

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4179876号
(P4179876)

(45) 発行日 平成20年11月12日(2008.11.12)

(24) 登録日 平成20年9月5日(2008.9.5)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	M
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/15 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/15	Z
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/50	Z

請求項の数 31 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-544663 (P2002-544663)	(73) 特許権者	503191162
(86) (22) 出願日	平成13年11月27日(2001.11.27)		インテリジェント メディカル デバイ
(65) 公表番号	特表2005-509127 (P2005-509127A)		シーズ エル. エル. シー.
(43) 公表日	平成17年4月7日(2005.4.7)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケ
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/044868		ンブリッジ チャールズ ストリート 5
(87) 国際公開番号	W02002/042775		8
(87) 国際公開日	平成14年5月30日(2002.5.30)	(74) 代理人	100062007
審査請求日	平成16年7月30日(2004.7.30)		弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	60/253, 284	(74) 代理人	100114188
(32) 優先日	平成12年11月27日(2000.11.27)		弁理士 小野 誠
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100119253
(31) 優先権主張番号	60/287, 994		弁理士 金山 賢教
(32) 優先日	平成13年5月1日(2001.5.1)	(74) 代理人	100103920
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 大崎 勝真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 臨床的にインテリジェントな診断装置および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体によって示される1つ以上の医学的**症状の原因を検出するための指標を得る方法**であって、

(a) 被験体から入手された生物試料を準備する段階と、
 (b) 異なるプローブのアレイまたは異なるプローブセットのアレイを入手する段階であって、各プローブまたは各プローブセットが、1つ以上の医学的**症状の異なる既知の原因と関連する標的と選択的に相互作用し、プローブまたはプローブセットが、医学的**症状に特異的に群状に集成されており、全てのプローブが、同一条件下においてそれぞれの標的と選択的に相互作用し、アレイが少なくとも****

(i) 第1標的を対象とする第1プローブまたは第1プローブセットであり、第1標的は1または2以上の医学的**症状の原因として既知の1または2以上の感染性原因に対する1または2以上のマーカーよりなるもの**；および

(ii) 第2標的を対象とする第2プローブまたは第2プローブセットであり、第2標的は1または2以上の医学的**症状の原因として全て既知である、被験体の1または2以上の遺伝子マーカー、または、1または2以上の生物学的または化学的分子よりなるもの、を含み、**

(c) 全てのプローブを生物試料中の任意の標的と選択的に相互作用させられる条件下において、アレイ中のプローブに生物試料を適用する段階と、

(d) 相互作用を検出する段階とを含む、前記方法。

【請求項 2】

プローブのアレイまたはプローブセットのアレイが平坦な基材上に整列されている、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

各標的が核酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、抗原、有機小分子、無機分子、酵素または多糖である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

プローブのアレイが核酸プローブおよびポリペプチドプローブを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

アレイ中の全てのプローブがポリペプチドである、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 6】

プローブが抗体、抗原、酵素、ジンクフィンガー結合タンパク質、副溝結合物質、転写因子、それらの組み合わせまたはそれらのキメラである、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

被験体が植物または動物である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

被験体がヒトである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

被験体が死亡している、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 10】

アレイが 4 以上の異なるプローブまたはプローブセットを含み、各プローブまたはプローブセットは異なる標的を対象とし、異なる第 1 および第 2 標的が少なくともウィルス・マーカー、細菌マーカー、生物学的分子および被験体の遺伝的マーカーを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

生物試料が血液、脳脊髄液、細胞培養物、尿、汗、口腔内スワブ、組織生検または吸引試料である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

共有結合または非共有結合を使用して、プローブを基材に結合する、請求項 2 記載の方法。

30

【請求項 13】

アミド結合またはチオール結合を使用して、プローブを基材に結合する、請求項 2 記載の方法。

【請求項 14】

プローブが、遺伝的に改変された細胞表面上で発現される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 15】

プローブが、特異的に標的と結合することによって、標的と選択的に相互作用して複合体を形成する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 16】

第 1 のプローブが、細菌、ウィルスまたは真菌によって生じる感染性疾患に関連する標的と選択的に相互作用し、第 2 の異なるプローブが、遺伝的原因に関連する標的と選択的に相互作用する、請求項 1 記載の方法。

40

【請求項 17】

プローブのアレイが、1 つ以上の医学的症状の原因が存在しないことをアッセイするプローブを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 18】

全てのプローブが、同一条件下においてそれぞれの標的と選択的に相互作用する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 19】

50

プローブのアレイが核酸プローブを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 0】

アレイ中の全プローブが核酸プローブである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 1】

アレイが第 3 標的を対象とする第 3 プローブまたは第 3 プローブセットを更に含み、第 3 標的が、被験体または第 1 標的ないし両者の治療最適化因子マーカを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 2】

生物学的または化学的分子が、癌マーカ、血管マーカ、炎症マーカ、内分泌マーカ、代謝マーカまたは自己免疫マーカである、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 2 3】

生物学的または化学的分子が、イムノグロブリン、自己抗原または抗原である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 4】

生物学的または化学的分子が、毒物、薬物、小有機または無機分子である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 5】

感染性原因が、ウイルス、細菌、真菌または病原性植物である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 6】

1 または 2 以上の医学的症状の原因に対する被験体の感受性の指標を得ることを更に含む請求項 1 記載の方法であって、アレイが第 3 標的を対象とする第 3 プローブまたは第 3 プローブセットを更に含み、第 3 標的が、1 または 2 以上の医学的症状の原因に対する被験体の感受性と関連する 1 または 2 以上の遺伝子マーカまたはタンパク質を含む、前記方法。

20

【請求項 2 7】

1 または 2 以上の医学的症状の原因の処置に対して 1 または 2 以上の治療剤の適切性を評価することを更に含む請求項 1 記載の方法であって、アレイが第 3 標的を対象とする第 3 プローブまたは第 3 プローブセットを更に含み、第 3 標的が 1 または 2 以上の治療最適化因子に対する 1 または 2 以上のマーカを含む、前記方法。

【請求項 2 8】

第 3 標的が、(i) 2 以上の第 1 標的、(i i) 2 以上の第 2 標的、または (i i i) 各第 1 および 2 標的の 1 または 2 以上に対する 1 または 2 以上の治療最適化因子マーカを含む、請求項 2 7 記載の方法。

30

【請求項 2 9】

1 または 2 以上の医学的症状の原因を処置するために 1 または 2 以上の治療剤の適切性を評価することを更に含む請求項 2 6 記載の方法であって、アレイが第 4 標的を対象とする第 4 プローブまたは第 4 プローブセットを更に含み、第 4 標的が 1 または 2 以上の治療最適化因子マーカを含む、前記方法。

【請求項 3 0】

プローブのアレイが核酸プローブを含む、請求項 2 7 記載の方法。

40

【請求項 3 1】

アレイ中の全プローブが核酸プローブである、請求項 2 7 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本願は、全て全体の内容が参照として本明細書に組み入れられる、2000年11月27日提出の米国特許仮出願第60/253,284号、2001年5月1日提出の同第60/287,994号および2001年7月30日提出の同第60/308,870号の優先権を主張するものである。

【0 0 0 2】

50

技術分野

本発明は医学的な診断に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

患者は、不快を経験しているとき医師の助言を求めるのは一般的である。しかし、患者は、すでに下されている診断を医師に提示することはめったになく、その代わりに、1つ以上の症状を提示する。選択肢（仮説）のリストから最も可能性の高い診断を選択することは鑑別診断と呼ばれる過程である。ある種の徴候または症状は特定の疾患の病因を示唆しうる。しかし、患者は、困惑させられている臨床症状を医師に提示するのが典型的であり、症状だけに基づいた診断を非常に困難にしている。医師は、数多くの主な病因のどれが、患者が経験している不快の原因となっているかを判定する困難な仕事をしなければならない。これはまた、特定の診断の選択は治療計画および療法と密接に関係するので重要である。症状により、医師は病歴、理学的検査および最も重要なものとして、症状の説明を示唆する臨床所見を同定する診断試験により情報を収集する。

