローブを含み、前記複数のプローブを、同じまたは異なるマイクロニードルへと付着させた、請求項９４に記載の方法。
【請求項１００】
少なくとも２つの異なるプローブを、同じマイクロニードルへと付着させた、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０１】
特異的なバイオマーカーに対する、少なくとも２つの同一なプローブをさらに含み、同一なプローブを、１または複数のマイクロニードルへと付着させた、請求項９４に記載の方法。
【請求項１０２】
前記マイクロニードルが、ポリマー、金属、またはセラミックから作製された、請求項９４に記載の方法。
【請求項１０３】
前記マイクロニードルが、ポリマーを含む、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１０４】
前記プローブを、リンカーを介して、前記マイクロニードルへと付着させた、請求項９４に記載の方法。
【請求項１０５】
前記リンカーが、チオール／アミノ二官能性リンカーである、請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０６】
前記リンカーが、ポリ（エチレングリコール）リンカーである、請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０７】
ｉｎ　ｓｉｔｕで前記プローブにより捕捉された前記バイオマーカーを増幅および同定するためのシステムをさらに含む、請求項９４に記載の方法。
【請求項１０８】
前記検出することが、前記１または複数のバイオマーカーを、検出可能な標識と接触させることを含む、請求項９４に記載の方法。
【請求項１０９】
前記検出可能な標識が、フルオロフォアである、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１０】
前記検出することが、前記バイオマーカーを増幅することを含む、請求項９４に記載の方法。
【請求項１１１】
前記マイクロニードル上の前記プローブに結合した前記バイオマーカーが、ポリメラーゼ連鎖反応により検出される、請求項９４に記載の方法。
【請求項１１２】
前記マイクロニードル上の前記プローブに結合した前記バイオマーカーが、ポリヌクレオチドでタグ付けされた二次抗体および前記ポリヌクレオチドタグのＰＣＲ増幅により検出される、請求項９４に記載の方法。
【請求項１１３】
前記バイオマーカーが、低分子または代謝産物であり、前記プローブが、前記バイオマーカーに特異的なリガンドである、請求項９４に記載の方法。
【請求項１１４】
前記１または複数のバイオマーカーが、皮膚の状態と関連する、請求項９４に記載の方法。

【請求項１１５】
前記１または複数のバイオマーカーが、眼の状態と関連する、請求項９４に記載の方法。
【請求項１１６】
前記マイクロニードルが、前記マイクロニードルの表面積を増大させるようにエッチングされている、請求項９４に記載の方法。
【請求項１１７】
細胞外マトリックスを破壊することが可能な作用物質でコーティングされた複数のマイクロニードルを含む組成物。
【請求項１１８】
前記作用物質が、酵素である、請求項１１７に記載の組成物。
【請求項１１９】
前記酵素が、セリンプロテアーゼ、チオールプロテアーゼ、ＭＭＰ、パパイン、ヒアルロニダーゼ、ストレプトキナーゼ、ストレプトドルナーゼ、トリプシン、キモトリプシン、アルファ－キモトリプシン、アルファ－アミラーゼ、ＤＮアーゼ、コラゲナーゼ、およびスチラインからなる群から選択される、請求項１１７に記載の組成物。
【請求項１２０】
前記酵素が、ヒアルロニダーゼである、請求項１１７に記載の組成物。
【請求項１２１】
被験体の組織内の１または複数のバイオマーカーを検出するための方法であって、（ａ）マイクロニードルを、前記被験体の前記組織と、ｉｎ　ｓｉｔｕで接触させることであって、前記組織が、細胞外マトリックスを含み、前記マイクロニードルを、プローブのセットへと共有結合により付着させており、前記プローブが、バイオマーカーにｉｎ　ｓｉｔｕで結合することと、（ｂ）前記細胞外マトリックスを破壊することとを含む方法。
【請求項１２２】
前記細胞外マトリックスを、酵素活性により破壊する、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１２３】
前記細胞外マトリックスを破壊することが、超音波エネルギーを、前記細胞外マトリックスへと適用することを含む、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１２４】
前記細胞外マトリックスを、電位により破壊する、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１２５】
被験体のｉｎ　ｓｉｔｕの組織から１または複数のバイオマーカーを検出するための方法であって、（ａ）マイクロニードルを、前記組織と接触させることであって、前記組織が、細胞膜を含み、前記マイクロニードルを、プローブのセットへと付着させており、前記プローブが、バイオマーカーにｉｎ　ｓｉｔｕで結合することと、（ｂ）前記細胞膜を破壊することとを含む方法。
【請求項１２６】
前記細胞膜を、酵素活性により破壊する、請求項１２５に記載の方法。
【請求項１２７】
前記細胞膜を破壊することが、超音波エネルギーを、前記細胞膜へと適用することを含む、請求項１２５に記載の方法。
【請求項１２８】
前記細胞膜を、電位により破壊する、請求項１２５に記載の方法。
【請求項１２９】
マイクロニードルデバイスを調製する方法であって、
（ａ）無機塩を含む溶液を得ることと、
（ｂ）プローブおよびマイクロニードルを、前記溶液へと添加することと、
（ｃ）前記溶液内で前記プローブを前記マイクロニードルへとコンジュゲートさせることと

を含む方法。
【請求項１３０】
前記無機塩が、塩化ナトリウムである、請求項１２９に記載の方法。
【請求項１３１】
前記無機塩の濃度が、２．５Ｍ未満である、請求項１２９に記載の方法。
【請求項１３２】
被験体における１または複数のバイオマーカーを検出するための方法であって、マイクロニードルデバイスを、前記被験体の皮膚または眼組織と接触させることを含む方法。
【請求項１３３】
前記１または複数のバイオマーカーが、皮膚または眼の状態に関係する、請求項１３２に記載の方法。
【請求項１３４】
前記バイオマーカーが、ポリヌクレオチドである、請求項１３２に記載の方法。
【請求項１３５】
前記バイオマーカーが、前記被験体の血液中に存在する、請求項１３２に記載の方法。
【請求項１３６】
被験体における１または複数のバイオマーカーを検出するための方法であって、マイクロニードルデバイスを、前記被験体の皮膚毛細血管と接触させることを含む方法。
【請求項１３７】
前記マイクロニードルデバイスを、前記被験体の血液試料と接触させることをさらに含む、請求項１３６に記載の方法。
【請求項１３８】
１または複数のポリヌクレオチドバイオマーカーを被験体におけるｉｎ　ｓｉｔｕの組織から検出するための方法であって、術中手順の間に、マイクロニードルデバイスを、前記被験体の前記組織と接触させることを含む方法。
【請求項１３９】
前記組織が、脳、心臓、乳房、肝臓、膵臓、脾臓、膀胱、胃、肺、子宮、子宮頸部、前立腺、腎臓、腸、虫垂、甲状腺、および結腸からなる群から選択される臓器に由来する、請求項１３８に記載の方法。
【請求項１４０】
前記被験体の前記組織が、良性組織を含む、請求項１３８に記載の方法。
【請求項１４１】
前記被験体の前記組織が、悪性と疑われる組織を含む、請求項１３８に記載の方法。
【請求項１４２】
前記マイクロニードルデバイスが、悪性組織および前記悪性組織に隣接する良性組織に接触する、請求項１３８に記載の方法。
【請求項１４３】
前記マイクロニードルデバイスが、悪性組織に隣接する良性組織に接触する、請求項１３８に記載の方法。
【請求項１４４】
前記マイクロニードルデバイスが、腫瘍に接触する、請求項１３８に記載の方法。
【請求項１４５】
腫瘍のサージカルマージンを決定することをさらに含む、請求項１３８に記載の方法。
【請求項１４６】
前記被験体から得られる基準組織から１または複数のバイオマーカーを検出することをさらに含む、請求項７５、９４、１２１、１２５、１２９、１３２、１３６、または１３８に記載の方法。
【請求項１４７】
前記ポリマーが、熱可塑性ポリマーである、請求項１４に記載のデバイス。
【請求項１４８】

前記熱可塑性ポリマーが、ポリカーボネート、ポリ（メタクリル酸メチル）、ポリエチレン、およびポリプロピレンからなる群から選択される、請求項１４に記載のデバイス。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【０００１】

関連出願の引用

本願は、２０１２年１２月１４日提出の米国仮特許出願第６１／７３７，２３７号の利益を主張する。米国仮特許出願第６１／７３７，２３７号は、その全体が本明細書に参考として援用される。

【０００２】

背景

バイオマーカーの解析は、早くも、疾患を早期に検出し、患者を層別化し、処置の有効性をモニタリングするために好ましい方法となりつつある。バイオマーカーの変化の、迅速かつ高感度の検出は、技術的に不可能であるか、または複数の処理ステップを伴う煩瑣な手順を必要としうることが多く、大量の試料容量および診断／予後診断時程の長期化を必然化する。患者に由来する試料は、容量が限定されており、処理時間を延長する複数のステップを必要とする処理または手順に適さないことが多い。

【０００３】

診断適用で、対象とする分子バイオマーカーまたは生物学的解析物を検出するための現在の方法は、患者からの体液（例えば、血液、間質組織液）の抽出を主に利用する。アッセイされる特異的なバイオマーカーは、この体液試料に由来する。より近年の発明では、臨床的に関与性のバイオマーカーを、適用部位から直接はサンプリングせず、体液のさらなる処理を必要とする。分子アッセイに基づかない他の診断法、例えば、生検は、通常煩瑣であり、それらに固有の視覚的かつ主観的な性格に起因して、誤診の危険性が大きい。しかし、局在化された非循環バイオマーカーについては、現在のところ、生検が唯一の診断的選択肢となっていることが多い。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００４】

当技術分野では、多様な疾患または障害を有するかまたはこれらを発症する危険性がある被験体の体内に存在するバイオマーカーを検出および解析するためのより良好な手段が必要とされている。本発明は、この必要および他の必要に取り組む。

【課題を解決するための手段】

【０００５】

発明の概要

一態様では、本発明は、被験体の組織または生体試料から１または複数のバイオマーカーをｉｎ　ｓｉｔｕで検出または抽出するためのデバイスを提供する。デバイスは、マイクロニードルのアレイおよびバイオマーカーに特異的な複数のプローブを含むことが可能であり、この場合、プローブを、マイクロニードルへと共有結合により付着させている。デバイスのうちのいくつかでは、プローブは、異なるバイオマーカーに特異的であり、各異なるプローブを、異なるマイクロニードルへと付着させている。他のいくつかのデバイスでは、特異的なバイオマーカーに対する同じプローブを、２つ以上のマイクロニードルへと付着させている。デバイス内のマイクロニードルは、ポリマー、金属、セラミックまたは他の任意の適切な材料から作製することができる。

【０００６】

いくつかの場合には、本開示は、被験体のｉｎ　ｓｉｔｕの組織または生体試料から１または複数のバイオマーカーを検出または抽出するためのデバイスであって、１または複数のマイクロニードルと、バイオマーカーに特異的な１または複数のプローブとを含み、プローブを、共有結合的連結または非共有結合的連結を介して、マイクロニードルへと付着させたデバイスを提示する。

【０００７】
デバイスは、第１のマイクロニードルを含みうる。第１のマイクロニードルは、第１のバイオマーカーに特異的な第１のプローブへと共有結合により付着させることができる。代替的に、第１のマイクロニードルは、第１のプローブへと非共有結合により付着させることもできる。さらに、第１のプローブは、複数のマイクロニードルへと付着させることができる。いくつかの場合には、本発明は、第１のマイクロニードルを含むデバイスであって、第１のマイクロニードルを、第１のバイオマーカーに特異的な第１のプローブへと共有結合または非共有結合により付着させたデバイスを提供する。いくつかの場合には、第１のバイオマーカーは、ポリヌクレオチドでありうる。第１のプローブは、第１のバイオマーカーと相補的なポリヌクレオチドでありうる。他の場合には、第１のバイオマーカーは、ポリペプチド、抗体、代謝産物、または低分子でありうる。さらに、第１のプローブは、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、低分子、または生物学的受容体でありうる。いくつかの場合には、第１のニードルは、基材上に形成されている。

【０００８】
デバイスは、第２のバイオマーカーに特異的な第２のプローブをさらに含みうる。第２のプローブは、第１のプローブと異なりうる。第２のプローブは、第１のマイクロニードルへと共有結合または非共有結合により付着させることができる。代替的に、第２のプローブは、第２のマイクロニードルへと共有結合または非共有結合により付着させることもできる。第２のバイオマーカーは、ポリヌクレオチドでありうる。第２のプローブは、第２のバイオマーカーと相補的なポリヌクレオチドでありうる。第２のバイオマーカーはまた、ポリペプチド、抗体、代謝産物、または低分子でもありうる。さらに、第２のプローブは、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、低分子、生物学的受容体でもありうる。いくつかの場合には、第１のプローブは、第１のヌクレオチド多型に特異的に結合し、第２のプローブは、第２のヌクレオチド多型に特異的に結合する。いくつかの場合には、第１のプローブおよび第２のプローブは、各々が同じバイオマーカーの異なるエピトープに特異的な異なる抗体である。

【０００９】
いくつかの場合には、デバイスは、ポリマー、金属、またはセラミックを含むマイクロニードルをもたらす。第１のプローブは、複数のマイクロニードルへと共有結合または非共有結合により付着させることができる。第２のプローブおよび他の複数のプローブは、複数のマイクロニードルへと共有結合または非共有結合により付着させることができる。

【００１０】
本発明のいくつかのデバイスは、核酸バイオマーカーの検出を対象とする。これらのデバイスでは、マイクロニードルへとコンジュゲートさせうるプローブは、オリゴヌクレオチドまたはバイオマーカーと相補的なポリヌクレオチドである。デバイスのうちのいくつかは、熱可塑性ポリマーで製作されたマイクロニードルを採用する。デバイス内のポリヌクレオチドプローブは、チオール／アミノ二官能性リンカーまたはポリ（エチレングリコール）リンカーを含むがこれらに限定されない多くの適切な連結を介して、マイクロニードルへとコンジュゲートさせることができる。いくつかの場合には、本発明のデバイスは、第１のバイオマーカーおよび第２のバイオマーカーを増幅および同定するための区画をさらに含む。

【００１１】
本発明の他のいくつかのデバイスはとりわけ、ペプチドバイオマーカーまたはタンパク質バイオマーカーを検出するようにデザインされている。これらのデバイスのうちのいくつかでは、マイクロニードル上に固定化されたプローブは、バイオマーカーに特異的な抗体である。本発明の多様な実施形態では、マイクロニードルのアレイを支持するのに、平面状の基材を使用する。本発明のデバイスは、プローブにより検出されたバイオマーカーを増幅するための手段も加えて含有しうる。

【００１２】
デバイスは、複数のマイクロニードルを含みうる。複数のマイクロニードルは、バイオ

マーカーに特異的な少なくとも１つのプローブへと共有結合または非共有結合により付着させた、少なくとも１つのマイクロニードルを含みうる。バイオマーカーは、皮膚または眼の状態を含むがこれらに限定されない具体的な状態を指し示しうる。いくつかの場合には、バイオマーカーは、皮膚の状態を指し示しうる。いくつかの例では、皮膚の状態は、皮膚がんである。他の場合には、バイオマーカーは、眼の状態を指し示しうる。いくつかの例では、眼の状態は、眼のがんまたは眼の炎症である。

【００１３】

いくつかの場合には、本開示は、複数のマイクロニードルを含むデバイスであって、複数のマイクロニードルが、バイオマーカーに特異的な少なくとも１つのプローブへと共有結合または非共有結合により付着させた、少なくとも１つのマイクロニードルを含み、バイオマーカーが、皮膚または眼の状態を指し示すデバイスを提示する。いくつかの場合には、バイオマーカーは、ポリヌクレオチドであり、少なくとも１つのプローブは、バイオマーカーと相補的である。いくつかの場合には、少なくとも１つのプローブは、同じバイオマーカーの異なるヌクレオチド多型に特異的な異なるポリヌクレオチドプローブを含む。いくつかの場合には、バイオマーカーは、ペプチドまたはポリペプチドであり、少なくとも１つのプローブは、バイオマーカーに特異的な抗体である。いくつかの場合には、少なくとも１つのプローブは、同じバイオマーカーの異なるエピトープに特異的な異なる抗体を含む。

【００１４】

本発明のデバイスは、複数の異なるバイオマーカーに特異的な複数のプローブを含むことが可能であり、この場合、複数のプローブを、同じまたは異なるマイクロニードルへと付着させている。いくつかの場合には、少なくとも２つの異なるプローブを、同じマイクロニードルへと付着させている。いくつかの場合には、デバイスは、特異的なバイオマーカーに対する、少なくとも２つの同一なプローブを含み、少なくとも２つの同一なプローブを、１または複数のマイクロニードルへと付着させている。

【００１５】

代替的に、バイオマーカーはまた、術中手順の間に得ることもできる。デバイスは、プローブが、バイオマーカーを検出すると光学シグナルを発するセンサーをさらに含みうる。いくつかの例では、プローブの光学シグナルは、プローブがバイオマーカーを検出すると変化しうる。

【００１６】

別の態様では、本開示は、被験体におけるｉｎ　ｓｉｔｕの組織（例えば、皮膚、血流、組織）またはｅｘ　ｖｉｖｏの組織試料から１または複数のバイオマーカーを検出または増幅するための方法を提示する。方法は、（ａ）バイオマーカーに特異的な複数のプローブを共有結合により付着させた、複数のマイクロニードルを調製することと、（ｂ）マイクロニードルを、被験体の組織または生体試料と接触させることと、（ｃ）マイクロニードル上のプローブに結合したバイオマーカーを検出することとを伴う。

【００１７】

いくつかの場合には、本開示は、被験体におけるｉｎ　ｓｉｔｕの組織または生体試料から１または複数のバイオマーカーを検出するための方法であって、（ａ）マイクロニードルを、被験体の組織または生体試料と接触させることであって、マイクロニードルを、プローブのセットへと付着させており、プローブが、１または複数のバイオマーカーにｉｎ　ｓｉｔｕで結合することと、（ｂ）プローブに結合した１または複数のバイオマーカーを検出することと、を含む方法を提示する。

【００１８】

いくつかの場合には、本開示は、複数のマイクロニードルを含むデバイスであって、複数のマイクロニードルが、バイオマーカーに特異的なプローブへと共有結合または非共有結合により付着させた、少なくとも１つのマイクロニードルを含み、プローブが、プローブがバイオマーカーを検出すると光学シグナルを発するセンサーを含むデバイスを提示する。いくつかの場合には、プローブの光学シグナルは、プローブがバイオマーカーを検出

すると増大する。いくつかの場合には、プローブの光学シグナルは、プローブがバイオマーカーを検出すると低下する。

【００１９】

いくつかの場合には、本開示は、被験体におけるｉｎ　ｓｉｔｕの組織または生体試料から１または複数のバイオマーカーを検出するための方法であって、（ａ）バイオマーカーに特異的な１または複数のプローブを共有結合により付着させた、１または複数のマイクロニードルを含むデバイスを調製することと、（ｂ）マイクロニードルデバイスを、被験体の組織または生体試料と接触させることと、（ｃ）マイクロニードルアレイ上のプローブに結合したバイオマーカーを検出することと、を含む方法を提示する。

【００２０】

いくつかの場合には、本開示は、被験体におけるｉｎ　ｓｉｔｕの組織または生体試料から１または複数のバイオマーカーを検出するための方法であって、（ａ）マイクロニードルデバイスを、被験体の組織または生体試料と接触させることであって、マイクロニードルデバイスが、１または複数のバイオマーカーに特異的な１または複数のプローブを含み、少なくとも１つのプローブが、プローブがバイオマーカーを検出すると視覚的シグナルを発するセンサーを含むことと、（ｂ）視覚的シグナルに基づき、バイオマーカーを検出することと、を含む方法を提示する。

【００２１】

代替的に、方法は、（ａ）マイクロニードルデバイスを、被験体の組織または生体試料および１または複数のバイオマーカーに特異的な少なくとも２つのプローブと接触させることであって、バイオマーカーに特異的な少なくとも２つのプローブが異なり、プローブを、共有結合的連結または非共有結合的連結を介してマイクロニードルへと付着させることと、および（ｂ）プローブに結合したバイオマーカーを検出することも含みうる。

【００２２】

いくつかの場合には、本開示は、被験体の組織内の１または複数のバイオマーカーを検出するための方法であって、（ａ）マイクロニードルを、被験体の組織と、ｉｎ　ｓｉｔｕで接触させることであって、組織が、細胞外マトリックスを含み、マイクロニードルを、プローブのセットへと共有結合により付着させており、プローブが、バイオマーカーにｉｎ　ｓｉｔｕで結合することと、（ｂ）細胞外マトリックスを破壊することとを含む方法を提示する。いくつかの場合には、細胞外マトリックスを、酵素活性により破壊する。いくつかの場合には、細胞外マトリックスを破壊することは、超音波エネルギーを、細胞外マトリックスへと適用することを含む。いくつかの場合には、細胞外マトリックスを、電位により破壊する。

【００２３】

さらなる例では、方法は、（ａ）マイクロニードルデバイスを、細胞外マトリックスを含む試料と接触させることであって、マイクロニードルを、プローブのセットへと共有結合により付着させており、プローブが、バイオマーカーにｉｎ　ｓｉｔｕで結合することと、（ｂ）細胞外マトリックスを破壊することとを含みうる。代替的に、方法は、細胞膜を破壊することも含みうる。いずれの例でも、細胞外マトリックスまたは細胞膜は、酵素活性、超音波エネルギー、または電位により破壊することができる。

【００２４】

さらに別の例では、方法は、（ａ）マイクロニードルデバイスを、被験体の組織または生体試料と接触させることであって、マイクロニードルデバイスが、１または複数のバイオマーカーに特異的な１または複数のプローブを含むことと、（ｂ）バイオマーカーを増幅することとを含みうる。

【００２５】

バイオマーカーは、ポリヌクレオチドでありえ、プローブは、バイオマーカーと相補的なポリヌクレオチドでありうる。いくつかの場合には、プローブは、同じバイオマーカーの異なるヌクレオチド多型に特異的な異なるポリヌクレオチドプローブでありうる。

【００２６】

バイオマーカーは、ペプチドまたはポリペプチドでありえ、プローブは、バイオマーカーに特異的な抗体でありうる。いくつかの場合には、プローブは、同じバイオマーカーの異なるエピトープに特異的な異なる抗体でありうる。

【００２７】

異なるバイオマーカーを同時的に検出するため、方法で使用されるプローブを、異なるバイオマーカーに特異的とすることができる。プローブは、異なるマイクロニードルと付着させることもでき、同じマイクロニードルと付着させることもできる。他のいくつかの実施形態では、少なくとも２つのマイクロニードルが同一のプローブを保有する場合もあり、特異的なバイオマーカーを検出するために、複数のプローブを使用する場合もある。

【００２８】

本開示はまた、マイクロニードルデバイスを調製する方法であって、（ａ）無機塩を含む溶液を得ることと、（ｂ）プローブおよびマイクロニードルを、溶液へと添加することと、（ｃ）溶液内でプローブをマイクロニードルへとコンジュゲートさせることとを含む方法も提示する。いくつかの場合には、無機塩は、塩化ナトリウムである。いくつかの場合には、無機塩の濃度は、２．５Ｍ未満である。

【００２９】

これらの方法で使用されるマイクロニードルアレイの作製では、任意の適切な材料を使用することができる。例は、ポリマー、金属、またはセラミックを含むがこれらに限定されない。本発明のいくつかの方法では、核酸バイオマーカーの検出が意図される。これらの方法では、採用されるプローブは、バイオマーカーの配列と相補的な配列を伴うオリゴヌクレオチド分子またはポリヌクレオチド分子である。方法のうちのいくつかでは、マイクロニードルデバイスにより捕捉された核酸バイオマーカーを、ＰＣＲまたは定量的リアルタイムＰＣＲ（ｑＲＴ－ＰＣＲ）により検出および解析する。方法のうちのいくつかでは、マイクロニードルは、ポリマーから作製されており、プローブを、チオール／アミノ二官能性リンカーを介してマイクロニードルへと付着させる。代替的に、マイクロニードルは、ステンレス鋼から作製され、金でコーティングされており、プローブを、チオールリンカーを介してマイクロニードルへと付着させる。いくつかの実施形態では、マイクロニードルは、固体でありうる。本発明の他のいくつかの方法では、ペプチドバイオマーカーまたはポリペプチドバイオマーカーの検出が意図される。これらの方法では、採用されるプローブは、バイオマーカーに特異的に結合することが可能な分子、例えば、モノクローナル抗体である。マイクロニードルへとコンジュゲートさせた抗体で捕捉すると、マイクロニードル上のプローブに結合したペプチドバイオマーカーまたはタンパク質バイオマーカーは、オリゴヌクレオチドでタグ付けされた二次抗体を添加し、その後、コンジュゲートさせたタグをＰＣＲ増幅することにより検出することができる。

【００３０】

いくつかの場合には、被験体における皮膚または眼組織から１または複数のポリヌクレオチドバイオマーカーを検出するための方法は、マイクロニードルデバイスを、被験体の皮膚または眼組織と接触させることを含みうる。方法は、マイクロニードルデバイスを、被験体の皮膚毛細血管と接触させることをさらに含みうる。他の場合には、方法は、マイクロニードルデバイスを、術中手順の間に、被験体の組織または生体試料と接触させることを含みうる。組織または生体試料は、脳、心臓、乳房、肝臓、膵臓、脾臓、膀胱、胃、肺、子宮、子宮頸部、前立腺、腎臓、腸、虫垂、および結腸からなる群から選択される臓器に由来しうる。方法は、腫瘍を被験体から摘出した後で、マイクロニードルを、腫瘍のマージンへと接触させることをさらに含みうる。いくつかの場合には、本開示の方法は、被験体の血液中に存在するバイオマーカーを検出する。

【００３１】

本開示はまた、プローブをマイクロニードルへとコンジュゲートさせるための方法であって、無機塩を添加する方法も提示する。無機塩の例は、ハロゲン化物対イオンを伴うことが多い、リチウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、マグネシウム塩、およびカルシウム塩を含むがこれらに限定されない。いくつかの場合には、無機塩は、塩化ナトリウムであ

る。無機塩は、約０．１Ｍ～２．０Ｍの間の濃度で添加しうる。さらに、無機塩は、約０．５Ｍ～１．５Ｍの間の濃度でも添加しうる。

【００３２】

本発明の多様な方法は、被験体から得られる基準組織から１または複数のバイオマーカーを検出することをさらに含みうる。本発明のいくつかのデバイスまたは方法は、被験体の血流からバイオマーカーを検出および収集するようにデザインする。これらの実施形態では、被験体の皮膚を穿刺することにより、プローブをコンジュゲートさせたマイクロニードルアレイを、被験体の血流と接触させる。

【００３３】

さらに別の態様では、本発明は、本出願で記載される、バイオマーカーを検出または抽出するためのデバイスのうちのいずれかを含むキットを提供する。キットは、ポリメラーゼ連鎖反応のための試薬のセットをさらに含みうる。いくつかの例では、試薬のセットは、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応用でありうる。キットは、ホルダーまたはその使用のための指示書をさらに含みうる。

