

(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)
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 Z N A A	4 B O 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B O 2 9
G O 1 N 33/545 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
G O 1 N 33/547 (2006.01)	G O 1 N 33/545 A	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	G O 1 N 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 W02014/093934
 (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 943
 01, 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
 ユート
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92
 037, 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。

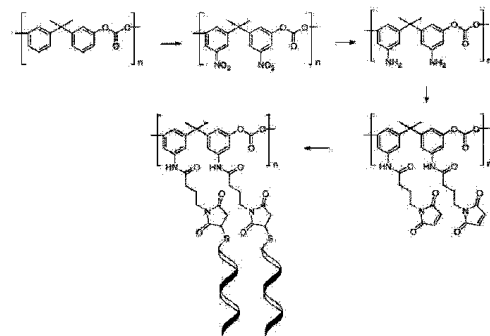


FIGURE 1

【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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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。

50

- 【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。 10
- 【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。 20
- 【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。 30
- 【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。 40
- 【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】 50

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 3 4 に記載のデバイス。

【請求項 3 6】

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 3 4 に記載のデバイス。

【請求項 3 7】

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 2 0 に記載のデバイス。

【請求項 3 8】

*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を増幅および同定するための区画をさらに含む、請求項 2 0 に記載のデバイス。

10

【請求項 3 9】

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 4 0】

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を検出すると増大する、請求項 3 9 に記載のデバイス。

【請求項 4 1】

20

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を検出すると低下する、請求項 3 9 に記載のデバイス。

【請求項 4 2】

前記バイオマーカが、ポリヌクレオチドであり、前記プローブが、前記バイオマーカと相補的なポリヌクレオチドである、請求項 3 9 に記載のデバイス。

【請求項 4 3】

前記プローブが、同じバイオマーカ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 4 2 に記載のデバイス。

【請求項 4 4】

前記バイオマーカが、ペプチドまたはポリペプチドであり、前記プローブが、前記バイオマーカに特異的な抗体である、請求項 3 9 に記載のデバイス。

30

【請求項 4 5】

前記プローブが、同じバイオマーカ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 4 4 に記載のデバイス。

【請求項 4 6】

複数の異なるバイオマーカ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 3 9 に記載のデバイス。

【請求項 4 7】

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 3 9 に記載のデバイス。

40

【請求項 4 8】

特異的なバイオマーカに対する、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 3 9 に記載のデバイス。

【請求項 4 9】

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 3 9 に記載のデバイス。

【請求項 5 0】

前記マイクロニードルが、ポリマーを含む、請求項 4 9 に記載のデバイス。

【請求項 5 1】

50

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。 10

【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。 20

【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。 30

【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】 40

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 50

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。

10

20

30

40

50

- 【請求項 8 3】
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 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 8 4】
前記マイクロニードルが、ポリマーを含む、請求項 8 3 に記載の方法。
- 【請求項 8 5】
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 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 8 6】
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 8 5 に記載の方法 10
- 【請求項 8 7】
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 8 5 に記載の方法。
- 【請求項 8 8】
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 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 8 9】
前記検出可能な標識が、フルオロフォアである、請求項 8 8 に記載の方法。
- 【請求項 9 0】
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 7 5 に記載の方法。 20
- 【請求項 9 1】
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 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 9 2】
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 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 9 3】
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 7 5 に記載の方法。 30
- 【請求項 9 4】
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を含む方法。 40
- 【請求項 9 5】
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 9 4 に記載の方法。
- 【請求項 9 6】
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 9 5 に記載の方法。
- 【請求項 9 7】
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 9 4 に記載の方法。
- 【請求項 9 8】 50

前記プローブが、同じバイオマーカ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 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 9】

複数の異なるバイオマーカ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 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

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 9 9 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

特異的なバイオマーカに対する、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 9 4 に記載の方法。

10

【請求項 1 0 2】

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 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

前記マイクロニードルが、ポリマーを含む、請求項 1 0 2 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

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 9 4 に記載の方法。

20

【請求項 1 0 5】

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 1 0 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

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 1 0 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

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 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 8】

前記検出することが、前記 1 または複数のバイオマーカを、検出可能な標識と接触させることを含む、請求項 9 4 に記載の方法。

30

【請求項 1 0 9】

前記検出可能な標識が、フルオロフォアである、請求項 1 0 8 に記載の方法。

【請求項 1 1 0】

前記検出することが、前記バイオマーカを増幅することを含む、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 1 1】