10

【0004】

従って、臨床検査室および治療現場（point-of-care）（POC）で実施される診断試験はいずれも医療システムの不可欠な部分である。このような試験は、疾患診断、治療の進捗状況のモニタリング並びに健康状態および感染症のスクリーニングを含む、患者のケアの全ての局面において中心的な役割を果たす。分子診断試験（インビトロ診断（IVD）試験など）は、特定の臨床発現の正確な原因を特定し、医師が診断を下し、正しい治療および療法を処方する助けとなるので、特に有用である。

20

【0005】

現在、診断試験過程は非常に冗長で、時間がかかり、厄介で遅い。これは、所定の症状について数多くの異なる試験を実施しなければならないことが多く、これらの試験の各々は個別に実施されるからである。さらに、臨床検査は常に最新化されており、医学的な診断を容易にする新たな試験を追加しているので、医師は、このような試験を依頼し、解釈するときいつもジレンマに直面する。ここ20年にわたり、医師が利用できる臨床試験の総数および異なる試験の種類は指数的に増加している。現代の臨床検査医学におけるこのような進歩は、大いに有用であるが、新たな問題も生み出している。これらの試験はユーザーフレンドリーでないことが多く、すでに負担が重くなっている医療システムの費用を増大させる。実際、医師は、臨床検査室における試験の進行が遅く、患者の正確な診断を遅らせていることに不満を持っている。また、多くの試験は全く利用されていないか、1もしくは2箇所の試験所/臨床検査室でしか利用されていないか、または専門家にしか知られていない。

30

【0006】

疾患を効果的に管理するためには、病因および可能な合併症を幅広く知ることが必要である。最初に選択された試験群は明確でない結果を与えることがあり、正確な診断を妨げる。疾患の性質および比較的特異的でない症状は適切な診断目標となることがある。このような場合には、反復的および連続的に実施される、より多くの試験を実施する。従って、試験は患者のケアおよび治療過程全体を遅延させ、それは費用がかさみ、患者の健康および治療計画に不利益となる。

40

【発明の開示】

【0007】

概要

本発明は、臨床的にインテリジェントな設計（clinically intelligent design）の（マイクロアレイなどの）診断装置と、このような装置を製造し、特定の臨床症状または症状のセットの鑑別分析/診断に使用する方法とに関する。1局面において、本発明の装置は、数多くの分析物の平行スクリーニングを実施するために使用される種々のプローブを備える。プローブは、特定の疾患および障害に関連する症状の既知の臨床発現に基づいて

50

装置に群状に集成 (cluster) される。別の局面において、本発明の装置は、既知の血液媒介性病原および抗体などの臨床的に関連する数多くの分析物の平行スクリーニングを実施するために使用される。さらに別の局面において、これらの装置は、農学的試料、法医学的試料、獣医学的試料および他の試料に見られる分析物の平行スクリーニングを実施するために使用される。

【 0 0 0 8 】

一般に、本発明は、被験体によって示される1つ以上の医学的症状の原因を判定する方法であって、(a) 被験体から生物試料を入手する段階と、(b) 異なるプローブのアレイまたは異なるプローブセットのアレイを入手する段階であって、各プローブまたは各プローブセットが、1つ以上の医学的症状の異なる既知の原因と関連する標的と選択的に相互作用する段階と、(c) 全てのプローブを生物試料中の任意の標的と選択的に相互作用させられる条件下において、アレイ中のプローブに生物試料を適用する段階と、(d) 相互作用を検出する段階と、(e) 相互作用を分析して、1つ以上の医学的症状の原因を判定する段階とを含む方法に関する。この方法では、プローブのアレイまたはプローブセットのアレイを平坦な基材上に整列させることができる。標的は核酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、抗原、有機小分子、無機分子、酵素または多糖であってもよい。アレイのプローブは全てポリペプチド、例えば、抗体、抗原、酵素、ジンクフィンガー結合タンパク質、副溝結合物質、転写因子、それらの組み合わせまたはそれらのキメラであってもよい。

【 0 0 0 9 】

これらの方法において、被験体は、植物もしくは動物またはヒト患者もしくは死亡したヒトであってもよい。ある種の態様において、プローブは遺伝的に改変された細胞の表面上で発現させることができ、プローブは、標的に特異的に結合することによって標的と選択的に相互作用して複合体を形成することができる。ある種の態様において、プローブのアレイは、細菌、ウィルスまたは真菌によって生じる感染性疾患に関連する標的と選択的に相互作用する第1のプローブと、遺伝的原因に関連する標的と選択的に相互作用する第2の異なるプローブとを備える。プローブのアレイはまた、1つ以上の医学的症状の病因が存在しないことをアッセイするプローブを含んでもよい。

【 0 0 1 0 】

別の局面において、本発明は、1つ以上の医学的症状の原因に対する被験体の感受性を判定する方法であって、(a) 被験体から生物試料を入手する段階と、(b) 異なるプローブのアレイまたは異なるプローブセットのアレイを入手する段階であって、各プローブまたは各プローブセットが、1つ以上の医学的症状の異なる原因に対する被験体の感受性に関連する標的と選択的に相互作用する段階と、(c) 全てのプローブを生物試料中の任意の標的と選択的に相互作用させられる条件下において、アレイ中のプローブに生物試料を適用する段階と、(d) 相互作用を検出する段階と、(e) 相互作用を分析して、1つ以上の医学的症状の原因に対する被験体の感受性を判定する段階とを含む方法を特徴とする。

【 0 0 1 1 】

新規方法では、同一条件下においてそれぞれの標的と選択的に相互作用するように全てのプローブを設計することができる。

【 0 0 1 2 】

別の局面において、本発明はまた、被験体の1つ以上の医学的症状の原因を判定して、症状の原因を治療するための1つ以上の治療薬の好適性を評価する方法であって、(a) 被験体から生物試料を入手する段階と、(b) 異なるプローブのアレイまたは異なるプローブセットのアレイを入手する段階であって、第1のプローブまたはプローブセットが、1つ以上の医学的症状の既知の原因と関連する標的と選択的に相互作用し、第2の異なるプローブが、治療最適化因子に関連する標的と選択的に相互作用する段階と、(c) 全てのプローブを生物試料中の任意の標的と選択的に相互作用させられる条件下において、アレイ中のプローブに生物試料を適用する段階と、(d) 相互作用を検出する段階と、(e) 相互作用を分析して、1つ以上の医学的症状の原因を判定し、1つ以上の症状の原因を治療する

10

20

30

40

50

ための治療薬の好適性を判定する段階とを含む方法も含む。この方法では、治療最適化因子は、特定の薬剤に対する被験体または病因の耐容性、不耐容性または感受性であってもよく、治療最適化因子に関連する標的は、治療薬に暴露された場合に病原の感受性、耐性または特有の反応を生じる病原の遺伝子であってもよい。

【0013】

他の態様において、本発明はまた装置を特徴とする。例えば、本発明の装置は、(a) 上面を有する複数の突出部を備える表面を有する基材と、(b) 各プローブまたはプローブセットが独自の標的と選択的に相互作用し、突出部の1つの上面に接続されているプローブのアレイまたはプローブセットのアレイとを備えてもよい。基材はケイ素、二酸化ケイ素、ガラス、ポリスチレン、金、金属、金属合金、ゼオライト (zeolyte)、ポリマーまたは他の有機もしくは無機分子であってもよい。

10

【0014】

本発明の装置はまた、(a) 各ウェルがマイクロミキサーを備える多数のウェルを備える表面を有する基材と、(b) 各マイクロミキサーに接続されるマイクロモーターと、(c) アレイ中の各プローブまたはプローブセットが独自の標的と選択的に相互作用し、ウェルの1つの内部に接続されているプローブのアレイまたはプローブセットのアレイとを備えてもよい。ある種の態様において、マイクロミキサーはマイクロファンのブレードであり、マイクロモーターは電磁気、化学的または生物学的モーターである。

【0015】

別の装置は、(a) 例えば、平坦面のような表面を有する基材と、(b) アレイ中の各プローブまたはプローブセットが独自の標的と特異的に結合するプローブのアレイまたはプローブセットのアレイと、(c) 表面にプローブを結合し、長さが異なるリンカーのセットとを備える。リンカーはポリエチレングリコール分子であってもよい。

