

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3981328号

(P3981328)

(45) 発行日 平成19年9月26日(2007.9.26)

(24) 登録日 平成19年7月6日(2007.7.6)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 B 10/00 (2006.01)	A 6 1 B 10/00 E
A 6 1 B 5/07 (2006.01)	A 6 1 B 10/00 T
G O 1 N 21/64 (2006.01)	A 6 1 B 5/07
	G O 1 N 21/64 F

請求項の数 18 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2002-541386 (P2002-541386)	(73) 特許権者	503169585
(86) (22) 出願日	平成13年11月7日(2001.11.7)		サイセル・テクノロジーズ, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2004-523257 (P2004-523257A)		アメリカ合衆国ノースカロライナ州27560, モリスヴィル, ゲイトウェイ・センター・ブルヴァード 3800, スウィート 308
(43) 公表日	平成16年8月5日(2004.8.5)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/047373	(74) 代理人	100099623
(87) 国際公開番号	W02002/039112		弁理士 奥山 尚一
(87) 国際公開日	平成14年5月16日(2002.5.16)	(74) 代理人	100096769
審査請求日	平成16年11月8日(2004.11.8)		弁理士 有原 幸一
(31) 優先権主張番号	60/247,574	(74) 代理人	100107319
(32) 優先日	平成12年11月9日(2000.11.9)		弁理士 松島 鉄男
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光タグを使用した生体分子濃縮物をインビボで検出するための方法、回路、および物質の組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

第一の光学放射を発生して、標的生体分子に選択的に結合した、局部の蛍光標識された結合分子をインビボで励起するインビボでの使用のために構成された光学放射源と、

前記第一の光学放射に暴露された励起に反応して、前記標的生体分子に結合した標識された結合分子の蛍光により発せられた第二の光学放射を検出する、インビボでの使用のために構成された光学放射検出器と、

該光学放射源および該光学放射検出器に連結されたプロセッサ回路であって、該第一の光学放射の発生を制御し、該第二の光学放射の強度に関連する強度シグナルを受信し、該第二の光学放射の強度に関するシグナルをエキスビボシステムに伝達するプロセッサ回路と、

前記第一の光学放射により励起されるように構成された、前記蛍光標識された結合分子の供給源であって、時間の経過とともに溶解して該蛍光標識された結合分子を、該蛍光標識された結合分子が結合するように構成された前記標的生体分子の近くにインビボで放出する材料によりカプセル化されている供給源と

を含む、移植可能な装置。

【請求項2】

前記標識された結合分子が蛍光標識された抗体である、請求項1に記載の装置。

【請求項3】

前記標的生体分子が腫瘍細胞に関連する抗原であり、前記蛍光標識された結合分子が、

10

20

前記腫瘍細胞に関連する抗原に結合し、他の種類の生体分子には結合しないように選択された蛍光標識された抗体を含む、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 4】

前記光学放射源が、生物付着組織を通過して前記第一の光学放射を発する請求項 1 に記載の装置。

【請求項 5】

前記光学放射検出器が、生物付着組織を通過して前記第二の光学放射を検出する、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 6】

前記光学放射源が高出力の LED およびレーザからなる群から選択される、請求項 1 に記載の装置。 10

【請求項 7】

前記光学放射検出器がフォトランジスタ、フォトダイオード、および光電子増倍管からなる群から選択される、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 8】

前記第一の光学放射が第一の周波数を有し、前記第二の光学放射が第二の周波数を有する請求項 1 に記載の装置。

【請求項 9】

前記第一の周波数が前記第二の周波数より大きい請求項 8 に記載の装置。

【請求項 10】

前記光学放射源に連結された発光フィルターと、
前記光学放射検出器に連結された吸収フィルターと
をさらに含む、請求項 1 に記載の装置。 20

【請求項 11】

前記プロセッサ回路に連結されたインダクタをさらに含み、該インダクタは、前記エクスビシステムから受信した出力シグナルに応答して前記プロセッサ回路に出力する請求項 1 に記載の装置。

【請求項 12】

前記プロセッサ回路と前記光学放射源と前記光学放射検出器とが載置された直径が約 2 . 0 mm のプラットフォームをさらに含む請求項 1 に記載の装置。 30

【請求項 13】

前記シグナルが前記インダクタを介してデジタル方式でコードされる、請求項 11 に記載の装置。

【請求項 14】

前記光学放射源と前記光学放射検出器とが生体適合性の透光性層でコートされている、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 15】

前記蛍光標識された結合分子の供給源が、前記蛍光標識された結合分子を含む第一の部分および第二の部分と、
該第二の部分と該第一の部分とを隔離する隔離部分と
を含む、請求項 1 に記載の装置。 40

【請求項 16】

前記隔離部分は、前記第一の部分および第二の部分よりも組織における溶解性が低い、請求項 15 に記載の装置。

【請求項 17】

前記第一の部分および第二の部分が、第一の蛍光標識された結合分子と第二の蛍光標識された結合分子とを含み、該第一の蛍光標識された結合分子と該第二の蛍光標識された結合分子とが異なる請求項 15 に記載の装置。

【請求項 18】

前記蛍光標識された結合分子の供給源が、前記光学放射源と前記光学放射検出器と前記 50

プロセッサ回路とを備えるプラットフォーム上に位置する、請求項 1 に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[優先権主張および関連出願のクロスリファレンス]

本出願は、2000年11月9日に出願された、「生体分子濃縮物をインピボで蛍光タグを使用して検出する方法、回路、および物質の組成物」というタイトルの米国仮出願番号第60/247,574号(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)の優先権を主張する。

