

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6611794号
(P6611794)

(45) 発行日 令和1年11月27日(2019.11.27)

(24) 登録日 令和1年11月8日(2019.11.8)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 M	1/26	(2006.01)	C 1 2 M 1/26
C 1 2 Q	1/24	(2006.01)	C 1 2 Q 1/24
G O 1 N	33/48	(2006.01)	G O 1 N 33/48 B
G O 1 N	1/28	(2006.01)	G O 1 N 1/28 J

請求項の数 26 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2017-515281 (P2017-515281)	(73) 特許権者	317002548
(86) (22) 出願日	平成27年6月1日(2015.6.1)		デビオファーム インターナショナル ソ
(65) 公表番号	特表2017-522899 (P2017-522899A)		シエテ アノニム
(43) 公表日	平成29年8月17日(2017.8.17)		スイス国 シーエイチー1006 ローザ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2015/054150		ンヌ シュマン メシドール 5-7 フ
(87) 国際公開番号	W02015/186049		ォルム アブレドゥマン
(87) 国際公開日	平成27年12月10日(2015.12.10)	(74) 代理人	110000796
審査請求日	平成30年4月13日(2018.4.13)		特許業務法人三枝国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	00838/14	(72) 発明者	リダ アマール
(32) 優先日	平成26年6月1日(2014.6.1)		スイス国 1022 ローザンヌ ルート
(33) 優先権主張国・地域又は機関	スイス(CH)	(72) 発明者	フェラーリ セレーネ
			スイス国 シーエイチー1006 ローザ
			ンヌ アヴニユ モン-ロワジュール 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サンプルの採集及び処理用のデバイス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

デバイスの容器に投入した場合に、標的粒子又は分子が捕捉された重合フィブリンペレット(9)を形成することが可能なフィブリノゲン含有液体サンプルから標的粒子又は分子を分離及び濃縮するデバイスであって、該デバイスが前記サンプルを採集する容器(1)を備え、

該容器が第1の上端部と、第2の下端部と、前記サンプルを収容するリザーバ部分(5)を規定する少なくとも1つの内壁とを備え、

該リザーバ部分が、標的粒子又は分子が捕捉された前記重合フィブリンペレット(9)を、前記サンプルを前記容器(1)に添加することで該重合フィブリンペレット(9)が形成された後に局所的に引っ掛けるように構成された少なくとも1つのアンカー要素(4)を備え、

前記容器(1)が前記リザーバ部分(5)へと伸びる細長いピン要素(3)を備え、前記アンカー要素(4)は前記ピン要素(3)の端部又はその近くに位置し、

前記アンカー要素(4)が、その周辺に前記フィブリン重合フィブリンペレットが局所的に付着する局所表面コーティングを備える、デバイス。

【請求項2】

前記容器(1)の容量が0.1ml~20mlである、請求項1に記載のデバイス。

【請求項3】

前記容器(1)にトロンピン又はトロンピン様酵素を含む、請求項1に記載のデバイス

。

【請求項 4】

前記容器(1)にフィブリノゲンを含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のデバイス

。

【請求項 5】

前記トロンピン及び/又はフィブリノゲンが凍結乾燥形態である、請求項 3 又は 4 に記載のデバイス。

【請求項 6】

前記容器(1)の前記第 1 の上端部が、前記リザーバ部分(5)へと伸びる細長いピン要素(3)を備えるクロージャキャップ(2)により閉鎖される開放端部であり、前記アンカー要素(4)が前記ピン要素(3)の端部又はその近くに位置する、請求項 1 に記載のデバイス。

10

【請求項 7】

前記容器(1)の前記第 2 の下端部が閉鎖されており、前記リザーバ部分(5)へと伸びる細長いピン要素(3)を備え、前記アンカー要素(4)が前記ピン要素(3)の端部又はその近くに位置する、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 8】

前記アンカー要素(4)が、その周辺にフィブリン重合フィブリンペレットが局所的に捕捉されるフックの形状を形成する、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 9】

前記表面コーティングが疎水性である、請求項 1 に記載のデバイス。

20

【請求項 10】

前記標的分子又は粒子が細菌、ウイルス、酵母、細胞、タンパク質、ペプチド又は核酸を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 11】

請求項 1 に記載のデバイスを用いて標的粒子又は分子をフィブリノゲン含有サンプルから分離及び濃縮する方法であって、

(a) 前記サンプルを前記デバイスの容器(1)に添加する工程と、

(b) 前記サンプル内のフィブリノゲンを少なくとも部分的にフィブリンへと変換し、それにより前記標的分子又は粒子を捕捉するフィブリン網を形成する工程と、

30

(c) 形成された工程(b)のフィブリン網を前記デバイスのアンカー要素(4)の周辺に引っ掛けられた小さなペレットまで退縮させる工程と、

(d) 工程(b)の重合フィブリンペレットを周囲のサンプル媒体から分離する工程と、

、

を含む、方法。

【請求項 12】

分離工程(d)が、前記アンカー要素(4)を有するクロージャキャップ(2)を前記容器(1)から取り外すことによって達成される、請求項 6 に記載のデバイスを使用する請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