20

【0016】

別の局面において、本発明は、各装置が異なるプローブのアレイまたは異なるプローブセットのアレイを備え、各プローブまたはプローブセットが医学的症状または関連する医学的症状のセットの異なる既知の原因と関連する標的と選択的に相互作用する、本発明に記載の複数の装置を備える診断システムを特徴とする。本発明はまた、被験体によって示される1つ以上の医学的症状の原因を判定する方法であって、(a) 被験体の症状を評価する段階と、(b) 診断システムから新規装置の1つを選択する段階と、(c) 被験体から生物試料を入手する段階と、(d) 全てのプローブを生物試料中の任意の標的と選択的に相互作用させられる条件下において装置アレイ上のプローブに生物試料を適用する段階と、(e) 相互作用を検出する段階と、(f) 相互作用を分析して、1つ以上の医学的症状の原因を判定する段階とを含む方法を含む。本発明の方法は、相互作用を分析して、1つ以上の症状の原因を治療するための治療薬の好適性を判定する段階をさらに含んでもよい。

30

【0017】

これらの方法において、病因は真菌、細菌、ウイルスまたは他の微生物病因、遺伝的もしくは他の病因または病因の組み合わせであってもよい。病因はまた、血管、感染症/炎症/自己免疫疾患、新生物、薬物、医原性、先天性/発生上/遺伝的 (inherited) または環境暴露/内分泌/代謝性であってもよい。試料は血液、脳脊髄液、尿、汗、口腔内スワブもしくは他のスワブ、細胞試料または細胞培養物であってもよい。タンパク質分析物は抗体、抗原、糖タンパク質または酵素であってもよい。核酸分析物は1本鎖または2本鎖DNAもしくはRNA、またはDNA-RNA複合体/ハイブリッドまたは細胞であってもよい。さらに、共有結合または非共有結合を使用してプローブを基材に結合することができる。例えば、アミドまたはチオール結合を使用してプローブを基材に結合することができる。

40

【0018】

本発明の装置では、ウェルはファンなどのマイクロミキサーを有してもよく、混合装置をエネルギー源、例えば、電圧源に接続する電氣的接続をさらに含んでもよい。また、マイクロミキサーは、例えば、ATPase、キネシン、キネシン関連タンパク質、ミオシン、DNAヘリカーゼ、DNAスライディングクランプ、核酸系ロタキサンおよび擬ロタキサン、環状

50

3本鎖形成オリゴヌクレオチド（CTFO）、2本鎖DNA並びにこのようなタンパク質および核酸のキメラおよび誘導体に基づいて、生物反応に作用するマイクロモーターによって駆動される生物分子であってもよい。突出部またはウェルは、電磁放射線または圧電効果または他のエネルギー源によって駆動される混合装置を有してもよい。

【0019】

他の態様において、本発明は、キット設計中にプローブをインテリジェントであるように群状に集成する方法と、新規装置/システムに使用する試薬およびキット、データおよび結果を解釈して診断を推奨する方法と、活性が大部分保存されるように生物分子を固定する方法（例えば、捕獲プローブを結合するために架橋ストレプトアビジンおよび他のタンパク質層を使用することによって、またはプローブの生物活性を安定化/保存する際に助けとなる試薬を溶液にスポットすることによって）と、単純に目で見ることによって容易に結果に変換することができる読出しを提供する、1回以上反復し、幾何学的パターンでプローブを分注する方法（例えば、「X」パターン）と、画像を保存し、処理して、保存した信号を操作して新たな画像を形成する方法と、試料採取モジュールに診断装置を組み合わせて（生物試料を採取管から診断装置へ移動する必要性をなくす）単一の組み合わせ装置/システムを形成する新規装置/システムと、試料採取モジュールが診断装置モジュールから分離されており、採取モジュールから手で試料を採取する必要なく、任意の段階において容易に一体として結合される新規システム/装置と、（例えば、BSA、乳汁タンパク質、グリセロール、トレハロースまたは結合されたプローブの活性を保存するような他の試薬を含有する緩衝水溶液に密封して保存することによって）展開したスライドを保存する方法と、（スクリーニング、スキャンングおよび結果の送達を含む）スライドの自動処理を実施する方法と、各分析物のための単一の独自のプローブまたは各分析物のための多種の独自のプローブのどちらかを選択して使用する方法と、（例えば、パイオチップ/マイクロアレイにダイナミックレンジ決定および内部較正のための列状の希釈液系列を備えてもよい）自動画像処理および読出しのための光学的位置決めマーカーを配置する方法とを特徴とする。

【0020】

特に明記しない限り、本明細書において使用する全ての専門用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に普通に理解されているものと同じ意味を持つ。例えば、分子生物学における普通の用語の定義は、ベンジャミン レビン（Benjamin Lewin）、遺伝子 VII（Genes VII）、オックスフォード ユニバーシティ プレス（Oxford University Press）発行、2000年（ISBN 0-19-899276-X）、ケンドリュー（Kendrew）ら（編）、分子生物学百科（The Encyclopedia of Molecular Biology）、ブラックウェルサイエンス エルティエディー（Blackwell Science Ltd.）発行、1994年（ISBN 0-632-02182-9）、ロバート エー メイヤーズ（Robert A. Meyers）（編）、分子生物学およびバイオテクノロジー：総合デスク10リファレンス（Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk 10 Reference）、ブイシーエッチ パブリッシャーズ インク（VCH Publishers, inc.）発行、1995年（ISBN 1-56081-569-8）およびハリソンの内科学（Harrison's Principles of Internal Medicine）、第12版、マグローヒル（McGraw-Hill）、ニューヨーク、米国、発行、1991年に見出すことができる。

【0021】

症状は、疾患または障害の測定可能および/または観察可能な徴候である。症状は、ヒト患者、任意の動物（例えば、家禽などの鳥またはイヌ、ネコ、ウシ、ブタもしくはウマなどの家畜などの哺乳類）または、さらに、病気になっている植物などの任意の被験体によって示されうる。

【0022】

プローブは、標的もしくは分析物と相互作用する（例えば、標的もしくは分析物に特異的に結合するまたは標的もしくは分析物と測定可能な反応を生じる）、抗体、抗原、タンパク質、RNAもしくはDNAなどの核酸または他の分子もしくは化合物である。標的または分析物は、疾患、病因、障害、治療等のマーカーであり、従って特定の疾患または障害の1

10

20

30

40

50

つ以上の症状の考えられる原因に関連する。例えば、標的は、細菌、ウイルス、真菌などの微生物、または、さらに藻類などの病原性植物によって発現される抗原であってもよい。標的は、酵素、毒素もしくは(DNAまたはRNAなどの)核酸などの微生物によって産生される生物分子もしくは化学分子、または、さらに有機小分子または液体もしくはガスなどの無機化合物であってもよい。標的は、試験対象の被験体の遺伝的障害を示す特異的な遺伝的配列であってもよい。例えば、遺伝的障害は、遺伝子の突然変異、一塩基多型(SNP)、正常な染色体もしくは遺伝子の過剰コピーまたは欠損遺伝子によってマークすることができる。標的は、特定の薬剤に対する耐性、耐容性または感受性を提供する微生物遺伝子などの治療最適化因子のマーカであってもよい。このような治療最適化因子は、特定の薬剤に対して被験体を耐性、耐容性または不耐容性(例えば、アレルギー)にする被験体の遺伝的特徴であってもよい。

10

【0023】

各場合において、標的はプローブによって検出および/または定量される。プローブは、特定の疾患または障害の1つ以上の症状に関連する標的と特異的に結合する。従って、プローブの標的との相互作用、例えば、結合して複合体を形成することは、1つ以上の症状の特定の原因が存在することを示す。

【0024】

遺伝子分析は、遺伝的基礎もしくは原因を有する任意の標的もしくは分析物、例えば、核酸配列中の一塩基多型の検出もしくは測定または特定の核酸配列の有無である。遺伝子分析は、特定タンパク質のmRNA、特定タンパク質または代謝産物などの任意の内因性生理学的分析物の定性的または定量的測定も含む。また、遺伝子分析は、抗体または抗原の特定のエピトープを検出することを含む。

20

【0025】

「遺伝的原因」は、核酸を基礎とする任意の原因である。例えば、遺伝的原因は核酸配列中の一塩基多型であってもよい。それはまた核酸配列の有無であってもよい。遺伝的原因は、抗体もしくは抗原の特定のエピトープの存在またはタンパク質の特定の立体配座によって求めることができる。