【0002】

10

[発明の分野]

本発明は、センサに関する。本発明はより詳細には、生体分子センサの分野に関する。

【背景技術】

【0003】

悪性細胞群のエクスピボ研究により、いくつかの一般的な原理が確立され、臨床治療プロトコルが開発されている。これらの原理は、悪性細胞と正常細胞との間で異なり、悪性疾患治療で使用されている。全ての腫瘍細胞を死滅させて治癒率を改善するために、前臨床研究および臨床研究の両方でこれらの相違を利用することが試みられてきた。

【0004】

この目的の達成における一つの主要な障害は、正常な組織への毒性を最小にしながら腫瘍細胞の死滅を増加させること(治療指数)の困難さである。したがって、いくつかの治療戦略は、悪性疾患治療における経験的アプローチを使用する。特に、細胞傷害薬の送達時間および用量は、悪性細胞群に対する効果よりも正常組織に対する応答および毒性によってより支配され得る。

20

【0005】

不運なことに、このアプローチでは悪性細胞群の治療時の変化についての正確な情報を得ることができない。利用可能なこの情報の収集により、臨床医は悪性細胞と正常細胞との相違を利用して治療手順を改良することが可能である。

【0006】

細胞群内で起こる変化を研究する試みが多数行われている。しかし、これらの試みはリアルタイムベースの変化をモニタリングする能力を示していない。実際、これらの方法は、典型的には、時間内に一つの情報を提供し、ほとんどがある特定の情報またはパラメータを提供するようにデザインされている。さらに、ほとんどの従来の方法は、高額且つ時間がかかり得る。このことは、特に積極的な治療およびその後の積極的な治療の際の変化を追跡することが望ましい場合、典型的には照射および化学療法の長期治療を受けている患者にとっては問題であり得る。

30

【0007】

さらに、腫瘍は、照射または薬物療法による治療のためにより感受性の高い期間を有し得る。継続的に、または半継続的にモニタリングし、このような感受性を示す条件を識別することができる可能性のあるモニタリングシステムを得ることにより、腫瘍破壊率が増加する。

40

【0008】

多数の腫瘍特異的抗原(TSA)が同定されており、多数のこれらのTSAに特異的な抗体が知られている。例えば、9Lラット脳腫瘍細胞株の細胞表面上で見出されるシグマ2受容体、マウス乳腺癌株66(二倍体)および67(異数体)、ならびにMCF-7ヒト乳癌細胞株は、腫瘍細胞増殖のマーカであり得ることが証明されている。Mach RHら、「乳癌における増殖の潜在的な生体マーカーとしてのシグマ2受容体」、Cancer Res. 1997, Jan 1, 57(1), 156~61; Al-Nabulsi Iら、「増殖および静止腫瘍細胞におけるシグマ2受容体発現に対する倍数性、漸増、環境因子、およびタモキシフェン治療の効果」、Br J Cancer, 1999

50

、Nov、81(6)、925~33を参照のこと。このようなマーカーは、非侵襲性の(non-invasive)画像処理手順による検出の影響を受け得る。したがって、シグマ2受容体に選択的に結合するリガンドを使用して腫瘍の増殖状態を評価することができるが、このようリガンドを使用したインビボ技術はこれまで知られていない。腫瘍特異的な治療分野は依然として相対的には確立されていないが、さまざまな研究者がこのような治療に有用ないくつかの潜在的に重要な技術を提案している。例えば、生体分子のエキスピボでの検出は、有利な腫瘍の治療時期の推定に有用であり得る。多数のこれらの技術は、生体分子に関連する物理的または化学的な性質を変化させるために、「ハイブリッド形成事象」を使用する。性質が変化した生体分子を、例えば、光学的手段または化学的手段によって検出することができる。

10

【0009】

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)と呼ばれる公知の生体分子検出技術は、生体分子と、該生体分子に特異的な酵素標識された抗体との間の結合を検出するステップを含む。他の生体分子の検出法は、生体分子の存在を示すために蛍光標識された抗体を使用する免疫蛍光を使用する。これらの技術のインビボでの使用は、分析すべきインビボ部位へのセンサの侵襲性の(invasive)導入を含み得る。さらに、これらの技術は、センサおよび組織が相互作用する面がきれいでない場合に信頼することができない。特に、インビボでの使用により、センサが長期間に「生物付着」されて、センサの操作性が変化し得る。特に、タンパク質は、センサの組織への挿入から数分以内にセンサ上に生成し始めて、センサの操作が不適切になり得る。これらを考慮して、特に、インビボでの生体分子濃度を検出するための回路、物質の組成物、およびこれを使用することができる方法が必要である。

20

【発明の開示】

【0010】

[発明の要約]

本発明の実施形態による方法には、標識された抗体に特異的に結合する抗原を有する組織に、標識された抗体をインビボで提供するステップを含んでもよい。第一の光学放射をインビボで組織に発して、インビボで抗原に結合する標識された抗体を励起する。その励起に反応した、励起された標識された抗体が発した第二の光学放射を、インビボで検出することができる。いくつかの実施形態では、標識された抗体は蛍光標識された抗体である。

30

【0011】

別の実施形態では、前記提供するステップは、インビボで、時間の経過とともにマトリクス材料から標識された抗体を放出させるステップを含んでもよい。他の実施形態では、前記提供するステップには、インビボに存在する調節回路に応答して、マトリクス材料からインビボで標識された抗体を放出するステップを含んでもよい。

【0012】

いくつかの実施形態では、励起するステップは、生物付着組織から第一の光学放射を発するステップを含んでもよい。他の実施形態では、検出するステップは、生物付着組織から第二の光学放射を検出するステップを含んでもよい。