分離工程(d)が、周囲のサンプルを前記容器(1)からデカントすることによって達成される、請求項 7 に記載のデバイスを使用する請求項 11 に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記重合フィブリンペレットを該フィブリンペレットの溶解を可能にする液体媒体に再懸濁し、それにより前記標的分子又は粒子を回収する工程(e)を更に含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

回収工程(e)が、前記クロージャキャップ(2)を、再懸濁液体媒体(7)を含有する再懸濁容器(6)に浸漬することによって達成される、請求項 14 又は 12 に記載の方法。

50

【請求項 16】

回収工程 (e) が、再懸濁液体媒体 (7) を前記容器 (1) に添加することによって達成される、請求項 14 又は 13 に記載の方法。

【請求項 17】

前記フィブリンペレットのサイズが最大でも初期サンプル容量の 1 / 10 である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 18】

工程 (e) の前記再懸濁液体媒体の容量が最大でも初期サンプル容量の 1 / 10 である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 19】

前記標的分子又は粒子が細菌、ウイルス、酵母、細胞、タンパク質、ペプチド又は核酸を含む、請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記サンプル内のフィブリノゲンの濃度が 0 . 1 mg / ml ~ 100 mg / ml である請求項 11 に記載の方法。

【請求項 21】

前記重合フィブリンペレットが、前記フィブリノゲン含有サンプルがトロンビン又はトロンビン様酵素に曝露されることで前記容器 (1) 内に形成される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 22】

前記トロンビン又はトロンビン様酵素が前記容器 (1) 内に初めから含まれている、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記トロンビン又はトロンビン様酵素がサンプル採集後に前記容器 (1) に添加される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

前記フィブリノゲン含有サンプル内のフィブリノゲンが該サンプルに固有のものである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 25】

フィブリノゲンを含まないサンプルを、フィブリノゲンを初めから含む前記容器 (1) に投入することでフィブリノゲン含有サンプルが形成される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 26】

前記トロンビン及び / 又はフィブリノゲンが前記容器 (1) に凍結乾燥形態で含まれる、請求項 22 又は 25 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は液体サンプルの採集、特に液体生体サンプルの採集、及びサンプル中に存在し得る標的分子又は粒子を診断又は特性化する目的での処理のためのデバイスに関する。特に本発明は、サンプルからの標的分子又は粒子の効果的な分離及び濃縮を可能にするサンプル調製に好適なデバイスに関する。

【背景技術】

【0002】

バイオアッセイでは、標的分子 (複数の場合もある) 、粒子 (複数の場合もある) 又は分析物 (複数の場合もある) を多様なサンプルから抽出、濃縮及び精製する能力 (すなわちサンプル調製) が重要な工程であり、効果的な標的の検出及び分析に必須の工程として課題となっている。サンプル調製工程は検出限界、再現性、及び上記粒子 (複数の場合もある) 又は分析物 (複数の場合もある) の他の化合物への干渉という点でバイオアッセイの主な律速工程である。典型的な既存のサンプル調製手順は、長い遠心分離期間を含む長

10

20

30

40

50

時間の手作業による又は複雑なロボットによるピペット操作工程を伴う。かかる手順は緩慢で高コストであり、労力を要するだけでなく、実験室スタッフへの健康リスクを示し、高コストの有害化学物質の廃棄が必要となる可能性もある。さらに、特に新世代の分子標的に対するサンプル調製のワークフローはいっそう複雑なものとなっており、いくつかの解決策が提案されている。現在、サンプル調製の個々の異なる解決策が各々のサンプルタイプ及び標的に対して使用されている。実行が容易であり、自動化及び試薬組込みに適合し、最小限の操作時間を有する複数のサンプル及び標的に適用可能な標準的なサンプル調製ワークフローの解決策の提供は、依然としてライフサイエンス及び診断環境において未解決の要件である。さらに、サンプルワークフロー方法論の標準化は主に規制診断環境において大きな要件となっている。

10

【0003】

現在、アッセイ処理には2つの方法論がある。(1)分析物間において溶液中、分子レベルで行われる均質アッセイ。これらのアッセイにおける反応速度は液相中で行われるため急速であり、それらの実施は比較的単純である。しかしながら、それらの低い特異性及び媒体干渉に対する強い感受性が大きな制限となり、更なるサンプル処理工程なしに使用することは不可能である。(2)不均質アッセイは、標的分析物に「選択的に」結合し、分離することで分析物を溶液中で検出する分子認識基(複数の場合もある)を有する固体表面を含有する。これは優れた特異性をもたらすが、分析物と固体表面との遅い反応速度、更には固体表面への非特異的結合の高い可能性が代償として生じる。単一プロセスにおける両方のタイプのアッセイ間の調整は、より高感度の正確で迅速な診断ツールを設計する可能性を開く。実際に、分子間相互作用及び分子レベルでの認識の特異性の制御、更には固体表面に対して同時に行われる分離の制御を可能にすることで、バイオアッセイにおける新たな見通しが開かれる。