【００３４】

いくつかの場合には、本開示は、（ａ）複数のマイクロニードルを含むデバイスであって、複数のマイクロニードルが、バイオマーカーに特異的な第１のプローブへと共有結合または非共有結合により付着させた、少なくとも１つのマイクロニードルを含むデバイスと、（ｂ）ポリメラーゼ連鎖反応のための試薬のセットとを含むキットを提示する。いくつかの場合には、キットは、ホルダーをさらに含む。いくつかの場合には、試薬のセットは、ポリメラーゼ酵素、緩衝液、および対照試料を含む。いくつかの場合には、キットは、その使用のための指示書をさらに含む。

【００３５】

さらなる態様では、本発明は、細胞外マトリックスを破壊することが可能な基質でコーティングされた複数のマイクロニードルを含む組成物を提供する。いくつかの場合には、基質は、酵素でありうる。酵素は、セリンプロテアーゼ、チオールプロテアーゼ、およびＭＭＰからなる群から選択することができる。具体的な酵素は、パパイン、ヒアルロニダーゼ、ストレプトキナーゼ、ストレプトドルナーゼ、トリプシン、キモトリプシン、アルファ－キモトリプシン、アルファ－アミラーゼ（ａｌｐｈａ－ａｍｌｙａｓｅ）、ＤＮアーゼ、コラゲナーゼ、およびスチラインを含む。一例では、酵素は、ヒアルロニダーゼである。

【００３６】

本発明の性格および利点についてのさらなる理解は、明細書の残りの部分および特許請求の範囲を参照することによりなされうる。

【００３７】

参照による組込み

本明細書で言及される全ての刊行物および特許出願は、各個別の刊行物または特許出願が参照により組み込まれることが、具体的かつ個別に指し示された場合と同様に、参照により本明細書に組み込まれる。

【００３８】

本発明の新規の特色は、付属の特許請求の範囲に特定して示される。本発明の特色および利点についてのより良好な理解は、本発明の原理が活用される例示的な実施形態を示す、以下の詳細な記載、および付属の図面（また、「図（Ｆｉｇｕｒｅ）」または「図（ＦＩＧ）」とも称する）を参照することにより得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００３９】

【図１】図１は、ポリカーボネート表面を化学修飾し、チオール修飾されたＤＮＡプローブを付着させるスキームを例示する。

【００４０】

【図２】図２は、近赤外フィルターを使用して、共焦点顕微鏡で画像化した、５’－Ｃｙ

５修飾を保有するＤＮＡで修飾されたポリマー表面を例示する。画像の左部分内のエリアを修飾した。
【００４１】
【図３】図３は、蛍光ｄＵＴＰ塩基を含有するＤＮＡで修飾されたステンレス鋼表面を例示する。パネルＡ：ステンレス鋼表面上のＤＮＡについての蛍光画像である。パネルＢ：ステンレス鋼試料の表面を示す明視野画像である。
【００４２】
【図４】図４は、複数のマイクロニードルを伴う、本開示のデバイスの表面についての概略図である。
【００４３】
【図５】図５は、金表面へとカップリングされたＤＮＡプローブが、バイオマーカーにハイブリダイズする工程を例示する。
【００４４】
【図６】図６は、本開示のデバイスによる処置を施す方法を例示する。
【００４５】
【図７】図７は、ＮａＣｌをカップリング手順へと添加したときの、オリゴヌクレオチドの、金属マイクロニードルのアレイ表面への結合の増強を呈示する。
【００４６】
【図８】図８は、本発明の方法を使用する、ホモジナイズされたヒト皮膚試料のアッセイに由来するｑＲＴ－ＰＣＲデータを表示する。
【発明を実施するための形態】
【００４７】
詳細な説明
本明細書では、本発明の多様な実施形態について示し、記載してきたが、当業者には、このような実施形態は、例だけを目的として提示されることが明らかであろう。本発明から逸脱しない限りにおいて、当業者は、多数の変更、変化、および代替を想定しうる。本発明の実施においては、本明細書で記載される本発明の実施形態に対する多様な代替物を採用しうることを理解されたい。
【００４８】
本発明は、被験体の体内からバイオマーカー、とりわけ、分子バイオマーカーを検出および収集するためのデバイスおよび方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明に従い、単一または複数のマイクロニードルを伴うマイクロニードルアレイベースのデバイスが製作される。アレイ上の個々のマイクロニードルの長さは、例えば、５０μｍ～５ｍｍの範囲で変化しうる。デバイスは、金属および合金、無機セラミックおよびポリマーを含むがこれらに限定されない、異なる材料、複合材料、および材料の組合せにより製作することができる。マイクロニードルは、バイオマーカーのためのプローブを、マイクロニードル表面へとカップリングさせるように化学修飾する。具体的なカップリング化学反応は、マイクロニードルの材料に依存する。異なるバイオマーカーは、同じアレイ上または同じマイクロニードル上に固定化されたコグネイトプローブにより検出することができる。例示として述べると、デバイスは、所望のバイオマーカーが提示されたプローブに結合することを可能とする目的で、皮膚、眼、腫瘍、または他の組織など、患者の解剖学的位置へと適用することができる。適用は、手（例えば、親指の圧力）で行うこともでき、それをサンプリングの持続時間にわたり適所に保持するためのストラップまたはバンドを伴うかまたは伴わないアプリケーターデバイスで行うこともできる。マイクロニードルプローブを物理的に挿入することにより、細胞膜を破壊して、挿入されたマイクロニードル上のプローブへの結合が可能なバイオマーカーを含む遺伝子材料を放出させることができる。細胞外のバイオマーカーは、プローブへの結合が直接可能であり、破壊された細胞から放出された材料からサンプリングする必要がない。
【００４９】
バイオマーカーがマイクロニードルに結合するのに必要とされる時間は、バイオマーカ

ーの全体量、生体内分布、および濃度、組織の組織化、ならびにマイクロニードルプローブの物理的および化学的大きさ（例えば、表面積、プローブの数、結合部位の数）を含むがこれらに限定されない、いくつかのパラメータに依存するであろう。適用時間は、例えば、１０秒間未満～６０分間の範囲にわたりうる。マイクロニードルアレイを組織から取り出すと、ＰＣＲ、定量的ＰＣＲ、タンパク質ＰＣＲ、サンドイッチＥＬＩＳＡ、溶出質量分析、溶出ウェスタンブロット、および溶出ＥＬＩＳＡを含むがこれらに限定されない、いくつかの異なる技法を使用して、バイオマーカーをアッセイすることができる。バイオマーカーは、マイクロニードルから分離した後でアッセイすることもでき、マイクロニードル上で直接アッセイすることもできる。

【００５０】

実施例で詳細に例示される通り、プローブの、マイクロニードルへのコンジュゲーションでは、カップリングされるマイクロニードルおよびプローブに応じて、多様な化学反応を使用することができる。生体分子を共有結合により付着させるための、ポリマーから作製されたマイクロニードルの化学修飾は、当技術分野で開発された多数の連結により実施することができる。例えば、ポリカーボネート表面を伴うマイクロニードルでは、カーボネート単量体は、重合後に化学的に誘導体化されうる芳香族部分を含有する。ニードルを硝酸で処理した後、結果として得られるニトロ基を還元することにより、分子をポリマー骨格へとカップリングさせうる、アミンハンドルがもたらされる。この２ステップ反応が、作製されたマイクロニードルアレイ上で、アレイまたは個々のマイクロニードルの完全性を損なわずに実施しうることは重要である。この手順を使用して、カルボン酸含有プローブを、マイクロニードル表面へと連結するのに、標準的なアミド結合カップリング試薬を使用することができる。

【００５１】

マイクロニードルを金属で製作する場合も、ポリマー表面について記載されたのと同じ原理の、金属表面への適用が達成可能である。例えば、ステンレス鋼表面を、スパッターコーティング工程を介して、金でコーティングし、付着のための化学ハンドルをもたらすことができる。次いで、十分に特徴付けられた、金表面に対するチオールのアフィニティーを活用することにより、二価の架橋剤を、一方の末端におけるチオールおよび他方の末端におけるアミンにより、金属表面へと付着させ、これにより、プローブ分子の、マイクロニードル表面への同一のカップリング化学反応を可能とすることができる。当技術分野ではまた、生体分子を共有結合により連結するための、他の種類のマイクロニードル表面（例えば、無機セラミック）の化学修飾に適する方法も公知である。

【００５２】

本明細書で記載される本発明は、診断法および疾患の予後診断のための遺伝子（例えば、ｍＲＮＡ、ＤＮＡ）バイオマーカー、タンパク質バイオマーカー、ホルモンバイオマーカー、低分子バイオマーカー、および細胞バイオマーカーを含む、診断法の多くの異なる側面における広範な適用可能性を有する。例えば、本明細書で記載されるデバイスまたは方法は、皮膚ベースのバイオマーカーの検出、全身循環バイオマーカーの検出、病原体（例えば、細菌、ウイルス、または寄生虫）の検出、または手術による腫瘍の切除時における腫瘍マージンの決定において有用でありうる。本明細書で記載される通り、本発明の皮膚ベースの診断適用の具体例は、皮膚悪性黒色腫、非メラニン細胞皮膚がん（例えば、基底細胞癌、扁平上皮癌）、自己免疫障害（例えば、乾癬）、感染性疾患、および局所疾患（例えば、ブルーリ潰瘍、オンコセルカ症）のためのバイオマーカーの検出を含む。本発明の非皮膚ベースの診断適用の具体例は、腫瘍性疾患、血液疾患、心血管疾患、ダウン症候群のためのマーカーの検出、および臨床試験時における、リアルタイムで迅速なバイオマーカーの検出を含む。

【００５３】

以下の節は、本発明を実施するためのより詳細な指針を提示する。

【００５４】

定義

別段に定義されない限りにおいて、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が関連する技術分野の当業者により一般に理解される意味と同じ意味を有する。以下の参考文献は、当業者に、本発明で使用される用語の多くについての一般的な定義を提示する。Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｍｏｒｒｉｓ（Ｅｄ．），Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（第１版，１９９２）；Ｏｘｆｏｒｄ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｓｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．（Ｅｄｓ．），Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ（改訂版，２０００）；Ｅｎｃｙｃｌｏｐａｅｄｉｃ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｋｕｍａｒ（Ｅｄ．），Ａｎｍｏｌ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ Ｐｖｔ．Ｌｔｄ．（２００２）；Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（Ｅｄｓ．），Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（第３版，２００２）；Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｈｕｎｔ（Ｅｄ．），Ｒｏｕｔｌｅｄｇｅ（第１版，１９９９）；Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，Ｎａｈｌｅｒ（Ｅｄ．），Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ Ｔｅｌｏｓ（１９９４）；Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｋｕｍａｒ ａｎｄ Ａｎａｎｄａｎｄ（Ｅｄｓ．），Ａｎｍｏｌ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ Ｐｖｔ．Ｌｔｄ．（２００２）；およびＡ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｏｘｆｏｒｄ Ｐａｐｅｒｂａｃｋ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ），Ｍａｒｔｉｎ ａｎｄ Ｈｉｎｅ（Ｅｄｓ．），Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ（第４版，２０００）。加えて、本発明の実施において、読者の一助となる以下の定義も提示される。

【００５５】

バイオマーカーとは、正常な生物学的過程、病原性過程、または治療的介入に対する薬理学的応答の指標として客観的に測定され、評定される、任意の特徴を広く指す。別段に言及しない限りにおいて、本明細書で使用される「バイオマーカー」という用語は具体的に、生体試料（例えば、血漿、血清、脳脊髄液、気管支肺胞洗浄液、生検）中のそれらの測定を可能とする生物物理的特性を有するバイオマーカーを指す。別段に言及しない限りにおいて、「バイオマーカー」という用語は、「分子バイオマーカー」または「分子マーカー」と互換的に使用される。バイオマーカーの例は、核酸バイオマーカー（例えば、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド）、ペプチドバイオマーカーまたはタンパク質バイオマーカー、脂質マーカー、およびリポ多糖マーカーを含む。

【００５６】

本明細書で使用される「マイクロニードルデバイスまたはマイクロニードルアレイ（マイクロアレイ）」とは、診断剤または診断化合物が固定化された、少なくとも１つの小型の穿刺エレメントまたはマイクロニードルを含むデバイスを指す。マイクロニードルは、接触すると、ヒトまたは他の哺乳動物被験体（例えば、皮膚の角質層）における生物学的障壁を穿刺することが可能である。好ましくは、デバイスは、複数のこのようなマイクロニードル、例えば、２、５、１０、２５、５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、２０００、５０００、１００００、２００００本、またはそれより多くのマイクロニードルを含む。診断プローブを、マイクロニードルへとコンジュゲートさせることにより、本発明のマイクロニードルデバイスは、被験体の組織内または生体試料中（例えば、血流中または皮膚内）のバイオマーカーをｉｎ ｓｉｔｕで検出するための手段をもたらす。

【００５７】

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、プリン塩基およびピリミジン塩基、あるいは他の天然のヌクレオチド塩基、化学修飾もしくは生化学修飾されたヌクレオチド塩基、非天然のヌクレオチド塩基、または誘導体化されたヌクレ

オチド塩基を含む、リボヌクレオチドであれ、デオキシリボヌクレオチドであれ、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。本発明の実施形態のポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、リボ核酸（ＲＮＡ）、またはリボ核酸（ｃＤＮＡ）のＤＮＡコピーの配列を含み、これらの全ては、天然の供給源から単離することもでき、組換えにより作製することもでき、人工的に合成することもできる。ポリヌクレオチドのさらなる例は、ポリアミドポリヌクレオチド（ＰＮＡ）である。ポリヌクレオチドおよび核酸は、一本鎖として存在する場合もあり、二本鎖として存在する場合もある。ポリヌクレオチドの骨格は、ＲＮＡ内またはＤＮＡ内に典型的に見出されうる糖およびリン酸基を含む場合もあり、修飾または置換された糖またはリン酸基を含む場合もある。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などの修飾ヌクレオチドを含みうる。ヌクレオチドの配列は、ヌクレオチド以外の構成要素により中断させることができる。本明細書ではまた、核酸およびポリヌクレオチドなど、ヌクレオチドから作製されたポリマーも、ヌクレオチドポリマーと称する場合がある。

【００５８】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、２つ以上のデオキシリボヌクレオチド、好ましくは３つを超えるデオキシリボヌクレオチドを含む分子と定義される。その正確なサイズは、多くの因子に依存し、多くの因子は、オリゴヌクレオチドの最終的な機能および使用に依存するであろう。本明細書で使用される「プライマー」という用語は、精製された制限消化物中に自然発生するのであれ、合成により作製されるのであれ、核酸鎖と相補的なプライマー伸長産物の合成が誘導される、すなわち、ヌクレオチドおよびＤＮＡポリメラーゼなどの誘導剤の存在下で、適切な温度およびｐＨの条件下に置かれる場合に、合成の開始点として作用することが可能なオリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、一本鎖の場合もあり、二本鎖の場合もあるが、誘導剤の存在下で、所望の伸長産物の合成をプライミングするのに十分な程度に長くなければならない。プライマーの正確な長さは、温度、プライマーの供給源、および使用される方法を含む多くの因子に依存するであろう。例えば、診断適用では、標的配列の複雑性に応じて、オリゴヌクレオチドプライマーは、１５～２５ヌクレオチド以上を含有することが典型的であるが、より少数のヌクレオチドを含有する場合もある。当業者には、適切なプライマーの長さの決定に関与する因子がたやすく公知である。

【００５９】

ポリペプチドとは、アミド結合（ペプチド結合）により併せて付着された、アミノ酸残基単量体を含むポリマー鎖である。アミノ酸は、Ｌ－光学異性体の場合もあり、Ｄ－光学異性体の場合もある。一般に、ポリペプチドとは、アミノ酸残基の長鎖ポリマー、例えば、少なくとも１０、２０、５０、１００、２００、５００以上のアミノ酸残基単量体からなる長鎖ポリマーを指す。ポリペプチドは、少なくとも２つのアミノ酸、ペプチド模倣体、タンパク質、組換えタンパク質、抗体（モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体）、抗体断片、抗原、エピトープ、酵素、受容体、ビタミン、もしくは構造類似体、またはこれらの組合せによる鎖でありうる。しかし、別段に言及されない限りにおいて、本明細書で用いられる「ポリペプチド」という用語はまた、２つ以上のアミノ酸単量体であるが、通常１０、１５、または２０以下のアミノ酸単量体を含有することが典型的な短鎖ペプチドも包摂する。

【００６０】

タンパク質とは、ペプチド結合を介して連結されたアミノ酸の長鎖ポリマーであり、２つ以上のポリペプチド鎖からなりうる。より具体的には、「タンパク質」という用語は、特異的な順序の、１または複数のアミノ酸鎖、例えば、タンパク質をコードする遺伝子内のヌクレオチドの塩基配列により決定される順序の、１または複数のアミノ酸鎖からなる分子を指す。タンパク質は、体内の細胞、組織、および臓器の構造、機能、および調節に不可欠であり、各タンパク質は、固有の機能を有する。例は、ホルモン、酵素、および抗体である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドという用語と、タンパク質という用語とは、互換的に使用することができる。

【００６１】
本明細書で用いられる「生体試料」とは、対象とするバイオマーカーまたは解析物を含有することが疑われる生体組織または化学的流体の試料である。試料は、ｅｘ　ｖｉｖｏ試料の場合もあり、ｉｎ　ｖｉｖｏ試料の場合もある。試料は、例えば、全血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿、リンパ液、ならびに涙液、唾液、精液、母乳など、気道、腸管、および尿生殖路の多様な外分泌物などの体液；ならびに細胞培養物懸濁液、細胞抽出物、細胞培養物上清など、他の生物学的流体を含む。試料はまた、例えば、肺、肝臓、脳、眼、舌、結腸、腎臓、筋肉、心臓、乳房、皮膚、膵臓、子宮、子宮頸部、前立腺、唾液腺などに由来する組織生検も含みうる。試料はまた、患者から抽出され、その後、例えば、レーザーキャプチャーマイクロディセクションを使用して処理された、マイクロ生検、少量の試料、なおまたは単一の細胞でもありうる。試料は、例えば、緩衝液中、抽出液中、溶媒中などに懸濁または溶存させることができる。
【００６２】
本明細書で使用される「組織」とは、類似する細胞およびそれらを取り囲む細胞内物質のコレクションを指す。体内には、４つの基本的な組織：１）上皮；２）血液、骨、および軟骨を含む結合組織；３）筋肉組織；ならびに４）神経組織が存在する。
【００６３】
本明細書では、範囲を、「約」１つの特定の値から、かつ／または「約」別の特定の値までの範囲として表すことができる。このような範囲を表す場合、別の実施形態は、１つの特定の値から、かつ／または他の特定の値までの範囲を含む。同様に、先行詞である「約」の使用により、値を概数として表す場合、特定の値が、別の実施形態を形成することが理解されるであろう。範囲の各々の端点が、他の端点との関連で有意であり、かつ、他の端点から独立しても有意であることがさらに理解されるであろう。特定の使用法の文脈では、本明細書で使用される「約」という用語は、言明された数値から±１５％の範囲を指す。例えば、約１０は、８．５～１１．５の範囲を含むであろう。
【００６４】
共有結合とは、原子間における電子対の共有を伴う化学結合である。共有結合は、σ結合、π結合、金属間結合、アゴスティック相互作用、および３中心２電子結合を含む多くの種類の相互作用を含む。非共有結合的相互作用は、電子の共有を伴わないという点で、共有結合と異なる。非共有結合は一般に、４つの範疇：静電結合、π効果、ファンデルワールス力、および疎水性効果へと分類することができる。
【００６５】
バイオマーカー
本明細書で記載されるデバイスまたは方法は、特異的なバイオマーカーを検出および捕捉するための、多様な診断適用において採用することができる。バイオマーカーを臨床的実践において使用して、疾患の危険性を同定するかまたは疾患を診断することもでき、患者を層別化することもでき、疾患の重症度または進行を評価することもでき、予後を予測することもでき、処置を誘導することもできる。薬物開発では、バイオマーカーを使用して、いかにして薬物が体内で働くのか決定する一助とすることもでき、薬物の生体有効用量を決定することもでき、薬物が安全または有効であるのかどうかを評価する一助とすることもでき、薬物で処置された場合に、処置に応答する可能性が最も高いかまたは有害事象を被る可能性が最も小さい患者を同定する一助とすることもできる。バイオマーカーは場合によって、薬物または処置のための承認工程の一部として使用して、規制機関の意思決定の情報を与えることもできる。
【００６６】
いくつかの場合には、本明細書で記載されるマイクロニードルアレイデバイス、および日常的に実施される増幅技術（例えば、ゲノミクス技術またはプロテオミクス技術）を採用して、本発明の方法およびデバイスにより、被験体の体内の多様なバイオマーカーを検出することができる。いくつかの場合には、バイオマーカーまたはバイオマーカーのセットを捕捉するのにマイクロニードルアレイデバイスを使用し、次いで、捕捉されたバイオ

マーカーを検出するのに１または複数のさらなるタグ付けされたプローブを使用して、被験体に由来する多様なバイオマーカーを検出することができる。

【００６７】

本開示により検出されうるバイオマーカーは、核酸ベースのバイオマーカー（ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ転写物、ゲノムＤＮＡ、ｔＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、ミトコンドリアＲＮＡ、エキソソーム核酸、無細胞ＤＮＡまたは無細胞ＲＮＡ、突然変異遺伝子および多型を保有するポリヌクレオチド）、ペプチド、タンパク質、脂質、脂質代謝産物、および低分子を含む。バイオマーカーは、診断バイオマーカー（例えば、心筋梗塞を診断するための心臓トロポニン）、疾患バイオマーカーによる病期分類（例えば、うっ血性心不全のための脳ナトリウム利尿ペプチド）、疾患の予後診断バイオマーカー（がんバイオマーカー）、および介入に対する臨床応答をモニタリングするためのバイオマーカー（抗糖尿病処置のためのＨｂＡｌｃ）を含む。バイオマーカーはまた、初期の薬物開発における意思決定で使用されるバイオマーカーも含む。例えば、薬力学（ＰＤ）バイオマーカーとは、用量最適化研究において、とりわけ対象となる、ある種の薬理学的応答についてのマーカーである。疾患を含意するバイオマーカーの例は、高コレステロールおよび高血圧についての血清ＬＤＬ、がんについてのＰ５３遺伝子およびＭＭＰを含む。下記では、本発明の方法およびデバイスによる検出に適する、特異的な核酸バイオマーカーおよびタンパク質バイオマーカーのさらなる例について記載される。

【００６８】

本発明のいくつかの好ましい実施形態は、核酸バイオマーカーの検出および増幅を対象とする。当技術分野では、多くの核酸バイオマーカーが公知である。例は、肝細胞癌についての診断バイオマーカーとしてのテロメラーゼ逆転写酵素ｍＲＮＡ（Ｍｉｕｒａら、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．、１１巻：３２０５～９頁、２００５年）、肺がんについてのバイオマーカーとしての血漿ｈｎＲＮＰ Ｂ１ ｍＲＮＡ（Ｓａｔｏら、Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．、１３４巻：１１９１～７頁、２００８年）、小細胞肺がんについてのバイオマーカーとしてのＧＤ２／ＧＭ２シンターゼｍＲＮＡ（Ｃｈｅｎら、Ｌｕｎｇ Ｃａｎｃｅｒ．、６７巻：２１６～２０頁、２０１０年）、劇症肝炎についての予後診断バイオマーカーとしての血清形質転換成長因子－アルファｍＲＮＡ（Ｍｉｕｒａら、Ｈｅｐａｔｏｌ Ｉｎｔ．、２巻：２１３～２１頁、２００８年）、消化器がんについてのプラコフィリン３ ｍＲＮＡ（Ｖａｌｌａｄａｒｅｓ－Ａｙｅｒｂｅｓら、Ｃａｎｃｅｒ Ｅｐｉｄｅｍｉｏｌ Ｂｉｏｍａｒｋｅｒｓ Ｐｒｅｖ．、１９巻：１４３２～１４４０頁、２０１０年）、重金属曝露についてのバイオマーカーとしてのメタロチオネイン（Ｙａｍａｄａら、Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ Ｈｅａｌｔｈ、３９巻：２９～３２頁、２００１年）、急性骨髄性白血病における最小残存疾患をモニタリングするためのバイオマーカーとしてのＷＴ１ ｍＲＮＡ（Ｓａｋａｍｏｔｏら、Ｔｏｈｏｋｕ Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ．、２１９巻：１６９～７６頁、２００９年）、および腎移植拒絶についてのバイオマーカーとしてのグランザイムＡ ｍＲＮＡ（ｖａｎ Ｈａｍら、Ｋｉｄｎｅｙ Ｉｎｔ’ｌ．、２０１０年８月１８日）を含む。これらのバイオマーカーのほか、当技術分野で公知の他の多様な核酸バイオマーカーも全て、本発明の方法およびデバイスによる検出に適する。当技術分野では、これらの公知のバイオマーカーのポリヌクレオチド配列が、既に記載され、特徴付けられた。それらの公知の配列に基づき、これらのバイオマーカーを検出するための特異的なプローブ（例えば、オリゴヌクレオチドプライマー）を、容易にデザインし、分子生物学の方法により合成することができる。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ： Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ、Ｎ．Ｙ．、（３版、２０００年）；およびＢｒｅｎｔら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．（螺旋綴じ版、２００３年）を参照されたい。

【００６９】

他のいくつかの実施形態では、本発明のデバイスおよび方法により、ペプチドバイオマ

ーカーまたはタンパク質バイオマーカーを検出する。本明細書で記載される方法およびデバイスは、当技術分野で特徴付けられた、多様なペプチドバイオマーカーまたはタンパク質バイオマーカーを検出するために有用である。本発明に適するペプチドバイオマーカーまたはタンパク質バイオマーカーの具体例は、前立腺がんについてのバイオマーカーとしてのＰＳＡ（Ｐｏｌａｓｃｉｋら、Ｊ．　Ｕｒｏｌ．、１６２巻：２９３～３０６頁、１９９９年）、卵巣がんについてのバイオマーカーとしてのがん抗原１２５（ＣＡ１２５）（Ｊａｃｏｂｓら、Ｌａｎｃｅｔ、３５３巻：１２０７～１２１０頁、１９９９年）、乳がんを検出するための血清バイオマーカーとしてのＢＣ１、ＢＣ２、およびＢＣ３（Ｍａｔｈｅｌｉｎら、Ｂｒｅａｓｔ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．　Ｔｒｅａｔ．、９６巻：８３～９０頁、２００６年）、乾癬についての血清バイオマーカーとしてのβ－デフェンシン－２タンパク質（Ｐａｔｒｉｃｋら、ＰＬｏＳ　ＯＮＥ、４巻：ｅ４７２５頁、２００９年）、腎細胞癌の転移についてのバイオマーカーとしてのＣ反応性タンパク質（Ｊｏｈｎｓｏｎら、Ｍｏｌ．　Ｄｉａｇｎ．　Ｔｈｅｒ．、１４巻：１９１～３頁、２０１０年）、線維形成性黒色腫についてのバイオマーカーとしての高分子量黒色腫関連抗原（Ｇｏｔｏら、Ｐｉｇｍｅｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｍｅｌａｎｏｍａ　Ｒｅｓ．、２３巻：１３７～１４０頁、２０１０年）、炎症性腸疾患を伴う患者における悪性形質転換についてのバイオマーカーとしてのテロメラーゼ発現（Ｇｏｎｚａｌｏら、Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ　Ｈｅｐａｔｏｌ．、３３巻：２８８～９６頁、２０１０年）、および口腔扁平上皮癌についての予後診断バイオマーカーとしてのインスリン様成長因子ＩＩ　ｍＲＮＡ結合性タンパク質３（ＩＭＰ３）（Ｌｉら、Ｈｅａｄ　Ｎｅｃｋ．、２０１０年７月２２日）を含むがこれらに限定されない。これらのバイオマーカーを検出するためのプローブ（例えば、モノクローナル抗体）は、標準的な免疫学の技法（例えば、ハイブリドーマ技術）によりたやすく作り出すこともでき、供給業者（例えば、Ａｂｎｏｖａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｆｕｌｌ　Ｍｏｏｎ　ＢｉｏＳｙｓｔｅｍｓおよびＳｐｒｉｎｇ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）から得ることもできる。