40

【0013】

したがって、標識された抗体は、腫瘍細胞に関連する抗原に結合することができる。放射源を使用して、抗原に結合している標識された抗体を励起することができる。標識された抗体は、励起に応答して第二の光学放射を発する。センサを使用して、標識された抗体によって発せられた光学放射レベルを検出することができる。第二の光学放射レベルを使用して、抗原の存在濃度を決定することができる。腫瘍細胞の成長または増殖は、抗原濃度に近似するであろう。本発明の実施形態は、移植可能なセンサプラットフォームを使用して蛍光標識物質を探索する能力を有利に組み込み、それにより、インビボで抗原濃度を正確にリアルタイムで決定することが可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

50

【 0 0 1 4 】

[本発明の実施形態の説明]

本発明を、本発明の好ましい実施形態を示す添付の図面を参照して以下に詳細に記載する。しかし、本発明は、多数の異なる形態で実施することができ、上記実施形態に制限されると解釈すべきではなく、むしろ、これらの実施形態は、本開示が詳細且つ完全であり、本発明の範囲が当業者に完全に示唆されるように提供する。本発明を通して、類似の数字は、類似の要素をいう。図では、明白にするために、一定の層、領域、成分を、強調し、または拡大することができる。

【 0 0 1 5 】

本発明の説明で使用する技術用語は、特定の実施形態のみの説明のためであり、本発明を制限することを意図しない。本発明の説明および添付の特許請求の範囲で使用する、「a」、「an」、および「the」は、文脈上明らかに別のものを示さない限り、複数形も含むことを意図する。

【 0 0 1 6 】

特に定義しない限り、本明細書中で使用する全ての技術用語および科学用語は、本発明に属する当業者によって一般に理解されている意味と同一である。本明細書中に記載した全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その全てが引用することにより本明細書の一部をなすものとする。本明細書中で使用される、用語「組織」には、細胞、器官、体液、および生体サンプルまたは被験体の体内にある他の生体物質を含みんでもよい。例えば、用語「組織」を使用して、細胞、器官、および/またはヒト体内の他の生体物質を説明することができる。用語「生体分子」には、特定の腫瘍細胞型に関連するタンパク質などの腫瘍特異的抗原(TSA)を含み得る。本発明をインビボの用途またはエクスピボの用途に使用できると理解される。用語「インビボ」は、インサイチュー適用を含むことを特に意図するとも理解される。

【 0 0 1 7 】

本発明の好ましい実施形態では、異常増殖細胞(前悪性および非新生物性または非悪性高増殖細胞と共に腫瘍、癌、および新生物性組織を含む)に関連する生体分子(例えば、抗原)を検出する。用語「腫瘍」は、一般に、当該分野で多細胞生物内の非分化細胞の異常な塊を意味すると理解される。腫瘍は、悪性または良性であり得る。好ましくは、本明細書中に開示の本発明の実施形態を使用して、悪性腫瘍に関連する生体分子を検出する。本発明の実施形態によって検出することができる生体分子に関連する腫瘍、癌、および新生物性組織の例には、乳癌;骨肉種;血管肉腫;線維肉腫および他の肉腫;洞腫瘍(sinus tumors);卵巣癌、尿管癌、膀胱癌、前立腺癌、および他の尿生殖器癌;結腸癌、および胃癌、ならびに他の胃腸の癌;肺癌;骨髄腫;脾臓癌;肝臓癌;腎臓癌;内分泌癌;皮膚癌;ならびに神経膠種および神経芽腫を含む脳腫瘍または中枢神経系および末梢神経系(CNS)腫瘍(悪性または良性)などの悪性腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。前悪性および非新生物性または非悪性異常増殖組織に関連する生体分子には、骨髄異形成障害;インサイチューでの頸部癌;家族性腸ポリープ症(ガードナー症候群など);口腔白斑症;組織球増殖症;ケロイド;血管腫;乾癬;およびウイルス感染による異常増殖性細胞(hyperproliferative: いぼなど)に関連する生体分子が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 1 8 】

本発明を腫瘍および他の異常増殖性細胞に関連する抗原の検出に関して本明細書中に記載しているが、本発明を、グルコース、細胞壊死副産物、細胞シグナル伝達タンパク質などの測定に使用することもできる。

【 0 0 1 9 】

本発明の実施形態は、主にヒト被験体に関係するが、本発明の実施形態を、獣医学的目的、薬物スクリーニング、および薬物開発目的で、動物被験体、特に哺乳動物被験体(霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、家畜、およびウマなど)に使用することもできる。

【 0 0 2 0 】

10

20

30

40

50

本明細書中で使用される、用語「光学放射」には、組織におけるシグナルの伝達に使用することができる放射（可視光線、紫外線、赤外線、および/または電磁放射線スペクトルの他の部分の放射など）を含み得る。

【0021】

本明細書中に記載の実施形態が蛍光標識された結合分子（すなわち、抗体）について説明しているが、本発明を、任意の型の標識（蛍光標識（例えば、フルオレセイン、ローダミン）、放射性標識（例えば、³⁵S、¹²⁵I、¹³¹I）、生体発光標識（例えば、ビオチン-ストレプトアビジン、緑色蛍光タンパク質（GFP））、および酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ）を含む）と共に使用することができる。と理解される。

10

【0022】

本明細書中に記載の実施形態は、特に抗体をいい、本発明を検出すべき生体分子に結合する他の分子と共に使用することもできると理解される。さらに、本発明を抗原濃度の検出に関して説明するが、本発明を使用して、検出が望まれる任意の生体分子（タンパク質、ポリペプチド、核酸、多糖類などが含まれるが、これらに限定されない）の濃度を検出することもできる。