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が、ポリメラーゼ連鎖反応により検出される、請求項 9 4 に記載の方法。

40

【請求項 1 1 2】

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 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

前記バイオマーカが、低分子または代謝産物であり、前記プローブが、前記バイオマーカに特異的なリガンドである、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

前記 1 または複数のバイオマーカが、皮膚の状態と関連する、請求項 9 4 に記載の方法。

50

【請求項 1 1 5】

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 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

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 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

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 1 1 8】

前記作用物質が、酵素である、請求項 1 1 7 に記載の組成物。

【請求項 1 1 9】

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 1 1 7 に記載の組成物。

【請求項 1 2 0】

前記酵素が、ヒアルロニダーゼである、請求項 1 1 7 に記載の組成物。

【請求項 1 2 1】

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を含む方法。

【請求項 1 2 2】

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 1 2 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

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 1 2 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記細胞外マトリックスを、電位により破壊する、請求項 1 2 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

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を含む方法。

【請求項 1 2 6】

前記細胞膜を、酵素活性により破壊する、請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

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 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記細胞膜を、電位により破壊する、請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

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

10

20

30

40

50

を含む方法。

【請求項 1 3 0】

前記無機塩が、塩化ナトリウムである、請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記無機塩の濃度が、2 . 5 M 未満である、請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

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 1 3 3】

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係る、請求項 1 3 2 に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記バイオマーカーが、ポリヌクレオチドである、請求項 1 3 2 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

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 1 3 2 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

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 1 3 7】

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 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

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 1 3 9】

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 1 3 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 0】

前記被験体の前記組織が、良性組織を含む、請求項 1 3 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

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 1 3 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

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 1 3 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

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 1 3 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

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 1 3 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

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 1 3 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

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 7 5、9 4、1 2 1、1 2 5、1 2 9、1 3 2、1 3 6、または 1 3 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

前記ポリマーが、熱可塑性ポリマーである、請求項 1 4 に記載のデバイス。

【請求項 1 4 8】

10

20

30

40

50

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。

10

20

30

40

50

【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。

10

【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。

20

【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ず。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。

30

【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。

40

【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

50

マーカ-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-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-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-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-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-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-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-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-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-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-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-の異なるエピトープに特異的な異なる抗体を含む。

10

【0014】

本発明のデバイスは、複数の異なるバイオマーカ-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-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。

20

【0015】

代替的に、バイオマーカ-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-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む。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-を検出すると変化しうる。

30

【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-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-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-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-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-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-を検出することと、を含む方法を提示する。

40

【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-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-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-を検出

50

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、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む。

【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む。代替的に、方法は、細胞膜を破壊することも含む。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む。

【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】

10

20

30

40

50

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、2.5 M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む。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む。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む。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む。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

10

20

30

40

50

る。無機塩は、約 0.1 M ~ 2.0 M の間の濃度で添加しうる。さらに、無機塩は、約 0.5 M ~ 1.5 M 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む。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む。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む。

10

【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。

20

【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 - amylase)、DNA 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。

30

【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。

40

【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

50

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、 $50\ \mu\text{m} \sim 5\ \text{mm}$ 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

【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

10

20

30

40

50

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】

本明細書に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、本明細書に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。本明細書に記載される通り、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

10

20

30

40

50

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。

10

20

30

40

50

【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る、合成により作製されるのであり、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依りて、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―または解析物を含む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。

10

【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 $\pm 15\%$ 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。

20

【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、結合、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、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。

30

【0065】

バイオマーカ―

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―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―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―を使用して、いかにして薬物が体内で働くのが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―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。

40

【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―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―またはバイオマーカ―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

50

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HbA1c）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。

10

【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シクターゼ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。