【００７０】

検出されるバイオマーカーの特異的な種類に応じ、本明細書で記載されるマイクロニードルデバイスは、分子実体を増幅および検討するための、当技術分野で公知の多様な方法と組み合わせることができる。多くのゲノミクス法およびプロテオミクス法は、タンパク質マーカーおよび核酸マーカーを検出および解析するための、本発明のデバイスおよび方法における使用に適する。例えば、ＰＣＲは、マイクロニードル上のプローブに結合した核酸分子を増幅および検討するために使用することができる。ＥＬＩＳＡは、本発明のマイクロニードルベースのデバイスにより捕捉された、ペプチドマーカーまたはタンパク質マーカーを解析するために使用することができる。ゲノミクスプラットフォームおよびプロテオミクスプラットフォームによるバイオマーカーアッセイ法以外に、メタボロミクス法、リピドミクス法、およびグリコミクス法も、他の化学クラスのバイオマーカーを同定および検出するのに使用することができる。例えば、質量分析、クロマトグラフィー、および核磁気共鳴は、マイクロニードルに結合した多様な生体分子を検出および解析するのに有用である。

【００７１】

診断プローブを付着させるためのマイクロニードル

本発明は、被験体からバイオマーカーをｉｎ　ｓｉｔｕで検出および収集するための、分子プローブを共有結合により付着させたマイクロニードルデバイスを提供する。マイクロベースのデバイスは、皮膚または粘膜など、哺乳動物の生物学的障壁へと穿刺されうる、１または複数のマイクロニードルを含有する。マイクロニードルは、非侵襲性であるか、または侵襲性が最低限であることが多い。複数のマイクロニードルが存在する場合、デバイスはまた、マイクロニードルを支持する平面状の基材も有しうる。基材は、マイクロニードルの材料と同じ材料から作製することができる。基材はまた、異なる材料から作製することもできる。本発明で採用されるマイクロニードルは、長さ（高さ）が、典型的に、２０μｍ～１ｍｍの範囲、好ましくは、５０μｍ～５００μｍの範囲である。図４は、

複数のマイクロニードルを含む、本発明のデバイスの表面についての概略図である。４０１内の各「正方形」は、個々のマイクロニードルを例示する。４０１は、本発明のデバイスの表面上の複数のマイクロニードルであって、ニードルの高さが約４００μｍ～約１０００μｍの範囲にわたるマイクロニードルを例示する。いくつかの実施形態では、ニードルの高さは、約２０μｍ～約５０μｍ、約２０μｍ～約１００μｍ、約２０μｍ～約１５０μｍ、約２０μｍ～約２００μｍ、約２０μｍ～約２５０μｍ、約２０μｍ～約３００μｍ、約２０μｍ～約３５０μｍ、約２０μｍ～約４００μｍ、約２０μｍ～約４５０μｍ、約２０μｍ～約５００μｍ、約２０μｍ～約５５０μｍ、約２０μｍ～約６００μｍ、約２０μｍ～約６５０μｍ、約２０μｍ～約７００μｍ、約２０μｍ～約７５０μｍ、約２０μｍ～約８００μｍ、約２０μｍ～約８５０μｍ、約２０μｍ～約９００μｍ、約２０μｍ～約９５０μｍ、または約２０μｍ～約１ｍｍである。いくつかの場合には、マイクロニードルの高さは、１μｍ未満、５μｍ未満、１０μｍ未満、１５μｍ未満、２０μｍ未満、２５μｍ未満、３０μｍ未満、３５μｍ未満、４０μｍ未満、４５μｍ未満、５０μｍ未満、７５μｍ未満、１００μｍ未満、１５０μｍ未満、２００μｍ未満、２５０μｍ未満、３００μｍ未満、５００μｍ未満、７５０μｍ未満、１０００μｍ未満、２０００μｍ未満、３０００μｍ未満、４０００μｍ未満、５０００μｍ未満、７５００μｍ未満、または１００００μｍ未満である。いくつかの場合には、マイクロニードルの高さは、１μｍを超える、５μｍを超える、１０μｍを超える、１５μｍを超える、２０μｍを超える、２５μｍを超える、３０μｍを超える、３５μｍを超える、４０μｍを超える、４５μｍを超える、５０μｍを超える、７５μｍを超える、１００μｍを超える、１５０μｍを超える、２００μｍを超える、２５０μｍを超える、３００μｍを超える、５００μｍを超える、７５０μｍを超える、１０００μｍを超える、２０００μｍを超える、３０００μｍを超える、４０００μｍを超える、５０００μｍを超える、７５００μｍを超える、または１００００μｍを超える。

【００７２】

ニードル形状のマイクロニードルは、先端が鋭利でない対象物でもありうるが、先端が鋭利な対象物であることが好ましい。いくつかの実施形態では、マイクロニードルは、基部の直径が、一般に１０μｍ～５００μｍの範囲内であり、好ましくは２０μｍ～２００μｍの範囲内の円錐構造を有する。４０１は、基部の直径が幅１０ｍｍ未満である、複数のマイクロニードルを伴う本発明のデバイスの表面を例示する。複数のマイクロニードルを含有するデバイスでは、マイクロニードルは、デバイス上に列をなして存在しうる。いくつかの実施形態では、列は、整列させたニードルの間隔と事実上等間隔で配置することができる。いくつかの実施形態では、列は、不規則な間隔で配置することもできる。

【００７３】

マイクロニードルは、複数の形状を有することが可能であり、例えば、マイクロニードルは、円形、円錐形、三角形、正方形、長方形、五角形、六角形、七角形、八角形、または他の任意の適切な形状でありうる。マイクロニードルは、鋭利なマイクロニードルの場合もあり、鋭利でないマイクロニードルの場合もあり、これらの任意の組合せの場合もある。例えば、複数の鋭利なマイクロニードルを含む本発明のデバイスを使用して、被験体の皮膚を穿通し、これにより、マイクロニードル上のプローブを、例えば、ＲＮＡバイオマーカーと接触させることができる。鋭利なマイクロニードルを使用して、細胞の層または細胞の外膜など、生体試料の組織を破壊することができる。鋭利でないマイクロニードルを使用して、被験体の皮膚の表面に接触し、これにより、マイクロニードルを、例えば、皮膚上の細胞表面バイオマーカーと接触させることができる。いくつかの場合には、本開示は、形状の異なるマイクロニードル（例えば、鋭利なマイクロニードルおよび鋭利でないマイクロニードル）を含むマイクロニードルデバイスを提示する。

【００７４】

いくつかの実施形態では、本発明のデバイスは、少なくとも１本のマイクロニードル、少なくとも１００本のマイクロニードル、少なくとも２００本のマイクロニードル、少なくとも３００本のマイクロニードル、少なくとも４００本のマイクロニードル、少なくと

も５００本のマイクロニードル、少なくとも６００本のマイクロニードル、少なくとも７００本のマイクロニードル、少なくとも８００本のマイクロニードル、少なくとも９００本のマイクロニードル、少なくとも１０００本のマイクロニードル、少なくとも１１００本のマイクロニードル、少なくとも１２００本のマイクロニードル、少なくとも１３００本のマイクロニードル、少なくとも１４００本のマイクロニードル、少なくとも１５００本のマイクロニードル、少なくとも１６００本のマイクロニードル、少なくとも１７００本のマイクロニードル、少なくとも１８００本のマイクロニードル、少なくとも１９００本のマイクロニードル、少なくとも２０００本のマイクロニードル、少なくとも２１００本のマイクロニードル、少なくとも２２００本のマイクロニードル、少なくとも２３００本のマイクロニードル、少なくとも２４００本のマイクロニードル、少なくとも２５００本のマイクロニードル、少なくとも２６００本のマイクロニードル、少なくとも２７００本のマイクロニードル、少なくとも２８００本のマイクロニードル、少なくとも２９００本のマイクロニードル、少なくとも３０００本のマイクロニードル、少なくとも３１００本のマイクロニードル、少なくとも３２００本のマイクロニードル、少なくとも３３００本のマイクロニードル、少なくとも３４００本のマイクロニードル、少なくとも３５００本のマイクロニードル、少なくとも３６００本のマイクロニードル、少なくとも３７００本のマイクロニードル、少なくとも３８００本のマイクロニードル、少なくとも３９００本のマイクロニードル、少なくとも４０００本のマイクロニードル、少なくとも４１００本のマイクロニードル、少なくとも４２００本のマイクロニードル、少なくとも４３００本のマイクロニードル、少なくとも４４００本のマイクロニードル、少なくとも４５００本のマイクロニードル、少なくとも４６００本のマイクロニードル、少なくとも４７００本のマイクロニードル、少なくとも４８００本のマイクロニードル、少なくとも４９００本のマイクロニードル、または少なくとも５０００本のマイクロニードルを含む。

【００７５】

いくつかの実施形態では、本発明のデバイスは、最大で１００００本のマイクロニードル、最大で５０００本のマイクロニードル、最大で２５００本のマイクロニードル、最大で２０００本のマイクロニードル、最大で１０００本のマイクロニードル、最大で５００本のマイクロニードル、最大で４００本のマイクロニードル、最大で３００本のマイクロニードル、最大で１００本のマイクロニードル、最大で９０本のマイクロニードル、最大で５０本のマイクロニードル、最大で４０本のマイクロニードル、最大で３０本のマイクロニードル、最大で２０本のマイクロニードル、最大で１５本のマイクロニードル、最大で１０本のマイクロニードル、最大で９本のマイクロニードル、最大で８本のマイクロニードル、最大で７本のマイクロニードル、最大で６本のマイクロニードル、最大で５本のマイクロニードル、最大で４本のマイクロニードル、最大で３本のマイクロニードル、最大で２本のマイクロニードル、または１本のマイクロニードルを含む。

【００７６】

いくつかの実施形態では、本発明のデバイスは、約１本のマイクロニードル～約１００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約２００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約３００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約４００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約５００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約６００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約７００約１本のマイクロニードル～約８００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約９００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約１０００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約１１００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約１２００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約１３００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約１４００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約１５００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約１６００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約１７００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約１８００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約１９００本のマイクロニードル、約１本のマイ

クロニードル～約２０００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約２１００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約２２００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約２３００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約２４００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約２５００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約２６００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約２７００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約２８００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約２９００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約３０００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約３１００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約３２００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約３３００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約３４００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約３５００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約３６００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約３７００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約３８００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約３９００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約４０００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約４１００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約４２００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約４３００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約４４００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約４５００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約４６００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約４７００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約４８００本のマイクロニードル、約１本のマイクロニードル～約４９００本のマイクロニードル、または約１本のマイクロニードル～約５０００本のマイクロニードルを含む。

【００７７】

アレイの基材およびマイクロニードルは、多様な生体分解性材料または非生体分解性材料から作製することができる。マイクロニードルまたは基材のための材料の例は、ポリ（メタクリル酸メチル）、ケイ素、二酸化ケイ素、セラミック、金属（ステンレス鋼、チタン、ニッケル、モリブデン、クロム、およびコバルトなど）、および合成または天然の樹脂材料を含む。いくつかの実施形態では、ポリ乳酸、ポリグリコリド、ポリ乳酸－ｃｏ－ポリグリコリド、プルラン、カプロノラクトン、ポリウレタン、またはポリ無水物などの生体分解性ポリマーを使用する。他のいくつかの実施形態では、非分解性材料、例えば、ポリマーであるポリカーボネート、ポリメタクリル酸、エチレン酢酸ビニル、ポリテトラフルオロエチレン、ポリスルホン、またはポリオキシメチレンなど、合成または天然の樹脂材料を採用して、マイクロニードルアレイを製作する。いくつかの実施形態では、採用される材料は、ヒアルロン酸、プルラン、デキストラン、デキストリン、または硫酸コンドロイチンなどの多糖を含むかまたはこれらでコーティングされている。いくつかの場合には、マイクロニードルは、熱可塑性ポリマーで製作する。

【００７８】

アレイの基材およびマイクロニードルは、多様な熱可塑性ポリマーから作製することができる。熱可塑性ポリマーの非限定的な例は、ポリ（メタクリル酸メチル）（ＰＭＭＡ）、ナイロン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはＴｅｆｌｏｎなどのアクリルポリマーを含む。いくつかの場合には、本発明のデバイスは、ポリカーボネート、ポリ（メタクリル酸メチル）、ポリエチレン、およびポリプロピレンからなる群から選択される、熱可塑性ポリマーで製作する。

【００７９】

非分解性ポリマーの非限定的な例は、例えば、シリコーン、架橋ポリ（ビニルアルコール）および架橋ポリ（メタクリル酸ヒドロキシエチル）、エチレン－酢酸ビニル（ｅｔｈｙｌｅｎｅ－ｖｉｖｙｌ　ａｃｅｔａｔｅ）、アシル置換された酢酸セルロース、およびそのアルキル誘導体、部分的または完全に加水分解されたアルキレン－酢酸ビニルコポリマー、無可塑ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニルの架橋ホモポリマーおよび架橋コポリマー

、アクリル酸および／またはメタクリル酸の架橋ポリエステル、ポリビニルアルキルエーテル、ポリフッ化ビニル、ポリカーボネート、ポリウレタン、ポリアミド、ポリスルホン、スチレンアクリロニトリルコポリマー、架橋ポリ（酸化エチレン）、架橋ポリ（アルキレン）、架橋ポリ（ビニルイミダゾール）、架橋ポリ（エステル）、架橋ポリ（エチレンテレフタレート）、架橋ポリホスファゼン、および架橋クロロスルホン化ポリオレフィン、ならびにこれらの組合せなどのハイドロゲルを含む。いくつかの実施形態では、ポリマーは、エチレン酢酸ビニルを含む。

【００８０】

生体分解性ポリマーの非限定的な例は、３－ヒドロキシプロピオネート、３－ヒドロキシブチレート、３－ヒドロキシバレレート、３－ヒドロキシカプロエート、３－ヒドロキシヘプタノエート、３－ヒドロキシオクタノエート、３－ヒドロキシノナノエート、３－ヒドロキシデカノエート、３－ヒドロキシウンデカノエート、３－ヒドロキシドデカノエート、４－ヒドロキシブチレート、５－ヒドロキシバレレートなどのポリエステル、ポリ（ｄ－乳酸）、ポリ（ｌ－乳酸）、ポリ（ｄ，ｌ－乳酸）を含むポリラクチドまたはポリ乳酸、ポリグリコール酸およびポリグリコリド、ポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール酸）、ポリ（ラクチド－ｃｏ－グリコリド）、ポリ（ε－カプロラクトン）、ならびにポリジオキサノンを含む。また、デンプン、グリコーゲン、セルロース、およびキチンを含む多糖も、生体分解性材料として使用することができる。

【００８１】

４０２は、少なくとも１つの種類のプローブとカップリングさせた、複数のマイクロニードルを含む、本開示のデバイス４０１の表面を例示する。４０２は、例えば、ポリヌクレオチドプローブ、ペプチドプローブ、タンパク質プローブ、またはこれらの任意の組合せとカップリングさせることができる。デバイス４０２上のマイクロニードルへと付着させたプローブは、マイクロニードルへと共有結合または非共有結合によりカップリングさせることができる。実施例１および２では、プローブを表面へと、共有結合によりカップリングさせるための多様な方法についてさらに詳細に記載する。

【００８２】

本開示のデバイス上の２つのマイクロニードルの中心間の距離を計算して、デバイス内のマイクロニードルの密度を決定することができる。いくつかの実施形態では、２つのマイクロニードルの間の中心間距離は、１０００μｍ未満、９００μｍ未満、８００μｍ未満、７００μｍ未満、６００μｍ未満、５００μｍ未満、４００μｍ未満、３００μｍ未満、２００μｍ未満、または１００μｍ未満でありうる。いくつかの実施形態では、２つのマイクロニードルの間の中心間距離は、１００μｍ以下、２００μｍ以下、３００μｍ以下、４００μｍ以下、５００μｍ以下、６００μｍ以下、７００μｍ以下、８００μｍ以下、９００μｍ以下、または１０００μｍ以下でありうる。

【００８３】

本開示のマイクロニードルは、複数の異なる直径または基部幅を含みうる。マイクロニードルの基部の形状は、例えば、円形、長方形、三角形、正方形、五角形、六角形、七角形、または他の幾何学的形状でありうる。本開示のマイクロニードルは、直径または基部幅が、５００μｍ以下、４００μｍ以下、３００μｍ以下、２００μｍ以下、１００μｍ以下、５０μｍ以下、４０μｍ以下、３０μｍ以下、２０μｍ以下、１０μｍ以下、１０００ｎｍ以下、９００ｎｍ以下、８００ｎｍ以下、７００ｎｍ以下、６００ｎｍ以下、５００ｎｍ以下、４００ｎｍ以下、３００ｎｍ以下、２００ｎｍ以下、または１００ｎｍ以下でありうる。

【００８４】

プローブは、マイクロニードル内の複数の異なる深さにおいて、マイクロニードルへと共有結合または非共有結合により付着させることができる。４０３は、高さを６００μｍとし、幅を２００μｍとするマイクロニードルを例示する。４０４は、高さを６００μｍとし、幅を２００μｍとするマイクロニードルおよび１０μｍの深さで共有結合により付着させたプローブを例示する。４０５は、高さを６００μｍとし、幅を２００μｍとする

マイクロニードルおよび５００μｍの深さで共有結合により付着させたプローブを例示する。いくつかの場合には、マイクロニードル内のプローブの深さを使用して、バイオマーカーが見出されうる、組織内の深さを決定することができる。いくつかの場合には、異なるマイクロニードルの異なる深さにおいて複数のプローブを付着させた、複数のマイクロニードルを含むデバイスを使用して、組織内のどこでバイオマーカーが見出されうるのかを決定することができる。例えば、デバイスを使用して、がん性病変などの病変のサイズまたは深さを決定することができる。

【００８５】

プローブの深さは、約１０μｍ、約２０μｍ、約３０μｍ、約４０μｍ、約５０μｍ、約６０μｍ、約７０μｍ、約８０μｍ、約９０μｍ、約１００μｍ、約１１０μｍ、約１２０μｍ、約１３０μｍ、約１４０μｍ、約１５０μｍ、約１６０μｍ、約１７０μｍ、約１８０μｍ、約１９０μｍ、約２００μｍ、約２１０μｍ、約２２０μｍ、約２３０μｍ、約２４０μｍ、約２５０μｍ、約２６０μｍ、約２７０μｍ、約２８０μｍ、約２９０μｍ、約３００μｍ、約３１０μｍ、約３２０μｍ、約３３０μｍ、約３４０μｍ、約３５０μｍ、約３６０μｍ、約３７０μｍ、約３８０μｍ、約３９０μｍ、約４００μｍ、約４１０μｍ、約４２０μｍ、約４３０μｍ、約４４０μｍ、約４５０μｍ、約４６０μｍ、約４７０μｍ、約４８０μｍ、約４９０μｍ、約５００μｍ、約５１０μｍ、約５２０μｍ、約５３０μｍ、約５４０μｍ、約５５０μｍ、約５６０μｍ、約５７０μｍ、約５８０μｍ、約５９０μｍ、約６００μｍ、約６１０μｍ、約６２０μｍ、約６３０μｍ、約６４０μｍ、約６５０μｍ、約６６０μｍ、約６７０μｍ、約６８０μｍ、約６９０μｍ、約７００μｍ、約７１０μｍ、約７２０μｍ、約７３０μｍ、約７４０μｍ、約７５０μｍ、約７６０μｍ、約７７０μｍ、約７８０μｍ、約７９０μｍ、約８００μｍ、約８１０μｍ、約８２０μｍ、約８３０μｍ、約８４０μｍ、約８５０μｍ、約８６０μｍ、約８７０μｍ、約８８０μｍ、約８９０μｍ、約９００μｍ、約９１０μｍ、約９２０μｍ、約９３０μｍ、約９４０μｍ、約９５０μｍ、約９６０μｍ、約９７０μｍ、約９８０μｍ、約９９０μｍ、または約１０００μｍでありうる。

【００８６】

任意選択で、本発明のマイクロニードルデバイスは、デバイスを被験体へと適用するのに使用しうるアプリケーターユニットを加えて含有しうる。アプリケーターユニットは、アレイを適用する速度、アレイを適用する力、および／またはアレイが被験体の組織（例えば、皮膚）に影響を及ぼす角度などの多様な適用パラメータを制御しうる。加えて、アプリケーターは、アレイを保管ユニットから被験体へと操作するかまたは他の形で移動させる一助ともなりうる。いくつかの実施形態では、アプリケーターは、保管ユニットおよび適用ツールのいずれとしても用いられる、単回使用型のディスポーザブルツールでありうる。適切なアプリケーターおよびマイクロニードルアレイの適用法の例は、米国特許第６，２９３，９２５号（Ｓａｆａｂａｓｈら）、同第６，７４３，２１１号（Ｐｒａｕｓｎｉｔｚら）、同第６，８８１，２０３号（Ｄｅｌｍｏｒｅら）、および同第６，８５５，１３１号（Ｔｒａｕｔｍａｎら）、および米国特許出願公開第２００４／０１８１２０３号（Ｃｏｒｍｉｅｒら）、同第２００２／００３２４１５号（Ｔｒａｕｔｍａｎら）、および同第２００２／００８７１８２号（Ｔｒａｕｔｍａｎら）において開示されている。アプリケーターユニットは、複数の異なる形状を有しうる。いくつかの実施形態では、アプリケーターユニットは、例えば、直線形、三角形、長方形、またはディスク形でありうる。いくつかの実施形態では、アプリケーターユニットは、ペンアプリケーターである。

【００８７】

診断プローブをコンジュゲートさせるためのマイクロニードルアレイは、マイクロプロトルージョン構造を伴うアレイを製作するための、当技術分野で周知の材料および方法を使用して、たやすく作製することができる。例えば、米国特許第７４１６５４１号、同第７３３２１９７号、同第６６６３８２０号、同第６５０３２３１号、米国特許出願第２０１００１０６１０５号、および欧州特許出願第２１１９４６９Ａ号を参照されたい。例え

ば、マイクロニードルアレイは、ケイ素基材を使用する、ウェットエッチング処理またはドライエッチング処理、金属または樹脂を使用する、精密機械処理（放電機械処理、レーザー機械処理、賽の目切り処理、熱エンボス処理、および射出成形など）、および機械切断により製作することができる。このような処理法により、ニードル部分と支持部分とを、１つの部品へと成形する。ニードル部分を中空化する方法の例は、ニードル部分を調製した後、レーザー機械処理などを使用することにより、二次処理を実施する方法を含む。いくつかの場合には、本開示のマイクロニードルは、固体の（中空ではない）マイクロニードルでありうる。いくつかの場合には、本開示のマイクロニードルは、マイクロニードルの表面積を増大させるようにエッチングすることができる。

【００８８】

バイオマーカーを、プローブへと接近可能とするのに、細胞を破壊する複数の方法が必要とされる場合がある。細胞は、細胞外マトリックスを破壊することにより破壊することもでき、細胞膜を破壊することにより破壊することもできる。本開示のデバイスは、例えば、少なくとも１つのマイクロニードルが、ヒト皮膚などの生体試料に接触し、穿孔するとき、細胞破壊を引き起こしうる。

【００８９】

ｉｎ　ｓｉｔｕまたはｅｘ　ｖｉｖｏにおける複数の細胞を、物質により破壊することができる。したがって、本発明は、細胞外マトリックスを破壊することが可能な物質でコーティングされた複数のマイクロニードルを含む組成物をさらに提供する。いくつかの場合には、物質は酵素である。セリンプロテアーゼ、チオールプロテアーゼ、およびＭＭＰを含むがこれらに限定されないいくつかの酵素であれば、この工程において有用でありうるだろう。細胞および組織を破壊するために使用しうる酵素の非限定的な例は、パパイン、ヒアルロニダーゼ、ストレプトキナーゼ、ストレプトドルナーゼ、トリプシン、キモトリプシン、アルファ－キモトリプシン、アルファ－アミラーゼ、ＤＮアーゼ、コラゲナーゼ、プロテアーゼであるスチライン、リゾチーム、リパーゼ、ザイモラーゼ（ｚｙｍｏｌａｓｅ）、セルラーゼ、ムタノリシン、またはグリカナーゼを含むがこれらに限定されない。いくつかの例では、酵素は、ヒアルロニダーゼ（ｈｙａｌｕｒｏｄｉｎａｓｅ）である。

【００９０】

細胞および組織を破壊するさらなる方法は、例えば、超音波処理、電気穿孔、極低温粉状化、圧力による物理的破壊、破砕、洗浄剤ベースの細胞溶解、または、例えば、ホモジナイザーによる、組織の機械的せん断を含みうる。例えば、細胞外マトリックスまたは細胞膜は、超音波エネルギーにより破壊することもでき、電位により破壊することもできる。また、溶媒の生体試料への適用を使用して、バイオマーカーを、プローブとのハイブリダイゼーションに利用可能とすることもできる。

【００９１】

本開示のデバイスは、生体組織を、ｉｎ　ｓｉｔｕまたはｅｘ　ｖｉｖｏにおいて、侵襲性が最低限の様式で破壊しうる。例えば、本開示のマイクロニードルを、被験体の眼における外皮と接触させることができる。マイクロニードルは、眼の外皮における細胞の層の膜を静かに破壊し、これにより、眼内のバイオマーカーの、マイクロニードル内のプローブへの接近をもたらしうる。いくつかの実施形態では、本開示の方法およびデバイスは、慎重を要する組織または手術不可能な組織に由来するバイオマーカーの同定および特徴付けへと適用することができる。例えば、バイオマーカーは、眼内または脳内に存在する。いくつかの実施形態では、本開示の方法およびデバイスを、生検における外科的摘出に利用可能となりえない生体試料、例えば、ある種の脳腫瘍に由来するバイオマーカーの、ｉｎ　ｓｉｔｕにおける特徴付けへと適用する。