【0023】

本明細書中で使用される、用語「抗体」は、この用語が当該分野で理解される全ての抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、および一本鎖抗体、Fabフラグメント、ならびにFab発現ライブラリーから産生されるフラグメントが含まれるが、これらに限定されない）を含むと理解される。培地中の連続細胞株による抗体分子の産生のための任意の技術を使用して、モノクローナル抗体を調製することができる。これらには、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびEBVハイブリドーマ技術が含まれるが、これらに限定されない。例えば、G. Kohlerら、1975、Nature、256、495~497；D. Kozborら、1985、J. Immunol. Methods、81、31~42；R. J. Coteら、1983、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、80、2026~2030；およびS. P. Coleら、1984、Mol. Cell Biol.、62、109~120を参照のこと。

20

【0024】

キメラ抗体を、例えば、S. L. Morrisonら、1984、Proc. Natl. Acad. Sci.、81、6851~6855；M. S. Neubergerら、1984、Nature、312、604~608；およびS. Takedaら、1985、Nature、314、452~454に記載の方法に従って産生することができる。あるいは、当該分野で公知の方法を使用して一本鎖抗体の産生のために記載された技術を適用して、抗原特異的一本鎖抗体を産生することができる。文献に開示されるように、リンパ球集団のインビボ産生の誘導または免疫グロブリンライブラリーのスクリーニングまたは特異性の高い結合試薬パネルによって抗体を産生することもできる。例えば、R. Orlandiら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci.、86、3833~3837；およびG. Winterら、1991、Nature、349、293~299を参照のこと。関連する特異性を有するがイディオタイプ組成が異なる抗体を、ランダムコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー由来のチェーンシャuffling（chain shuffling）によって作製することができる。例えば、D. R. Burton、1991、Proc. Natl. Acad. Sci.、88、11120~11123を参照のこと。

30

40

【0025】

抗原の特異的結合部位を含む抗体フラグメントを使用することもできる。例えば、このようなフラグメントには、抗原分子のペプシン消化によって産生することができるF(ab')₂フラグメントおよびF(ab')₂フラグメントのジスルフィド結合の還元によって作製することができるF(ab')₂フラグメントが含まれるが、これらに限定され

50

ない。あるいは、Fab発現ライブラリーを、所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメントを迅速且つ簡単に識別できるように構築することができる。W. D. Husseら、1989、Science、254、1275～1281を参照のこと。

【0026】

エキスピボ研究用の蛍光ベースのアッセイは十分に確立されており、多数のフルオロフォアおよびタグ化抗体系が市販されている。本発明の実施で有用な市販のpH依存性フルオロフォアの広範なリストを、R. P. Haugland、第二三章(「pHインジケータ」)、「蛍光プローブおよび研究試薬ハンドブック」、第6版(Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, 1996およびwww.probes.comに記載のHTMLバージョン)に見出すことができる。

10

【0027】

本発明の実施形態によれば、抗体などの蛍光標識された結合分子を、腫瘍細胞に関連する抗原などの生体分子に結合させることができる。光学放射源を使用して、抗原に結合した蛍光標識された抗体を励起することができる。蛍光標識された抗体は、励起にตอบสนองして第二の光学放射を発生する。センサを使用して、蛍光標識された抗体が発生した光学放射レベルを検出することができる。発生した光学放射レベルを使用して、抗原の存在濃度を決定することができる。次いで、抗原濃度を、腫瘍特異的抗原濃度とこれらのパラメータとの間の既知の関係に基づいて、または当業者により決定しうる関係に従って、腫瘍細胞の量、存在、成長もしくは増殖挙動を相関させることができる。

【0028】

20

図1は、インピボ腫瘍組織110の抗原レベルを決定するために使用することができる本発明の実施形態の概略図である。腫瘍組織110を、腫瘍組織110の表面100に存在する腫瘍特異的抗原(TSA)195のタイプによって特徴付けることができる。例えば、TSA195を、細胞組織110の表面上に見出すことができる。一般に、腫瘍細胞増殖の指標となる適切な生体分子(すなわち、TSA)は、固形腫瘍で見出される多数の生物学的、生理学的、および/または環境の性質から実質的に独立している。たった一つの組織110表面しか示されなくても、本発明の実施形態を使用して複数の組織110についての生体分子濃度を検出できると解される。

【0029】

表面100でのTSA195の濃度レベルに基づいて腫瘍組織110を検出することができる。例えば、腫瘍の「成長」期を比較的高濃度のTSA195によって特徴付けることができ、「寛解(remission)」期を比較的低濃度のTSA195によって特徴付けることができる。

30

【0030】

プラットフォーム105はインピボで腫瘍組織110に接近するように存在し、生物付着組織190で長期にわたり付着されていてもいなくてもよい。プラットフォーム105は、マトリクス材料140に懸濁された蛍光標識された抗体130を含むことができるマトリクス材料140を有する。マトリクス材料140は、蛍光標識された抗体130がマトリクス材料140から時間の経過とともに放出されるように可溶性であってもよい。マトリクス材料140は、例えば、図3および4に示すようにシリンダーの形状であってもよい。他の形状を使用することもできる。プラットフォーム105はまた、システムへの、またはシステムからのシグナルを、エキスピボで伝達および受信する遠隔測定システムを含んでもよい。