20

30

40

【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

50

ーカーまたはタンパク質バイオマーカ-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-またはタンパク質バイオマーカ-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-またはタンパク質バイオマーカ-の具体例は、前立腺がんについてのバイオマーカ-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-としてのがん抗原125 (CA125) (Jacobson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-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-としての - 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-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-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-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-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-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-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-および核酸マーカ-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-またはタンパク質マーカ-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-アッセイ法以外に、メタボロミクス法、リポミクス法、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-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-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、20 μm ~ 1 mmの範囲、好ましくは、50 μm ~ 500 μm 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400 μm ～約1000 μm 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20 μm ～約50 μm 、約20 μm ～約100 μm 、約20 μm ～約150 μm 、約20 μm ～約200 μm 、約20 μm ～約250 μm 、約20 μm ～約300 μm 、約20 μm ～約350 μm 、約20 μm ～約400 μm 、約20 μm ～約450 μm 、約20 μm ～約500 μm 、約20 μm ～約550 μm 、約20 μm ～約600 μm 、約20 μm ～約650 μm 、約20 μm ～約700 μm 、約20 μm ～約750 μm 、約20 μm ～約800 μm 、約20 μm ～約850 μm 、約20 μm ～約900 μm 、約20 μm ～約950 μm 、または約20 μm ～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、1 μm 未満、5 μm 未満、10 μm 未満、15 μm 未満、20 μm 未満、25 μm 未満、30 μm 未満、35 μm 未満、40 μm 未満、45 μm 未満、50 μm 未満、75 μm 未満、100 μm 未満、150 μm 未満、200 μm 未満、250 μm 未満、300 μm 未満、500 μm 未満、750 μm 未満、1000 μm 未満、2000 μm 未満、3000 μm 未満、4000 μm 未満、5000 μm 未満、7500 μm 未満、または10000 μm 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、1 μm を超える、5 μm を超える、10 μm を超える、15 μm を超える、20 μm を超える、25 μm を超える、30 μm を超える、35 μm を超える、40 μm を超える、45 μm を超える、50 μm を超える、75 μm を超える、100 μm を超える、150 μm を超える、200 μm を超える、250 μm を超える、300 μm を超える、500 μm を超える、750 μm を超える、1000 μm を超える、2000 μm を超える、3000 μm を超える、4000 μm を超える、5000 μm を超える、7500 μm を超える、または10000 μm を超える。

10

20

30

40

50

【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10 μm ～500 μm の範囲内であり、好ましくは20 μm ～200 μm 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

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-c-o-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-vinyl 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(-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。

10

【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。

20

【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、1000 μm未満、900 μm未満、800 μm未満、700 μm未満、600 μm未満、500 μm未満、400 μm未満、300 μm未満、200 μm未満、または100 μm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、100 μm以下、200 μm以下、300 μm以下、400 μm以下、500 μm以下、600 μm以下、700 μm以下、800 μm以下、900 μm以下、または1000 μm以下でありうる。

30

【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、500 μm以下、400 μm以下、300 μm以下、200 μm以下、100 μm以下、50 μm以下、40 μm以下、30 μm以下、20 μm以下、10 μm以下、1000 nm以下、900 nm以下、800 nm以下、700 nm以下、600 nm以下、500 nm以下、400 nm以下、300 nm以下、200 nm以下、または100 nm以下でありうる。

40

【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600 μmとし、幅を200 μmとするマイクロニードルを例示する。404は、高さを600 μmとし、幅を200 μmとするマイクロニードルおよび10 μm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600 μmとし、幅を200 μmとする

50

マイクロニードルおよび500 μm 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10 μm 、約20 μm 、約30 μm 、約40 μm 、約50 μm 、約60 μm 、約70 μm 、約80 μm 、約90 μm 、約100 μm 、約110 μm 、約120 μm 、約130 μm 、約140 μm 、約150 μm 、約160 μm 、約170 μm 、約180 μm 、約190 μm 、約200 μm 、約210 μm 、約220 μm 、約230 μm 、約240 μm 、約250 μm 、約260 μm 、約270 μm 、約280 μm 、約290 μm 、約300 μm 、約310 μm 、約320 μm 、約330 μm 、約340 μm 、約350 μm 、約360 μm 、約370 μm 、約380 μm 、約390 μm 、約400 μm 、約410 μm 、約420 μm 、約430 μm 、約440 μm 、約450 μm 、約460 μm 、約470 μm 、約480 μm 、約490 μm 、約500 μm 、約510 μm 、約520 μm 、約530 μm 、約540 μm 、約550 μm 、約560 μm 、約570 μm 、約580 μm 、約590 μm 、約600 μm 、約610 μm 、約620 μm 、約630 μm 、約640 μm 、約650 μm 、約660 μm 、約670 μm 、約680 μm 、約690 μm 、約700 μm 、約710 μm 、約720 μm 、約730 μm 、約740 μm 、約750 μm 、約760 μm 、約770 μm 、約780 μm 、約790 μm 、約800 μm 、約810 μm 、約820 μm 、約830 μm 、約840 μm 、約850 μm 、約860 μm 、約870 μm 、約880 μm 、約890 μm 、約900 μm 、約910 μm 、約920 μm 、約930 μm 、約940 μm 、約950 μm 、約960 μm 、約970 μm 、約980 μm 、約990 μm 、または約1000 μm 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ションユニットを加えて含有しうる。アプリケーションユニットは、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、アプリケーションは、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、アプリケーションは、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プレイツールでありうる。適切なアプリケーション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(Delmorre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。アプリケーションユニットは、複数の異なる形状を有しうる。いくつかの実施形態では、アプリケーションユニットは、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、アプリケーションユニットは、ペンアプリケーションである。