【００９２】

プローブのコンジュゲーションならびにバイオマーカーを増幅および検出するためのアッセイ

プローブとコンジュゲートさせたマイクロニードル

【００９３】
複数のプローブを、本開示のマイクロニードルと付着させることができる。いくつかの場合には、プローブは、ポリヌクレオチド（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｃＤＮＡ、ｃＲＮＡなど）を含む。ポリヌクレオチドプローブは、特異的なポリヌクレオチドバイオマーカーに結合またはハイブリダイズするようにデザインすることが多い。本開示はまた、ペプチドバイオマーカーまたはタンパク質バイオマーカーを検出するための方法およびデバイスも提示する。これらの実施形態では、マイクロニードルへと付着させたプローブは、対象とする標的ペプチドまたは標的タンパク質を特異的に認識し、これらに特異的に結合しうる。プローブは、特異的なペプチドバイオマーカーまたはタンパク質バイオマーカーに結合することが可能な任意の物質でありうる。プローブは、例えば、タンパク質（例えば、抗体、抗原、またはこれらの断片）、炭水化物、またはポリヌクレオチドでありうる。ポリヌクレオチドは、バイオマーカーに対する配列特異性を保有しうる。

【００９４】
使用されるプローブは、検出されるバイオマーカーまたは複数のバイオマーカーに依存する。したがって、検出されるバイオマーカーの性格および数に応じて、マイクロニードルへと固定化されたプローブの数は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０以上でありうる。いくつかの場合には、マイクロニードル内のプローブの総数は、約１プローブ～約１，０００プローブ、約１プローブ～約１０，０００プローブ、約１プローブ～約１００，０００プローブ、約１プローブ～約１，０００，０００プローブ、約１プローブ～約１０，０００，０００、約１プローブ～約１００，０００，０００プローブ、約１，０００プローブ～約１０，０００プローブ、約１，０００プローブ～約１００，０００プローブ、約１，０００プローブ～約１，０００，０００プローブ、約１，０００プローブ～約１０，０００，０００、約１，０００プローブ～約１００，０００，０００プローブ、約１０，０００プローブ～約１，０００，０００プローブ、約１０，０００プローブ～約１０，０００，０００、約１０，０００プローブ～約１００，０００，０００プローブ、約１００，０００プローブ～約１，０００，０００プローブ、約１００，０００プローブ～約１０，０００，０００、約１００，０００プローブ～約１００，０００，０００プローブ、約１，０００，０００プローブ～約１０，０００，０００、約１，０００，０００プローブ～約１００，０００，０００プローブ、または約１０，０００，０００プローブ～約１００，０００，０００プローブでありうる。

【００９５】
いくつかの場合には、マイクロニードル内のプローブの総数は、少なくとも、約１、約２、約３、約４、約５、約６、約７、約８、約９、約１０、約１２、約１４、約１６、約１８、約２０、約２５、約３０、約３５、約４０、約４５、約５０、約６０、約７０、約８０、約９０、約１００、約１５０、約２００、約２５０、約３００、約３５０、約４００、約４５０、約５００、約６００、約７００、約８００、約９００、約１０００、約１１００、約１２００、約１３００、約１４００、約１５００、約２０００、約２５００、約３０００、約３５００、約４０００、約４５００、約５０００、約６０００、約７０００、約８０００、約９０００、約１００００、約１２０００、約１４０００、約１６０００、約１８０００、約２００００、約３００００、約４００００、約５００００、約６００００、約７００００、約８００００、約９００００、約１，０００，０００，約２，０００，０００、約３，０００，０００、約４，０００，０００、約５，０００，０００、約６，０００，０００、約７，０００，０００、約８，０００，０００、約９，０００，０００、約１０，０００，０００、約２０，０００，０００、約３０，０００，０００、約４０，０００，０００、約５０，０００，０００、約６０，０００，０００、約７０，０００，０００、約８０，０００，０００、約９０，０００，０００、または約１００，０００，０００プローブである。

【００９６】
いくつかの場合には、マイクロニードル内のプローブの総数は、約１プローブ未満、約２プローブ未満、約３プローブ未満、約４プローブ未満、約５プローブ未満、約６プローブ未満、約７プローブ未満、約８プローブ未満、約９プローブ未満、約１０プローブ未満、約１２プローブ未満、約１４プローブ未満、約１６プローブ未満、約１８プローブ未満、約２０プローブ未満、約２５プローブ未満、約３０プローブ未満、約３５プローブ未満、約４０プローブ未満、約４５プローブ未満、約５０プローブ未満、約６０プローブ未満、約７０プローブ未満、約８０プローブ未満、約９０プローブ未満、約１００プローブ未満、約１５０プローブ未満、約２００プローブ未満、約２５０プローブ未満、約３００プローブ未満、約３５０プローブ未満、約４００プローブ未満、約４５０プローブ未満、約５００プローブ未満、約６００プローブ未満、約７００プローブ未満、約８００プローブ未満、約９００プローブ未満、約１０００プローブ未満、約１１００プローブ未満、約１２００プローブ未満、約１３００プローブ未満、約１４００プローブ未満、約１５００プローブ未満、約２０００プローブ未満、約２５００プローブ未満、約３０００プローブ未満、約３５００プローブ未満、約４０００プローブ未満、約４５００プローブ未満、約５０００プローブ未満、約６０００プローブ未満、約７０００プローブ未満、約８０００プローブ未満、約９０００プローブ未満、約１００００プローブ未満、約１２０００プローブ未満、約１４０００プローブ未満、約１６０００プローブ未満、約１８０００プローブ未満、約２００００プローブ未満、約３００００プローブ未満、約４００００プローブ未満、約５００００プローブ未満、約６００００プローブ未満、約７００００プローブ未満、約８００００プローブ未満、約９００００プローブ未満、約１０００００プローブ未満、約２０００００プローブ未満、約３０００００プローブ未満、約４０００００プローブ未満、約５０００００プローブ未満、約６０００００プローブ未満、約７０００００プローブ未満、約８０００００プローブ未満、約９０００００プローブ未満、約１，０００，０００プローブ未満、約２，０００，０００プローブ未満、約３，０００，０００プローブ未満、約４，０００，０００プローブ未満、約５，０００，０００プローブ未満、約６，０００，０００プローブ未満、約７，０００，０００プローブ未満、約８，０００，０００プローブ未満、約９，０００，０００プローブ未満、約１０，０００，０００プローブ未満、約２０，０００，０００プローブ未満、約３０，０００，０００プローブ未満、約４０，０００，０００プローブ未満、約５０，０００，０００プローブ未満、約６０，０００，０００プローブ未満、約７０，０００，０００プローブ未満、約８０，０００，０００プローブ未満、約９０，０００，０００プローブ未満、または約１００，０００，０００プローブ未満である。

【００９７】
加えて、バイオマーカーのためのプローブは、本明細書でさらに記載される通り、特に、低濃度のバイオマーカーを検出するために、本開示のデバイス内の複数のマイクロニードルへと固定化することができる。いくつかの場合には、単一のマイクロニードルは、同じバイオマーカーに結合するかまたはこれを検出することが可能な、複数の異なるプローブを含む。いくつかの場合には、単一のマイクロニードルは、同じバイオマーカーのための少なくとも２種の異なるプローブ、同じバイオマーカーのための、少なくとも３種の異なるプローブ、少なくとも４種の異なるプローブ、少なくとも５種の異なるプローブ、少なくとも６種の異なるプローブ、少なくとも７種の異なるプローブ、少なくとも８種の異なるプローブ、少なくとも９種の異なるプローブ、少なくとも１０種の異なるプローブ、少なくとも１１種の異なるプローブ、少なくとも１２種の異なるプローブ、少なくとも１３種の異なるプローブ、少なくとも１４種の異なるプローブ、少なくとも１５種の異なるプローブ、少なくとも１６種の異なるプローブ、少なくとも１７種の異なるプローブ、少なくとも１８種の異なるプローブ、少なくとも１９種の異なるプローブ、少なくとも２０種の異なるプローブ、少なくとも２１種の異なるプローブ、少なくとも２２種の異なるプローブ、少なくとも２３種の異なるプローブ、少なくとも２４種の異なるプローブ、少なくとも２５種の異なるプローブ、少なくとも２６種の異なるプローブ、少なくとも２７種

の異なるプローブ、少なくとも２８種の異なるプローブ、少なくとも２９種の異なるプローブ、少なくとも３０種の異なるプローブ、少なくとも４０種の異なるプローブ、少なくとも４１種の異なるプローブ、少なくとも４２種の異なるプローブ、少なくとも４３種の異なるプローブ、少なくとも４４種の異なるプローブ、少なくとも４５種の異なるプローブ、少なくとも４６種の異なるプローブ、少なくとも４７種の異なるプローブ、少なくとも４８種の異なるプローブ、少なくとも４９種の異なるプローブ、または少なくとも５０種の異なるプローブを含む。いくつかの場合には、同じマイクロニードルは、同じバイオマーカーのための５０を超える異なる種類のプローブを含む。

【００９８】

いくつかの場合には、同じマイクロニードルは、複数の異なるプローブを含む。異なるプローブは、同じバイオマーカーに特異的な場合もあり、異なるバイオマーカーに特異的な場合もある。マイクロニードルは、少なくとも２種の異なるプローブ、少なくとも１０種の異なるプローブ、少なくとも１００種の異なるプローブ、少なくとも２００種の異なるプローブ、少なくとも３００種の異なるプローブ、少なくとも４００種の異なるプローブ、少なくとも５００種の異なるプローブ、少なくとも６００種の異なるプローブ、少なくとも７００種の異なるプローブ、少なくとも８００種の異なるプローブ、少なくとも９００種の異なるプローブ、少なくとも１，０００種の異なるプローブ、少なくとも１，１００種の異なるプローブ、少なくとも１，２００種の異なるプローブ、少なくとも１，３００種の異なるプローブ、少なくとも１，４００種の異なるプローブ、少なくとも１，５００種の異なるプローブ、少なくとも１，６００種の異なるプローブ、少なくとも１，７００種の異なるプローブ、少なくとも１，８００種の異なるプローブ、少なくとも１，９００種の異なるプローブ、少なくとも２，０００種の異なるプローブ、少なくとも２，１００種の異なるプローブ、少なくとも２，２００種の異なるプローブ、少なくとも２，３００種の異なるプローブ、少なくとも２，４００種の異なるプローブ、少なくとも２，５００種の異なるプローブ、少なくとも２，６００種の異なるプローブ、少なくとも２，７００種の異なるプローブ、少なくとも２，８００種の異なるプローブ、少なくとも２，９００種の異なるプローブ、少なくとも３，０００種の異なるプローブ、少なくとも３，１００種の異なるプローブ、少なくとも３，２００種の異なるプローブ、少なくとも３，３００種の異なるプローブ、少なくとも３，４００種の異なるプローブ、少なくとも３，５００種の異なるプローブ、少なくとも３，６００種の異なるプローブ、少なくとも３，７００種の異なるプローブ、少なくとも３，８００種の異なるプローブ、少なくとも３，９００種の異なるプローブ、少なくとも４，０００種の異なるプローブ、少なくとも４，１００種の異なるプローブ、少なくとも４，２００種の異なるプローブ、少なくとも４，３００種の異なるプローブ、少なくとも４，４００種の異なるプローブ、少なくとも４，５００種の異なるプローブ、少なくとも４，６００種の異なるプローブ、少なくとも４，７００種の異なるプローブ、少なくとも４，８００種の異なるプローブ、少なくとも４，９００種の異なるプローブ、少なくとも５，０００種の異なるプローブ、少なくとも５，１００種の異なるプローブ、少なくとも５，２００種の異なるプローブ、少なくとも５，３００種の異なるプローブ、少なくとも５，４００種の異なるプローブ、少なくとも５，５００種の異なるプローブ、少なくとも５，６００種の異なるプローブ、少なくとも５，７００種の異なるプローブ、少なくとも５，８００種の異なるプローブ、少なくとも５，９００種の異なるプローブ、少なくとも６，０００種の異なるプローブ、少なくとも６，１００種の異なるプローブ、少なくとも６，２００種の異なるプローブ、少なくとも６，３００種の異なるプローブ、少なくとも６，４００種の異なるプローブ、少なくとも６，５００種の異なるプローブ、少なくとも６，６００種の異なるプローブ、少なくとも６，７００種の異なるプローブ、少なくとも６，８００種の異なるプローブ、少なくとも６，９００種の異なるプローブ、少なくとも７，０００種の異なるプローブ、少なくとも７，１００種の異なるプローブ、少なくとも７，２００種の異なるプローブ、少なくとも７，３００種の異なるプローブ、少なくとも７，４００種の異なるプローブ、少なくとも７，５００種の異なるプローブ、少なくとも７，６００種の異なるプローブ、少なくとも７，７

００種の異なるプローブ、少なくとも７，８００種の異なるプローブ、少なくとも７，９００種の異なるプローブ、少なくとも８，０００種の異なるプローブ、少なくとも８，１００種の異なるプローブ、少なくとも８，２００種の異なるプローブ、少なくとも８，３００種の異なるプローブ、少なくとも８，４００種の異なるプローブ、少なくとも８，５００種の異なるプローブ、少なくとも８，６００種の異なるプローブ、少なくとも８，７００種の異なるプローブ、少なくとも８，８００種の異なるプローブ、少なくとも８，９００種の異なるプローブ、少なくとも９，０００種の異なるプローブ、少なくとも９，１００種の異なるプローブ、少なくとも９，２００種の異なるプローブ、少なくとも９，３００種の異なるプローブ、少なくとも９，４００種の異なるプローブ、少なくとも９，５００種の異なるプローブ、少なくとも９，６００種の異なるプローブ、少なくとも９，７００種の異なるプローブ、少なくとも９，８００種の異なるプローブ、少なくとも９，９００種の異なるプローブ、または少なくとも１０，０００種の異なるプローブを含みうる。マイクロニードルは、２種未満の異なるプローブ、１０種未満の異なるプローブ、１００種未満の異なるプローブ、２００種未満の異なるプローブ、３００種未満の異なるプローブ、４００種未満の異なるプローブ、５００種未満の異なるプローブ、６００種未満の異なるプローブ、７００種未満の異なるプローブ、８００種未満の異なるプローブ、９００種未満の異なるプローブ、１，０００種未満の異なるプローブ、１，１００種未満の異なるプローブ、１，２００種未満の異なるプローブ、１，３００種未満の異なるプローブ、１，４００種未満の異なるプローブ、１，５００種未満の異なるプローブ、１，６００種未満の異なるプローブ、１，７００種未満の異なるプローブ、１，８００種未満の異なるプローブ、１，９００種未満の異なるプローブ、２，０００種未満の異なるプローブ、２，１００種未満の異なるプローブ、２，２００種未満の異なるプローブ、２，３００種未満の異なるプローブ、２，４００種未満の異なるプローブ、２，５００種未満の異なるプローブ、２，６００種未満の異なるプローブ、２，７００種未満の異なるプローブ、２，８００種未満の異なるプローブ、２，９００種未満の異なるプローブ、３，０００種未満の異なるプローブ、３，１００種未満の異なるプローブ、３，２００種未満の異なるプローブ、３，３００種未満の異なるプローブ、３，４００種未満の異なるプローブ、３，５００種未満の異なるプローブ、３，６００種未満の異なるプローブ、３，７００種未満の異なるプローブ、３，８００種未満の異なるプローブ、３，９００種未満の異なるプローブ、４，０００種未満の異なるプローブ、４，１００種未満の異なるプローブ、４，２００種未満の異なるプローブ、４，３００種未満の異なるプローブ、４，４００種未満の異なるプローブ、４，５００種未満の異なるプローブ、４，６００種未満の異なるプローブ、４，７００種未満の異なるプローブ、４，８００種未満の異なるプローブ、４，９００種未満の異なるプローブ、５，０００種未満の異なるプローブ、５，１００種未満の異なるプローブ、５，２００種未満の異なるプローブ、５，３００種未満の異なるプローブ、５，４００種未満の異なるプローブ、５，５００種未満の異なるプローブ、５，６００種未満の異なるプローブ、５，７００種未満の異なるプローブ、５，８００種未満の異なるプローブ、５，９００種未満の異なるプローブ、６，０００種未満の異なるプローブ、６，１００種未満の異なるプローブ、６，２００種未満の異なるプローブ、６，３００種未満の異なるプローブ、６，４００種未満の異なるプローブ、６，５００種未満の異なるプローブ、６，６００種未満の異なるプローブ、６，７００種未満の異なるプローブ、６，８００種未満の異なるプローブ、６，９００種未満の異なるプローブ、７，０００種未満の異なるプローブ、７，１００種未満の異なるプローブ、７，２００種未満の異なるプローブ、７，３００種未満の異なるプローブ、７，４００種未満の異なるプローブ、７，５００種未満の異なるプローブ、７，６００種未満の異なるプローブ、７，７００種未満の異なるプローブ、７，８００種未満の異なるプローブ、７，９００種未満の異なるプローブ、８，０００種未満の異なるプローブ、８，１００種未満の異なるプローブ、８，２００種未満の異なるプローブ、８，３００種未満の異なるプローブ、８，４００種未満の異なるプローブ、８，５００種未満の異なるプローブ、８，６００種未満の異なるプローブ、８，７００種未満の異なるプローブ、８，８００種未満の異なるプローブ、８，９０

０種未満の異なるプローブ、９，０００種未満の異なるプローブ、９，１００種未満の異なるプローブ、９，２００種未満の異なるプローブ、９，３００種未満の異なるプローブ、９，４００種未満の異なるプローブ、９，５００種未満の異なるプローブ、９，６００種未満の異なるプローブ、９，７００種未満の異なるプローブ、９，８００種未満の異なるプローブ、９，９００種未満の異なるプローブ、または１０，０００種未満の異なるプローブを含みうる。

【００９９】

いくつかの場合には、複数のプローブは、同一（例えば、同じポリヌクレオチドまたは抗体の同一のコピー）である。いくつかの実施形態では、マイクロニードルは、同じプローブの多数のコピー（例えば、同じプローブの２、５、１０、５０、１００、１０００、５０００、７５００、１００００、または５００００を超えるコピー）と関連しうる。例えば、マイクロニードルは、同じ多型またはバイオマーカーにハイブリダイズするようにデザインされたポリヌクレオチドプローブの複数のコピーを含みうる。いくつかの場合には、マイクロニードルは、同じエピトープに結合するようにデザインされた抗体プローブの複数のコピーを含みうる。

【０１００】

いくつかの場合には、マイクロニードルは、ポリヌクレオチドプローブを含む。プローブは、同じ疾患、障害、または状態と関連した異なるバイオマーカーを検出するようにデザインすることができる。いくつかの場合には、第１のプローブは、疾患と関連した多型（例えば、ＤＮＡ多型、ＲＮＡ多型）を認識し、第２のプローブは、同じ疾患と関連した異なる多型を認識する。例えば、マイクロニードル上の第１のＤＮＡプローブは、皮膚の状態であるオンコセルカ症と関連したＲＮＡバイオマーカーの第１の多型を検出するようにデザインすることができる。マイクロニードル上の第２のＤＮＡプローブは、オンコセルカ症と関連したＲＮＡバイオマーカーの第２の多型を検出するようにデザインすることができる。多型は、例えば、一塩基多型（ＳＮＰ）でありうる。遺伝子変異およびゲノム変異は、単一のＳＮＰを含む場合もあり、複数のＳＮＰを含む場合もある。ＳＮＰは、単一の遺伝子座において生じる場合もあり、多くの遺伝子座において生じる場合もある。１つの遺伝子座において、特定のＳＮＰ対立遺伝子を保有する個体は、他の遺伝子座においても、特異的なＳＮＰ対立遺伝子を保有しうることが予測可能である。ＳＮＰの相関は、個体に疾患または状態の素因を与える対立遺伝子間の関連をもたらしうる。いくつかの場合には、異なるポリヌクレオチドプローブは、異なる状態と関連した異なるバイオマーカーを検出するようにデザインする。例えば、１つのプローブが、疾患のバイオマーカーを検出しうるのに対し、他のプローブは、ハウスキーピング遺伝子またはハウスキーピング遺伝子産物を検出しうる。いくつかの場合には、マイクロニードルを、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドとポリペプチドとの混合物へと付着させる。

【０１０１】

マイクロニードルはまた、複数の異なるタンパク質プローブまたは抗体プローブと会合させることもできる。例えば、マイクロニードル上の第１の抗体プローブは、例えば、皮膚がんと関連した抗原の第１のエピトープを検出するようにデザインすることができる。第２の抗体プローブは、抗原と関連した第２のエピトープを検出するようにデザインすることができる。または、いくつかの場合には、第２の抗体プローブは、異なる皮膚の状態と関連したエピトープを検出しうる。

【０１０２】

いくつかの場合には、本開示は、マイクロニードルのセットを含み、セット内の各マイクロニードルが、同一のプローブまたはプローブのセットを含む、マイクロニードルデバイスを提示する。いくつかの実施形態では、同一のプローブを、デバイスの複数のマイクロニードルへと付着させる。同一のプローブは、例えば、マイクロニードルのうちの約１％、マイクロニードルのうちの約５％、マイクロニードルのうちの約１０％、マイクロニードルのうちの約１５％、マイクロニードルのうちの約２０％、マイクロニードルのうちの約２５％、マイクロニードルのうちの約３０％、マイクロニードルのうちの約３５％、

マイクロニードルのうちの約４０％、マイクロニードルのうちの約４５％、マイクロニードルのうちの約５０％、マイクロニードルのうちの約５５％、マイクロニードルのうちの約６０％、マイクロニードルのうちの約６５％、マイクロニードルのうちの約７０％、マイクロニードルのうちの約７５％、マイクロニードルのうちの約８０％、マイクロニードルのうちの約８５％、マイクロニードルのうちの約９０％、マイクロニードルのうちの約９５％、またはマイクロニードルのうちの約１００％へと付着させることができる。いくつかの実施形態では、同一のプローブは、マイクロニードルのうちの５％以下、マイクロニードルのうちの１０％以下、マイクロニードルのうちの１５％以下、マイクロニードルのうちの２０％以下、マイクロニードルのうちの２５％以下、マイクロニードルのうちの３０％以下、マイクロニードルのうちの３５％以下、マイクロニードルのうちの４０％以下、マイクロニードルのうちの４５％以下、マイクロニードルのうちの５０％以下、マイクロニードルのうちの５５％以下、マイクロニードルのうちの６０％以下、マイクロニードルのうちの７０％以下、マイクロニードルのうちの７５％以下、マイクロニードルのうちの８０％以下、マイクロニードルのうちの８５％以下、マイクロニードルのうちの９０％以下、マイクロニードルのうちの９５％以下、またはマイクロニードルのうちの９９％以下へと付着させられる。

【０１０３】

いくつかの場合には、マイクロニードルのセットは、第１のプローブへと付着させた少なくとも１つのマイクロニードルと、第１のプローブと異なる第２のプローブへと付着させた少なくとも１つのマイクロニードルとを含みうる。例えば、本明細書で記載される通り、第１のプローブは、疾患または障害のバイオマーカーに特異的に結合するポリヌクレオチドまたはポリペプチド（例えば、抗体、タンパク質）でありえ、第２のプローブは、同じ疾患または障害と関連した異なるバイオマーカーに特異的に結合するポリヌクレオチドまたはポリペプチドでありうる。いくつかの場合には、第１のプローブは、疾患または障害のバイオマーカーに特異的に結合するポリヌクレオチドまたはポリペプチド（例えば、抗体、タンパク質）でありえ、第２のプローブは、異なる疾患、障害、または状態と関連した異なるバイオマーカーに特異的に結合するポリヌクレオチドまたはポリペプチドでありうる。いくつかの場合には、異なる疾患、状態、または障害は、同じ臓器と関連する。例えば、第１のプローブは、皮膚と関連した第１の疾患、障害、または状態と関連することが可能であり、第２のプローブは、皮膚または眼と関連した第２の疾患、障害、または状態と関連しうる。いくつかの場合には、デバイスは、マイクロニードルのアレイを含むことが可能であり、各マイクロニードルは、同じ臓器と関連した、異なる疾患、障害、または状態と関連したバイオマーカーを検出するプローブを含む。マイクロニードルのアレイは、異なる疾患、障害、または状態と関連した、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、７５、１００、１５０、２００、５０、または１０００を超えるマイクロニードルを含みうる。いくつかの場合には、異なる疾患、障害、または状態は、異なる臓器（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、または２０を超える臓器）と関連する。

【０１０４】

いくつかの場合には、マイクロニードルデバイスは、マイクロニードルの複数のアレイを含み、マイクロニードルの複数のアレイは、マルチプレックス反応に適することが多い。いくつかの場合には、複数のアレイは、マイクロニードルの２つ以上のアレイであって、異なるバイオマーカーを検出するようにデザインされたアレイを含む。いくつかの場合には、第１のマイクロニードルのアレイは、疾患、障害、または状態と関連したバイオマーカーを検出するようにデザインすることができ、第２のマイクロニードルのアレイは、同じ疾患、障害、または状態と関連した異なるバイオマーカーを検出するようにデザインする。いくつかの場合には、第１のマイクロニードルのアレイは、疾患、障害、または状態と関連したバイオマーカーを検出するようにデザインすることができ、第２のマイクロニードルのアレイは、異なる疾患、障害、または状態と関連した異なるバイオマーカーを検出するようにデザインすることができる。いくつかの場合には、第１のマイクロニード

ルのアレイは、疾患、障害、または状態と関連した複数のバイオマーカーを検出するようにデザインすることができ、第２のマイクロニードルのアレイは、異なる疾患、障害、または状態と関連した複数のバイオマーカーを検出するようにデザインすることができる。いくつかの場合には、第２のマイクロニードルのアレイは、陽性対照であれ、陰性対照であれ、対照バイオマーカー（例えば、ハウスキーピング遺伝子）を検出するようにデザインすることができる。

【０１０５】

いくつかの場合には、本明細書で提示される方法およびデバイスを使用して、蛍光の使用を伴うかまたは伴わない、マルチプレックス反応を実施することができる。例えば、固有のＰＣＲ試薬（例えば、固有のプローブまたはプライマー）を含有する、各マイクロニードルを、それ自体の空洞（例えば、針で刺した空洞）へと挿入することができる。ＰＣＲ反応を実行し、試料を、多様なバイオマーカーについて解析することができる。いくつかの場合には、蛍光標識プローブまたは異なる光学シグナルを発するプローブにより、マルチプレックス反応を実施する。いくつかの場合には、蛍光を使用しない。