20

【0004】

国際公開第2012035508号は、標的をサンプルから捕捉及び分離する手段として種々の親和性基をコーティングした磁性ビーズ又はマイクロウェル等の固体表面を使用する現行の技術水準のアプローチの代わりに、標的分子又は粒子を実質的にあらゆる種類のサンプルから分離するためのビヒクルとしてフィブリノゲンを使用する方法を開示している。国際公開第2012035508号の方法論では、標的分離はフィブリノゲンビヒクルをフィブリンへと変換し、小さなペレットまで退縮し(retract)、サンプルから分離するフィブリン網中でのそれらの凝集をもたらすことによって達成される。懸濁液中の自由分子間の相互作用に基づく(すなわち均質条件)、標的とフィブリノゲンビヒクルとの反応は非常に急速かつ効率的である。しかしながら、国際公開第2012035508号に開示の方法は、依然として分離プロセス中のフィブリンペレットの取扱いに関する制限という欠点がある。特に、国際公開第2012035508号はフィブリンペレットの物理的な取扱いに関連する問題に対処していない。

30

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

このため、国際公開第2012035508号に開示の方法により形成されるフィブリンペレットの容易な自動化された取扱いを可能にし、既存の固体表面ベースの方法論の複雑さを克服する新たな均質サンプル処理アプローチを提供する可能性を開く新たなデバイス及び方法が依然として必要とされている。

40

【課題を解決するための手段】**【0006】**

本発明は、デバイスの容器に投入した場合に標的粒子又は分子が捕捉された重合フィブリンペレットを形成することが可能なフィブリノゲン含有液体サンプルから標的粒子又は分子を分離及び濃縮するデバイスであって、サンプルを採集する容器と、好ましくはクロージャとを備える、デバイスを開示する。容器は第1の上端部と、第2の下端部と、サンプルを収容するリザーバ部分を規定する少なくとも1つの内壁とを備え、該リザーバ部分

50

は、上記サンプルを容器に添加することで形成される重合フィブリンペレットを局所的に引っ掛けるように構成された少なくとも1つのアンカー要素を備え、標的粒子又は分子は重合フィブリンペレット内に捕捉される。

【0007】

本発明によるデバイス内の標的を捕捉する重合フィブリンペレットは、国際公開第2012035508号（その内容が引用することにより本明細書の一部をなす）に記載の方法によって実現される。この点から、本発明は、標的粒子又は分子をフィブリノゲン含有液体サンプルから分離及び濃縮するデバイスであって、サンプルを採集する容器と、好ましくはクロージャとを備える、デバイスに関する。容器は第1の上端部と、第2の下端部と、上記サンプルを収容するリザーバ部分を規定する少なくとも1つの内壁とを備え、該リザーバは上記サンプルを容器に添加することで形成される重合フィブリンペレットを局所的に引っ掛けるように構成された少なくとも1つのアンカー要素を備える。標的粒子又は分子は、サンプル中に含まれるフィブリノゲンがフィブリンへと少なくとも部分的に変換されることで形成される重合フィブリンペレット内に捕捉される。

10

【0008】

本発明は、標的粒子又は分子をフィブリノゲン含有サンプルから分離及び濃縮する方法であって、

- (a) 上記サンプルをデバイスの容器に添加する工程と、
- (b) サンプル内のフィブリノゲンを少なくとも部分的にフィブリンへと変換し、それにより標的分子又は粒子を捕捉するフィブリン網を形成する工程と、
- (c) 形成された工程(b)のフィブリン網をデバイスのアンカー要素の周辺に引っ掛けられた小さなペレットまで退縮させる工程と、
- (d) 工程(b)の重合フィブリンペレットを周囲のサンプル媒体から分離する工程と、

20

を操作中に含む、方法も開示する。

【0009】

本発明のデバイスは、使用時に標的粒子又は分子が捕捉及び濃縮された小さなフィブリンペレットの形成をもたらす。そのように形成されたフィブリンペレットはデバイスの容器内に位置するアンカー要素によって局所的に捕捉され、周囲の液体媒体からのその容易な分離が可能となる。

30

【0010】

さらに、標的濃縮率はそのように形成されるフィブリンペレットのサイズによって決まる。したがって、デバイスの構成及び設計は、最大でも初期サンプルサイズの1/3のサイズを有する血餅の形成をもたらすようなものであり、血餅サイズは最大でも初期サンプル容量の1/10であるのが好ましい。さらに、本発明の好ましい実施の形態では、血餅は退縮して、初期サンプル容量の1/50~1/1000の値に達し得るサイズを有する小さなペレットを更に形成する。