【0026】

臨床的にインテリジェントな設計は、所定の症状についてどの標的が検出されると思われるかに基づいて標的を分析するためのプローブを1セットまたは複数セットを群状に集成する方法である。本発明の方法は、1つのアッセイの異なる試験の適合性に単純に基づいてプローブを群状に集成することとは異なる。むしろ、1つ以上の特定の症状の分析に関連する試験だけを群状に集成する。従って、本発明の方法は、単一のアッセイにおいて群状に集成されるプローブを設計し選択する際に、臨床的なインテリジェンスを組み込む。

30

【0027】

本明細書に記載するものと同様または等価な方法および材料を本発明を実施または試験する際に使用することができるが、好適な方法および材料を以下に記載する。本明細書に記載する全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は全体の内容が参照として組み入れられる。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が支配する。また、材料、方法および実施例は例示的なものにすぎず、限定する意図のものではない。

40

【0028】

本発明はいくつかの利点を提供する。新規診断キットは少量の試薬および試料しか必要としないので、医師および/または臨床医学者は、新規装置および臨床検査の利点を使用することによって多岐にわたる情報を迅速に受け取る。所定の症状に関連する試験は全て同一反応条件下において1つの装置で迅速に分析することができ、それによって試験費用を削減する一方で、包括的に標準化された結果を迅速に提供する。ヒト患者などの試験対象被験体は、多数の試料を必要とする一連の試験を患者に実施する状況と比較したとき、より優れたより速やかな診断を医師から受け取ることができるので、大きな利益を得る。

【0029】

50

新規装置／システムはまた、アッセイ手法を簡単にし、サンプルサイズを低下し、必要なドナー試料の取り扱い量を低下することによって（スクリーニング手法に必要な別々の試験／個別の試験の総数を低下することによって）、医療従事者へのリスクを低下し、それによって感染のリスクを低下する。

【0030】

また、新規方法および装置は、追加試験を加えるための装置の変更および追加が容易で低価格であり、例えば、各試験ごとに個々の被験体から別個の試料を使用し別個に実施される一連の試験に新たな試験を追加する面倒で費用のかかる方法と比較して安価である。

【0031】

別の利点は、核酸および核酸以外の成分などのほとんど任意の生物学的分析物を混合物中で同時に検出する方法を提供することである。新規装置はまた、大多数の（同一または異なる）試料の平行処理に使用することができ、ハイスループット環境を提供する。例えば、多数のセットのマイクロアレイを単一のバイオチップ上に配置することができ、多数の患者試料のスクリーニングを可能にする。

10

【0032】

新規システムはまた、単純に目で見ることによって結果の容易で簡単な読出しを提供し、いくつかの態様では、試料採取および分析モジュールを組み合わせて生物試料を採取管から診断装置に輸送する必要性をなくすことによって試料の取り扱いを簡単にする。新規方法および装置はまた、アッセイ中に、より良好で新規な試料混合法を提供し、質を改善するだけでなく、アッセイを実施するのに必要な時間を短縮する。

20

【0033】

別の利点は、マイクロアレイに基づいた診断方法は容易に自動化することができ、新規装置は、臨床試験を行っているほとんどの検査室で現在使用されているロボットおよび技術とともに使用することができるということである。これは、この新規技術を既存の検査室に導入する費用を削減するであろう。また、マイクロアレイに基づいた診断方法は、携帯可能な装置で実施することができる。

【0034】

本発明の他の特徴および利点は以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【0035】

さまざまな図面における類似の参照記号は、類似の要素を示す。

30

【0036】

詳細な説明

医師および／または臨床医学者に、特定の症状または症状のセットに基づいて異なる病因を識別させ、判別させることができる臨床的に有用な様式に試験を群状に集成する総合的診断／スクリーニングアッセイの必要性がある。新規診断装置またはキットでは、反復的で逐次的に実施される個別試験による疾患診断の遅れを回避するために、試験は平行に実施される。新規装置は鑑別診断方法をかなり単純化することができる。

【0037】

一般的方法

40

本発明は、多数の試験を1つの試験キットまたは装置にインテリジェントに一体化する方法を提供する。本発明の方法は、1つ以上の特定の臨床症状の多重試験を平行して実施する装置およびアッセイを提供するために、症状に特異的な試験（例えば、プローブ）を臨床的にインテリジェントな方法で群状に集成または多重化することを可能にする。新規装置は、（例えば、正確な診断を下す助けとするために）観察される症状の特定の原因を確認または排除する助けとすることができるプローブだけを含む。

【0038】

新規多重化装置様式は診断試験の新規アプローチを提供する。新規装置は、試料物質が適用される複数のプローブを有するアレイを使用して、（例えば、血液および血液誘導体、脳脊髄液（CSF）、血清、尿または他の体液、例えば、歯肉もしくは頬内側の細胞スワ

50

ブ並びに細胞培養物などの)生物試料内の分析物を分子レベルで検出する。ある態様において、医療用診断装置は、多数のプローブを単一のバイオチップ上に群状に集成するためにマイクロアレイ技術を使用することができる。しかし、新規装置および方法はバイオチップまたはマイクロアレイに限定されない。このような装置を作製するために他の技術を使用することができる。例えば、多重化装置はビーズアレイ技術またはマイクロ流体アレイ技術(ルミネックス(Luminex)社、イルミナ(Illumina)社、アクララ(Aclara)社およびカリパー(Caliper)社製など)に基づきうる。本明細書に記載するように、多重化アレイを製造する方法は多数存在する。

【0039】

新規方法は、固定したプローブ分子を生物学的に活性な状態で維持する方法および条件を使用して、全てが基材に結合されている多重化プローブの使用を可能にする。多重化診断装置はまた、同一反応条件下において、数多くの異なる試験/プローブを高感度および高特異性で同時に使用することを可能にする。

【0040】

新規方法および装置の別の特徴は、核酸および核酸以外の分析物を含む数多くの種類の分析物を同一装置で同時に検出および/または定量することができることである。数多くの天然型または合成分子は生理学的条件下において核酸を認識する。このような分子の例には、(例えば、ジンクフィンガードメイン(ZFP)などの)転写因子、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフタンパク質(例えば、GATA-1)、免疫グロブリンモチーフタンパク質(例えば、NFkB、NFAT)およびオリゴマーヘテロ環状副溝結合物質(MGB)などのポリアミドなどの、ポリペプチド系またはポリアミドプローブが挙げられる。(ZFPおよびMGBなどの)ポリアミド分子を使用する利点には、1)それらは2本鎖核酸に結合する、並びに2)それらは、他のタンパク質および他の分子に結合するために使用されるタンパク質とほとんど同一の条件下において2本鎖核酸に結合する、ことが挙げられる。

【0041】

ZFPIは、DNAおよびRNA結合転写因子TFIIIAにおいて最初にDNA-結合モジュールとして同定されたCis2His2クラスのジンクフィンガードメインを含有する真核生物(例えば、酵母、植物および哺乳類)の転写因子である。このクラスのジンクフィンガードメインは、DNA結合特異性が適合性が高いという点において独自であり、ほとんどの他のDNA-結合ドメインと異なり、これまでに特徴づけられた数ダースのジンクフィンガードメインは多種多様なDNA配列と結合し、各ジンクフィンガードメインはそれぞれのDNA結合部位を認識できる。各ジンクフィンガードモジュールはほんの約30アミノ酸を含み、折りたたまれて、[]-シートのシステイン対と[]-ヘリックスのヒスチジン対との間の亜鉛のキレート化によって安定化された[][]モチーフを形成する。小型球形構造は、核酸結合の際、特に転写因子の機能の主要部であるDNAの配列特異的認識の際に機能を発揮することが多い。