【０１０６】

本明細書で記載されるマイクロニードルデバイスは、任意の数のプローブを含むことが可能であり、プローブは、デバイス内の複数のニードルへと付着させることが多い。プローブは、同一の場合もあり、異なる場合もある。加えて、バイオマーカーのためのプローブは、特に、低濃度のバイオマーカーを検出するために、本開示のデバイス内の複数のマイクロニードルへと固定化することができる。いくつかの場合には、マイクロニードルデバイス内のプローブの総数は、約１プローブ～約１，０００プローブ、約１プローブ～約１０，０００プローブ、約１プローブ～約１００，０００プローブ、約１プローブ～約１，０００，０００プローブ、約１プローブ～約１０，０００，０００プローブ、約１プローブ～約１００，０００，０００プローブ、約１，０００プローブ～約１０，０００プローブ、約１，０００プローブ～約１００，０００プローブ、約１，０００プローブ～約１，０００，０００プローブ、約１，０００プローブ～約１０，０００，０００プローブ、約１，０００プローブ～約１００，０００，０００プローブ、約１０，０００プローブ～約１００，０００，０００プローブ、約１０，０００プローブ～約１，０００，０００プローブ、約１０，０００プローブ～約１０，０００，０００プローブ、約１０，０００プローブ～約１００，０００，０００プローブ、約１００，０００プローブ～約１，０００，０００プローブ、約１００，０００プローブ～約１０，０００，０００プローブ、約１００，０００プローブ～約１００，０００，０００プローブ、約１，０００，０００プローブ～約１０，０００，０００プローブ、約１，０００，０００プローブ～約１００，０００，０００プローブ、または約１０，０００，０００プローブ～約１００，０００，０００プローブでありうる。

【０１０７】

いくつかの場合には、マイクロニードルデバイス内のプローブの総数は、少なくとも、約１、約２、約３、約４、約５、約６、約７、約８、約９、約１０、約１２、約１４、約１６、約１８、約２０、約２５、約３０、約３５、約４０、約４５、約５０、約６０、約７０、約８０、約９０、約１００、約１５０、約２００、約２５０、約３００、約３５０、約４００、約４５０、約５００、約６００、約７００、約８００、約９００、約１０００、約１１００、約１２００、約１３００、約１４００、約１５００、約２０００、約２５００、約３０００、約３５００、約４０００、約４５００、約５０００、約６０００、約７０００、約８０００、約９０００、約１００００、約１２０００、約１４０００、約１６０００、約１８０００、約２００００、約３００００、約４００００、約５００００、約６００００、約７００００、約８００００、約９００００、約１，０００，０００、約２，０００，０００、約３，０００，０００、約４，０００，０００、約５，０００，０００、約６，０００，０００、約７，０００，０００、約８，０００，０００、約９，０００，０００、

約１０，０００，０００、約２０，０００，０００、約３０，０００，０００、約４０，０００，０００、約５０，０００，０００、約６０，０００，０００、約７０，０００，０００、約８０，０００，０００、約９０，０００，０００、または約１００，０００，０００プローブである。

【０１０８】

いくつかの場合には、マイクロニードルデバイス内のプローブの総数は、約１プローブ未満、約２プローブ未満、約３プローブ未満、約４プローブ未満、約５プローブ未満、約６プローブ未満、約７プローブ未満、約８プローブ未満、約９プローブ未満、約１０プローブ未満、約１２プローブ未満、約１４プローブ未満、約１６プローブ未満、約１８プローブ未満、約２０プローブ未満、約２５プローブ未満、約３０プローブ未満、約３５プローブ未満、約４０プローブ未満、約４５プローブ未満、約５０プローブ未満、約６０プローブ未満、約７０プローブ未満、約８０プローブ未満、約９０プローブ未満、約１００プローブ未満、約１５０プローブ未満、約２００プローブ未満、約２５０プローブ未満、約３００プローブ未満、約３５０プローブ未満、約４００プローブ未満、約４５０プローブ未満、約５００プローブ未満、約６００プローブ未満、約７００プローブ未満、約８００プローブ未満、約９００プローブ未満、約１０００プローブ未満、約１１００プローブ未満、約１２００プローブ未満、約１３００プローブ未満、約１４００プローブ未満、約１５００プローブ未満、約２０００プローブ未満、約２５００プローブ未満、約３０００プローブ未満、約３５００プローブ未満、約４０００プローブ未満、約４５００プローブ未満、約５０００プローブ未満、約６０００プローブ未満、約７０００プローブ未満、約８０００プローブ未満、約９０００プローブ未満、約１００００プローブ未満、約１２０００プローブ未満、約１４０００プローブ未満、約１６０００プローブ未満、約１８０００プローブ未満、約２００００プローブ未満、約３００００プローブ未満、約４００００プローブ未満、約５００００プローブ未満、約６００００プローブ未満、約７００００プローブ未満、約８００００プローブ未満、約９００００プローブ未満、約１０００００プローブ未満、約２０００００プローブ未満、約３０００００プローブ未満、約４０００００プローブ未満、約５０００００プローブ未満、約６０００００プローブ未満、約７０００００プローブ未満、約８０００００プローブ未満、約９０００００プローブ未満、約１，０００，０００プローブ未満、約２，０００，０００プローブ未満、約３，０００，０００プローブ未満、約４，０００，０００プローブ未満、約５，０００，０００プローブ未満、約６，０００，０００プローブ未満、約７，０００，０００プローブ未満、約８，０００，０００プローブ未満、約９，０００，０００プローブ未満、約１０，０００，０００プローブ未満、約２０，０００，０００プローブ未満、約３０，０００，０００プローブ未満、約４０，０００，０００プローブ未満、約５０，０００，０００プローブ未満、約６０，０００，０００プローブ未満、約７０，０００，０００プローブ未満、約８０，０００，０００プローブ未満、約９０，０００，０００プローブ未満、または約１００，０００，０００プローブ未満である。

【０１０９】

いくつかの場合には、マイクロニードルデバイスは、同じバイオマーカーのための少なくとも２つの異なるプローブ、同じバイオマーカーのための、少なくとも３種の異なるプローブ、少なくとも４種の異なるプローブ、少なくとも５種の異なるプローブ、少なくとも６種の異なるプローブ、少なくとも７種の異なるプローブ、少なくとも８種の異なるプローブ、少なくとも９種の異なるプローブ、少なくとも１０種の異なるプローブ、少なくとも１１種の異なるプローブ、少なくとも１２種の異なるプローブ、少なくとも１３種の異なるプローブ、少なくとも１４種の異なるプローブ、少なくとも１５種の異なるプローブ、少なくとも１６種の異なるプローブ、少なくとも１７種の異なるプローブ、少なくとも１８種の異なるプローブ、少なくとも１９種の異なるプローブ、少なくとも２０種の異なるプローブ、少なくとも２１種の異なるプローブ、少なくとも２２種の異なるプローブ、少なくとも２３種の異なるプローブ、少なくとも２４種の異なるプローブ、少なくとも２５種の異なるプローブ、少なくとも２６種の異なるプローブ、少なくとも２７種の異な

るプローブ、少なくとも２８種の異なるプローブ、少なくとも２９種の異なるプローブ、少なくとも３０種の異なるプローブ、少なくとも４０種の異なるプローブ、少なくとも４１種の異なるプローブ、少なくとも４２種の異なるプローブ、少なくとも４３種の異なるプローブ、少なくとも４４種の異なるプローブ、少なくとも４５種の異なるプローブ、少なくとも４６種の異なるプローブ、少なくとも４７種の異なるプローブ、少なくとも４８種の異なるプローブ、少なくとも４９種の異なるプローブ、または少なくとも５０種の異なるプローブを含む。いくつかの場合には、同じマイクロニードルは、同じバイオマーカーのための５０を超える異なる種類のプローブを含む。

【０１１０】

いくつかの場合には、マイクロニードルデバイスは、複数の異なるプローブを含む。異なるプローブは、同じバイオマーカーに特異的な場合もあり、異なるバイオマーカーに特異的な場合もある。マイクロニードルデバイスは、少なくとも２つの異なるプローブ、少なくとも１０種の異なるプローブ、少なくとも１００種の異なるプローブ、少なくとも２００種の異なるプローブ、少なくとも３００種の異なるプローブ、少なくとも４００種の異なるプローブ、少なくとも５００種の異なるプローブ、少なくとも６００種の異なるプローブ、少なくとも７００種の異なるプローブ、少なくとも８００種の異なるプローブ、少なくとも９００種の異なるプローブ、少なくとも１，０００種の異なるプローブ、少なくとも１，１００種の異なるプローブ、少なくとも１，２００種の異なるプローブ、少なくとも１，３００種の異なるプローブ、少なくとも１，４００種の異なるプローブ、少なくとも１，５００種の異なるプローブ、少なくとも１，６００種の異なるプローブ、少なくとも１，７００種の異なるプローブ、少なくとも１，８００種の異なるプローブ、少なくとも１，９００種の異なるプローブ、少なくとも２，０００種の異なるプローブ、少なくとも２，１００種の異なるプローブ、少なくとも２，２００種の異なるプローブ、少なくとも２，３００種の異なるプローブ、少なくとも２，４００種の異なるプローブ、少なくとも２，５００種の異なるプローブ、少なくとも２，６００種の異なるプローブ、少なくとも２，７００種の異なるプローブ、少なくとも２，８００種の異なるプローブ、少なくとも２，９００種の異なるプローブ、少なくとも３，０００種の異なるプローブ、少なくとも３，１００種の異なるプローブ、少なくとも３，２００種の異なるプローブ、少なくとも３，３００種の異なるプローブ、少なくとも３，４００種の異なるプローブ、少なくとも３，５００種の異なるプローブ、少なくとも３，６００種の異なるプローブ、少なくとも３，７００種の異なるプローブ、少なくとも３，８００種の異なるプローブ、少なくとも３，９００種の異なるプローブ、少なくとも４，０００種の異なるプローブ、少なくとも４，１００種の異なるプローブ、少なくとも４，２００種の異なるプローブ、少なくとも４，３００種の異なるプローブ、少なくとも４，４００種の異なるプローブ、少なくとも４，５００種の異なるプローブ、少なくとも４，６００種の異なるプローブ、少なくとも４，７００種の異なるプローブ、少なくとも４，８００種の異なるプローブ、少なくとも４，９００種の異なるプローブ、少なくとも５，０００種の異なるプローブ、少なくとも５，１００種の異なるプローブ、少なくとも５，２００種の異なるプローブ、少なくとも５，３００種の異なるプローブ、少なくとも５，４００種の異なるプローブ、少なくとも５，５００種の異なるプローブ、少なくとも５，６００種の異なるプローブ、少なくとも５，７００種の異なるプローブ、少なくとも５，８００種の異なるプローブ、少なくとも５，９００種の異なるプローブ、少なくとも６，０００種の異なるプローブ、少なくとも６，１００種の異なるプローブ、少なくとも６，２００種の異なるプローブ、少なくとも６，３００種の異なるプローブ、少なくとも６，４００種の異なるプローブ、少なくとも６，５００種の異なるプローブ、少なくとも６，６００種の異なるプローブ、少なくとも６，７００種の異なるプローブ、少なくとも６，８００種の異なるプローブ、少なくとも６，９００種の異なるプローブ、少なくとも７，０００種の異なるプローブ、少なくとも７，１００種の異なるプローブ、少なくとも７，２００種の異なるプローブ、少なくとも７，３００種の異なるプローブ、少なくとも７，４００種の異なるプローブ、少なくとも７，５００種の異なるプローブ、少なくとも７，６００種の異なるプローブ、少な

くとも７，７００種の異なるプローブ、少なくとも７，８００種の異なるプローブ、少なくとも７，９００種の異なるプローブ、少なくとも８，０００種の異なるプローブ、少なくとも８，１００種の異なるプローブ、少なくとも８，２００種の異なるプローブ、少なくとも８，３００種の異なるプローブ、少なくとも８，４００種の異なるプローブ、少なくとも８，５００種の異なるプローブ、少なくとも８，６００種の異なるプローブ、少なくとも８，７００種の異なるプローブ、少なくとも８，８００種の異なるプローブ、少なくとも８，９００種の異なるプローブ、少なくとも９，０００種の異なるプローブ、少なくとも９，１００種の異なるプローブ、少なくとも９，２００種の異なるプローブ、少なくとも９，３００種の異なるプローブ、少なくとも９，４００種の異なるプローブ、少なくとも９，５００種の異なるプローブ、少なくとも９，６００種の異なるプローブ、少なくとも９，７００種の異なるプローブ、少なくとも９，８００種の異なるプローブ、少なくとも９，９００種の異なるプローブ、または少なくとも１０，０００種の異なるプローブを含みうる。いくつかの場合には、マイクロニードルデバイスは、２種未満の異なるプローブ、１０種未満の異なるプローブ、１００種未満の異なるプローブ、２００種未満の異なるプローブ、３００種未満の異なるプローブ、４００種未満の異なるプローブ、５００種未満の異なるプローブ、６００種未満の異なるプローブ、７００種未満の異なるプローブ、８００種未満の異なるプローブ、９００種未満の異なるプローブ、１，０００種未満の異なるプローブ、１，１００種未満の異なるプローブ、１，２００種未満の異なるプローブ、１，３００種未満の異なるプローブ、１，４００種未満の異なるプローブ、１，５００種未満の異なるプローブ、１，６００種未満の異なるプローブ、１，７００種未満の異なるプローブ、１，８００種未満の異なるプローブ、１，９００種未満の異なるプローブ、２，０００種未満の異なるプローブ、２，１００種未満の異なるプローブ、２，２００種未満の異なるプローブ、２，３００種未満の異なるプローブ、２，４００種未満の異なるプローブ、２，５００種未満の異なるプローブ、２，６００種未満の異なるプローブ、２，７００種未満の異なるプローブ、２，８００種未満の異なるプローブ、２，９００種未満の異なるプローブ、３，０００種未満の異なるプローブ、３，１００種未満の異なるプローブ、３，２００種未満の異なるプローブ、３，３００種未満の異なるプローブ、３，４００種未満の異なるプローブ、３，５００種未満の異なるプローブ、３，６００種未満の異なるプローブ、３，７００種未満の異なるプローブ、３，８００種未満の異なるプローブ、３，９００種未満の異なるプローブ、４，０００種未満の異なるプローブ、４，１００種未満の異なるプローブ、４，２００種未満の異なるプローブ、４，３００種未満の異なるプローブ、４，４００種未満の異なるプローブ、４，５００種未満の異なるプローブ、４，６００種未満の異なるプローブ、４，７００種未満の異なるプローブ、４，８００種未満の異なるプローブ、４，９００種未満の異なるプローブ、５，０００種未満の異なるプローブ、５，１００種未満の異なるプローブ、５，２００種未満の異なるプローブ、５，３００種未満の異なるプローブ、５，４００種未満の異なるプローブ、５，５００種未満の異なるプローブ、５，６００種未満の異なるプローブ、５，７００種未満の異なるプローブ、５，８００種未満の異なるプローブ、５，９００種未満の異なるプローブ、６，０００種未満の異なるプローブ、６，１００種未満の異なるプローブ、６，２００種未満の異なるプローブ、６，３００種未満の異なるプローブ、６，４００種未満の異なるプローブ、６，５００種未満の異なるプローブ、６，６００種未満の異なるプローブ、６，７００種未満の異なるプローブ、６，８００種未満の異なるプローブ、６，９００種未満の異なるプローブ、７，０００種未満の異なるプローブ、７，１００種未満の異なるプローブ、７，２００種未満の異なるプローブ、７，３００種未満の異なるプローブ、７，４００種未満の異なるプローブ、７，５００種未満の異なるプローブ、７，６００種未満の異なるプローブ、７，７００種未満の異なるプローブ、７，８００種未満の異なるプローブ、７，９００種未満の異なるプローブ、８，０００種未満の異なるプローブ、８，１００種未満の異なるプローブ、８，２００種未満の異なるプローブ、８，３００種未満の異なるプローブ、８，４００種未満の異なるプローブ、８，５００種未満の異なるプローブ、８，６００種未満の異なるプローブ、８，７００種未満の異なるプローブ、８

，８００種未満の異なるプローブ、８，９００種未満の異なるプローブ、９，０００種未満の異なるプローブ、９，１００種未満の異なるプローブ、９，２００種未満の異なるプローブ、９，３００種未満の異なるプローブ、９，４００種未満の異なるプローブ、９，５００種未満の異なるプローブ、９，６００種未満の異なるプローブ、９，７００種未満の異なるプローブ、９，８００種未満の異なるプローブ、９，９００種未満の異なるプローブ、または１０，０００種未満の異なるプローブを含みうる。

【０１１１】

多様な生物学的マーカーを検出するためのプローブは、購入することもでき、当技術分野で周知の方法に従い合成することもできる。プローブは、任意の適切な方法に従いデザインすることができる。例えば、コンピュータ化された検索プログラムを使用して、交差ハイブリダイゼーションを最小とし、同様のハイブリダイゼーション効率で、標的のバイオマーカー配列（例えば、ｍＲＮＡ）に特異的な核酸プローブをデザインすることができる。このような例示的プログラムは、Ｏｌｉｇｏ　５．０（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｉｎｃ．）、Ｐｒｉｍｅｒ　３（ＭＩＴ）、およびＡｒｒａｙ　Ｄｅｓｉｇｎｅｒ（Ｔｅｌｅｃｈｅｍ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｃ．）を含む。本方法で使用されるヌクレオチドプローブは、任意の適切な長さ、例えば、約１５～約１００ヌクレオチドを有しうる。タンパク質バイオマーカーでは、バイオマーカーを検出するための特異的なプローブ（抗体）はまた、たやすく作り出すこともでき、購入することもできる。本方法で使用されるヌクレオチドプローブまたはポリペプチドプローブは、検出可能な標識を含みうる。任意の適切な標識を使用することができる。例えば、検出可能な標識は、光学的手段、磁気的手段、機械的手段、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、放射性手段、または酵素的手段により検出することができる。いくつかの実施形態では、検出可能な標識は、ＧＦＰなどの蛍光標識もしくは化学発光標識；磁性部分；アビジン、ストレプトアビジンなどのタンパク質；またはヒスチジンタグもしくはＦＬＡＧタグなどのペプチドタグである。

【０１１２】

固定化されたプローブは、本明細書で記載されるマイクロニードルデバイスの表面上に存在する。固定化されたプローブは、マイクロニードルの表面に、当技術分野で公知の方法または本明細書の実施例で記載される具体的な連結法により、共有結合または非共有結合により結合しうる。例えば、プローブは、例えば、ビオチン－アビジン間相互作用またはビオチン－ストレプトアビジン間相互作用、プロテインＡ相互作用、プロテインＧ相互作用、ヤギ抗マウスＦｃ相互作用、アミド結合を介して、マイクロニードルへとコンジュゲートさせることもでき、他の任意の共有結合的または非共有結合的相互作用を介してマイクロニードルへとコンジュゲートさせることもできる。プローブは、ポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）など、プローブとマイクロニードル表面との間の適切なスペーサーエレメントを伴って、マイクロニードルへと共有結合により付着させることもでき、これを伴わずにマイクロニードルへと共有結合により付着させることもできる。抗体プローブまたはヌクレオチドプローブを固定化するために当技術分野で日常的に実施される方法をたやすく採用し、本発明の実施において適宜改変することができる。このような方法は、当技術分野、例えば、Ｍｅｎｄｏｚａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　２７：７７８-７８６，１９９９；Ａｒｅｎｋｏｖ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎａｌ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　２７８：１２３-１３１，２０００；Ｚｈｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．　Ｇｅｎｅｔ．　２６：２８３-２８９，２０００；ＭａｃＢｅａｔｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８９：１７６０-１７６３，２０００；Ｊｙｏｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｓｅｎｓ．　Ｂｉｏｅｌｅｃｔｒｏｎ．　２１：２３１５-２３１９，２００６；Ｌｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎａｌ．　Ｃｈｅｍ．　６７：８３　８７，１９９５；Ｖｉｊａｙｅｎｄｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎａｌ．　Ｃｈｅｍ．　７３：４７１-４８０，２００１；Ｎａｋａｎｉｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎａｌ．　Ｃｈｅｍ．　６８：１６９５-１７００，１９９６；Ｒｏｗｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎａｌ．　Ｃｈｅｍ．　７１：４３３-４３９，１９９９；Ｄａｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｃｈｅｍ．　Ｊ．　２７８：７３５－７

４０，１９９１；Ｆｏｄｏｒ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５１：７６７－７７３，１９９１；Ｓｃｈｅｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０：４６７－４７０，１９９５；Ｌａｍｔｕｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２２：２１２１－２１２５，１９９４；Ｇｕｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２２：５４５６－５４６５，１９９４；ならびにＰＣＴ国際公開第ＷＯ００／２２１０８号、第ＷＯ０１／７５４４７号および第ＷＯ０２／１２８９１号において記載されている。

【０１１３】

プローブはまた、反応性部分で修飾し、１または複数のマイクロニードルの金でコーティングされた表面へと付着させることもできる。反応性部分は、チオール基でありうる。いくつかの場合には、無機塩を添加することができる。無機塩の例は、ハロゲン化物対イオンを伴うことが多い、リチウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、マグネシウム塩、およびカルシウム塩を含むがこれらに限定されない。いくつかの場合には、無機塩は、塩化ナトリウムである。無機塩は、好ましくは約０．１Ｍ～２．０Ｍ、約０．２Ｍ～２．０Ｍ、約０．２Ｍ～１．５Ｍ、または約０．５Ｍ～１．５Ｍの間の濃度で存在しうる。いくつかの場合には、無機塩の濃度は、約０．１Ｍ未満、約０．２Ｍ未満、約０．２Ｍ未満、約０．３Ｍ未満、約０．４Ｍ未満、約０．５Ｍ未満、約１．０Ｍ未満、約１．１Ｍ未満、約１．２Ｍ未満、約１．３Ｍ未満、約１．４Ｍ未満、約１．５Ｍ未満、約１．６Ｍ未満、約１．７Ｍ未満、約１．８Ｍ未満、約１．９Ｍ未満、約２．０Ｍ未満、約２．５Ｍ未満、約３．０Ｍ未満、約３．５Ｍ未満、約４．０Ｍ未満、または約４．５Ｍ未満である。いくつかの場合には、無機塩の濃度は、約０．１Ｍを超える、約０．２Ｍを超える、約０．２Ｍを超える、約０．３Ｍを超える、約０．４Ｍを超える、約０．５Ｍを超える、約１．０Ｍを超える、約１．１Ｍを超える、約１．２Ｍを超える、約１．３Ｍを超える、約１．４Ｍを超える、約１．５Ｍを超える、約１．６Ｍを超える、約１．７Ｍを超える、約１．８Ｍを超える、約１．９Ｍを超える、約２．０Ｍを超える、約２．５Ｍを超える、約３．０Ｍを超える、約３．５Ｍを超える、約４．０Ｍを超える、または約４．５Ｍを超える。

【０１１４】

バイオマーカーの捕捉

【０１１５】

プローブへと共有結合または非共有結合により付着させたマイクロニードルは、ｉｎ ｓｉｔｕで、ヒトの皮膚、眼、術中組織、皮膚毛細血管などの生体試料へと挿入することができる。プローブへと共有結合により付着させたマイクロニードルはまた、ｅｘ ｖｉｖｏで、生検時における抽出された組織などの生体試料へと挿入することもできる。プローブは、生体試料に対する生理学的条件下で、指定された時間にわたり、バイオマーカーにハイブリダイズまたは結合させることができる。摂氏約２０～約４０度の温度範囲、大気圧１、ｐＨ６～８、１～２０ｍＭのグルコース濃度、大気酸素濃度、および地球における重力は、大半の被験体に対する生理学的条件の例でありうる。プローブは、少なくとも１分間、少なくとも２分間、少なくとも３分間、少なくとも５分間、少なくとも１０分間、少なくとも１５分間、少なくとも２０分間、少なくとも２５分間、少なくとも３０分間、少なくとも４５分間、少なくとも１時間、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも５時間、少なくとも１０時間、または少なくとも２４時間にわたり、生体試料にハイブリダイズまたは結合させることができる。いくつかの実施形態では、プローブは、１分間以下、２分間以下、３分間以下、５分間以下、１０分間以下、１５分間以下、２０分間以下、２５分間以下、３０分間以下、１時間以下、２時間以下、３時間以下、５時間以下、または１０時間以下にわたり、生体試料にハイブリダイズさせることができる。共有結合または非共有結合により連結されたプローブを伴うマイクロニードルは、生体試料、例えば、ヒト皮膚から除去することができる。プローブにハイブリダイズまたは結合したバイオマーカーは、マイクロニードルをヒト皮膚から除去することにより、生体試料から単離することができる。

【０１１６】

バイオマーカーの検出
【０１１７】
本発明のいくつかの実施形態は、ポリヌクレオチドバイオマーカー（例えば、ｍＲＮＡ、ＤＮＡ）の検出を対象とする。これらの実施形態では、１または複数の特異的なバイオマーカーのためのプローブ（例えば、オリゴヌクレオチドプローブ、ポリヌクレオチドプローブ）は、標的バイオマーカーの配列に基づき、たやすく合成することができる。核酸バイオマーカーは、本発明のマイクロニードルデバイス上のプローブに結合したら、増幅反応（例えば、ＰＣＲ、逆転写ＰＣＲ）にかけられるか、または標識されたタグにより検出されることが典型的である。標識されたタグは、マイクロニードルへと付着させたプローブへと直接連結することができるか、いくつかの場合には、標識されたタグは、バイオマーカーがマイクロニードルへと付着させたプローブにより既に捕捉された後で、バイオマーカーに結合する。
【０１１８】
当技術分野で日常的に実施される多くの方法をたやすく採用して、被験体から得られる核酸バイオマーカーを増幅することができる。これらは、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）または逆転写ＰＣＲを含む。一般に、ＰＣＲ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ： Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ＤＮＡ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ（Ｈ．Ａ． Ｅｒｌｉｃｈ編、Ｆｒｅｅｍａｎ Ｐｒｅｓｓ、ＮＹ、ＮＹ、１９９２年）；ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ： Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ（Ｉｎｎｉｓら編、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ、１９９０年）；Ｍａｔｔｉｌａら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、１９巻、４９６７頁（１９９１年）；Ｅｃｋｅｒｔら、ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、１巻、１７頁（１９９１年）；ＰＣＲ（ＭｃＰｈｅｒｓｏｎら編、ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ、Ｏｘｆｏｒｄ）；および米国特許第４，６８３，２０２号（これらの各々が、全ての目的で、参照により組み込まれる）を参照されたい。他の適切な増幅法は、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）（ＷｕおよびＷａｌｌａｃｅ、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、４巻、５６０頁（１９８９年）、Ｌａｎｄｅｇｒｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４１巻、１０７７頁（１９８８年）を参照されたい）、転写増幅（Ｋｗｏｈら、Ｐｒｏｃ． Ｎａｔｌ． Ａｃａｄ． Ｓｃｉ． ＵＳＡ、８６巻、１１７３頁（１９８９年））、ならびに自己持続配列複製（Ｇｕａｔｅｌｌｉら、Ｐｒｏｃ． Ｎａｔ． Ａｃａｄ． Ｓｃｉ． ＵＳＡ、８７巻、１８７４頁（１９９０年））および核酸ベースの配列増幅（ＮＡＳＢＡ）を含む。後者の２つの増幅法は、一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）および二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）の両方を、それぞれ、約３０または１００対１の比で増幅産物として生成させる、等温転写に基づく等温反応を伴う。次いで、増幅されたら、捕捉されたバイオマーカーの識別を、例えば、シークエンシング解析、電気泳動などの標準的な技法によりたやすく確認することができる。
【０１１９】
本発明のいくつかの実施形態では、ＰＣＲを使用して、プローブとハイブリダイズするか、または他の形でプローブへと接続されたバイオマーカーを検出する。ＰＣＲによるバイオマーカーの増幅は、いくつかの桁数にわたることが可能であり、場合によって、標的の単一または少数のコピーから出発して、特定のＤＮＡ配列の数千～数百万コピーを作り出す。ＰＣＲは、ＤＮＡの融解および酵素によるＤＮＡの複製のための、反復された加熱反応および冷却反応のサイクルを含む、サーマルサイクリングを使用しうる。これらのサーマルサイクリング操作は、ＤＮＡ融解と呼ばれる工程において高温で、ＤＮＡ二重螺旋内の２つの鎖を物理的に分離しうる。次いで、低温では、各鎖を、ＤＮＡポリメラーゼによるＤＮＡ合成における鋳型として使用して、標的ＤＮＡを選択的に増幅することができる。ＰＣＲの選択性は、特異的なサーマルサイクリング条件下における増幅のためにターゲティングされるＤＮＡ領域と相補的なプライマー（短鎖ＤＮＡ断片）の使用から生じうる。
【０１２０】