【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、マイクロプロトジェクシ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

10

20

30

40

50

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、糞の目切り処理、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 (*hyaluronidase*) 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、極低温粉砕、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む。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クセ

プローブとコンジュゲートさせたマイクロニードル

10

20

30

40

50

【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

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。

10

【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という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。

20

30

【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、皮膚がんに関連した抗原の第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。

40

【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%、

50

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。

10

20

30

40

50

【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、本明細書に記載される通り、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

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、蛍光標識プロブまたは異なる光学シグナルを発するプロブにより、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。

10

【0106】

本明細書に記載されるマイクロニードルデバイスは、任意の数のプロブを含むことが可能であり、プロブは、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ブの総数は、約1プロブ～約1,000プロブ、約1プロブ～約10,000プロブ、約1プロブ～約100,000プロブ、約1プロブ～約1,000,000プロブ、約1プロブ～約10,000,000プロブ、約1プロブ～約100,000,000プロブ、約1プロブ～約1,000,000,000プロブ、約1プロブ～約10,000,000,000プロブ、約1プロブ～約100,000,000,000プロブ、約1プロブ～約1,000,000,000,000プロブ、約1プロブ～約10,000,000,000,000プロブ、約1プロブ～約100,000,000,000,000プロブ、約1プロブ～約1,000,000,000,000,000プロブ、約1プロブ～約10,000,000,000,000,000プロブ、約1プロブ～約100,000,000,000,000,000プロブ、または約10,000,000,000,000,000,000プロブでありうる。

20

30

【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100000、約200000、約300000、約400000、約500000、約600000、約700000、約800000、約900000、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、

40

50

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 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-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-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

10

20

30

40

50

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4
 1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、同じバイオマーカに特異的な場合もあり、異なるバイオマーカに特
 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2
 00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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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

10

20

30

40

50

、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、本明細書に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に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., *Biotecniques* 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., *Biochem. J.* 278:735-7

10

20

30

40

50

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 WO 00/22108 号、第 WO 01/75447 号および第 WO 02/12891 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 0.1 M ~ 2.0 M、約 0.2 M ~ 2.0 M、約 0.2 M ~ 1.5 M、または約 0.5 M ~ 1.5 M 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 0.1 M 未満、約 0.2 M 未満、約 0.2 M 未満、約 0.3 M 未満、約 0.4 M 未満、約 0.5 M 未満、約 1.0 M 未満、約 1.1 M 未満、約 1.2 M 未満、約 1.3 M 未満、約 1.4 M 未満、約 1.5 M 未満、約 1.6 M 未満、約 1.7 M 未満、約 1.8 M 未満、約 1.9 M 未満、約 2.0 M 未満、約 2.5 M 未満、約 3.0 M 未満、約 3.5 M 未満、約 4.0 M 未満、または約 4.5 M 未満である。いくつかの場合には、無機塩の濃度は、約 0.1 M を超える、約 0.2 M を超える、約 0.2 M を超える、約 0.3 M を超える、約 0.4 M を超える、約 0.5 M を超える、約 1.0 M を超える、約 1.1 M を超える、約 1.2 M を超える、約 1.3 M を超える、約 1.4 M を超える、約 1.5 M を超える、約 1.6 M を超える、約 1.7 M を超える、約 1.8 M を超える、約 1.9 M を超える、約 2.0 M を超える、約 2.5 M を超える、約 3.0 M を超える、約 3.5 M を超える、約 4.0 M を超える、または約 4.5 M 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、pH 6 ~ 8、1 ~ 20 mM 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。

10

【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. Natl. 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、シーケンシング解析、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。

20

30

【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ットィングされる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。

40

【0120】

50

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、鋳型として的一本鎖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、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、本明細書に記載される、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