【0042】

マウス転写因子Zif268のものに関連するDNA結合ジンクフィンガードメインは、タンパク質-DNA相互作用を理解する上で有用なパラダイムとなり、所定の配列特異性を有するDNA結合タンパク質を設計する際の足場としてうまく使用されているような簡単な様式のDNA認識を使用する。小さいサイズのジンクフィンガードメインは2本鎖DNAの隣接する2,3塩基対だけの認識に個々のモジュールを制限するが、多数のタンデムモジュールをDNAの主溝に巻きつかせ、長い鎖長の塩基を認識する。DNAに結合したZif268フィンガードメインの結晶構造では、3つのモジュールがDNAの主溝を連続して占め、各々は塩基特異的に接触し、典型的には3~4塩基対サブサイトに重複する。特異性は、各ジンクフィンガードメイン[]-ヘリックスの残基と対応するDNA塩基との間の1:1相互作用から生じる。ジンクフィンガードメインはまた、DNA-RNAハイブリッド、RNA2本鎖および修飾塩基を含有する核酸に結合するためにも使用されている。

【0043】

ジンクフィンガードメインの単純な共有結合タンデム反復は核酸の長い非対称配列の認識を可能にする。DNA/RNA認識におけるジンクフィンガードメインのこのような適合性は

10

20

30

40

50

、DNA/RNA結合特異性が変更された新規タンパク質を単離または設計するため、およびほとんど任意の所定のDNA/RNA配列を特異的に認識するテラーメイド核酸結合タンパク質を構築するために使用することができる。例えば、ファージディスプレイ技術は、高い親和性および特異性で異なる配列に結合する新規ジンクフィンガータンパク質を作製するために使用することができる。望ましい核酸結合特異性を有するこのような新規または「デザイナー」ジンクフィンガータンパク質は、試料中の核酸配列を検出するのに効率的なプローブとして働くことができる。

【0044】

同様に、MGBポリアミドは、顕著な親和性および特異性で2本鎖DNAの副溝に配列特異的な方法で結合するクラスの小さい合成分子である。MGBは、DNAの副溝の4つのワトソン-クリック塩基対の各々を識別することができる化学的な認識コードを使用する。化学者は、ヒトゲノムの所定の標的配列を特異的に認識する数多くの異なるこのような分子を設計し合成するために、この結合コードを適用してきた。MGBはまた、生理学的条件下において標的核酸に結合する。望ましい核酸結合特異性を有するこのような新規または「デザイナー」副溝結合リガンドは、試料中の核酸配列を検出するのに効率的なプローブとしても使用することができる。

10

【0045】

ZFPなどの転写因子、およびMGBなどの核酸を認識する小分子ポリアミドリガンドは、生理学的条件下において核酸を認識し検出する新規クラスのプローブを構成する。このような作用物質を標的核酸配列に結合するために使用する条件は、タンパク質および他の核酸以外の成分を検出するために使用するものと同様である。従って、これらの作用物質を、一体化したスクリーニング装置（例えば、UniScreen（商標））のための、チップなどの、単一の支持体上でタンパク質および他の生物学的検出物質と一体化することができる。このような装置は、単一の装置（バイオチップなど）および同一条件下においてDNA、RNA、タンパク質、糖タンパク質、多糖、他の抗原を同時に検出することができる（図37A~C参照）。

20

【0046】

プローブ分子の結合に必要な特定の生化学的環境は、現在、多重分析物バイオチップアッセイを制限している。例えば、タンパク質は、折りたたまれた状態を維持し、標的分子に対する最適な結合親和性を保持するために、安定なpHおよび温度を必要とする。逆に、DNA、PNAおよびRNAは、相補鎖のハイブリダイゼーションを生じさせるために熱サイクルを必要とする。この温度変化はタンパク質の結合能力を低下させると思われ、ほとんどの場合完全にタンパク質を変性させる。従って、本明細書に記載する新規方法が開発される前は、タンパク質および核酸プローブが同一アッセイにおいて標的分子に結合する可能性は困難であった。

30

【0047】

しかし、鎖侵入などの方法によって核酸を認識する天然型および合成分子は数多く存在する。鎖侵入は、2本鎖DNAとハイブリダイゼーションし、自由エネルギーという利点により、ある鎖長の核酸を除去することができる修飾された核酸配列に関する。1本鎖DNA、RNAおよびペプチド核酸（PNA）分子は、特定の条件下において鎖侵入を実施する。このような分子のキメラも鎖侵入された複合体を形成する。また、エポックバイオサイエンス（Epoch Biosciences）社は、標的2本鎖核酸とハイブリッドを形成する修飾された核酸塩基からなる選択的結合相補的オリゴヌクレオチド（selective binding complementary oligonucleotide）（SBC）と呼ばれるクラスの合成プローブを作製した。SBCの特徴は、2つの鎖は互いに安定な2本鎖を形成しないが、標的DNAの2つの鎖と非常に安定な複合体を形成することである。これらの分子は通常一緒に使用される。すなわち、DNAの鎖侵入を実施するために2つの相補的な配列を使用する。

40

【0048】

DNAまたはRNA標的と、バイオチップに接続されたDNA/RNAプローブとのハイブリダイゼーションには、標的は1本鎖形態であることが必要である。本発明者らは、PNA、環状DNA

50

/RNAまたは2つのSBCの一方などの鎖-インベダー(invader)(例示を図34Bに示す)は標的2本鎖を分離して、1本鎖になった標的領域との複合体を形成する助けをすることができる方法を開発した。図34A~Eに示すように、この1本鎖になった標的は、チップ上で熱変性段階を必要としないで、バイオチップに結合されているプローブに容易に結合することができる。反応を終了まで誘導するために、第2のさらに小さいオリゴヌクレオチドを混合物中に使用することもできる。

【0049】

2本鎖のオリゴサイズ部分を欠損しているDNAプローブは、生理学的条件下においてさえも任意の相補的核酸配列に対して極めて高い結合親和性を有するので、この方法はバイオチップアッセイに関連する。(例えば、SBCオリゴ、エポックバイオサイエンス(Epoch Biosciences)、米国特許第5,912,340号およびZhangら、Nucleic Acids Research, 28, 3332-38, 2000参照)。

【0050】

新規多重化診断装置およびキットは以前に記載されていないが、固相基材に個々のプローブを接続する技法は、例えば、米国特許第6,110,426号、米国特許第5,763,158号、米国特許第6,171,797号、国際公開公報第00540046号、米国特許第5,858,804号、米国特許第5,252,743号、米国特許第5,981,180号、米国特許第6,083,763号、国際公開公報第0004390号、国際公開公報第00104389号、国際公開公報第00104382号および他の関連する刊行物などの種々の刊行物に記載されている。

【0051】

新規装置/システムは多数の有用且つ有利な形状構成を含む。例えば、新規装置/システムは、均一な温度および圧力条件下において分析物を検出することができ、開いているまたは閉じている反応部位/アレイをチャンパー内に有することもできる。これらのチャンパーはフロースルーであっても、非フロースルーであってもよい。装置/システムはまた、一旦試料が導入されたら完全に密封することもできる。他の態様では、新規システム/装置は試料採取モジュールを診断装置と一体化して独自の一体化モジュールを形成し、生物試料を採取管などから診断装置に輸送する必要性をなくす。または、システム/装置は、診断装置モジュールから分離されていて、採取モジュールから試料を取り出す必要なく、任意の段階において容易に接続することができる試料採取モジュールを備える。

【0052】

新規多重化診断システムは、数多くの別個の試験を同時に、同一条件下において、低い交差反応性並びに高い感受性および特異性で実施させることができる。装置/システムはまた、現在利用可能なシステムよりも優れたダイナミックレンジを提供し、簡単なデータ解釈および正確な診断推奨を提供する。

【0053】

新規装置/システムはまた必要な生物試料量を低下する。現在実施されている個々の試験は各々所定の量の生物試料を必要とする。試験数が増加すると、必要な生物試料量も増加する。新たな試験プローブをシステムに追加する場合でも、サンプルサイズは一般に変わりなく同じであるので、新規多重化アッセイ装置は試験および試料要件のこのような制限を克服している。

【0054】

新規装置/システムはまた、大多数の(同一または異なる)試料を平行に処理するために使用することができ、従ってハイスルーput環境を提供する単一の装置を提供する「複数アレイを配列した(array of arrays)」様式で使用することができる。例えば、単一のバイオチップに多数のセットのマイクロアレイを導入することによって、多数の患者試料を臨床的に群状に集成した試験を用いて1段階でスクリーニングすることができる。

【0055】

新規装置は、ロボットおよびコンピュータ制御式スクリーニング、スキャンングおよび結果送達などの自動処理を使用して処理および分析することができる。診断用バイオチップなどの新規装置は、多数の染料/着色料を使用して処理することができる。アッセイは