対象とするバイオマーカーと相補的な配列を含有するプライマーを、ＤＮＡポリメラーゼと共に使用して、選択的で反復された増幅を達成することができる。ＰＣＲが進行するにつれ、作り出されたＤＮＡを、複製のための鋳型として使用して、ＤＮＡ鋳型が指数関数的に増幅される連鎖反応を作動させることができる。ＰＣＲ適用では、元来細菌であるＴｈｅｒｍｕｓ　ａｑｕａｔｉｃｕｓから単離された酵素であるＴａｑポリメラーゼなど、熱安定性のＤＮＡポリメラーゼを採用することができる。このＤＮＡポリメラーゼは、例えば、鋳型としての一本鎖ＤＮＡおよびＤＮＡ合成を開始するためのＤＮＡオリゴヌクレオチド（また、ＤＮＡプライマーとも呼ばれる）を使用することにより、新たなＤＮＡ鎖を、ヌクレオチドから酵素的にアセンブルすることができる。

【０１２１】

ＰＣＲ反応は、生体試料へと挿入されたマイクロニードル上で直接実施することができる。例えば、マイクロニードルは、ＰＣＲ反応に必要な試薬を含む、試験管内に入れることもでき、２つのプレートの間（例えば、スライドガラス）に置くこともできる。バイオマーカーは、複数の異なる方法により、ニードルから脱離させ、ＰＣＲ試験管へと放出することができる。例えば、マイクロニードルを加熱して、バイオマーカーをマイクロニードルから放出する場合もあり、バイオマーカーがニードルからＰＣＲ溶液へと自発的に放出される場合もある。ＰＣＲ反応は、上記で記載した通りに実施することができ、ＰＣＲ産物は、標準的な手順、例えば、電気泳動、リアルタイムＰＣＲ、およびＰＣＲ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：　Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ｆｏｒ　ＤＮＡ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ（Ｈ．Ａ．　Ｅｒｌｉｃｈ編、Ｆｒｅｅｍａｎ　Ｐｒｅｓｓ、ＮＹ、ＮＹ、１９９２年）；ＰＣＲ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：　Ａ　Ｇｕｉｄｅ　ｔｏ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ（Ｉｎｎｉｓら編、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ、１９９０年）において記載されているような他の手順を使用して、解析することができる。標準的なＰＣＲ法およびリアルタイムＰＣＲ法など、異なるＰＣＲ法を使用して、試料を解析することができる。リアルタイムＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）とは、ＰＣＲに基づく実験室技法であり、これを使用して、ターゲティングされたＤＮＡ分子を増幅し、同時に定量化することができる。リアルタイムＰＣＲを逆転写と組み合わせて、細胞内または組織内のメッセンジャーＲＮＡおよび非コードＲＮＡを定量化することができる。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、本開示のデバイスは、ＰＣＲ反応を実施しうる少なくとも１つの区画を含むようにさらに構成することができる。例えば、本開示のデバイスは、複数のマイクロニードルまたはマイクロニードルのアレイおよびＰＣＲ反応を実施しうる区画を含むように構成することができる。

【０１２３】

ＰＣＲ反応により、特定のマイクロニードルとハイブリダイズしたバイオマーカーを選択的に増幅することもでき、ＰＣＲ反応により、複数のマイクロニードルとハイブリダイズしたバイオマーカーのセットを増幅することもできる。例えば、４０２は、生体試料と接触させた複数のマイクロニードルを含む、本発明のデバイスの表面を例示する。４０２内の各「正方形」は、個々のマイクロニードルを例示し、この場合、各個別のマイクロニードルは、少なくとも１つのプローブを含む。４０２内の各プローブは、バイオマーカーとハイブリダイズする場合もあり、ハイブリダイズしない場合もある。４０２で例示される各マイクロニードルは、別個のＰＣＲ試験管内に入れ、各ＰＣＲ産物を、個別に解析することができる。代替的に、４０２で例示される複数のマイクロニードルは、同時的な解析のために、同じＰＣＲ試験管内に入れることもできる。

【０１２４】

いくつかの場合には、捕捉されたバイオマーカーは、捕捉されたバイオマーカーに結合することが可能な、標識されたプローブを使用することにより検出することができる。いくつかの場合には、標識されたプローブは、バイオマーカーが、本明細書で記載される、マイクロニードルへと付着させたプローブにより既に捕捉された後で、バイオマーカーに

結合する。いくつかの場合には、マイクロニードルを、バイオマーカーに結合すると、その光学シグナルを変化させる（強度を減少または増大させる）ようにデザインされた標識でタグ付けされたプローブへと直接付着させる。

【０１２５】

標識されたプローブは、光学シグナルを発しうる標識（例えば、フルオロフォア、放射性同位元素など）を含みうる。蛍光部分は、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）、またはこれらの変化形などの蛍光タンパク質でありうる。いくつかの場合には、標識されたプローブは、プローブがその標的に結合すると、増大するかまたは低下する光学シグナルを伴う標識を含む。蛍光部分は、フルオロフォアに結合するＲＮＡアプタマーでありうる。ＲＮＡ－フルオロフォア複合体は、可視光スペクトルにわたる光学シグナルを発しうる（Ｐａｉｇｅら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、３３３巻、６０４２頁（２０１１年）を参照されたい）。例えば、「Ｓｐｉｎａｃｈアプタマー配列」とは、バイオマーカーとハイブリダイズすると、蛍光光学シグナルを発するように構成されうるＧＦＰのＲＮＡ模倣体である。

【０１２６】

いくつかの実施形態では、そこに非共有結合的または共有結合により結合させたプローブのセットを含むマイクロニードルを使用して、被験体におけるバイオマーカーを検出することができる。例えば、本開示のデバイスは、被験体の皮膚へと接触させることができる。デバイスは、ＲＮＡ－フルオロフォア部分を含む、ポリヌクレオチドプローブを含みうる。ＲＮＡ－フルオロフォア部分は、対象とするバイオマーカーとハイブリダイズすると、蛍光シグナルなどの光学シグナルを発するように構成することができる。

【０１２７】

タンパク質バイオマーカーまたはペプチドバイオマーカーは、ポリペプチド検出についての当業者に周知のいくつかの方法のうちのいずれかにより、検出および定量化することができる。これらは、タンパク質ＰＣＲおよびＥＬＩＳＡなどのアッセイフォーマットを含む。局所性タンパク質バイオマーカーおよび全身性タンパク質バイオマーカーならびに局所性ペプチドバイオマーカーおよび全身性ペプチドバイオマーカーのいずれも、本発明のマイクロニードルアレイデバイスを使用してアッセイすることができる。この目的に適する他の方法は、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）、高拡散クロマトグラフィー、質量分析などの解析生化学的方法、または流体沈降素反応もしくはゲル沈降素反応、免疫拡散（一元または二元）、免疫組織化学、アフィニティークロマトグラフィー、免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、免疫蛍光アッセイ、ウェスタンブロット法、ディップスティックなど、他の多様な免疫学的方法を含む。イムノアッセイの一般的な総説については、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ、３７巻：Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ａｓａｉ編、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９３年）；Ｂａｓｉｃ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、７版、Ｓｔｉｔｅｓ ＆ Ｔｅｒｒ編（１９９１年）；ＩＭＭＵＮＯＡＳＳＡＹＳ ＦＯＲ ＴＨＥ ８０ｓ、Ｖｏｌｌｅｒ，Ａ．ら（編）、Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ：Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐａｒｋ Ｐｒｅｓｓ（１９８１年）；Ｍａｇｇｉｏら、ＥＮＺＹＭＥ－ＩＭＭＵＮＯＡＳＳＡＹ、Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ：ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ、１７２～１７６頁（１９８０年）；およびＴｉｊｓｓｅｎ、Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ｐｒａｃｔｉｃｅ ａｎｄ Ｔｈｅｏｒｙ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙｓ、１５巻、Ｅｌｓｅｖｉｅｒ、１９８５年も参照されたい。任意の特異的なタンパク質バイオマーカーまたはペプチドバイオマーカー（例えば、抗体）に関するこれらのアッセイを実施するための試薬は、販売元からたやすく得ることもでき、標準的で日常的に実施される技法（例えば、モノクローナル抗体を作製するためのハイブリドーマ技術）により作り出すこともできる。

【０１２８】

プローブとバイオマーカーとの間の結合性相互作用は、二次抗体などの二次検出試薬を使用して検出することができる。例えば、「サンドイッチＥＬＩＳＡ」を使用して、バイオマーカーの抗体プローブへの結合を検出することができる。バイオマーカーのプローブへの結合は、バイオマーカーの異なるエピトープに特異的な検出抗体を使用して検出することができる。検出において使用される抗体は、プローブとして使用される抗体とは異なるアイソタイプでありえ、例えば、抗体プローブは、ＩｇＧ抗体（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４などの亜型のうちのいずれかを含む）でありえ、二次抗体は、ＩｇＡ、ＩｇＭでありうる。検出抗体は、例えば、蛍光部分または放射性標識など、検出可能な標識へとコンジュゲートさせることができる。酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）法など、抗体ベースの検出法を使用して、プローブのバイオマーカーへの結合を検出することができる。

【０１２９】

タンパク質バイオマーカーおよびペプチドバイオマーカーはまた、タンパク質ＰＣＲ法を使用してアッセイすることもできる。例えば、これらの適用において、バイオマーカーを検出するのに適する１つのアッセイは、ＰＣＲ－ＥＬＩＳＡプロトコールである。アッセイでは、標準的なイムノアッセイ手順を採用する。捕捉抗体を、デバイスのマイクロニードルの表面へと付着させる。解析的シグナルを発現させるためのレポーター酵素を使用する代わりに、二次抗体を、一本鎖オリゴヌクレオチドへと融合させ、次いで、これを、ＰＣＲを使用して増幅することができる。挿入およびバイオマーカーの捕捉の後で、オリゴヌクレオチドで標識された二次抗体を添加し、その後、コンジュゲートさせたタグについてＰＣＲ解析を行うことにより、バイオマーカーの存在を検出することができる。

【０１３０】

診断適用および関連するキット

本明細書で記載されるデバイスおよび方法は、多様な診断適用において、バイオマーカーを検出および捕捉するのに有用である。これらは、例えば、皮膚疾患の診断、循環遺伝子マーカーの検出、およびタンパク質バイオマーカーまたはペプチドバイオマーカーの検出を含む。例として述べると、デバイスは、ＣＭＭを有するかまたはそれを発症する危険性があることが疑われる被験体における皮膚悪性黒色腫（ＣＭＭ）の診断にたやすく採用することができる。これらの適用では、ＣＭＭ特異的バイオマーカーのためのプローブを、マイクロニードルへとカップリングさせることができる。次いで、プローブをコンジュゲートさせたマイクロニードルのうちの１または複数を含有するデバイスを、被験体の皮膚上の全てのほくろ（母斑）へと直接適用することができる。デバイスを各母斑から除去し、次いで、マイクロニードルにより捕捉された任意のバイオマーカーを、ｉｎ　ｓｉｔｕのデバイス上で、またはデバイスから分離した後でアッセイする。本開示のデバイスは、診断適用および予後診断適用のために臨床で使用することができる。

【０１３１】

別の具体的な適用としては、本明細書で記載されるデバイスおよび方法は、皮膚がん切除術におけるマージン検出でも採用される。これらの実施形態では、デバイスは、プローブをコンジュゲートさせた、異なる長さのマイクロニードルを含有する。腫瘍特異的バイオマーカーの、これらのデバイスによる検出およびアッセイは、執刀医に、皮内、皮下、および基底腔における腫瘍浸潤の程度についての情報を与えうる。これらの適用により、現在、皮膚腫瘍の切除時において、マージンを決定するのに必要とされている、再三にわたる組織病理学検査が回避される。いくつかの場合には、方法は、皮膚の生検を含まない。

【０１３２】

本発明の方法およびデバイスは、皮膚の状態の診断および／または処置において使用することができる。これらの方法は、マイクロニードルを、被験体の皮膚組織と接触させることを含みうる。皮膚の状態は、良性状態の場合もあり、前悪性状態の場合もあり、悪性状態の場合もある。皮膚の状態は、健常状態でありうる。皮膚の状態の非限定的な例は、黒色腫およびモース皮膚がんなどの皮膚がん；オンコセルカ症；ループス；麻疹（はしか

）；血管腫；乾癬；酒さ；脂漏性湿疹；じんましん、白斑；疣贅；壊疽性筋膜炎；皮膚カンジダ症；癰；蜂巣炎；発汗減少症；膿痂疹；皮膚弛緩症；褥瘡性潰瘍；丹毒；発汗異常性湿疹；口内炎；ほくろ；ヘルペス性口内炎；尋常性魚鱗癬；ざ瘡；ヘルペス；皮膚筋炎；伝染性軟属腫；肢端皮膚病；皮脂嚢胞；脂漏性角化症；毛巣洞；ケロイド；扁平苔癬；光線性角化症；うっ滞性皮膚炎；魚の目およびたこ；湿疹；癜風；類天疱瘡；潰瘍；または帯状疱疹を含む。本発明の方法およびデバイスは、ブドウ膜炎、ドライアイ疾患、網膜疾患、緑内障、炎症性疾患など、複数の眼の状態の診断および処置において使用することができる。本発明のデバイスを使用して、がんを病期分類することができる。がんは、病期０、病期Ｉ、病期ＩＩ、病期ＩＩＩ、または病期ＩＶと病期分類することができる。

【０１３３】

本発明の方法およびデバイスはまた、例えば、角膜表面炎症、ブドウ膜炎、またはドライアイ疾患などの眼の状態の診断および／または処置で使用することもできる。これらの方法は、例えば、結膜下腔を接触させることにより、マイクロニードルを、被験体の眼組織と接触させることを含みうる。眼の状態は、良性状態の場合もあり、前悪性状態の場合もあり、悪性状態の場合もある。眼の状態は、健常状態でありうる。眼の状態の非限定的な例は、網膜芽腫；皮膚黒色腫または眼内（眼）黒色腫；網膜色素変性（ＲＰ）；糖尿病網膜症；緑内障（開放隅角緑内障（例えば、原発性開放隅角緑内障）、閉塞隅角緑内障、および続発性緑内障（例えば、色素性緑内障、偽落屑緑内障、ならびに外傷および炎症性疾患から生じる緑内障）を含む）、網膜剥離、加齢黄斑症または他の黄斑症、加齢黄斑変性、光網膜症、手術誘導性網膜症、毒性網膜症、未熟児網膜症、眼の外傷または浸潤性病変に起因する網膜症、遺伝性網膜変性、手術誘導性網膜症、毒性網膜症、眼の外傷または浸潤性病変に起因する網膜症を含む。対象とする具体的で例示的な遺伝性状態は、バルデー－ビードル症候群；先天性黒内障；錐体ジストロフィーまたは錐体杆体ジストロフィー；先天性停止性夜盲；黄斑変性；視神経委縮；症候性網膜症または全身性網膜症；およびアッシャー症候群を含むがこれらに必ずしも限定されない。

【０１３４】

本発明の方法およびデバイスを使用して、外科手順または美容手順におけるバイオマーカーの発現をモニタリングすることができる。本開示のデバイスおよび方法を使用して、例えば、眼組織または脳組織など、慎重を要する組織の生検を実施することができる。いくつかの場合には、マイクロニードルデバイスを、術中手順の間に、被験体の組織または生体試料と接触させることができる。組織または生体試料は、脳、心臓、乳房、肝臓、膵臓、脾臓、膀胱、胃、肺、子宮、子宮頸部、前立腺、腎臓、腸、虫垂、および結腸からなる群から選択される臓器から得ることができる。さらなる場合には、マイクロニードルは、腫瘍を被験体から摘出する前に、または腫瘍を被験体から摘出した後で、腫瘍のマージンへと接触させることができる。

【０１３５】

本発明の診断適用のさらなる例として述べると、本明細書で記載される方法およびデバイスは、被験体の体液（例えば、血流）中の、全身遺伝子バイオマーカーおよび循環遺伝子バイオマーカーの検出においても使用することができる。多くの疾患（例えば、ダウン症候群）は、血液中で循環する遺伝子（例えば、ｍＲＮＡ）バイオマーカーを有することが公知である。本発明のデバイス内のマイクロニードルの長さを延長し、皮膚毛細血管または皮下毛細血管へと穿通させ、これらに接近させることにより、バイオマーカーのためのプローブを、このようなバイオマーカーに特異的に結合させることが可能である。また、血液中に存在することが公知の、他の任意の核酸バイオマーカーも、同様の様式で検出することができる。例えば、本開示のデバイス上のマイクロニードルは、ｉｎ　ｓｉｔｕで被験体の皮膚を穿通し、被験体の皮膚毛細血管と接触しうる。皮膚毛細血管は、被験体の体内の最も細い血管である可能性があり、皮膚毛細血管の内膜は、細胞層約１つの厚さでありうる。本開示のデバイスは、デバイスを被験体の皮膚へと接触させると、１または複数の皮膚毛細血管の膜を穿通しうる。いくつかの実施形態では、本開示のデバイスを活用して、血液試料を被験体から採取せずに、血流中を循環するバイオマーカーについて調

べることができる。いくつかの場合には、本開示のデバイスは、妊娠に関連したバイオマーカーを含む、状態の胎児バイオマーカーまたは母体バイオマーカーを検出しうる。いくつかの場合には、本発明のデバイスは、タンパク質、ホルモン、ビタミン、共因子、またはポリヌクレオチドなど、血流中を循環するバイオマーカーを検出しうる。

【０１３６】

ポリヌクレオチドバイオマーカーに基づく本発明の方法およびデバイスで診断されうる遺伝子状態の非限定的な例は、嚢胞性線維症；デュシェンヌ型筋ジストロフィー；ヘモクロマトーシス；テイーサックス病；プラダーウィリー症候群；アンジェルマン症候群；神経線維腫症；フェニルケトン尿症；カナバン病；セリアック病；酸性ベーターグルコシダーゼ欠損症；ゴーシェ病；シャルコーマリートゥース病；色盲；猫泣き症候群；多発性嚢胞腎；尖頭症；家族性大腸腺腫症；副腎障害；筋委縮性側索硬化症（ＡＬＳ）；アルツハイマー病；パーキンソン病；貧血；運動失調；毛細血管拡張性運動失調；自閉症；骨髄疾患；ボネビーウルリッヒ症候群；脳疾患；フォンヒッペルーリンダウ病；先天性心疾患；クローン病；認知症；筋強直性ジストロフィー；ファブリー病；脆弱Ｘ症候群；ガラクトース血症；遺伝性気腫；網膜芽腫；ペンドレッド症候群；アッシャー症候群；ウィルソン病；神経障害；ハンチントン病；免疫系障害；痛風；Ｘ連鎖球脊髄性筋委縮症；学習障害；リーフラウメニ症候群；リパーゼＤ欠損症；ルーゲーリック病；マルファン症候群；代謝障害；ニーマンーピック病；ヌーナン症候群；骨脆弱症；ポイツーイェーガー症候群；ファイファー症候群；ポルフィリン症；早老症；レット症候群；結節性硬化症；言語コミュニケーション障害；脊髄性筋委縮症；トリーチャーコリンズ症候群；トリソミー；およびモノソミーを含む。

【０１３７】

いくつかの場合には、本発明のプローブを使用して、免疫系の状態を検出することができる。本発明のデバイスをアレルギー検査において使用して、アレルギーを確認または防止することができる。いくつかの場合には、本発明のデバイスを使用して、アレルギーパネルを解析することができる。免疫障害の非限定的な例は、ＨＩＶ、糖尿病、パーキンソン病、アルツハイマー病、関節リウマチ、ループス、がん、多発性硬化症、炎症性腸疾患、乾癬、強皮症、自己免疫性甲状腺疾患、血管炎、悪性貧血、重症複合型免疫不全症（ＳＣＩＤ）、ディジョージ症候群、高免疫グロブリンＥ症候群、分類不能型免疫不全症、慢性肉芽腫症、ウィスコットーアルドリッチ症候群、自己免疫性リンパ増殖症候群（ＡＬＰＳ）、高ＩｇＭ症候群、白血球接着不全症（ＬＡＤ）、ＮＥＭＯ（ＮＦ－κＢ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　ｍｏｄｉｆｉｅｒ）障害、選択的免疫グロブリンＡ欠損症、Ｘ連鎖無ガンマグロブリン血症、Ｘ連鎖リンパ球増殖性疾患、毛細血管拡張性運動失調、季節性アレルギー、肥満細胞症、通年性アレルギー、アナフィラキシー、食物アレルギー、アレルギー性鼻炎、およびアトピー性皮膚炎を含む。

【０１３８】

いくつかの実施形態では、本発明のデバイスおよび方法を使用して、複数のがんと関連した様々なバイオマーカーを診断することができる。がんの非限定的な例は、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、副腎皮質癌、ＡＩＤＳ関連がん、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、肛門がん、虫垂がん、星状細胞腫、基底細胞癌、胆管がん、膀胱がん、骨がん、小脳星状細胞腫、大脳星状細胞腫／悪性神経膠腫、上衣腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉腫瘍、視経路および視床下部神経膠腫などの脳腫瘍、乳がん、気管支腺腫、バーキットリンパ腫、原発不明癌、中枢神経系リンパ腫、小脳星状細胞腫、子宮頸がん、小児がん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性障害、結腸がん、皮膚Ｔ細胞リンパ腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、子宮内膜がん、上衣腫、食道がん、ユーイング肉腫、胚細胞腫瘍、胆嚢がん、胃（ｇａｓｔｒｉｃ）がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、神経膠腫、有毛細胞白血病、頭頸部がん、心臓がん、肝細胞（肝）がん、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、眼内黒色腫、島細胞癌、カポジ肉腫、腎がん、喉頭がん、口唇および口腔がん、脂肪肉腫、肝がん、非小細胞肺がんおよび小細胞肺がんなどの肺がん、リンパ腫、白血病、マクログロブリン血症、骨悪性線維性組織球腫／骨肉腫、髄芽腫、

黒色腫、中皮腫、原発不明の転移性頸部扁平上皮がん、口内がん、多発性内分泌腫瘍症候群、骨髄異形成症候群、骨髄性白血病、鼻腔および副鼻腔がん、鼻咽頭癌、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺がん、口腔がん、口腔咽頭がん、骨肉腫／骨悪性線維性組織球腫、卵巣がん、卵巣上皮がん、卵巣胚細胞腫瘍、膵がん、膵島細胞がん、副鼻腔および鼻腔がん、副甲状腺がん、陰茎がん、咽頭（ｐｈａｒｙｎｇｅａｌ）がん、褐色細胞腫、松果体星状細胞腫、松果体胚細胞腫、下垂体腺腫、胸膜肺芽腫、形質細胞腫瘍、原発性中枢神経系リンパ腫、前立腺がん、直腸がん、腎細胞癌、腎盂および尿管移行細胞がん、網膜芽腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、肉腫、皮膚がん、皮膚メルケル細胞癌、小腸がん、軟組織肉腫、扁平上皮癌、胃（ｓｔｏｍａｃｈ）がん、Ｔ細胞リンパ腫、咽頭（ｔｈｒｏａｔ）がん、胸腺腫、胸腺癌、甲状腺がん、絨毛腫瘍（妊娠性）、原発部位不明がん、尿道がん、子宮肉腫、膣がん、外陰がん、ワルデンストレームマクログロブリン血症、およびウィルムス腫瘍を含みうる。

【０１３９】

本開示のデバイスは、独立の診断法のために使用することもでき、治療的処置についての情報を与える副次的診断法として使用することもできる。本開示のマイクロニードルおよび方法は、侵襲性が最低限であり、迅速であり、正確な診断法および処置法をもたらす。加えて、本明細書で開示されるデバイスおよび方法は、携帯可能で、痛みがなく、廉価な診断を、複数の被験体にもたらしうる。本発明の被験体は、例えば、老齢成人、成人、青年、少年、小児、幼児、および乳児を含む、任意の年齢の被験体でありうる。本発明の被験体は、哺乳動物、鳥類、魚類、爬虫類、または両生類でありうる。被験体の非限定的な例は、ヒト、霊長動物、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、およびマウスを含む。

【０１４０】

被験体は、本発明のマイクロニードルによる解析のために複数の生体試料をもたらしうる。被験体の生体試料の解析は、ｉｎ　ｓｉｔｕで実施することもでき、ｅｘ　ｖｉｖｏで実施することもできる。例えば、ｉｎ　ｓｉｔｕの解析は、本発明のマイクロニードルを、被験体の皮膚へと直接接触させることを含みうる。ｅｘ　ｖｉｖｏ解析は、本発明のマイクロニードルを、生検組織へと接触させることを含みうる。いくつかの実施形態では、本発明のマイクロニードルおよび方法によるバイオマーカー解析のために、約１ｍｇ、約５ｍｇ、約１０ｍｇ、約１５ｍｇ、約２０ｍｇ、約２５ｍｇ、約３０ｍｇ、約３５ｍｇ、約４０ｍｇ、約４５ｍｇ、約５０ｍｇ、約５５ｍｇ、約６０ｍｇ、約６５ｍｇ、約７ｍｇ、約７５ｍｇ、約８０ｍｇ、約８５ｍｇ、約９０ｍｇ、約９５ｍｇ、または約１００ｍｇの生体試料が必要とされる。