10

20

30

40

50

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。

10

【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。

20

【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）；Maggiola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。

30

40

【0128】

50

プローブとバイオマーカ-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 E L I S A」を使用して、バイオマーカ-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-のプローブへの結合は、バイオマーカ-の異なるエピト-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、I g G 抗体 (I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4 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、I g A、I g M 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-トさせることができる。酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) 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-への結合を検出することができる。

10

【 0 1 2 9 】

タンパク質バイオマーカ-およびペプチドバイオマーカ-はまた、タンパク質 P C R 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-を検出するのに適する 1 つのアッセイは、P C R - E L I S A プロトコ-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-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、P C R 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-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-トさせたタグにつ

20

【 0 1 3 0 】

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-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-の検出、およびタンパク質バイオマーカ-またはペプチドバイオマーカ-の検出を含む。例として述べると、デバイスは、C M M 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 (C M M) 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、C M M 特異的バイオマーカ-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-トさせたマイクロニ-ードルのうちの 1 または複数を含むデバイスを、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-を、*i n s i t u* 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。

30

【 0 1 3 1 】

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-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-トさせた、異なる長さのマイクロニ-ードルを含む。腫瘍特異的バイオマーカ-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-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。

40

【 0 1 3 2 】

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む。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-ス皮膚がんなどの皮膚がん ; オンコセルカ症 ; ル-プス ; 麻疹 (はしか

50

) ; 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 ; 癬 ; 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 ; 癩風 ; 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。

【 0 1 3 3 】

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む。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 (R P) ; 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 ; 視神経萎縮 ; 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。

【 0 1 3 4 】

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。

【 0 1 3 5 】

本発明の診断適用のさらなる例として述べると、本明細書に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、*i n s i t u*
 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

10

20

30

40

50

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する。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する。

【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-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-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；筋萎縮性側索硬化症（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；ポネビー-ウルリッヒ症候群；脳疾患；フォンヒッペル-リンドウ病；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連鎖球脊髄性筋萎縮症；学習障害；リ-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-ピック病；ヌーナン症候群；骨脆弱症；ポイツ-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；脊髄性筋萎縮症；トリ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。

10

20

【0137】

いくつかの場合には、本発明のプロブを使用して、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、ウスコット-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-B 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。

30

【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、複数のがんに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、パーキットリンパ腫、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、カボジ肉腫、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、

40

50

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、非小細胞肺癌、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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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) DNア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

50

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む。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む。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む。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。

10

20

30

40

50

【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；H I V；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リ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V Xなどの神経剤；B Zなどの幻覚剤；パラチオン、馬拉チオン、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體または組合せを含む。

【0148】

本発明は、本明細書に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む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、本明細書に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、本明細書に記載されるデバイスと、E L I S A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、カボジ肉腫、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S N P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

10

20

30

40

50

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、および治療は、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、および副作用を評価することができる。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、薬理的処置に対する、バイオマーカの応答を同定することができる。

10

【0153】

動物モデルは、さらなる査定のために、薬理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価される化合物の選択をもたらしうる。

20

【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、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を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。

30

【0155】

本開示のデバイスは、臨床試験プロトコ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、バイオマーカレベルを検出し、薬理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るバイオマーカを同定し、定量化する方法を提示する。

40

【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など、バイオマーカ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価される処置を、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】

50

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
 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、臨床試験期間を通じた、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) 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 $C_{ss} = D / V_d$] 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 . (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_{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】

$$f = \frac{AUC_{po,Div}}{AUC_{iv,Dpo}}$$

] 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) % P
 TF = 100 ×

【数4】

$$\frac{(C_{max,ss} - C_{min,ss})}{C_{av,ss}}$$

[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。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 0 】

(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。

【 0 1 6 1 】

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。

10

【 0 1 6 2 】

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)。

20

【 0 1 6 3 】

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。

30

【 0 1 6 4 】

【 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

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

40

【 0 1 6 5 】

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。

【 0 1 6 6 】

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

50

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。

10

【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。

20

【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'-CAAGTTTGCCCTTTAGCGTCAGACTGTATTTTTTTT/T/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。

30

【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、緑色チャン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)。

40

【0171】

50

【 0 1 7 8 】

(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。

10

【 0 1 7 9 】

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 °C）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。

20

【 0 1 8 0 】

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。

30

【 0 1 8 1 】

(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 °C 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

40

50

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ていることも示す。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、パバイン、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。