40

【0031】

蛍光標識された抗体130を、腫瘍組織110を特徴付けるが正常組織には関連しないTSA195と特異的に相互作用するか結合するように選択する。一以上のTSA195は、腫瘍組織110を特徴付けることができる。蛍光標識された抗体130はマトリクス材料140から放出され、蛍光標識された抗体130のうちいくつかはプラットフォーム105付近の表面100上でTSA195と結合して結合している複合体160を形成する。非結合蛍光標識された抗体150は長期間にわたって浮遊してプラットフォーム1

50

05からはなれる。

【0032】

光学放射源120は、結合複合体160の蛍光レベルをより高いエネルギー状態に励起する第一の光学放射170を発する。本発明の一つの実施形態では、第一の光学放射は、生物付着組織190を通して発せられる。一旦励起されると、結合複合体の蛍光標識は、第二の光学放射180を発する。第一の光学放射170および第二の光学放射180の各波長を、生物付着組織190の浸透を促進するように選択することができる。光学放射源は、本明細書中でさらに記載のように、例えば、レーザダイオード、高出力発光ダイオード(LED)などであり得る。

10

【0033】

光学放射検出器115は、生物付着組織190を通過した第二の光学放射180を検出し、それにより従来技術に関するいくつかの欠点を回避することができる。第一の光学放射170の発光と第二の光学放射180の検出との間の時間間隔を、表面100上で蛍光標識された抗体130がTSA195に結合するように選択することができる。光学放射検出器115は、フォトダイオードまたはフォトトランジスタであり得る。本明細書中にさらに記載されており、そして/または当業者に公知の他のデバイスも使用することができる

【0034】

光学放射検出器115は、バックグラウンドノイズの影響を減少させるための光学的吸収フィルターを含んでもよい。光学放射源120および光学放射検出器115を、シールドで分離して光学放射検出器115に到達する第一の光学放射170の量を減少させることができる。いくつかの実施形態では、光学放射検出器115は、結合複合体160から約500 μ mの場所に存在する。他の実施形態では、光学放射検出器115は、光学放射検出器115と結合複合体160との間の分離が増加されるように第二の光学放射180を収集するか焦点に集めるレンズを含む。

20

【0035】

第二の光学放射180の強度を使用して、TSA195の濃度を決定することができる。特に、プラットフォーム105付近のTSA195は、これに結合している蛍光標識された抗体130を有してもよい。したがって、蛍光標識は、第一の光学放射170の励起後に第二の光学放射180を発することができる。

30

【0036】

図2は、本発明の実施形態の概略図である。図2によれば、プラットフォーム200は、インビボで抗原205を含む組織290付近に存在することができる。生物付着組織225は、プラットフォーム200の一部に長期にわたり付着し得る。プラットフォーム200は、それぞれ第一のマトリクス材料240および第二のマトリクス材料215を含んでもよい。第一のマトリクス材料240は、非標識された抗体220を含んでもよい。第二のマトリクス材料215は、蛍光標識された抗体210を含んでもよい。いくつかの実施形態では、さらなるマトリクス材料を使用することができる。本明細書中に記載のように、マトリクス材料は、異なる濃度の抗体および/または抗体の混合物を含むことができ、これらの抗体は標識することができるものも標識することができないものもある。

40

【0037】

標識されていない抗体220および蛍光標識された抗体210を、時間の経過とともに連続的にまたは本明細書中に記載の段階に放出させることができる。各抗体の放出は、互いに時期が異なってもよい。例えば、標識されていない抗体220を第一の時間間隔中に放出させることができ、蛍光標識された抗体210を第二の時間間隔中に放出させることができる。本明細書中にさらに記載の各マトリクス材料に連結した装置270を使用して、抗体を放出させることもできる。各々のマトリクス材料に連結した装置270は、異なってもよい。いくつかの実施形態では、装置270を使用して、標識されていない抗体および/または標識された抗体の放出速度を調節することができる。放出調節ストラテ

50

ジーを使用して、プラットフォーム200が機能しなければならない動的生物学的環境において有利であり得る蛍光標識された抗体230の連続供給源を提供することができる。

【0038】

標識されていない抗体220を組織290に放出させて、遊離の標識されていない抗体235を提供する。蛍光標識された抗体210を放出させて、蛍光標識された抗体230を提供する。いくつかの遊離の蛍光標識された抗体230を抗原205に結合させて、結合抗原231を提供する。いくつかの結合抗原231を、第二のマトリクス材料240の表面で標識されていない抗体220に結合させて、第二のマトリクス材料240の表面に結合構造体290を提供する。光学放射エミッター/検出器285は第二のマトリクス材料285に隣接し、これを使用して結合構造体290を励起し、上記のようにシグナルを検出することができる。

10

【0039】

図3は、本発明の物質の組成物の概略図である。図3によれば、蛍光標識された抗体330を時間の経過とともにマトリクス材料335から放出させる。生体適合性、放出時間の特徴、分解、懸濁した蛍光標識された抗体330との相互作用、自己蛍光の欠如などの要因に基づいてマトリクス材料を選択することができる。

【0040】

他の蛍光標識された抗体をマトリクス材料335中に含めて、異なる抗体型の混合物を提供することができる。用語「異なる抗体型」は、一つの抗体型がより多くの種類の標識(すなわち、標識Aおよび標識B)を有してもよいことを意味すると理解される。あるいは、一以上の抗体型(すなわち、抗体Aおよび抗体B)が同一の標識を有してもよい。例えば、マトリクス材料335は、A型およびB型の蛍光標識された抗体330を含んでもよい。さらに、A型およびB型蛍光標識された抗体330は、異なる濃度であってもよい。例えば、A型蛍光標識された抗体330は蛍光標識された抗体330の20%となるように含まれ、B型蛍光標識された抗体330は蛍光標識された抗体330の80%となるように含まれてもよい。さらなる型の蛍光標識された抗体330もまた、種々の濃度で含んでもよい。