10

20

30

40

50

同時または逐次的に実施することができる。アッセイは、各分析物のために単一の独自のプローブを使用しても、または各分析物のために多数の独自のプローブを使用してもよい。サンドイッチイムノアッセイ、競合イムノアッセイ、触媒抗体、ハイブリダイゼーションおよび1塩基伸長などの異なる種類のアッセイを新規方法で使用することができる。

【0056】

新規方法およびシステムはまた、画像の保存および処理を提供し、保存した信号を操作して新たな画像を形成する。このような方法は、読み取りおよび解釈が容易になる形式で試験結果を提供することができる。新規方法はまた、自動画像処理および読出しのための光学的位置決定マーカーを配置することを含む。例えば、このような方法は、各パイオチップ/マイクロアレイ上にダイナミックレンジ決定および内部較正のための列状の希釈液系列を備えてもよい。新規方法は、一般に、アッセイ中に現在使用されている試料混合条件を改善および最適化することによって優れたアッセイ結果を提供する。

【0057】

いくつかの態様において、新規方法は、インターネット、電話設備または無線通信システムなどの通信網により結果を送達する方法を含む。患者は、試料採取時に試験ID番号および第2の独自の識別子（パスワードなど）が与えられる。結果が用意できると、患者は通信網にアクセスすることができ（例えば、ウェブサイトログインする）、担当医のコメントを入手でき、示された期間後にデータをダウンロードまたは削除するクリックボタンを入手することができる。

【0058】

臨床的にインテリジェントで症状特異的な診断装置を製造する方法

診断装置は、固相プレート、チップまたはスライドおよび固相ビーズまたは微小粒子などの基材に基づいた種々の技術に基づいている。例えば、新規装置はマイクロアレイ技術を使用することができる（一例として図1Aおよび1Bを参照）。装置を製造するために、ガラスまたはケイ素製顕微鏡スライド/チップを使用することができる（図1a）。または、スライドあたり96ウェル/部位まで製造するために大きい膜を使用することができる（図1b）。プラスチック、ポリマー、金属および金属合金などの数多くの他の材料も基材として使用することができる。装置はスライドあたり1つ以上の部位を有することができる。例えば、図13A～13Cは、96部位および16部位の倒立型アレイ装置の略図を示す。ガラススライドは全て、表面特性を改善し、プローブをガラススライドに共有結合させるために、有機または無機材料でコーティングすることができる。膜をプローブの基材として使用する場合には、それらは事前処理する必要はないが、事前処理してもよい。基材（例えば、スライド）表面に固定された捕獲プローブの1つ以上のアレイを使用することによって、数多くの異なる標的が単一のアッセイで検出される。プローブを選択し、群状に集成する方法を以下に記載する。このような方法は、どのセットの捕獲プローブを特定のアレイに固定するかを決定するために使用される。コーティングしたガラススライドは市販品を購入しても、標準的な技法を使用して製造してもよい。次いで、種々の技法を使用して、プローブをコーティング済み基材に接続する。標準的な結合技法および以下に記載する新規プローブ接続方法を使用することができる。

【0059】

特定症状の標的の選択

任意の所定の臨床症状には、1つ、2つ、数ダースまたはおそらく数百の原因因子すなわち診断装置のプローブの標的が存在しうる。標的は、細菌、ウイルス、マイコプラズマ、リケッチア、クラミジア、原生動物、植物細胞（藻類および花粉など）または真菌のような1つ以上の微生物であってもよい。標的は、一塩基多型（SNP）、通常は存在しないかもしくは発現されないかまたは多数のコピーが存在しない特定の遺伝子、または通常存在する遺伝子の突然変異などの遺伝的障害であってもよい。標的はまた、治療最適化因子であってもよい。例えば、標的は、特定の微生物を特定の薬剤に対して感受性または耐性にする特定の微生物遺伝子であってもよい。標的はまた、被験体を特定の薬剤に対して耐性、耐容性または不耐容性（アレルギー）にする被験体の特定の遺伝的配列であってもよい。

これらの種類の標的は、特異的で、適合させた (tailored)、最適な治療方法を開発するために使用することができる。また、医師および/または臨床医学者による受け入れが最も多い結果を提供するように標的を選択することができる。

【0060】

標的選択の1目標は、選択した標的の1つが症状の原因であるという高いレベルの信頼性を提供する(すなわち、特定の症状の考えられる原因に関連する)数多くの標的を選択することであり、必要に応じて、治療を最適化するために使用することができる追加の標的を選択することである。言い換えると、目標は、症状の原因である可能性が最も高い標的を選択することである。例えば、症状を生じる可能性があると考えられる標的が50あるが、臨床上観察される所定の症状の例の90%を生じると知られているのはわずかに10標的しかない場合には、診断装置は、十分なレベルの信頼性を提供するために、そのような10標的だけを検出するプローブ(例えば、10以上のプローブ)を備えてもよい。被験体の症状の原因が、装置によって検出されない10%の標的のうち1つであるような場合には、この装置は陽性の結果を提供しないと思われる。さらに高性能の診断装置は、最初の10標的と共に、臨床上観察される症状の例の99%を生じることが知られているさらに10の既知の標的に特異的な追加のプローブセットを備えてもよい。どちらの装置も治療を最適化するように設計されているプローブを含むことができる。当然のことであるが、他の筋書きも可能である。

10

【0061】

高い精度の精度を提供するために、単一の特異的な標的を検出および/または定量するためにいくつかの異なるプローブを使用することができる。例えば、抗体標的の1つのエピトープに特異的に結合するように1つのプローブを設計し、同一抗体の第2のエピトープに特異的に結合するように第2のプローブを設計することができる。別の例において、1つのプローブが、特定の微生物によって産生される酵素に特異的で、第2のプローブがその微生物に関連する特定の核酸に特異的で、第3のプローブが、その微生物に暴露された後の被験体の血流中の抗体に特異的であってもよい。また、試料がアレイ全体にわたって確実に等しく分布され、低濃度の標的でも確実に検出されるように、同じ種類の数多くのプローブを基材の別の位置またはスポットに群状に集成することができる。抗体の異なるエピトープを認識する2つ以上のプローブを混合して、同一スポットに配置することもできる。

20

30

【0062】

各場合において、標的であるかまたは標的に関連する分析物に特異的に結合するようにプローブを設計する。例えば、標的が抗体である場合には、抗体が分析物である。標的が微生物遺伝子である場合には、特定の核酸配列が分析物でありうる。標的が被験体の遺伝的障害である場合には、分析物はSNPまたは特定の突然変異核酸配列であってもよい。

【0063】

プローブ選択

本節では、「チップ」などの異なる基材上のプローブとして使用することができる異なる種類の分子について述べる。任意の所定の標的について、標的に特異的に結合するために使用することができる1つ以上の種類のプローブが存在しうる。例えば、標的が、例えば、被験体または微生物のDNAまたはRNA由来の核酸分子である場合には、標的は、ジンクフィンガー結合タンパク質(ZFP)または副溝結合物質(MGB)などの、核酸プローブまたはタンパク質系、例えば、ポリアミド系プローブを用いて検出することができる。標的が特定の抗原である場合には、プローブは、その抗原に特異的に結合する抗体でありうる。標的が抗体である場合には、プローブは抗イディオタイプ抗体または標的抗体が結合することが既知の抗原でありうる。

40

【0064】

基材は、核酸標的だけを検出するプローブ(NuScreen(商標)チップ)、核酸以外の標的(例えば、タンパク質系またはポリペプチド系並びにハプテンおよび化学物質などの他の種類の標的)だけを検出するプローブ(ProScreen(商標)チップ)または核酸および