10

【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、RNA Later（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-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-アクチンプローブへとカップリングさせ、その後適切なベータ-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-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。

20

30

【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

40

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、250 μg/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（20 μLの水中に5 μL）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3 μL、25 mMのMgCl₂ 6 μL、0.1 MのDTT 3 μL、1.5 μLのRNase OUT（商標）、13 μLのDEPC水、10 mMのdNTPミックス2 μL）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、1.5 μLのSuperScript II（商標）

50

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(1.5 μL)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(1.5 μL)、および2倍濃度のTaqMan(商標)遺伝子発現ミックス(15 μL)を使用して、TaqMan(商標)PCR増幅を行った。反応物の総容量は、30 μLであった。4サイクルの後、5 μL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。

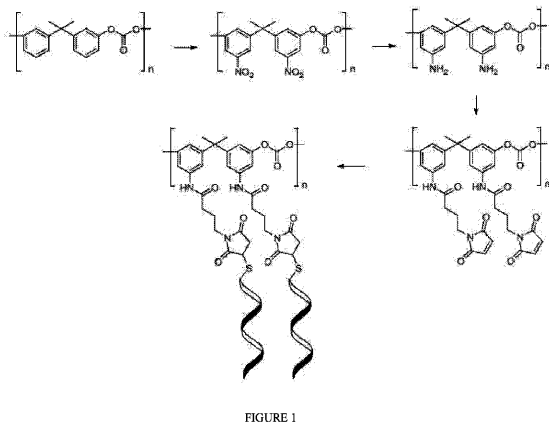
【0185】

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る。

【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。

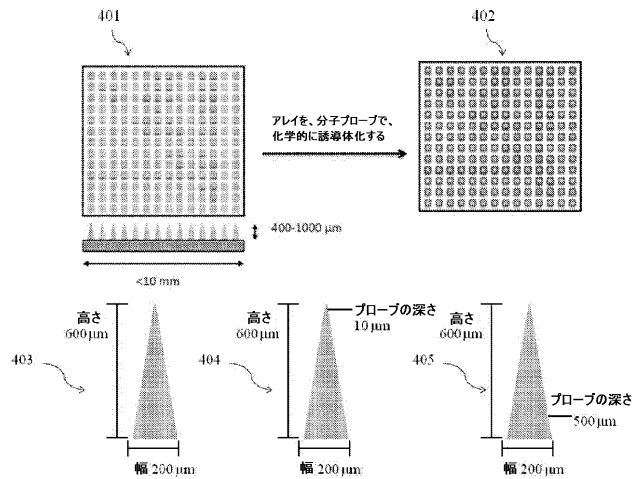
【図1】

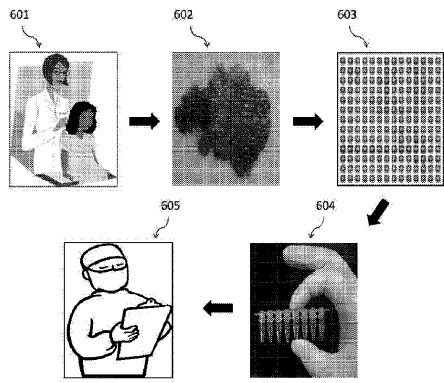


【図2】



【図4】





【 図 7 】

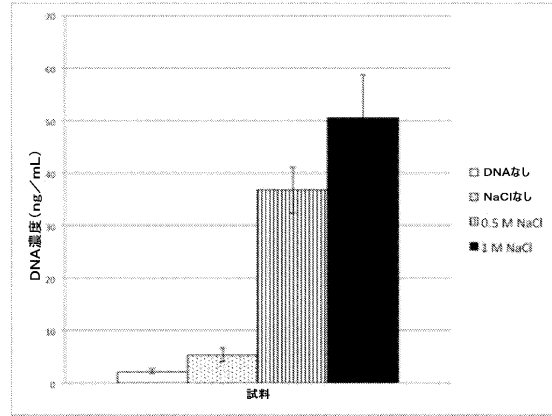


FIGURE 7

【 図 8 】

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