【0011】

したがって、本発明は、任意の標的分子又は粒子を実質的にあらゆる種類のサンプルから分離するためにフィブリノゲンをビヒクル分子として使用するデバイスを開示する。分離機構は、(1) サンプルをトロンビン又はトロンビン様酵素に曝すことで標的をフィブリン網内に捕捉することによるサイズ分離、(2) 懸濁液中のフィブリノゲンへの標的粒子又は分子の親和性捕捉、及びサンプルをトロンビン又はトロンビン様酵素に曝すことによるフィブリン網中に捕捉された標的の分離という2つの手順を含む。後者の場合、親和性捕捉はフィブリノゲン分子に対する標的の固有親和性によるものであり得る。別の実施の形態では、親和性捕捉はフィブリン/フィブリノゲン結合部分及び標的捕捉部分から構成される分子によって実現され得る。

40

【0012】

本発明による方法は、そのように生成したフィブリンペレットを溶解させて標的を回収する工程を更に含んでもよい。この溶解工程は、フィブリンペレット濃縮物を適切な

50

緩衝溶液に再懸濁することで達成される。調節緩衝液の典型例は、プラスミンのような線維素溶解物質及びノ又はプロテイナーゼK、プロナーゼ及びメタロプロテイナーゼのようなタンパク質分解物質と組み合わせた低張緩衝液、緩衝液を含有する洗浄剤である。かかる溶解工程は、プラスミノゲン又はプラスミノゲン活性化因子のような血餅溶解促進物質を更に添加することによって改善することができる。好ましい実施の形態では、溶解工程は核酸分解酵素の使用を更に含み得る。

【0013】

フィブリン網内へのサイズ捕捉及び特異親和性結合反応は、生体サンプル中の広範な標的物質の決定又は単離に用いることができる。標的物質の例は細胞、細胞成分、細胞垂集団（真核及び原核の両方）、細菌、ウイルス、寄生生物、抗原、特異抗体、毒素、タンパク質、核酸配列等である。

10

【0014】

本発明の主な態様は、独立請求項1に記載される、標的分子又は粒子をフィブリンノゲン含有サンプルから分離するデバイスに関する。

【0015】

本発明の別の主な態様は、請求項15に記載される、標的分子又は粒子をサンプルから分離する方法に関する。

【0016】

種々の実施の形態が従属請求項に提示される。請求項の主題及び特許請求される全ての組合せは引用することにより本明細書の一部をなし、請求項が放棄されたとしても本開示の一部であり続ける。

20

【0017】

本発明の目的及び特徴は特殊性（particularity）をもって添付の特許請求の範囲に記載される。本発明は、更なる目的及び利点を伴うその機構及び操作方法の両方に関して、添付の図面と併せて以下の記載を参照することにより最も理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】本発明によるデバイスの好ましい実施形態の概略図である。

【図2】（a）（b）はデバイスの操作の概略図である。

【図3】標的粒子又は分子の分離及び濃縮を示す図である。

30

【図4】標的の回収及び懸濁のための二次容器を示す図である。

【図5】3つの異なるタイプのアンカー要素を示す図である。

【図6】全体操作の図である。

【図7】（a）、（b）及び（c）は3つの異なる状態でのデバイスの更なる実施形態を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

図1はサンプルを採集する容器1と、容器の第1の開放上面に位置する閉鎖キャップ2とを備える、標的粒子又は分子を液体サンプルから分離及び濃縮するデバイスの好ましい実施形態の概略図である。容器は第2の閉鎖下端部と、サンプルを収容するリザーバ部分5を規定する少なくとも1つの内壁とを更に備える。閉鎖キャップ2は、デバイスのリザーバ5内のサンプルに浸漬され、その下端にアンカー要素4を備える細長い下方に突出したピン要素3を備える。

40

【0020】

図2は、標的粒子又は分子をサンプルから分離及び濃縮するためのデバイス操作の概略図である。図2（a）に示されるように、本発明によるデバイスは、分離又は濃縮すべき標的粒子又は分子8を含み得る液体サンプルを収容するように設計される。サンプルは固有成分としてフィブリンノゲンを含んでいてもよい（例えば血液）。フィブリンノゲンを含まないサンプルを処理する場合、容器1はフィブリンノゲンを含まないサンプルと混合される添加剤としてフィブリンノゲンを含む必要がある。図2（b）は、サンプルをデバイスに添

50

加すると、サンプルがトロンビン又はトロンビン様酵素に曝されることで液体内のフィブリノゲン（サンプルに固有であるか又は固有でない）が少なくとも部分的にフィブリンへと変換され、それにより標的分子又は粒子を捕捉するフィブリン網が形成されることを示す。そのように形成されたフィブリン網は退縮して、アンカー要素 4 の周辺に引っ掛けられた又は付着した重合フィブリンペレット 9 を形成する。