20

【0041】

マトリクス材料35はこれに懸濁した蛍光標識された抗体330と反応しないかこれを損傷しないことが好ましい。マトリクス材料335は蛍光標識された抗体330が過度の干渉を与えられることなく、時間の経過とともに放出されるように、相互作用表面340で生物付着を促進しないことが好ましい。マトリクス材料335は、いくつかのポリマーの一以上を含んでもよい。組織中のポリマーのカプセル化、分解、および放出特性が被験体ごとに、細胞ごとに、またはサンプルごとに変化し得るようにポリマーの選択を経験的に決定することができる。適切な生体分解性ポリマーは、ポリマー中のエステル結合の加水分解に基づくことができる。この型の種々のポリマーは市販されており、十分に特徴付けられている。これらのポリマーの多数は、小さな無毒の分子に分解する。最も一般的な生分解性ポリマーのうちのいくつかは、ポリ乳酸およびポリグリコール酸である。Fried, Joel R., Polymer Science and Technology, Englewood Cliffs, NJ, Prentice Hall, 1995、p. 246~249。本発明のいくつかの実施形態では、マトリクス材料335は、ポリ乳酸とポリグリコール酸との組み合わせといった異なる材料の混合物である。異なる材料は、ある濃度範囲に存在してもよい。例えば、マトリクス材料335は、約0~約50%との間のポリ乳酸および/または約10%~約50%との間のポリグリコール酸を含んでもよい。

30

40

【0042】

いくつかの実施形態では、蛍光標識された抗体330の時間放出を、検出すべき抗体または生体分子との材料335の生体適合性、ポリマー型、ポリマーの構造(例えば、ポリマー放出ビーズの物理的サイズおよび多孔度)、マトリクス材料335の分子量、マトリクス材料335の多孔度、および/または他の材料のパラメータに基づいたマトリクス材

50

料 3 3 5 の選択によって調節することができる。

【 0 0 4 3 】

他の実施形態では、マトリクス材料 3 3 5 を、マトリクス材料 3 3 5 が蛍光標識された抗体 3 3 0 を放出する速度に影響を与えることができる装置 3 5 0 に連結することができる。例えば、装置 3 5 0 は、マトリクス材料 3 3 5 を振動させ、それにより蛍光標識された抗体 3 3 0 が種々の速度で放出される圧電性回路であり得る。放出速度および経時時間を調節するためのいくつかのパラメータ（例えば、ポリマーの構造、分離用、多孔度など）を利用することが可能であるが、他の放出調節技術も使用することができる。例えば、圧電性素子の頂部にマウントし、エレメントの作動（例えば、圧電性回路へのシヌソイド入力を使用したポリマーの機械的震盪）により、放出速度を増加させることができる。放出速度を調整するための別の選択肢は、ポリマーの電気化学的酸化および還元により導電性ポリマー（例えば、ポリピロール）とマトリクス材料 3 3 5 とをブレンドし、ブレンドの多孔性を調節することである（Kontturiら、「薬物送達のモデル膜としてのポリピロール」、*Journal of Electroanalytical Chemistry*、1998、453（1～2）、231～238；Heipel, M.ら、「誘導性ポリマーマトリクスからのクロロプロマジンの電気化学的に調節された結合および放出のための電気化学的水晶結晶板マイクロバランスの適用」、*Microchemical Journal*、1997、56、54～64；Yano, S.ら、「浸透圧衝撃による導電性膜に固定した微細藻類からの組換え遺伝子産物の細胞外放出」、*Bioelectrochemistry and Bioenergetics*、1996、39、89～93；Bidanら、「ポリピロールへのスルホン化シクロデキストリンの組み込み - 中性薬物の電気調節送達へのアプローチ」、*Biosensors & Bioelectronics*、1995、10、219～229；Heipel, M.ら、「複合ポリマーフィルムからの薬物の電気放出」、*ACS Symposium Series*、1994、545、79～97）。

10

20

【 0 0 4 4 】

図 4 は、本発明による物質の組成物の概略図である。図 4 によれば、第一、第二、および第三のマトリクス材料切片 4 3 5、4 4 0、4 4 5 内に蛍光標識された抗体 4 3 0 が放出される。第一のマトリクスおよび第二のマトリクス材料切片 4 3 5、4 4 0 は、蛍光標識された抗体 4 3 0 を欠くものであってもよい第一の分離材料 4 5 0 によって分離されている。第二および第三のマトリクス材料切片 4 4 0、4 4 5 は、蛍光標識された抗体 4 3 0 を欠くものであってもよい第二の分離材料 4 5 5 によって分離されている。異なるマトリクス材料切片により、異なる時間で放出される標識材料の「パルス」を提供することができる。特に、バリア溶解後、下にあるマトリクス切片により、標識抗体が短時間で放出され得る。例えば、これを使用して時間の経過とともに抗原発現レベルを測定することができる。さらに、第一、第二、および第三のマトリクス材料切片 4 3 5、4 4 0、4 4 5 は、それぞれ異なる速度の長期放出を提供するための蛍光標識された抗体 4 3 0 の異なる組成物を有してもよい。

30

【 0 0 4 5 】

図 5 は、本発明によるインピボ回路およびシステムの実施形態を示す図である。マトリクス材料 5 3 0 は、例えば図 3 および図 4 に記載されているように組織 5 0 0 中に放出される蛍光標識された抗体を含む。マトリクス材料 5 3 0 を、例えば、図 3 および図 4 に記載されているように蛍光標識された抗体の放出速度を変化させることができる装置 5 8 0 に連結することができる。