FIGURE 8

【 図 3 】

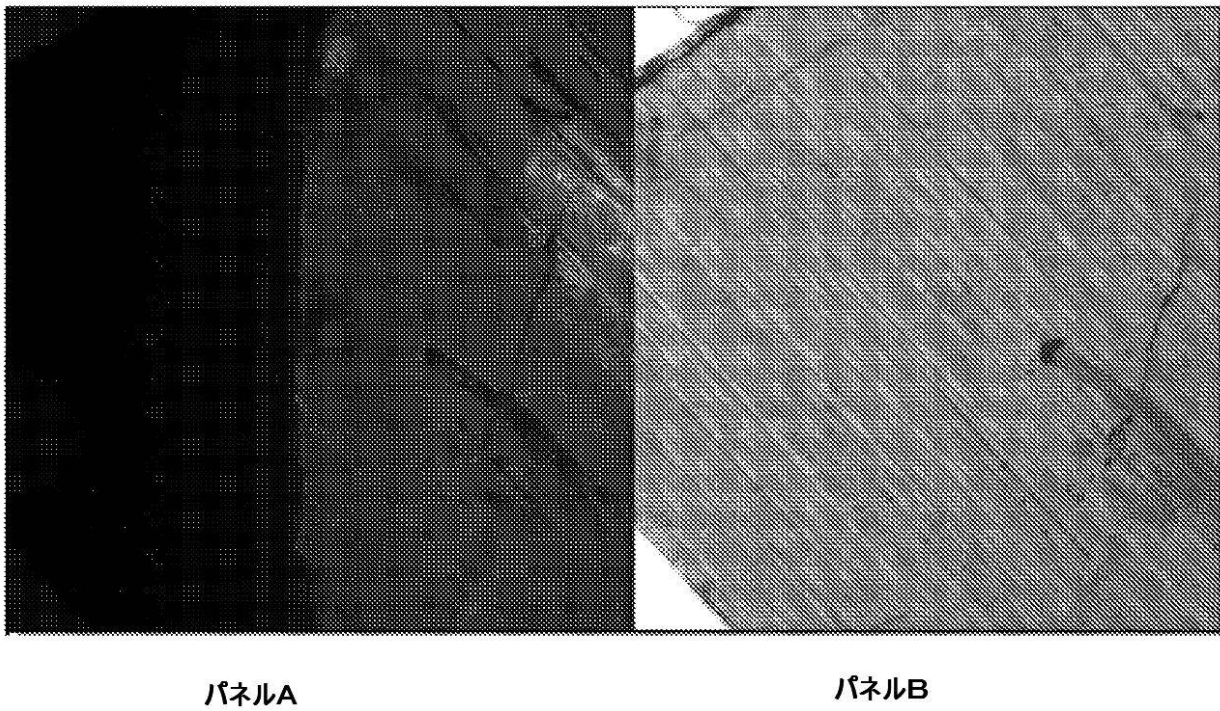


FIGURE 3

【 図 5 】

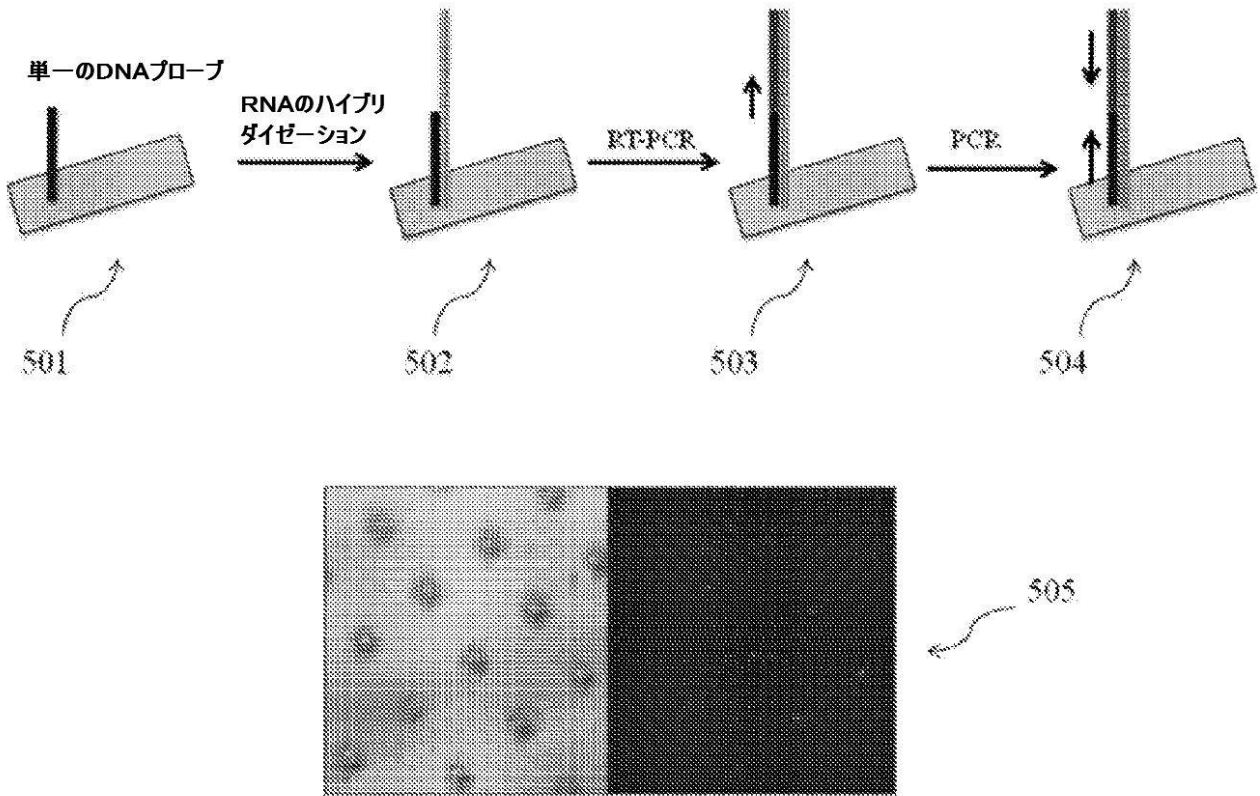


FIGURE 5

【 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 69/022 (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 2011/180069 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
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 April 2014		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">09 MAY 2014</div>
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 comprising 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 comprising 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)
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
		C 1 2 N	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, T M), 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, R S, 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, H R, 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. T E F L O N

(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 9 4 0 1 0, パーリンゲーム, バルボア アベニュー 1
3 2 4

(72)発明者 ディッカーソン, トピン ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ペイナード ウェイ 6 4 9
5

(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 9 4 1 0 9, サンフランシスコ, カリフォルニア ストリ
ート 1 6 3 0, アpartment 6 0 6

(72)発明者 チャベック, ペテル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 3 0, サンディエゴ, マーキュリオ ストリート
4 5 3 2