【 0 0 2 1 】

図 3 は、標的粒子又は分子をサンプルから分離及び濃縮するためのデバイス操作の概略図である。フィブリン網がアンカー要素 4 の周辺に引っ掛けられた重合フィブリンペレット 9 まで退縮した後、クロージャキャップ 2 をアンカー要素 4 及び引っ掛けられた重合フィブリンペレット 9 とともに容器 1 から取り外すことにより、重合フィブリンペレット 9 が捕捉された標的とともにサンプル媒体から分離される。後続の工程では、フィブリンペレットを溶解することにより標的分子又は粒子 8 の回収を可能にする再懸濁液体媒体 7 を含有する二次容器 6 にクロージャキャップ 2 を浸漬することができる。二次容器 6 は好ましくは本発明によるデバイスよりも小さい。

10

【 0 0 2 2 】

図 4 は、再懸濁液体を含有するより小さな二次容器 6 を備える標的回収及び再懸濁用デバイスの好ましい実施形態の概略図である。容器 6 は、本発明によるデバイスのアンカー要素 4 を備えるクロージャキャップ 2 等のキャップを収容するように適合する第 1 の開放上端部を備える。容器 6 は第 2 の閉鎖下端部と、フィブリンペレットを溶解することにより標的 8 の回収を可能にする再懸濁液体 7 を含有するリザーバ部分を規定する少なくとも 1 つの内壁とを更に備える。標的回収は、クロージャキャップ 2 のアンカー要素 4 を回収容器 6 に浸漬することによって達成される。

20

【 0 0 2 3 】

図 5 はアンカー要素 4 の種々の実施形態、すなわち（ 4 a ）リング形状、（ 4 b ）化学コーティング又は生物コーティング、及び（ 4 c ）不規則なフック形状を示す。

【 0 0 2 4 】

図 6 は、本発明によるデバイスを用いて標的粒子又は分子をフィブリノゲン含有サンプルから分離及び濃縮する方法の全体操作の概略図である。工程 1 ではサンプルをデバイスの容器に添加する。工程 2 ではフィブリン網形成反応が起こる。工程 3 では、フィブリンペレットがチューブキャップに嵌合した疎水性ピン（アンカー要素）の周辺に退縮する。工程 4 はペレット分離段階である。工程 5 ではペレットを少量の再懸濁溶液に浸漬する。最後に、工程 6 で標的粒子又は分子が回収される。

30

【 0 0 2 5 】

図 7 は、図 1 のデバイスとは異なり、リザーバ部分 5 に浸漬されるとともに容器 1 の閉鎖下端部に位置する上方に伸びた細長いピン要素 3 を備える、標的粒子又は分子を液体サンプルから分離及び濃縮するデバイスの好ましい実施形態の概略図である。細長いピン要素 3 は、その上端にアンカー要素 4 を更に備える。操作時に、重合フィブリンペレット 9 を形成する退縮したフィブリン網がアンカー要素 4 の周辺に引っ掛けられる又は付着する。そのように形成されたフィブリンペレットは、その後周囲の液体媒体をデカントすることによって分離することができる。標的回収は、フィブリンペレットを溶解することにより標的分子又は粒子 8 の回収を可能にするフィブリンペレット溶解緩衝液 7 を同じ容器 1 に添加することによって達成される。

40

【 0 0 2 6 】

図 1 に例示されるように、標的粒子又は分子をフィブリノゲン含有液体サンプルから分離及び濃縮するための本発明によるデバイスは、サンプルを採集する容器 1 と、クロージャ 2 とを備える。容器 1 は第 1 の上端部と、第 2 の下端部と、サンプルを収容するリザーバ部分 5 を規定する少なくとも 1 つの内壁とを備え、リザーバ部分はサンプルを容器に添加することで形成される重合フィブリンペレット 9 を局所的に引っ掛ける少なくとも 1 つのアンカー要素 4 を備え、標的粒子又は分子は重合フィブリンペレット内に捕捉される。

【 0 0 2 7 】

50

本発明はまた、生体サンプルを採集及び処理する方法であって、トロンピンと、潜在的にフィブリノゲンとを周囲の複合液体媒体からの標的分子又は粒子の効果的な分離をもたらす適切な濃度で含む容器を準備することを含む、方法を包含する。この方法は、重合物質内に高度に濃縮され、好ましくは最大でも初期サンプル容量の1/10の容量を有する標的(複数の場合もある)を回収することを更に可能にする。さらに、開示の方法の利点は初期サンプル容量の1/100~1/1000の濃縮率に達する能力である。そのように濃縮された標的(複数の場合もある)は、その後更なる精製工程(複数の場合もある)により非常に容易に処理するか、及び/又は現行の技術水準の方法論を用いて直接分析することができる。

【0028】

開示のデバイスの主な利点の1つは、重合フィブリンペレットを局所的に引っ掛ける、付着する又はその核となるアンカー要素4をデバイスに組み込むことにより、標的粒子又は分子の自動の容易な分離が可能となることである。実際には、アンカー要素4は図2に示されるように、その周辺にフィブリンペレットが小さなペレットまで形成及び退縮される「核形成」点を何らかの形で構成する。好ましい実施形態では、キャップの閉鎖時にリザーバ部分5に含まれる液体サンプルに浸漬される細長いピン要素3を備えるクロージャキャップ2にアンカー要素4を組み込む。この構成では、アンカー要素4はピン要素3の端部又はその近くに位置する。