40

【 0 0 4 6 】

光学放射源 5 0 5 は、光学放射 5 1 5 を発する高出力発光ダイオードを通る出力電流を提供するための調節入力 A に応答する増幅器を含んでもよい。光学放射 5 1 5 は、生物付着組織 5 7 0 を通過して、蛍光標識された抗体上の蛍光標識を励起することができる。

【 0 0 4 7 】

励起された蛍光標識は、生物付着組織 5 7 0 を通過することができる光学放射 5 2 0 を

50

発生して光学放射検出器 510 に到達する。例えば、光学放射 520 は、光検出器に突き当たる。反応の際、光検出器は電流を発生し、これを光学放射 520 のレベルを示す電圧レベルに変換することができる。本発明によるいくつかの実施形態では、光検出器は光電子増倍管である。光学放射検出器 510 は、バックグラウンドノイズを低減するための吸収フィルターを含み得る。

【0048】

光学放射源 505、光学放射検出器 510、およびマトリクス材料 530 は、プロセッサ回路 525 と連動して操作することができる。プロセッサ回路 525 は、例えば、マトリクス材料 530 を振動させて蛍光標識された抗体の放出速度を変化させる装置 580 の調節によって、マトリクス材料 530 からの蛍光標識された抗体の放出を調節することが

10

【0049】

プロセッサ回路 525 は、光学放射源 505 に入力することができる。プロセッサ回路 525 は、光学放射源 505 からの出力シグナル C をモニタリングして、例えばその出力を決定することができる。他の機能をモニタリングし、そして / または調節することができる。

【0050】

プロセッサ回路 525 は、光学放射検出器 510 からの電圧レベル B を受信して、例えば光学放射 520 の強度を決定することができる。プロセッサにより遠隔測定システム (526) への出力 E を提供することができる。遠隔測定システム 526 は、エキスピボシステムへ / エクスピボシステムから、データを伝達 / 受信することができる (図示せず)。エキスピボシステムは、インピボシステムによる受信のための身体へのシグナル伝達による蛍光標識された抗体の放出を調節することができる。インピボシステムは、エキスピボシステムからのシグナルにตอบสนองして、蛍光標識された抗体を放出することができる。エキスピボシステムから他のシグナルを伝達することができる。いくつかの実施形態では、伝達 / 受信したデータをデジタルでコードする。他のデータ伝達のタイプを使用することができる。

20

【0051】

インピボシステムは、エキスピボシステムにデータを伝達することができる。例えば、インピボシステムは、光学放射 520 の強度に関連するデータを伝達することができる。インピボシステムは、他のデータをエキスピボシステムへ伝達することができる。したがって、インピボで使用するためにインピボシステムを埋め込み、それによりエキスピボシステムは関連する侵入手順を使用することなくインピボシステムからのデータの受信を含むインピボシステムの操作を調節することができる。

30

【0052】

いくつかの実施形態では、移植された組織を介してインピボシステムを遠隔で出力する。例えば、インピボシステムは、エキスピボシステムからの誘導結合出力シグナルを介してインピボシステムに出力を提供するインダクタを含んでもよい。いくつかの実施形態では、インピボシステムの直径は約 2 mm である。

【0053】

上記の本発明の実施形態では、発光ダイオード (LED) またはレーザダイオード (より高い励起強度のため) を励起源として使用することができ、フォトダイオードを使用して対応する発光シグナルを検出することができる。集積発光および吸収フィルターを、必要ならばダイオードエレメント上に誘電性コーティングの形態で導入することができる。発光ダイオードおよび光検出器は、現在市販されている。これらのデバイスは、非常に小型であり、典型的にはレーザダイオードが 100 μm 未満である。当業者に公知の薄膜蒸着および光ファイバーテクノロジーにより、非常に高感度の光学フィルターを構築可能である。

40

【0054】

上記の光学的埋め込み装置用の外部センサパッケージは、約 2 mm \times 10 mm の円柱形

50

であってもよい。この形状は、生検ニードル類似のデバイスと共に使用する場合に被験体に容易に挿入することができる。パッケージサイズおよび結合構造体の標準化により、種々の範囲のコーティング（ダイヤモンド様カーボン（DLC）または種々の組成のガラスおよびプラスチックなど）が可能である。パッケージの内側の部分を使用し、密封して身体の水分および攻撃の影響からデバイスを隔離することができる。

【0055】

いくつかの実施形態では、レーザダイオードを放熱板にあて、回路基板と垂直方向の前方および後方のファセットから発光させる。後方のファセットからの光の強度を、回路基板の反対側に装備した光検出器によって測定することができる。これにより、光強度がフィードバック調節される。前記円柱を分割する光学バリアの片側で、シグナルフォトダイオードは、酸素測定の場合に比で示される戻りの蛍光または吸収シグナルを受信する。光除去フィルターを光検出器上に置いてバックグラウンドノイズを低減することができる。遠隔測定コイル、ドライバー、および他の電子部品は、回路基板のいずれかの側面に配置することができる。

10

【0056】

本明細書中に記載の実施形態は、本発明の実施において潜在的に重要な検討材料であるベースラインを有効に修正することができる。時間の関数としてのダイオードレーザ出力の変化を、標準的なフォトダイオードフィードバック技術の使用によって適応させることができる。挿入前および挿入後の測定を用いて、最初のベースラインを提供することができる。これは、バックグラウンド蛍光および非特異的結合の程度の評価において有用であり得る。パラメータとしての外部発光の影響もまた評価することができる。移植片の寿命は、場合によっては、6ヶ月またはそれ以上であり得る。