50

タンパク質系両方の標的を検出するプローブ (UniScreen (商標) チップ) に結合することができる。

【0065】

NuScreen (商標) チップ: これらのチップは、試料の核酸成分を分析するために使用される。それらはDNA、RNAまたは両方を分析することができ、1本鎖または2本鎖形態で分析することができる。プローブはXNA系 (DNA、RNA、PNA、LNA、HNA等) またはタンパク質およびポリペプチド系 (ZFPなどの転写因子およびMGBなどの小分子) またはそれらの組み合わせであってもよい。XNAプローブは、2本鎖に結合する3本鎖形成オリゴを除いて、通常1本鎖核酸に結合する。従って、選択的な変性段階を含んでもよい。好ましいプローブはDNAオリゴヌクレオチド16~40塩基鎖長に基づく。ZFPおよびMGBは2本鎖形態で核酸を認識するので、変性段階を必要としない。試料の標的核酸は、NuScreen (商標) チップで検出する前に事前増幅してもよい。標的核酸は、増幅段階中検出可能な部分で標識してもよい。増幅は、PCR、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、インビトロ転写 (IVT)、核酸配列に基礎をおいた増幅法 (Nucleic Acid Based Amplification) (NASDA)、ローリングサークル増幅法 (RCT) などの従来の技法を使用して実施することができる。

10

【0066】

ProScreen (商標) チップ: これらのチップは、NuScreen (商標) チップが検出できない混合物の他の全ての成分を分析するために使用される。従って、ProScreen (商標) チップは、例えば、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、糖タンパク質、抗原、ハプテンまたは有機小分子を検出するために使用される。プローブはタンパク質、ペプチド系または細胞系 (特異的な抗体を発現する細胞など) であってもよいが、例えば、糖タンパク質、抗原、ハプテン、有機小分子、核酸分子およびアプタマーであってもよい。

20

【0067】

UniScreen (商標) チップ: これらのチップは普遍的なスクリーニング装置であり、特定の核酸配列またはタンパク質または他のものであるほとんど任意の種類の標的を非常に高い特異性および選択性で検出することができることを意味する。核酸以外の全ての分析物の検出に使用されるプローブはProScreen (商標) チップに使用されるものと同様である。しかし、タンパク質およびペプチド系核酸プローブは、試料中のDNAおよびRNAなどの核酸を検出するために使用することができる。ZFPおよびMGBプローブなどのタンパク質系プローブの利点は、それらは、核酸を変性させる必要性が全くなく、生理学的条件下において特定の核酸配列を認識するという点である。従って、核酸以外の標的を検出するために使用され、同一の結合条件下において効果的に使用されるプローブとそれらを一体化することができる。

30

【0068】

本発明は、核酸に選択的に結合するある種のタンパク質およびペプチド分子の既知の配列特異的認識特性を使用する。特異的な結合反応は標的核酸の変性を必要とせず、通常の生理学的条件下において生じる。特に、標的核酸分子は1本鎖形態に変性させる必要性がない。ZFPは、DNA、RNAおよびDNA-RNA2本鎖を認識する。結合は生理学的反応条件下において生じ、各ZFP-核酸配列対に特異的である。ZFPの結合親和性は、ZFP分子の標的配列と1塩基でも異なる核酸に対しては大幅に低下するので、1塩基変化をこの方法で容易に探査することができる。異なる塩基がマルチプルフィンガー (例えば、スリーフィンガー) タンパク質分子のミドルフィンガーによって認識される場合には、結合のこの差は特に顕著になる。

40

【0069】

従って、新規方法により、同一表面上で、同一装置を使用して、分析物の性質とは独立して、ほとんどの任意の組み合わせの分析物の同時検出が初めて可能になる。このような機能を発揮する装置はUniScreen (商標) チップである。一態様において、ピオチン化DNA/RNA標的 (PCR/IVT段階中に標識される) を使用することができる。標識された核酸標的はZFPによって捕獲され、ストレプトアビジン/HRPに結合した抗ピオチン抗体を使用して検出される。また、チラミッドシグナル増幅/ローリングサークル増幅法 (TAS/RCAT) をさ

50

らなるシグナル増幅に使用することができる。銀上の金染色 (gold on silver staining) 方法 (免疫組織化学的染色技法に類似) も使用することができる。

【0070】

基材の選択およびプローブを接続する方法

この節には、診断装置を作製するために使用することができ、プローブをこれらの基材に接続するために使用することができる異なる固定方法の例を提供する異なる種類の基材 (例えば、ガラススライド) および表面を記載する。

【0071】

一態様において、ガラススライドは、バイオチップを製造するために使用される。基材 (フィルムまたは膜など) は、シリカ、ケイ素、プラスチック、金属、金属合金、アノポア (anopore)、ポリマーおよびナイロンから製造することもできる。結合を増強するためまたは使用時の非特異的結合を阻止するために、プローブを接続する前に、基材の表面を化学物質層で処理することができる。例えば、ガラススライドを、アミノアルキルシランのコーティングまたはアクリルアミドおよびタンパク質などのポリマー材料のコーティングなどの自己組織化単分子膜 (SAM) でコーティングすることができる。種々の市販のスライドを使用することができる。このようなスライドの例として、3D-link (登録商標) (Surmodics)、EZ-Rays (登録商標) (Mosaic Technologies)、Fastslides (登録商標) (Schleicher and Schuell)、Superaldehyde (登録商標) および Superamine (登録商標) (CEL Technologies) が挙げられる。

【0072】

プローブを基材の固相表面に共有結合で接続することができる (しかし、非共有結合による接続方法を使用することもできる)。一態様において、同様の基材、コーティングおよび接続化学が3つの装置、UniScreen (商標)、ProScreen (商標)、NuScreen (商標) 全てに使用される。別の態様において、異なる化学が適用される。

【0073】

プローブを基材に接続するために、数多くの異なる化学的表面改良剤を基材に付加することができる。化学的表面改良剤の例として、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) 基、アミン、アルデヒド、エポキシド、カルボキシル基、ヒドロキシル基、ヒドラジド、疎水基、膜、マレイミド、ビオチン、ストレプトアビジン、チオール基、ニッケルキレート、光反応性基、ホウ素基、チオエステル、システイン (例えば、Muirら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95巻、pp6705~6710、1998年6月の未変性の化学的ライゲーシオン方法のため)、ジスルフィド基、アルキルおよびアシルハライド基、グルタチオン、マルトース、アジド、ホスフェートおよびホスフィンが挙げられる。化学的に改良されたこのような表面を有するガラススライドは数多くの改良をについて市販品を購入可能である。それらは、その他のことは標準的な方法を使用して容易に製造することができる (マイクロアレイバイオチップ技術 (Microarray Biochip Technologies)、マークシェナ (Mark Schena) 編、2000年3月、バイオテクニクスブックス (Biotechniques Books))。

【0074】

一態様において、アミンに反応性の基材表面が使用される。この反応の利点は、素早く、毒性の副産物を生じないということである。このような表面の例として、NHS-エステル、アルデヒド、エポキシド、アシルハライドおよびチオエステルが挙げられる。ほとんどのタンパク質、ペプチド、糖ペプチド等は、このような表面と反応して、これらの表面に共有結合させる遊離アミン基を有する。内部または末端アミン基を有する核酸プローブを合成することもでき、市販品を購入可能である (例えば、IDTまたはOperon社製)。従って、同様の化学を使用して、核酸を表面に (例えば、共有または非共有) 結合することができる。

【0075】

基材表面はアミンと反応性である必要はないが、多数の基材表面はコーティングにより容易にアミン反応性基材に変換することができる。コーティングの例として、アミンコーティング (ビス-NHS架橋剤および他の試薬と反応することができる)、チオールコーティ

10

20

30

40

50

ング(マレイミド-NHS架橋剤等と反応することができる)、金コーティング(NHS-チオール架橋剤等と反応することができる)、ストレプトアビジンコーティング(ビス-NHS架橋剤、マレイミド-NHS架橋剤、ビオチン-NHS架橋剤等と反応することができる)およびBSAコーティング(ビス-NHS架橋剤、マレイミド-NHS架橋剤等と反応することができる)が挙げられる。または、基材ではなくプローブに特定の化学的改良剤を反応させて、プローブをそれぞれの表面と反応性にすることができる。