【0029】

キャップへのアンカー要素4の組込みは、アンカー要素4の周辺に引っ掛けられた重合フィブリンペレット9の容易な分離が可能となるという利点を有する。図3に示されるように、重合フィブリンペレット9が引っ掛けられたアンカー要素4を有するクロージャキャップ2を容器1から取り外すことができ、それにより標的が捕捉された濃縮重合フィブリンペレット9の初期サンプル媒体からの分離が達成される。クロージャキャップ2はその後、図4に示されるように、標的回収のための再懸濁液体媒体7を含有するより小さな容器6に差し込むことができる。

【0030】

本発明をアンカー要素4がクロージャキャップに組み込まれた好ましい実施形態によって例示したが、例えばリザーバ部分の壁面又は底部側に組み込まれる場合のように(図7に示される)、実際にはアンカー要素がデバイスの容器1の一部であってもよい。この場合、分離プロセスはフィブリンペレットがアンカー要素4に付着した(又は引っ掛けられた)ままでデバイスの容器1からサンプルをデカントすることによって達成される。標的回収は、フィブリンペレットを溶解することにより標的分子又は粒子8の回収を可能にするフィブリンペレット溶解緩衝液7を同じ容器1に添加することによって達成される(図7cに示される)。

【0031】

本発明によるアンカー要素は、図5に示されるような不規則又は規則的な形状を有する任意の局所部品である。好ましい実施形態では、アンカー要素はフィブリンペレットの局所付着を可能にする局所表面コーティングであってもよい。かかるコーティングの非限定的な例としては、化学コーティング(例えば疎水性コーティング)及び生物コーティング(例えばトロンピン、凝固因子XIII、細菌フィブリノゲン結合タンパク質及び組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)等のフィブリノゲン/フィブリン結合分子)が挙げられる。

【0032】

本明細書に開示のデバイスは、試験管及び遠心分離管等の管;採集バッグ等の閉鎖系サンプル採集デバイス;シリンジ、特にプレフィルドシリンジ;カテーテル;マイクロウェル及び他のマルチウェルプレート;アレイ;チューブ;フラスコ及びアセンブリ等の実験容器;ピペット及びピペットチップ等を含む任意のサンプル採集デバイスを包含し得る。概して本発明は、本明細書に概説される基準を満たす限りにおいて、生体サンプルを保持するのに好適な任意の容器、並びにサンプルの移送に関与する容器及び要素に関する。

10

20

30

40

50

【0033】

上述の開示に基づくと、本発明は、手作業で非常に容易に使用することができるか、又は現行の技術水準の自動化システムに組み込むことができるサンプル採集デバイスを使用して標的分子又は粒子をサンプルから分離する方法を更に含み、このサンプル調製方法は図6に示されるような日常的な実験室ワークフローに容易に組み込まれる。

【0034】

サンプル容器の容量は0.1ml~100ml、好ましくは0.1ml~10mlである。サンプル中のフィブリノゲンの濃度は、好ましくは少なくとも0.1 μ g/mlである。好ましい実施形態では、サンプル中のフィブリノゲンの濃度は0.1mg/ml~100mg/ml、最も好ましくは10mg/ml~10 μ g/mlである。

10

【0035】

デバイスは、添加剤としてトロンピン又はトロンピン様酵素を更に含んでいてもよい。トロンピン濃度は0.01 I.U./ml~10 I.U./ml、好ましくは0.1 I.U./ml~2 I.U./ml(サンプル)の範囲内である。実際には、トロンピン又はトロンピン様酵素の量は、所望のフィブリン網構造及びペレットサイズを得るためにデバイス内のフィブリノゲン濃度に対して調整しなければならない。トロンピン量は好ましくは1mgのフィブリノゲン当たり20 I.U.未満のトロンピン、好ましくは1mgのフィブリノゲン当たり0.01 I.U.~10 I.U.のトロンピン、より好ましくは1mgのフィブリノゲン当たり0.1 I.U.~1 I.U.のトロンピンの範囲である。

20

【0036】

全血等の血液サンプルの場合、本発明によるサンプル採集デバイスは、サンプル内の内因性トロンピンの生成を促進する凝固物質を更に含んでいてもよい。かかる促進物質は、例えばカオリン、セライト、珪藻土シリカ(diatomaceous silica)及びガラス繊維等の粉末又は繊維状ケイ酸塩化合物、炭酸カルシウム及び硫酸カルシウム等のカルシウム化合物の微粉末、ヘビ毒に由来するトロンピン様物質、並びに血液ペレット化因子(blood pelleting factors)を活性化して凝固を促進することができるポリフェノールを含む群から選択することができる。さらに、これらの凝固促進物質は例えば個別に若しくは組み合わせてサンプルに添加するか、又はサンプル容器の壁面内にコーティングすることができる。かかる促進物質の量は、凝固プロセスを制御して小さなフィブリンペレットのサイズが得られるように調整しなければならない。