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

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2016509471A5	公开(公告)日	2017-02-02
申请号	JP2015548022	申请日	2013-12-13
[标]申请(专利权)人(译)	マインデラコーポレイション 斯克里普斯研究学院		
申请(专利权)人(译)	Maindera公司 斯克里普斯研究所		
[标]发明人	マフムードタヒルエー ディッカーソントビンジェイ マフムードナデイルエー チャベックペテル		
发明人	マフムード, タヒル エー. ディッカーソン, トビン ジェイ. マフムード, ナデイル エー. チャベック, ペテル		
IPC分类号	C12M1/00 G01N33/53 G01N33/545 G01N33/547 C12Q1/68 C12N15/09		
CPC分类号	A61B5/14514 A61B5/1468 A61B5/150015 A61B5/150022 A61B5/150984 A61B5/685 A61B10/0045 A61B10/0233 A61B2010/008 A61B2562/046 A61K9/0021 C12Q1/6806 C12Q1/6837 C12Q1/6841 C12Q2531/113 C12Q2565/501 C12Q2565/607 C12Q2565/629 C12Q2543/101 A61B5/14503 C12Q1 /6876 C12Q2600/16 G01N1/08		
FI分类号	C12M1/00.ZNA.A G01N33/53.M G01N33/53.D G01N33/545.A G01N33/547 C12Q1/68.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/AA09 4B029 /AA21 4B029/AA23 4B029/BB11 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/FA12 4B029/FA15 4B029/GA08 4B029/GB05 4B029/GB10 4B029/HA01 4B029/HA10 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063 /QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ58 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/737237 2012-12-14 US		
其他公开文献	JP2016509471A		

摘要(译)

本发明提供了用于从受试者原位检测和捕获分子生物标志物的装置和方法。具体而言，该装置包含微针阵列，该微针阵列具有对一种或多种感兴趣的生物标志物具有特异性的探针。该设备可以直接用于受试者（例如，通过皮肤穿刺）以检测受试者体内的生物标记（例如，组织，血流）。一种包括第一微针的装置，其中所述第一微针通过共价键或非共价键连接至对所述第一生物标记物特异性的第一探针。