【０１４１】

いくつかの実施形態では、本発明の方法およびマイクロニードルにより、約１ｍｇ～約５ｍｇ以下、約１ｍｇ～約１０ｍｇ以下、約１ｍｇ～約２０ｍｇ以下、約１ｍｇ～約３０ｍｇ以下、約１ｍｇ～約４０ｍｇ以下、約１ｍｇ～約５０ｍｇ以下、約５０ｍｇ～約６０ｍｇ以下、約５０ｍｇ～約７０ｍｇ以下、約５０ｍｇ～約８０ｍｇ以下、約５０ｍｇ～約９０ｍｇ以下、約５０ｍｇ～約１００ｍｇ以下、約１００ｍｇ～約１グラム以下、約１００ｍｇ～約２グラム以下、約１００ｍｇ～約３グラム以下、約１００ｍｇ～約４グラム以下、約１００ｍｇ～約５グラム以下、約１００ｍｇ～約６グラム以下、約１００ｍｇ～約７グラム以下、約１００ｍｇ～約８グラム以下、約１００ｍｇ～約９グラム以下、約１００ｍｇ～約１０グラム以下、約１グラム～約２グラム以下、約１グラム～約３グラム以下、約１グラム～約４グラム以下、約１グラム～約５グラム以下、約１グラム～約６グラム以下、約１グラム～約７グラム以下、約１グラム～約８グラム以下、約１グラム～約９グラム以下、または約１グラム～約１０グラム以下の生体試料が必要とされる。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、さらなるアッセイを使用して、本開示のマイクロニードルおよび方法により同定されるバイオマーカーの同定に基づいてなされる診断を検証する。バイオマーカーを検証しうるアッセイの非限定的な例は、ａ）ＤＮＡーゼフットプリンティングアッセイおよびゲルシフトアッセイなど、タンパク質のＤＮＡとの相互作用を査定す

るアッセイ；ｂ）核ランオンアッセイなど、ＲＮＡ分子の完全性を査定するアッセイ；ｃ）アッセイの最終結果を定量的または定性的に測定しうる、エンドポイントアッセイ；ｄ）複数の時間間隔におけるデータ点の読取りを査定し、生物学的過程の反応速度を比較しうる、反応速度アッセイ；ｅ）ウェスタンブロットアッセイ、凝固アッセイ、および凝集アッセイなど、ある文脈において定量化されうるリードアウトをもたらす半定量アッセイ；ｆ）抗原抗体結合型の反応の応答を査定するイムノアッセイ；ｇ）機能および活性について調べる、酵素活性アッセイ；ｈ）増殖および分化する細胞の能力について調べうる、コロニー形成アッセイ；ｉ）フローサイトメトリーアッセイなどのカウンティングアッセイ；ならびにｊ）リアルタイムＰＣＲなど、複数のＰＣＲアッセイを含む。

【０１４３】

さらに、本開示の方法は、被験体から得られる基準組織から１または複数のバイオマーカーを検出することをさらに含みうる。例えば、方法は、試料組織および基準組織からバイオマーカーを検出することを含みうる。基準組織は、良性組織でありうる。いくつかの場合には、基準組織は、試料組織と同じ臓器または領域に由来する組織である。いくつかの場合には、試料組織は、疾患または障害（例えば、悪性腫瘍）を有することが疑われる組織を含み、基準組織は、疾患または障害を有さないことがわかっている、同じ臓器の組織を含む。いくつかの場合には、試料組織中で検出されたバイオマーカーレベルは、基準組織中で検出されたバイオマーカーレベルとさらに比較することができる。

【０１４４】

いくつかの場合には、本開示のデバイスを、手術中に腫瘍を摘出し、かつ／または腫瘍マージンを同定するのに使用することができる。本発明のデバイスを使用して、形状の異なる組織および組織マージンを、ｉｎ　ｓｉｔｕまたはｅｘ　ｖｉｖｏで特徴付けることができる。例えば、通常、組織が摘出され、切片化され、組織学的方法により評定されるモース皮膚がん手術では、本発明のデバイスを使用して、腫瘍のマージンを解析することができよう。いくつかの場合には、本発明のデバイスを使用して、組織のマージンを解析することにより、がんの転移を同定することができる。

【０１４５】

本開示のデバイスおよび方法は、個別化医療適用において活用することができる。被験体は、ある量の、例えば、皮膚試料を、臨床医に提供することができる。臨床医は、本開示のデバイスを使用して、被験体の皮膚と関連した複数のバイオマーカーについて調べることができる。臨床医は、同定されたバイオマーカーを使用して、特定の被験体における、予測される処置の有効性を決定することができる。本開示のデバイスおよび方法はまた、例えば、バイオマーカーの発現の増大または減少をモニタリングすることにより、特定の処置に対する被験体の応答をモニタリングするのに使用することもできる。臨床医は、バイオマーカー発現レベルの上昇または低下を利用して、処置の有効性を決定することができる。本発明のデバイスを使用して、バイオマーカーの発現を定量的に測定することができる。例えば、定量的ＰＣＲを使用して、マイクロニードル上のポリヌクレオチドプローブとハイブリダイズしたバイオマーカーのコピー数を増幅することができる。生体試料と接触させていないかまたは生体試料とハイブリダイズさせていないマイクロニードルは、陰性対照として使用することができる。既知量の、ハウスキーピング遺伝子などの標準対照を伴うマイクロニードルは、反応についての陽性対照として使用することができる。定量的ＰＣＲは、Ｔｈｅ　ＰＣＲ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ：　Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ　ＰＣＲ、Ｊａｍｅｓ　Ｗ.　Ｌａｒｒｉｃｋ、１９９７年６月、Ｅａｔｏｎ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇにおいて記載されている通りに実施することができる。

【０１４６】

本開示のデバイスおよび方法は、生物兵器防衛において使用することができる。生物兵器防衛は、生物学的または化学的作用物質の放出または播種の検出を含みうる。これらの作用物質は、細菌、ウイルス、または毒素でありえ、自然発生形態の場合もあり、ヒト改変形態の場合もある。本開示のデバイスを使用して、生物戦争において使用されうる病理学的作用物質と関連した、複数のバイオマーカーを検出することができる。

【０１４７】
生物戦争および／または化学戦争の作用物質は、例えば、テロ、大混乱、疾患、不安感、および／または死を引き起こす兵器として使用されうる、任意の生物学的実体および／または化学的実体を含みうる。化学的および生物学的作用物質の非限定的な例は、炭疽；天然痘；ツラレミア；トリインフルエンザ；ペスト；ＨＩＶ；エボラ；口蹄病；リシン；神経毒性有機リン酸；シアン化物；マスタードガスおよびルイサイトなどの発疱剤（またはびらん剤）；塩素およびホスゲンなどの窒息剤；サリン、タブン、ソマン、およびＶＸなどの神経剤；ＢＺなどの幻覚剤；パラチオン、マラチオン、およびアジンホスメチルなどの殺虫剤；ならびにこれらの誘導体または組合せを含む。

【０１４８】
本発明は、本明細書で記載される診断適用を実行するためのキットもさらに提供する。キットは、１または複数のマイクロニードルを含むマイクロニードルデバイスを含有することが典型的である。いくつかのキットでは、マイクロニードルを、１または複数のバイオマーカーを検出するための特異的なプローブと既にコンジュゲートさせている。他のいくつかのキットでは、１または複数のバイオマーカーを検出するためのプローブと、それらのマイクロニードルへのコンジュゲーションのための試薬とが、別個の構成要素として提供される。本発明のいくつかのキットは、公知の疾患または障害に特異的な１つのバイオマーカー（例えば、消化器がんのためのプラコフィリン－３　ｍＲＮＡ）を検出および捕捉することが意図される。これらのキットでは通常、デバイスのマイクロニードルを、同じプローブ分子（例えば、標的バイオマーカーと相補的なオリゴヌクレオチド）とコンジュゲートさせているかまたはコンジュゲートさせる。本発明の他のいくつかのキットは、１または複数の疾患または障害に関与している複数のバイオマーカーを検出するようにデザインする。これらのキットでは、異なるバイオマーカーのための異なるプローブを、デバイスのマイクロニードルへとコンジュゲートするか、またはこれらとのコンジュゲーションのために供給する。マイクロニードルデバイスおよびプローブに加えて、本発明のキットはまた、デバイスを被験体へと適用し、捕捉されたバイオマーカーを解析するための他の試薬（例えば、バイオマーカーをＰＣＲ増幅するための試薬）も含みうる。キットは、キットを使用して、意図される診断適用を実行するための指示（例えば、キット内の指示シート上またはキットのパッケージング材料上の）もさらに含有しうる。

【０１４９】
本発明のデバイスは、キットとしてパッケージングすることができる。いくつかの実施形態では、キットは、基底細胞癌などの状態を処置するためのデバイスの使用についての指示書を含む。その書記物は、例えば、ラベルでありうる。書記物は、キット内に含まれるマイクロニードルおよびさらなる試薬を使用する条件および方法を示唆しうる。指示は、被験体および主治医に、バイオマーカーの最適の検出を達成するための最良の指針を提供する。

【０１５０】
本開示のキットは、本明細書で記載されるデバイスと、ポリメラーゼ連鎖反応のための試薬のセットとを含みうる。本開示のキットは、本明細書で記載されるデバイスと、ＥＬＩＳＡアッセイのための試薬のセットとを含みうる。キットは、基底細胞癌などの具体的な状態を同定するようにデザインすることもでき、扁平上皮癌、カポジ肉腫、黒色腫、基底細胞癌、および光線性角化症（扁平上皮癌の前駆状態）など、複数の状態を同時に診断するようにデザインすることもできる。いくつかの場合には、本開示のキットは、本発明のデバイスと、書記物とを含みうる。いくつかの場合には、本開示のキットは、本発明のデバイスと、プローブのセットと、プローブをマイクロニードルへと連結するのに使用しうる試薬のセットとを含みうる。

【０１５１】
本開示のキットは、陽性対照および陰性対照を含みうる。陽性対照は、例えば、公知のバイオマーカーを含む試料でありうる。陽性対照は、基底細胞癌と関連した公知のＳＮＰのポリヌクレオチドなど、公知の配列のポリヌクレオチドでありうる。陰性対照は、例え

ば、スクランブルポリヌクレオチド配列でありうる。いくつかの場合には、キットは、組織中または生体試料中に存在するバイオマーカーの量を定量化するための検量線を作成するのに使用しうる、既知濃度または既知量の試薬（例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド）を含みうる。このような試薬はまた、本明細書で提示される任意の方法と共に使用することもできる。

【０１５２】

動物モデル

疾患のための多くの薬物、処置、および治癒は、動物モデルを使用することにより開発することができる。動物モデルは、疾患の研究時および探索時に使用される、生きた動物でありうる。薬物の医薬としての開発は、細胞アッセイでは検出されない、毒性および有害な副作用の探索を含みうる。動物モデルを使用して、薬理学的処置の有効性、吸収、代謝、分布、排出、毒性、薬理、および副作用を評定することができる。本発明のデバイスおよび方法を使用して、動物モデルにおける、薬理学的処置に対する、バイオマーカーの応答を同定することができる。

【０１５３】

動物モデルは、さらなる査定のために、薬理学的化合物を選択するための指針をもたらしうる。動物モデルは、例えば、ヒトにおける薬物動態／代謝研究のための指針をもたらしうる。動物モデルは、例えば、Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎａｌ　Ｎｅｗ　Ｄｒｕｇ（ＩＮＤ）適用を裏付ける、吸収、分布、代謝、排出、および毒性（ＡＤＭＥＴ）パラメータを査定するために使用することができる。動物モデルにおける研究は、例えば、前臨床試験および臨床試験でさらに評定される化合物の選択をもたらしうる。

【０１５４】

臨床介入および臨床試験

本開示のデバイスは、臨床試験において使用することができる。例えば、本開示のデバイスを、外科手順時に使用して、到達するのが困難な組織内のバイオマーカー、または生検のために切除および摘出することが不可能な組織内のバイオマーカーを同定することができる。例えば、本開示のデバイスは、心血管組織、脳組織、または外科手順時に臨床医へと露出される内臓におけるバイオマーカーの検出へと適用することができる。いくつかの場合には、本発明のデバイスは、臨床医が、生検のために組織を被験体から摘出する場合に、他の形でなら生じうる医学的合併症を防止しうる。本開示のデバイスは、例えば、日常的な診察において使用することもでき、外科手順時に使用することもでき、被験体の自宅で被験体が使用することもできる。本発明のデバイスは、例えば、心血管手術または眼手術において使用することができる。

【０１５５】

本開示のデバイスは、臨床試験プロトコールのデザインにおいて使用することができる。例えば、本開示のデバイスは、バイオマーカーレベルを検出し、薬理学的処置に対する被験体の応答をモニタリングするのに、臨床試験と共に使用することができる。本開示のデバイスは、前臨床開発および臨床試験のデザイン、実行、および解析のためのガイドラインをもたらしうる。本開示は、治療的に有効な化合物の最適な投与のために選択されうるバイオマーカーを同定し、定量化する方法を提示する。

【０１５６】

本開示のデバイスは、臨床試験における、異なる薬物投与量に対する被験体の応答の予測において使用することができる。例えば、眼組織内の網膜疾患のバイオマーカーなど、バイオマーカーレベルの上昇または低下をモニタリングすることにより、本発明の方法およびデバイスは、網膜疾患のための薬理学的処置の有効性を確立しうる。いくつかの場合には、治療剤についての臨床試験は、本開示のデバイスによるバイオマーカーの検出に基づき実行するかまたは変化させる。いくつかの場合には、本開示の方法およびデバイスを使用して、臨床試験において評定される処置を、公知の標準治療である処置に照らして比較することができる。

【０１５７】

臨床試験は、前臨床研究、パイロット研究、安全性スクリーニング研究、および有効性査定研究を含む複数のステップを介して進められることが典型的である。薬物が承認され、市販されるには、臨床試験のプロトコールにおいて指定された、提起された信頼区間内での有効性の裏付け、および本発明の統計学的検定力を裏付ける、有意数の個体の組入れを含む、全ての評価項目を満たさなければならないことが多い。本発明の適用の非限定的な例は、臨床試験期間を通した、複数のバイオマーカーのモニタリングを含む。本開示のデバイスおよび方法はまた、異なる薬理学的処置が、いかにしてバイオマーカーの発現に影響を及ぼしうるのかを、臨床試験の早期段階（前臨床段階およびフェーズＩの段階）でモニタリングするのに使用することもできる。

【０１５８】

本開示のデバイスおよび方法はまた、同定されたバイオマーカーの発現レベルに基づき、薬理学的処置の影響を受ける基底的な細胞経路の変化を予測するのに使用することもできる。基底的な細胞経路に影響を及ぼしうる、薬理学的処置の薬力学パラメータおよび薬物動態パラメータの非限定的な例は、ａ）用量Ｄとして表されうる、投与される薬物の量；ｂ）τとして表されうる投与間隔；ｃ）分布容量V_d［ここで、$V_d = D / C_0$］として表されうる、薬物が分布する見かけの容量；ｄ）濃度C_0またはC_{ss}［ここで、C_0または$C_{ss} = D / Vd$］として表されうる、所与の血漿容量中の薬物の量；ｅ）薬物の半減期である$t_{1/2}$［ここで、$t_{1/2} = ln(2) / k_e$］；ｆ）薬物が体内から除去される速度であるk_e［ここで、$k_e = ln(2) / t_{1/2} = CL / V_d$］；ｇ）式の両辺を等しくさせるのに必要とされる注入速度K_{in}［ここで、$K_{in} = C_{ss} \times CL$］；ｈ）$AUC_{0_\infty}$（ここでは、

【数１】

$$\int_0^\infty C\,dt$$

）として表されうるか、または、定常状態では、$AUC_{\tau,ss}$（ここでは、

【数２】

$$\int_t^{t+\pi} C\,dt$$

）として表されうる、単回投与を施した後における濃度－時間曲線の積分；ｉ）ＣＬ（クリアランス）［ここで、$CL = V_d \times k_e = D / AUC$］として表されうる、単位時間あたりにクリアランスされる薬物の血漿容量；ｊ）ｆ［ここで、

【数３】

$$f = \frac{AUCpo.Div}{AUCiv.Dpo}$$

］として表されうる、全身に利用可能な薬物の画分；ｋ）投与後における薬物のピーク血漿濃度であるC_{max}；ｌ）薬物がC_{max}に到達するのに要する時間であるt_{max}；ｍ）次回の投与が施される前に薬物が到達する最低濃度であるC_{min}；およびｎ）％ＰＴＦ＝１００×

【数４】

$$\frac{(Cmax,ss - Cmin,ss)}{Cav,ss}$$

［式中、

【数５】

$$C_{av,ss} = \frac{AUC\tau,ss}{\tau}$$

］として表されうる、定常状態における１つの投与間隔内のピークトラフ変動を含む。

【実施例】

【０１５９】

以下の実施例は、本発明をさらに例示する目的で提示されるものであり、その範囲を限定する目的で提示されるものではない。

【０１６０】
（実施例１）
ポリカーボネートへと固定化されたプローブによる、溶液中のｓｓＤＮＡの検出
本実施例では、ＤＮＡプローブにより機能化されたポリカーボネート、およびｓｓＤＮＡを溶液から特異的に捕捉するためのその活用について記載する。
【０１６１】
ＤＮＡプローブの、ポリカーボネートへの付着：ポリカーボネート表面を、まず、硝酸で処理し、還元して、アミノ基を導入し、これを使用して、市販のチオール／アミノ二官能性リンカーにさらに付着させた（図１）。その後、３’チオール修飾を伴うＤＮＡを、ポリカーボネートへと係合されたリンカーへとカップリングした。
【０１６２】
ポリカーボネートへと付着させた５’－Ｃｙ５修飾ＤＮＡの可視化：ポリカーボネート表面上のＤＮＡを可視化するため、ＤＮＡを、５’側において１つのＣｙ５で修飾し、３’側においてチオールで修飾し、上記で記載した化学反応を使用して付着させた。単一層の５’Ｃｙ５－ＤＮＡを、共焦点顕微鏡で画像化した（図２）ところ、表面の機能化の成功が示された。ｓｓＤＮＡの、特異的なＤＮＡプローブで修飾されたポリカーボネート上のｉｎ　ｖｉｔｒｏ捕捉：ポリカーボネートへと付着させたＤＮＡプローブの、ｓｓＤＮＡを溶液から特異的に捕捉する（ｓｓＤＮＡにハイブリダイズする）能力について調べるために、ポリカーボネートディスクを、環状一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ、約３．４ｋｂのサイズ）の領域と相補的なＤＮＡプローブで修飾した。修飾されたディスクを、ｓｓＤＮＡ溶液と共にインキュベートしたら、ディスクを十分に洗浄し、ハイブリダイズしたｓｓＤＮＡを、高温で変性させ、定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）を介して定量化することにより、ディスクから放出させた。特異的なＤＮＡプローブで修飾されたポリカーボネート上において捕捉されたＤＮＡの量を、リンカーだけで修飾されたポリカーボネート上の捕捉（バックグラウンド対照）に対する比として表した（図１）。
【０１６３】
研究から得られた結果を、表１にまとめる。データは、ｓｓＤＮＡ標的が、全ての被験ｓｓＤＮＡ濃度（濃度は６ｌｏｇにわたり変化させる）で、特異的なプローブ上の濃縮に成功したことを示す。
【０１６４】
【表１】

表1:特異的なプローブを伴うディスクからのDNA回収量の、リンカーだけで修飾されたディスクからの回収量に対する比としての捕捉効率

表1	
ssDNA試料の濃度	被験のDNA回収量/陰性対照のDNA回収量
1.66×10^{-18} M (1.66 aM)	> 4
1.66×10^{-16} M (166 aM)	> 3
1.66×10^{-14} M (16.6 fM)	11.4
1.66×10^{-12} M (1.66 pM)	5

【０１６５】
研究で使用された材料および方法について、以下で詳細に記載する。
【０１６６】
ポリカーボネートの誘導体化：ポリカーボネートは、３０％のＨＮＯ３水溶液中、６５℃で３０分間にわたり振とうし、次いで、水で十分に洗浄した。硝酸で処理したポリカーボネート（ステップ１）を、水中１０％のＮａＢＨ４溶液へと浸漬し、室温で一晩にわたり振とうし、最後に水で十分に洗浄した。アミノ修飾ポリカーボネート（ステップ２）を、ｐＨ７．２のＰＢＳ中６．４ｍＭのＳｕｌｆｏ－ＧＭＢＳ溶液（Ｐｉｅｒｃｅ）中に浸

漬し、室温で１．５時間にわたり振とうし、最後に水で十分に洗浄した。

【０１６７】

ＤＮＡチオール基の脱保護：３’端にＴｈｉｏｌ　Ｍｏｄｉｆｉｅｒ　Ｃ３　Ｓ－Ｓを伴うＤＮＡは、ＩＤＴから購入した。チオール修飾を脱保護するため、水中１００μＭのＤＮＡ溶液５μＬを、ｐＨ８．１のＰＢＳ中１００ｍＭの２－メルカプトエタノール２５μＬにより、室温で３０分間にわたり処理した。脱保護されたＤＮＡを精製するため、Ｑｉａｇｅｎヌクレオチド除去キットによるＰＮ緩衝液６００μＬを、反応混合物へと添加した後、イソプロピルアルコール（２５０μＬ）を添加した。溶液を、Ｑｉａｇｅｎヌクレオチド除去キットのシリカカラムへと適用し、キットの指示に従い洗浄した後、ｐＨ７．２のＰＢＳ　３５μＬで溶出させた。ＤＮＡのポリカーボネートへの付着：脱保護されたチオール修飾ＤＮＡの溶液（ステップ４）を、マレイミドリンカーで修飾されたポリカーボネート（ステップ３）へと速やかに適用し、加湿雰囲気中、３７℃で４５分間にわたりインキュベートし、次いで、水で十分に洗浄し、空気中で乾燥させた。

【０１６８】

Ｃｙ５修飾ＤＮＡの可視化：５’端において１つのＣｙ５で修飾され、３’端においてチオール修飾された２５マーのＤＮＡを、上記で記載した化学反応を使用して、ポリカーボネートの表面へと付着させた。水で十分に洗浄し、乾燥させた後、ポリカーボネートを、顕微鏡のスライドへと取り付け、近赤外フィルターを使用して、共焦点顕微鏡で画像化した。表面上のＤＮＡによる修飾エリアのエッジを局在化し、画像化したところ、Ｃｙ５標識されたＤＮＡ単層による修飾の効果が明確に示された。

【０１６９】

特異的なＤＮＡプローブで機能化されたポリカーボネート上のｓｓＤＮＡの捕捉：上記で記載した手順（ステップ１～４）を使用して、３’側にチオール修飾を伴うＤＮＡプローブ（５’－ＣＡＡＧＴＴＧＣＣＴＴＡＧＣＧＴＣＡＧＡＣＴＧＴＡＴＴＴＴＴＴＴＴ／ＴｈｉｏＭＣ３／－３’）（配列番号１）を、ポリカーボネートディスクへと付着させた。陰性対照実験のためのディスクは、リンカーだけで修飾した（ステップ１～３）。ディスクを、繊維状ファージから単離された環状ｓｓＤＮＡの、３倍濃度のＳＳＣ緩衝液（１５０ｍＭのＮａＣｌ、１５ｍＭのクエン酸ナトリウム）中の溶液（ＤＮＡ濃度については、表１を参照されたい）に浸漬し、３７℃で１０分間にわたりインキュベートした。その後、ディスクを、３つの洗浄緩衝液（洗浄緩衝液１：１倍濃度のＳＳＣ＋０．０３％のＳＤＳ；洗浄緩衝液２：０．２倍濃度のＳＳＣ、洗浄緩衝液３：０．０５倍濃度のＳＳＣ）で洗浄した。洗浄の後、ディスクを、最小容量の滅菌蒸留水に浸漬し、９０℃で２分間にわたり加熱した後、まだ暖かい水を、ディスクから除去した。繊維状ファージのｐ３遺伝子に特異的なプライマーによるｑＰＣＲを使用して、水溶液アリコート中のｓｓＤＮＡを定量化した。

【０１７０】

（実施例２）

ＤＮＡプローブの、ステンレス鋼表面へのコンジュゲーション

本実施例では、３’チオール修飾を含有するＤＮＡオリゴマープローブの、金でコーティングされたステンレス鋼表面への付着について記載する。ＤＮＡプローブの、金コーティングされたステンレス鋼への付着：金表面は、チオール誘導体化一本鎖ＤＮＡを付着させることにより、たやすく修飾された。チオール化ＤＮＡの硫黄原子は、金と共有結合を形成する。金コーティングされたステンレス鋼へのＤＮＡの可視化：金コーティングされたステンレス鋼試料の表面上において、ＤＮＡを可視化するため、蛍光標識されたｄＵＴＰを使用して、フィルインＰＣＲ反応を実施して、一本鎖ＤＮＡの相補鎖を合成した。結果として得られる二本鎖オリゴマーは、フルオレセインと同様に、緑色チャネルで蛍光発光する、Ｃｈｒｏｍａｔｉｄｅ（登録商標）Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－５－ｄＵＴＰの複数のコピーを含有した。蛍光顕微鏡法により、金コーティングされたステンレス鋼表面の機能化の成功が裏付けられる（図３）。

【０１７１】

研究で使用された材料および方法について、以下で詳細に記載する。

【０１７２】

ＤＮＡチオール基の脱保護およびステンレス鋼へのコンジュゲーション：３’端にＴｈｉｏｌ　Ｍｏｄｉｆｉｅｒ　Ｃ３　Ｓ－Ｓを伴うＤＮＡは、ＩＤＴから購入した。チオール修飾を脱保護するため、水中１００ｐＭのＤＮＡ溶液５ｐＬを、ｐＨ８．１のＰＢＳ中１００ｍＭの２－メルカプトエタノール２５ｐＬにより、室温で３０分間にわたり処理した。脱保護されたＤＮＡを精製するため、６００ｐＬのＱｉａｇｅｎヌクレオチド除去キットによるＰＮ緩衝液を、反応混合物へと添加した後、イソプロピルアルコール（３００ｐＬ）を添加した。溶液を、Ｑｉａｇｅｎヌクレオチド除去キットのシリカカラムへと適用し、キットの指示に従い洗浄した後、ｐＨ７．２のＴＥ緩衝液（１０ｍＭのトリス；１ｍＭのＥＤＴＡ）２４ｐＬで溶出させた。

【０１７３】

脱保護されたチオール修飾ＤＮＡの溶液を、ステンレス鋼片（約５ｍｍ×２．５ｍｍ）の金表面へと速やかに適用した。溶液を、加湿雰囲気中、３７℃で１６～２０時間にわたりインキュベートし、次いで、水で十分に洗浄した後、通気乾燥させた。

【０１７４】

蛍光シグナルを増幅するフィルイン反応：３’端にチオール誘導体化を伴う７５ｂｐの一本鎖ＤＮＡオリゴ（５’－ＧＣＡＴＧＣＡＴＧＣＡＴＧＣＡＴＧＣＡＴＧＣＡＴＧＣＡＴＧＣＡＴＧＣＡＴＧＣＡＴＧＣＧＣＣＴＧＴＧＧＧＣＧＡＣＴＡＡＡＴＴＣＣＧＴＴＡＡＡＧＣＣＧＧＣ／ＴｈｉｏｌＭＣ３／－３’）（配列番号２）を、金コーティングされたステンレス鋼試料の表面へと付着させた。洗浄し、乾燥させた後、ステンレス鋼試料を、０．５ｍＬの試験管に入れた。次いで、４８．５ｐＬのｄＨ２Ｏおよびチオール誘導体化ＤＮＡの３’端と相補的な１０ｐＭのプライマー１．５ｐＬを添加した。混合物を、５５℃で２分間にわたりインキュベートして、プライマーが、一本鎖ＤＮＡへとアニールすることを可能とした。次いで、混合物を室温へと戻した。