30

【0037】

好ましい実施形態では、フィブリン網構造を制御して標的分子又は粒子をサンプルから捕捉するために、本発明によるサンプル採集デバイスはカルシウム濃度の調整を可能にする添加剤を更に含んでいてもよい。実際には、これはカルシウムイオン源をデバイスに添加することによって達成することができる。カルシウムイオン源は好ましくは塩化カルシウム(CaCl_2)であり、好ましくは1mlのサンプル容量当たり1mg~10mg、更により好ましくは1mlのサンプル容量当たり4mg~7mg、最も好ましくは1mlのサンプル容量当たり5mg~6mgの濃度範囲である。血液サンプルでは例えばカルシウムが自然に存在し、カルシウム濃度の調整はデバイスにGDTA、EDTA又はクエン酸塩等のカルシウムキレート剤を更に添加することによって達成することができる。

40

【0038】

さらに、本発明によるデバイスは(I)フィブリン/フィブリノゲン結合部分と、(II)標的分子又は粒子に指向性を有する物質捕捉部分とを有する分子を含む添加剤を含んでいてもよい。したがって、標的分子又は粒子に指向性を有する物質捕捉部分は、該標的分子又は粒子を特異的に認識するように設計された抗体、核酸及びアプタマーを含む群から選択することができる。さらに、物質捕捉部分はトロンピン、フィブロネクチン、細菌フィブリノゲン結合タンパク質、組織型プラスミノーゲン活性化因子、インテグリンを含む群、及びこの群の任意の成員に由来する部分から選択されるフィブリン/フィブリノゲン結合部分と連結するか又は組み合わせることができる。好ましい実施形態では、フィブ

50

リン/フィブリノゲン結合部分及び物質捕捉部分を融合分子に組み合わせる。

【0039】

さらに、本発明によるデバイスは、フィブリノゲン組み換えタンパク質を含む添加剤を含んでいてもよい。かかる組み換えフィブリノゲンタンパク質は、デバイスでの使用下で組み換えフィブリノゲンタンパク質とサンプル中に含まれる特異標的分子又は粒子との親和性相互作用を増強又は阻害するように特異的に設計することができる。好ましい実施形態では、デバイスで使用される組み換えタンパク質は、上記標的分子又は粒子に指向性を有する捕捉部分ドメインを有するフィブリノゲン融合タンパク質である。別の実施形態では、フィブリノゲン融合タンパク質は分解部位を更に含む。これは溶解工程において結合標的分子又は粒子をフィブリン網から回収するのに特に有用である。好ましい実施形態では、分解部位は酵素分解部位又は加水分解部位である。最も好ましい実施形態では、分解部位はプラスミン及びマトリックスメタロプロテイナーゼからなる群から選択される酵素によって切断される酵素分解部位である。

10

【0040】

実際には、先に記載の添加剤は全てサンプル採集後のサンプルに添加するか、又はデバイス内に組み込んでおくことができる。後者の場合、添加剤を水性緩衝溶液に可溶化して組み込むことができる。好ましい実施形態では、上記添加剤はデバイスの使用直前に又はデバイスへのサンプルの投入時に可溶化することができる凍結乾燥形態でデバイスに組み入れることができる。

【0041】

20

本発明によるサンプル採集デバイスを使用して標的細胞、細胞成分、細胞亜集団（真核及び原核の両方）、細菌、ウイルス、寄生生物、抗原、特異抗体、毒素、タンパク質、核酸配列等の標的分子又は粒子を分離及び濃縮することができる。

【0042】

本発明によるサンプル採集デバイスを使用して、標的分子又は粒子を多様なサンプルから分離及び濃縮することができる。概して、サンプルとしては全血、血液製剤、血液成分、及びフィブリノゲンを含まないサンプル（尿、痰及びスワブを含むが、これらに限定されない）が挙げられる。この点において、本明細書におけるサンプルは食品サンプル、臨床サンプル、環境サンプル及び実験サンプルを含む試験の必要がある任意のサンプルタイプを指すことができる。

30

【0043】

実際には、デバイスは識別コードを備えていてもよい。かかる識別コードは限定されるものではないが、デバイスに付加されたコードバー若しくは色、又はデバイス自体のサイズ及び/又は形状によって決められ得る。かかる識別コードはデバイスの意図された使用及び適用の参照又は指標として使用することができる。本発明の幾つかの実施形態によるデバイスは、実際にそれらの構成、デバイスを使用するサンプルのタイプ及び/又は分離の必要がある標的（複数の場合もある）によって区別することができる。