20

【0057】

この検出スキームの一つの利点は、センサ外面の物質の付着（「生物付着」）に対して比較的耐性を示し得るという点である。本発明の一つの態様は、層上のどんなものでもセンサ表面をカバーすることにより発光波長および吸収波長を提供する。センサへの標的フルオロフォアの近接が好ましいにもかかわらず、センサ移植部位から離れたシグナルの検出に有意な余地が得られる。本明細書中で考察されるように、一つの実施形態は、時間放出タグ化抗体または事象活性化ハイブリダイゼーション反応を含む。反応速度も評価することができるように、移植センサの継続的なモニタリングが可能である。

30

【0058】

本発明の実施形態では、レンズシステムは存在してもよく、存在しなくてもよいが、検出器は蛍光源付近（例えば、500 μm）に置くことが好ましい。この方法では、検出器は画面であってもよい。あるいは、センサは非画像処理であってもよいので、これを蛍光シグナルの有無についての二進法検出器として使用することができる。

【0059】

上記で開示のように、本発明の実施形態によれば、蛍光標識された抗体を腫瘍細胞に関連する抗原に連結することができる。光学放射源を使用して、抗原に連結した蛍光標識された抗体を励起することができる。蛍光標識された抗体は、励起にตอบสนองして光学放射を発する。センサを使用して、蛍光標識された抗体によって発せられた光学放射レベルを検出することができる。光学放射レベルを使用して、組織表面に存在する抗原の濃度を決定することができる。次いで、抗原濃度を、組織の増殖状態または成長挙動に相関させることができる。図面および明細書では、本発明の典型的な好ましい実施形態および方法を開示している。特定の用語を使用しているが、これらは一般的な意味および説明の意味でのみ使用しており、特許請求の範囲に記載されている本発明の範囲を制限することを目的としない。

40

【図面の簡単な説明】**【0060】**

【図1】 図1は本発明による実施形態の概略図である。

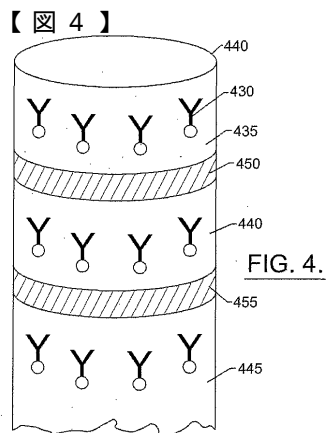
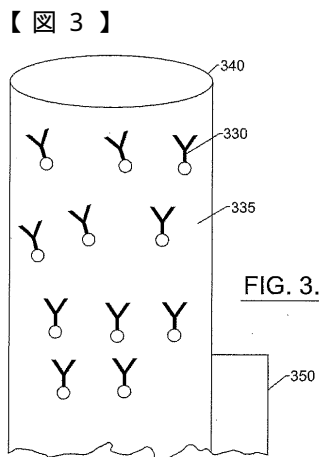
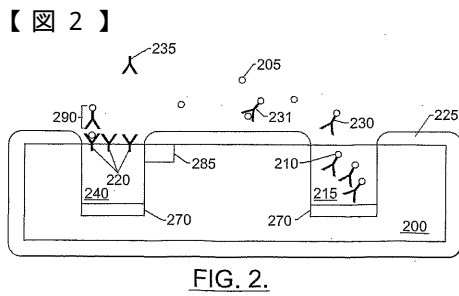
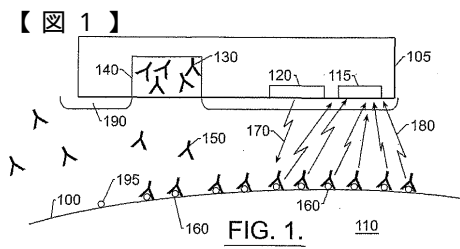
【図2】 図2は本発明による実施形態の概略図である。

50

【図3】図3は本発明による物質のマトリクス組成物の概略図である。

【図4】図4は本発明による物質のマトリクス組成物の概略図である。

【図5】図5は本発明による実施形態を例示する回路図である。



【 5 】

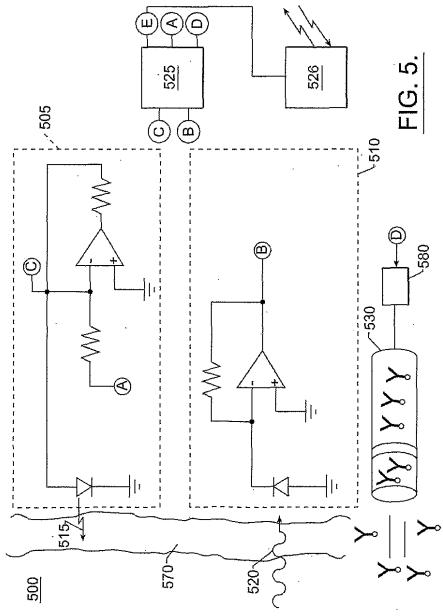


FIG. 5.

フロントページの続き

(72)発明者 ブラック, ロバート・ディー
アメリカ合衆国ノースカロライナ州27514, チャペル・ヒル, コナー・ドライブ 203-8

審査官 上田 正樹

(56)参考文献 特表2000-506410(JP, A)
特表平06-503979(JP, A)
特表平07-507472(JP, A)
特開平09-309845(JP, A)
特開平09-308604(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61B 10/00

A61B 5/07