【０１７５】

次いで、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎから購入したＣｈｒｏｍａｔｉｄｅ（登録商標）Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８－５－ｄＵＴＰを使用して、フィルイン反応を実施した。以下の成分：１０ｍＭのｄＮＴＰミックス（ｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＣＴＰ）２ｐＬ、１０倍濃度のＫｌｅｎｏｗ断片緩衝液（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）７．５ｐＬ、９．５ｐＬのｄＨ２Ｏ、１ｍＭの４８８－５－ｄＵＴＰ　４ｐＬ、および２ｐＬのＫｌｅｎｏｗ断片（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を、ステップ３の混合物へと添加した。反応物を、３７℃で３０分間にわたりインキュベートした。ステンレス鋼試料をタブから取り出し、水で十分に洗浄し、通気乾燥させた。

【０１７６】

Ｃｈｒｏｍａｔｉｄｅ（登録商標）Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）で修飾されたＤＮＡの可視化：ステンレス鋼試料が乾燥したら、顕微鏡のスライドへと取り付け、緑色フィルターを使用して、蛍光顕微鏡により画像化した。ステンレス鋼上のＤＮＡ修飾エリアのエッジを局在化し、画像化したところ、ＤＮＡの、金コーティングされた表面へのコンジュゲーションが明確に示された。

【０１７７】

（実施例３）

オリゴヌクレオチドの、金属マイクロニードルのアレイ表面への結合の増強

３’チオール修飾を含有するＤＮＡオリゴマープローブの、金でコーティングされたステンレス鋼表面への付着をさらに容易にするため、ＮａＣｌ滴定を導入した。濃度を上昇させるＮａＣｌを添加することにより、上記で記載した実施例２のプロトコールを実施した。表面へとカップリングされるｓｓＤＮＡの量は、添加されるＮａＣｌの量に比例して増大し、１ＭのＮａＣｌ濃度で約１０倍の増大が観察された（図７）。金表面に結合したＤＮＡの定量化は、Ｑｕａｎｔｉ－ｉＴ　Ｇｒｅｅｎ　ｓｓＤＮＡ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して決定した。

【０１７８】
（実施例４）
診断法
黒色腫診断の誤診は、皮膚科医にとって重大な懸念である。誤診の帰結は、患者には悲惨である可能性があり、保険会社には高額な費用となる可能性があり、医師にはダメージとなる可能性があり、したがって、黒色腫の早期の検出は、極めて重要である。しかし、標準的な生検手順の侵襲的な性格は、医師に、良性の外見をした組織における生検の遂行を思いとどまらせる場合がある。図５および６は、本開示のデバイスおよび方法による黒色腫の非侵襲的診断を例示する。５０１～５０５は、６０３の表面についてより詳細に記載する。
【０１７９】
図５は、黒色腫のバイオマーカーを検出するようにデザインされたＤＮＡプローブが、所望のバイオマーカーとハイブリダイズする工程を例示する。５０１は、マイクロニードルの金表面へと付着させた、単一のＤＮＡプローブを例示する。５０１内のＤＮＡプローブは、黒色腫と関連したＲＮＡと選択的にハイブリダイズする一塩基多型を含む。実施例２で記載した通り、５０１内のＤＮＡプローブは、マイクロニードル内の金表面へと共有結合により連結した。５０５は、ＤＮＡプローブを共有結合により連結した、複数のマイクロニードルを含む本発明のデバイスの表面についての、明視野画像および蛍光視野画像を例示する。デバイスが、被験体の皮膚に接触すると、マイクロニードルは、接触する皮膚内の細胞の膜を静かに破壊する。この工程により、マイクロニードル上のプローブが、細胞内のポリヌクレオチドバイオマーカー、ペプチドバイオマーカー、およびタンパク質バイオマーカーへと露出される。マイクロニードル上のプローブを、バイオマーカーに、ｉｎ　ｓｉｔｕの生理学的条件で、指定された時間にわたりハイブリダイズ５０２させることができる、例えば、プローブは、生理学的体温（約３７℃）で約３０分間にわたりハイブリダイズさせることができる。逆転写酵素－ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）アッセイ５０３を活用して、ハイブリダイズしたＲＮＡを、ＤＮＡへと転換することができる。標準的なＰＣＲプロトコール５０４を活用して、５０３の産物を増幅することができる。
【０１８０】
図６は、本発明のデバイスによる処置を施す方法についての概観を例示する。６０１は、臨床医による被験体の皮膚の目視検査の実行を例示する。臨床医６０１は、皮膚６０２または皮膚の部分の外見が、健常であるのか、健常でないのかを決定することができる。臨床医は、本発明のデバイスで被験体の皮膚に接触し、これにより、バイオマーカーのためのプローブを、被験体の皮膚へと、非侵襲的な様式で接触させることができる。６０３は、図５でより詳細に記載したデバイス表面についての概略図である。６０４は、ハイブリダイズしたバイオマーカーを増幅するように実施されるＰＣＲアッセイを例示する。６０５は、解析の結果を被験体に差し戻す臨床医を描示する。
【０１８１】
（実施例５）
修飾ポリマーマイクロニードルアレイについてのｉｎ　ｖｉｖｏ試験
本実施例では、本出願で記載される修飾ポリマーマイクロニードルアレイを使用する、ｉｎ　ｖｉｖｏにおけるマウスアクチンの検出について記載する。ポリカーボネートマイクロニードルを、マウスアクチンのｓｓＤＮＡプローブで修飾し、また、ｓｓＤＮＡプローブとカップリングさせたマイクロニードルの試料も、ヒアルロニダーゼでコーティングした。マウス（ｎ＝４；Ａ／Ｊ、Ｓｗｉｓｓ　Ｗｅｂｓｔｅｒ）を、ｓｓＤＮＡ修飾ポリカーボネートマイクロニードルで処置した。マイクロニードルアレイを、親指の圧力を使用して、マウスの剃毛された後脚部へと適用し、約１０秒間にわたりその位置に保持した。次いで、スライドガラス上でアレイを反転させ、ニードル基部とスライドとの間の空隙を、油でシーリングし、スライドをヒートブロック上に、５０℃で３０分間にわたり置くことにより、アレイに結合したｍＲＮＡを、マイクロニードル表面上で直接、ｃＤＮＡへと逆転写させた。次いで、反応混合物を、スライドから、ＰＣＲ試験管へと移し、従来の

ＰＣＲ法を使用して増幅した。サイクリングプログラムは、以下の通りに行った：９４℃で１分間；９４℃で１５秒間、５５℃で３０秒間、６８℃で６０秒間の４０サイクル；６８℃で５分間。試料は、ゲル画像化により可視化し、濃度測定を使用して定量化した。

【０１８２】

プローブを含有するマイクロニードルから単離されたｍＲＮＡの量の著明な増大が観察された。ｓｓＤＮＡプローブを含有する試料と非修飾マイクロニードルアレイとの間の差異が約２～３倍であるのに対し、ｓｓＤＮＡプローブおよびヒアルロニダーゼの両方を含有する試料と非修飾アレイとの間の差異は約８倍であった。これは、マイクロニードルが、標的を皮膚から抽出するだけではなく、細胞外マトリックスの破断が、抽出工程を容易にする結果として、収率の増大をもたらしうることも示す。セリンプロテアーゼ、チオールプロテアーゼ、およびＭＭＰを含むがこれらに限定されないいくつかの酵素であれば、この工程において有用でありうるであろう。酵素のさらなる具体例は、パパイン、ヒアルロニダーゼ、ストレプトキナーゼ、ストレプトドルナーゼ、トリプシン、キモトリプシン、アルファ－キモトリプシン、アルファ－アミラーゼ、ＤＮアーゼ、コラゲナーゼ、およびスチラインを含むがこれらに限定されない。

【０１８３】

（実施例６）

標的ｍＲＮＡの、ホモジナイズされたヒト皮膚からの単離

本実施例では、標的ｍＲＮＡの、ホモジナイズされたヒト皮膚からの単離について記載する。モース顕微鏡手術時に切除された、がん性組織および良性組織の両方を含む余剰ヒト皮膚を、Ｓｃｒｉｐｐｓ　Ｃｌｉｎｉｃから入手した。皮膚をホモジナイズし、以下の手順を使用して、全ＲＮＡを抽出した。６．０で２５秒間にわたる設定で、ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　ＦａｓｔＰｒｅｐ－２４およびＬｙｓｉｎｇ　Ｍａｔｒｉｘ　Ｄビーズ（試験管１本当たりの組織約３０～４０ｍｇ）を使用して、皮膚を、ＲＮＡｌａｔｅｒ（商標）内でホモジナイズした。次いで、製造元の指示に従い、ＲＮＡ抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ（商標））を使用して、全ＲＮＡを、このホモジネートから単離した。ヒトベーターアクチンと相補的な配列を伴うＤＮＡプローブを、金でコーティングされたステンレス鋼マイクロニードルへとコンジュゲートさせ、ホモジナイズされた皮膚から単離されたＲＮＡ溶液に入れ、室温または３７℃で、ある時間にわたりインキュベートした。ステンレス鋼のストリップを、溶液から単離し、結合したｍＲＮＡを、ｃＤＮＡへと逆転写させ、次いで、ｑＲＴ－ＰＣＲを使用して、これを増幅し、解析した。結果として、ベーターアクチンプローブへとカップリングさせ、その後に適切なベーターアクチンプローブを使用して増幅されたマイクロニードルだけが、測定可能量の標的をもたらした（図８）。本実施例では、非特異的なＤＮＡ配列を、マイクロニードル表面へとコンジュゲートさせ；アクチン以外の標的に対して、ＢＭＰ－４：Ｔａｑｍａｎプローブを使用し；Ａｃｔｂ－ヒト－１：ベーターアクチン配列を、マイクロニードルの表面へとコンジュゲートさせた。

【０１８４】

（実施例７）

マイクロニードルアレイを使用する、マウス皮膚ｍＲＮＡライブラリーからのｍＲＮＡの検出

これらの実験では、標的ｍＲＮＡを、マウス皮膚ｍＲＮＡライブラリー（Ｚｙａｇｅｎ（商標））から単離した。プール内のｍＲＮＡの総濃度は、２５０μｇ／ｍＬであった。次いで、プローブであるｓｓＤＮＡをカップリングさせた、金コーティングされたステンレス鋼マイクロニードルアレイを、ｍＲＮＡライブラリー（２０μＬの水中に５μＬ）へと添加し、３７℃で約１０分間にわたりインキュベートした。次いで、アレイを静かに洗浄し、短時間にわたり通気乾燥させた。次いで、逆転写酵素反応ミックス（１０倍濃度の逆転写酵素緩衝液３μＬ、２５ｍＭの$MgCl_2$　６μＬ、０．１ＭのＤＴＴ　３μＬ、１．５μＬのＲＮａｓｅ　ＯＵＴ（商標）、１３μＬのＤＥＰＣ水、１０ｍＭのｄＮＴＰミックス２μＬ）を、マイクロニードルアレイを含有する試験管へと添加し、４２℃で２分間にわたりインキュベートした後、１．５μＬのＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔＩＩ（商標）

逆転写酵素を添加することにより、ｃＤＮＡの合成を実施した。反応は、以下のプログラムによりサイクリングさせた：４２℃で５０分間、７０℃で１５分間であり、次いで、氷上で約１５分間。次いで、ＲＮａｓｅ　Ｈを、各反応物（１．５μＬ）へと添加し、反応物を３７℃で２０分間にわたりインキュベートした。次いで、これに続き、２０倍濃度のＴａｑＭａｎ（商標）アッセイプライマー（１．５μＬ）、および２倍濃度のＴａｑＭａｎ（商標）遺伝子発現ミックス（１５μＬ）を使用して、ＴａｑＭａｎ（商標）ＰＣＲ増幅を行った。反応物の総容量は、３０μＬであった。４サイクルの後、５μＬの溶液を除去し、製造元の指示に従い実施される、ＴａｑＭａｎ（商標）ｑＲＴ－ＰＣＲ（４０サイクル）のための鋳型として使用した。

【０１８５】

前出の発明について、明確な理解のための例示および例を目的として、ある程度詳細に記載してきたが、当業者には、付属の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱しない限りにおいて、前出の発明に対するある種の変化および改変を行いうることが、本発明の教示に照らしてたやすく明らかとなろう。

【０１８６】

本明細書で引用された全ての刊行物、データベース、ＧｅｎＢａｎｋ配列、特許、および特許出願は、各々が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に指し示された場合と同様に、参照により本明細書に組み込まれる。

【図１】

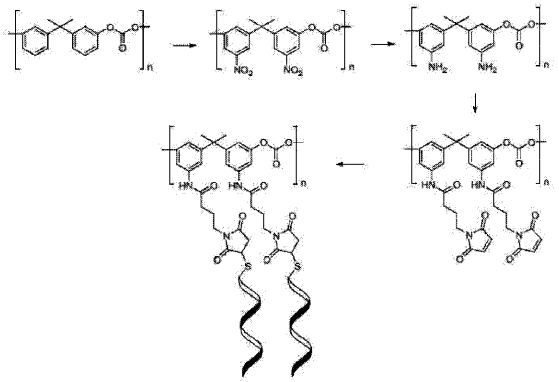


FIGURE 1

【図２】

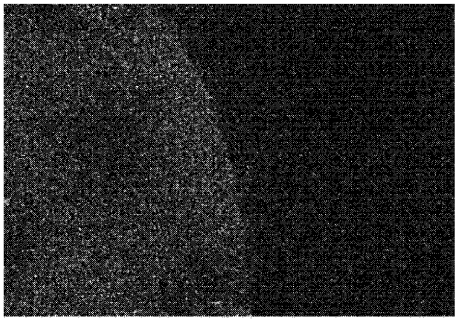


FIGURE 2

【図４】

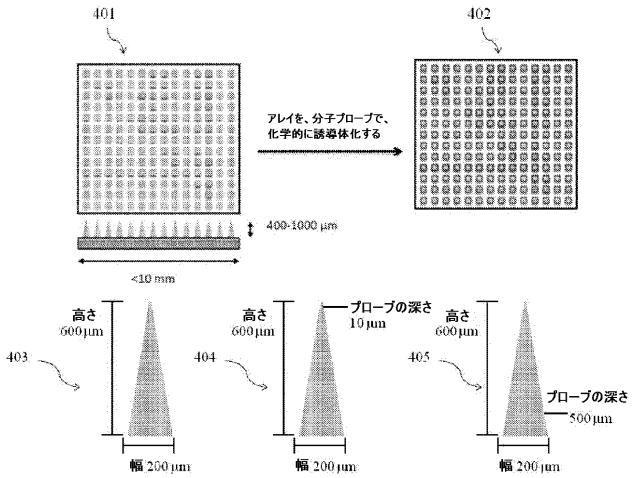
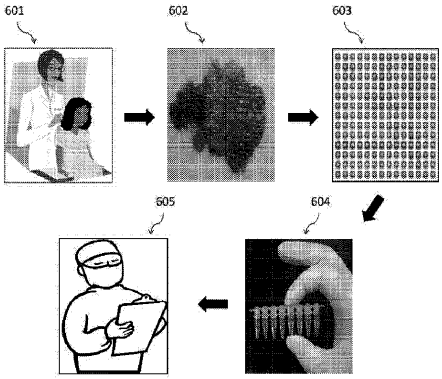


FIGURE 4



【図７】

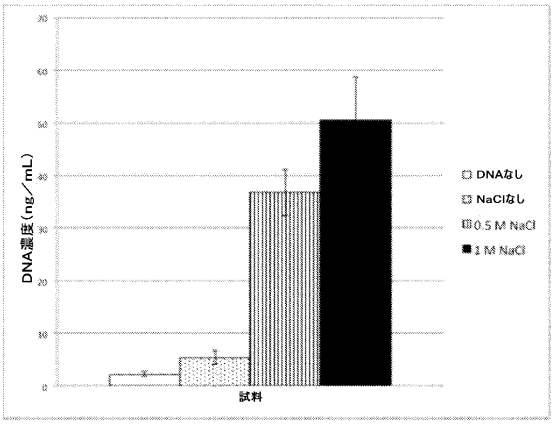


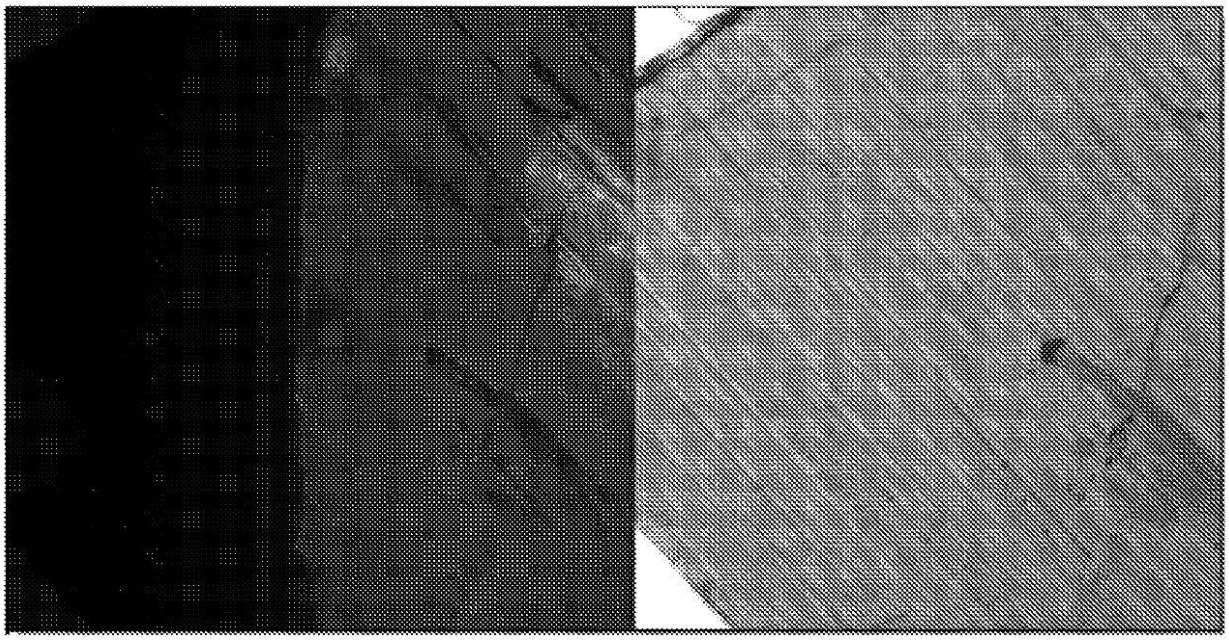
FIGURE 7

【図８】

MN DNA	TaqMan プローブ	C(t)
P2s	BMP-4	-
P2s	ベーターアクチン	-
Actb−ヒト−1	BMP-4	-
Actb−ヒト−1	ベーターアクチン	40.51 +/- 0.92

FIGURE 8

【図３】



パネルA　　パネルB

FIGURE 3

【図５】

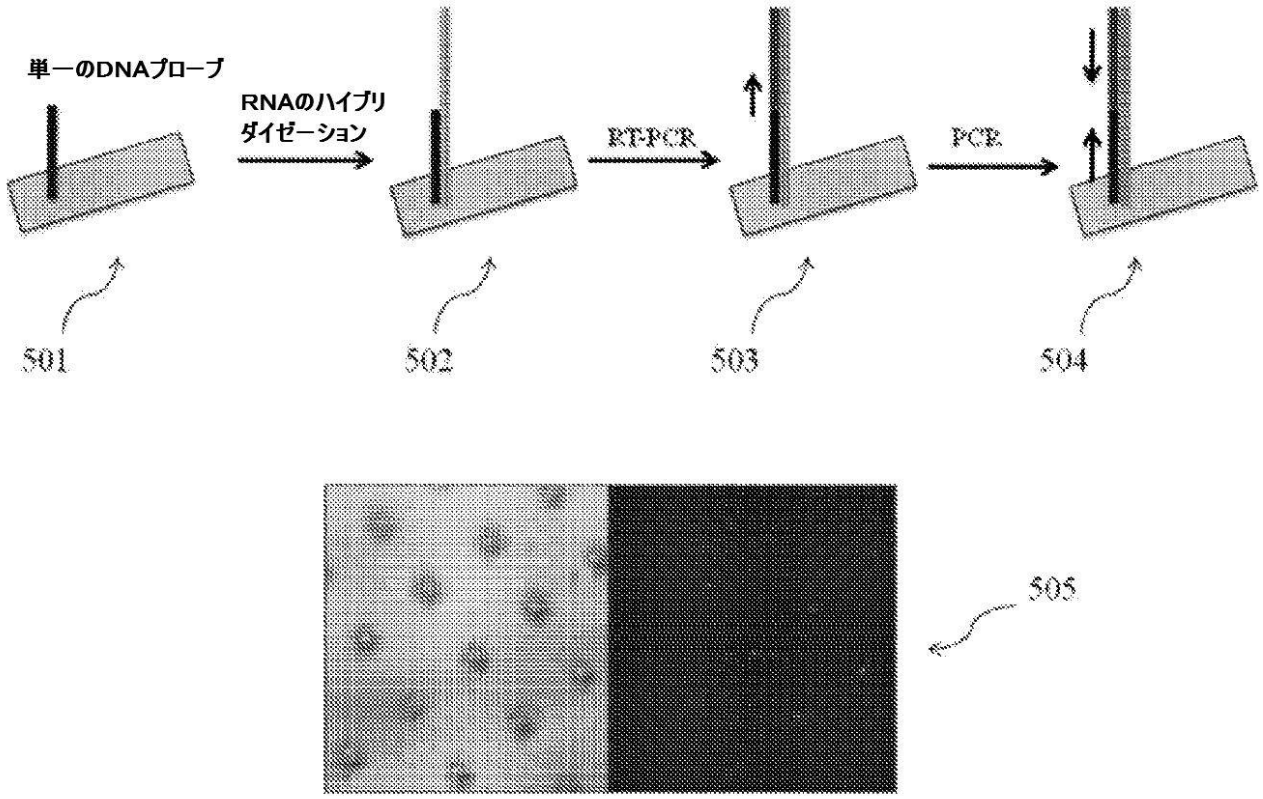


FIGURE 5

【手続補正書】
【提出日】平成27年8月13日(2015.8.13)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
2016509471000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/075187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61M 37/00 (2014.01)
USPC - 435/287.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8) - A61M 37/00; B05D 5/00; B29C 59/022 (2014.01)
USPC - 435/287.1; 435/6.1; 427/256;

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
CPC - G01N 33/54366; B01J 2219/00504; B01J 2219/00637 (2014.02)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatBase, Google Patents, Google Scholar, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011/160069 A1 (CORRIE et al) 30 June 2011 (30.06.2011) entire document	1-15, 17-34, 36-51, 53-67, 69-74
Y		16, 35, 52, 68, 147, 148
Y	HOJFELDT et al. 'A Cleavable Amino-Thiol Linker for Reversible Linking of Amines to DNA.' J. Org. Chem. Vol. 71, p. 9556-9559, 2006. entire document	16, 35, 52, 68
Y	US 2005/178760 A1 (CHANG et al) 18 August 2005 (18.08.2005) entire document	147, 148
A	US 2012/0034598 A1 (HOLMES et al) 09 February 2012 (09.02.2012) entire document	1-74, 147, 148

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 April 2014	09 MAY 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/075187

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Extra Sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-74, 147, and 148

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/075187

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I: claims 1-74, 147, and 148 are drawn to a device comprising a plurality of microneedles and a kit comprising the same.

Group II: claims 75-128 and 132-145 and claim 146 (in part) are drawn to a method for detecting one or more biomarkers from an in situ tissue or biological sample in a subject and a composition comrpsing the same.

Group III: claims 129-131 and claim 146 (in part) are drawn to a method of preparing a microneedle device.

The inventions listed in Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of Group I, a device comprising a plurality of microneedles and a kit comprising the same, are not present in Groups II and III; the special technical features of Group II, a method for detecting one or more biomarkers from an in situ tissue or biological sample in a subject and a composition comrpsing the same, are not present in Groups I and III; and the special technical features of Group III, a method of preparing a microneedle device, are not present in Groups I and II;

Additionally, Groups I-III share the technical features of a device comprising a plurality of microneedles, wherein the plurality of microneedles comprise at least one microneedle that is covalently attached to at least one probe specific for a biomarker, and wherein the probe comprises a sensor that emits an optical signal when the probe detects the biomarker. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, US 2012/0034598 A1 to Holmes et al. discloses a device comprising a plurality of microneedles (the fluidic device comprises at least one microneedle which punctures the skin, Para. [0036]), wherein the plurality of microneedles comprise at least one microneedle that is covalently attached to at least one probe specific for a biomarker (In embodiments with multiple reaction sites on a fluidic device, each reaction site may be immobilized with a reactant different from a reactant on a different reaction site. In a fluidic device with, for example, three reaction sites, there may be three different probes, each bound to a different reaction site to bind to three different analytes of interest in the sample, Para. [0064]; there are many ways of immobilizing various reactants onto a support where reaction can take place. The immobilization may be covalent or noncovalent, via a linker moiety, or tethering them to an immobilized moiety, Para. [0062]), and wherein the probe comprises a sensor that emits an optical signal when the probe detects the biomarker (a sample of bodily fluid suspected to contain said analyte to react with said immunoassay reagents contained within said assay immunoassay assembly to yield a detectable signal indicative of the presence of said analyte in said bodily fluid, Para. [0100]; detection proceeds by any of a variety of known methods, including spectrophotometric, Para. [0104]);; and contacting a microneedle device with the skin or eye tissue of the subject (the fluidic device comprises at least one microneedle which punctures the skin, Para. [0036]).

The inventions listed in Groups I-III therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 15/09	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/68	Ａ
		Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＥＦＬＯＮ

(72)発明者 マフムード, タヒル エー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０１０, バーリンゲーム, バルボア アベニュー １３２４
(72)発明者 ディッカーソン, トビン ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２１２１, サンディエゴ, ペイナード ウェイ ６４９５
(72)発明者 マフムード, ナディル エー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４１０９, サンフランシスコ, カリフォルニア ストリート １６３０, アパートメント ６０６
(72)発明者 チャペック, ペテル
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２１３０, サンディエゴ, マーキュリオ ストリート ４５３２

Ｆターム(参考) 4B024 AA12 BA80 CA01 CA09 HA12
4B029 AA07 AA09 AA21 AA23 BB11 BB20 CC01 CC02 FA12 FA15
GA08 GB05 GB10 HA01 HA10
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ42 QQ52 QQ58 QR08 QR32 QR55 QR62
QS25 QS28 QS34 QX02