【0044】

上述の好ましい実施形態の様々な適合形態及び修飾形態を本発明の範囲を逸脱することなく構成することができることを当業者は理解するであろう。したがって、添付の特許請求の範囲内において、本明細書に具体的に記載した以外の形で本発明を実施してもよいことを理解されたい。

40

【 図 1 】

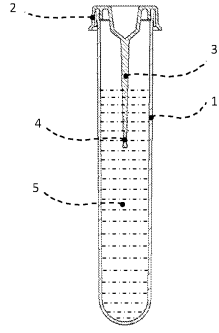


Figure 1

【 図 2 】

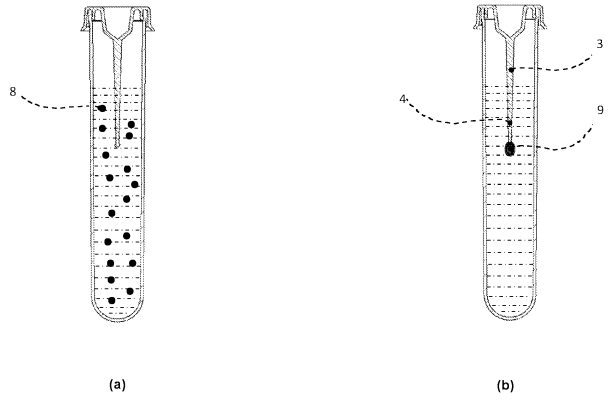


Figure 2

【 図 3 】

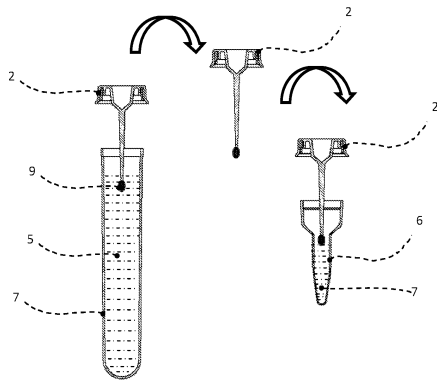


Figure 3

【 図 5 】

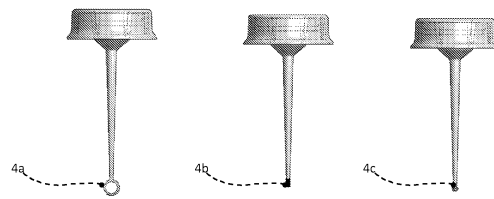


Figure 5

【 図 4 】

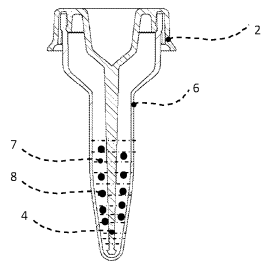


Figure 4

【 図 6 】

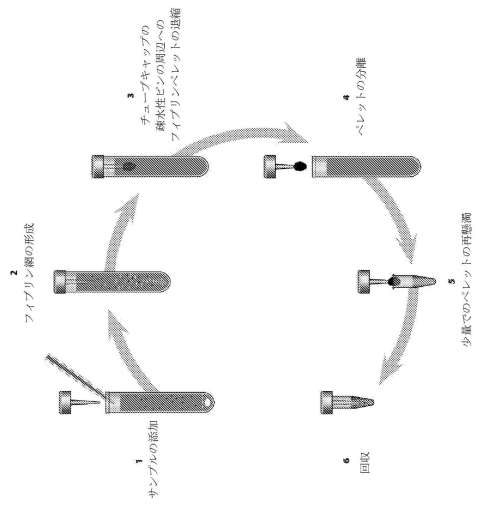


Figure 6

【 図 7 】

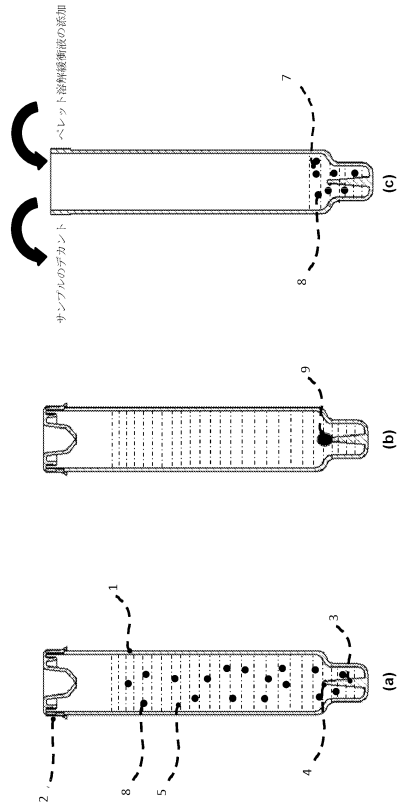


Figure 7

フロントページの続き

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 米国特許出願公開第2013/0109009(US, A1)
特開平10-257881(JP, A)
米国特許第03525254(US, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/26

C12Q 1/24

G01N 1/28

G01N 33/48

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)