【0076】

ある種類の表面の化学的反応性を別のものに変換するために、数多くの他の多官能性架橋剤を使用することができる。これらの基は二官能性、三官能性、四官能性等であってもよい。それらはまたホモ官能性またはヘテロ官能性であってもよい。二官能性架橋剤の例はX-Y-Z(式中、XおよびZは2つの反応性基であり、Yは接続リンカーである)である。さらに、XおよびZが、NHS-エステルなどの同一の基である場合には、得られる架橋剤、NHS-Y-NHSはホモ二官能性架橋剤で、アミン基含有分子でアミン表面に接続すると思われる。XがNHS-エステルで、Zがマレイミド基である場合には、得られる架橋剤、NHS-Y-マレイミドはヘテロ二官能性架橋剤であり、チオ基(またはアミノ基)含有プローブでアミン表面(またはチオール表面)に結合すると思われる。数多くの異なる官能基を有する架橋剤は広範に利用可能である。このような官能基の例として、NHS-エステル、チオ-エステル、アルキルハライド、アシルハライド(例えば、ヨードアセタミド)、チオール、アミン、システイン、ヒスチジン、ジスルフィド、マレイミド、シス-ジオール、ボロン酸、ヒドロキサム酸、アジド、ヒドラジン、ホスフィン、光反応性基(例えば、アントラキノ、ベンゾフェノン)、アクリルアミド(例えば、アクリダイト(acrydite))、親和性基(例えば、ビオチン、ストレプトアビジン、マルトース、マルトース結合タンパク質、グルタチオン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、ホスフェート、疎水基(例えば、フェニル、コレステロール)等が挙げられる。このような架橋剤は、プローブを表面に接合するために、表面またはプローブまたは両方と反応することができる。

【0077】

他には、アクリダイト(acrydite)、マレイミド、アシルハライドおよびチオ-エステル表面などのチオール反応性表面が挙げられる。このような表面は、(通常に存在する)チオール基を介してタンパク質、ペプチド、糖ペプチド等と共有結合することができる。チオール側基を含有する核酸プローブも容易に合成することができる。

【0078】

または、ポリエチレングリコール(PEG)などの分子でガラス表面を改良することができる。改良されたこのような表面を作製する新規方法は、鎖長がばらばらのPEGを使用することである(例えば、図4Aおよび4B並びに図6A~6C参照)。上記のように、PEGの露出されている末端を二官能性架橋剤で活性化することができる。図4Bに示すように、鎖長が異なるPEGリンカーは、平坦な二次元結合環境(図4A)ではなく三次元結合環境を作製し、接続の際に生物分子がよく充填されるので、プローブ接続密度が高くなる。タンパク質などの生物分子は、完全に平らで平坦な結合表面よりも、わずかに三次元的または平坦でない結合表面の方がよく充填されると思われる。

【0079】

さらに別の方法は、ストレプトアビジンまたは他のリンカー分子の三次元的に共有結合されたメッシュを作製することである(図5A~6C参照)。例えば、ピラニア(piranha)-処理ガラスを最初に末端アミン含有シリル化剤(例えば、N-(3-アクリルオキシ-2-ヒドロキシプロピル)-3-アミノプロピルトリエトキシシラン、アクリルオキシトリメチルシラン、トリエトキシメチルシランおよびアミノプロピルトリエトキシシラン)でコーティングする。焼成段階の後、活性化したストレプトアビジン(アビジンなどの他のタンパク質を使用することもできる)をブランクスライドの表面に適用する(活性化は、二官能性架橋剤を使用して実施される)(図5A)。これは、ガラス表面に三次元メッシュを作製する。ストレプトアビジン分子はガラス表面に結合するだけでなく、互いに架橋して(図5C)、秩

10

20

30

40

50

序あるアレイを作製する。架橋が存在しないと、アレイは、典型的には、無秩序になる（図5B）。架橋密度は、ストレプトアビジンおよび架橋剤（NHS-活性化剤、ビス-ビオチン等）の相対濃度によってコントロールすることができる。ストレプトアビジンによるコーティング後、過剰のNHS-エステルをグリシン（またはエタノールアミン、トリシン等の他の試薬）またはBSA膜、乳汁タンパク質もしくは非特異的結合を低下するような数多くの他の生化学的試薬で中和することができる。NHS-ビオチンまたはマレイミド-ビオチンなどの多官能性架橋剤をこの表面に付加すると、（アミンまたはチオ基含有）プローブを共有結合する準備が整った活性な基を再生する。得られる表面はタンパク質および他のプローブ分子との反応性はるかに大きい（図5C）。

【0080】

図6A～6Cは図5A～5Cに類似しているが、この例では、図4Aにも示すように、鎖長がさまざまなプローブを使用する。鎖長が異なるプローブ（および/または架橋剤）は、接続の際に生物分子がよく充填されるので、プローブ接続密度を高くすることができる平らでない結合環境を提供する。

【0081】

多数の他の表面改良法（光架橋性表面および熱架橋性表面）は当業者に既知である。Mosaic Technologies（マサチューセッツ州ウォルサム）、Exiqon（商標）（デンマーク、ヴェドバエク）、Schleicher and Schuell（ニューハンプシャー州ケーン）、Surmodics（商標）（ミネソタ州セントポール）、Xenopore（商標）（ニュージャージー州ホーソーン）、Pamgene（オランダ）、Eppendorf（ドイツ）、Prolinx（ワシントン州ボセル）、Spectral Genomics（テキサス州ヒューストン）およびCombimatrix（商標）（ワシントン州ボセル）などのいくつかの技術を市販品として利用可能である。

【0082】

ガラス以外の表面もこのような装置に好適である。例えば、金、ケイ素、銅、チタンおよびアルミニウムなどの金属表面、酸化ケイ素、酸化チタンおよび酸化鉄などの金属酸化物、並びにポリスチレンおよびポリエチレンなどのプラスチック、ゼオライト（zeolite）および他の材料を使用することもできる。装置は、LED（発光ダイオード）およびOLED（有機発光ダイオード）表面上に製造することもできる。LEDまたはOLEDのアレイをプローブアレイの基面に使用することができる。このようなシステムの利点は、それらが結果読出しの容易な光電気的手段を提供することである。裸眼で結果を読み取ることができる場合もある。

【0083】

固体ピン、羽軸ピン、インクジェットシステム、リング-アンド-ピンシステム等を使用した接触様式プリント法（例えば、米国特許第6,083,763号および同第6,110,426号参照）または非接触プリント法（圧電、バブルジェット、シリンジ、動電学的、機械的または音響的方法を用いる）を使用して、基材、例えば改良された表面にプローブを配置することができる。プローブを基材表面に配置し、分布させる装置は、例えば、パッカードインストルメンツ（Packard Instruments）社によって製造されている。当技術分野において既知の多数の他の方法がある。プローブを基材に配置、例えばスポットする好ましい装置には、固体ピンまたは羽軸ピンが含まれる（Telechem/Biorobotics）。良好な結果を得るために、各プローブは1回以上反復して配置することができる。単純に目で見るだけで読出しを結果に容易に変換することができるような幾何学的パターンでプローブを配置することもできる（図1～3参照）。例えば、プローブは、9スポットの四角形パターン（図1A）、5スポットの「X」パターン（例えば図1Bおよび3A）、3スポットの「V」もしくは「」パターン（図2B）、または5スポットの「+」（図2C）で配置することができる。

【0084】

装置の微調整（「展開」）

プローブを配置したら、使用した表面改良およびプローブ接続化学による標準的な技法を使用して、装置/スライド/支持体を展開する。例えば、アミン基含有プローブが接続されているNHS-エステル活性化スライドは、加湿チャンバー（好ましくは75%～80%）にお

10

20

30

40

50

いて、4 で2~16時間インキュベーションすることによって展開することができる。好ましい態様において、展開されたスライドは、使用時まで、緩衝水溶液中に密封しておくことができる。緩衝水溶液は、ウシ血清アルブミン(BSA)、乳汁タンパク質、グリセロール、トレハロースまたは接続したプローブの活性を保持するような他の試薬を含有してもよい。他の態様において、スライドは乾燥し、低温で、遮光した環境に保存することができる。

【0085】

通常使用されるブロッカーは以下のとおりである：

1. BSA、例えば、他のブロッカーおよび界面活性剤と組み合わされる。
2. 固有のビオチンを含有する乳汁系タンパク質であるカゼイン(しかし、干渉を防止するために、ビオチンに関係する系で実施する場合には避けるべきである)。
3. Peptidase(商標)(カゼインの酵素的な水解物)：カゼインの酵素的な誘導体。
4. 非イオン性界面活性剤：Tween 20(登録商標)およびTriton X-100(登録商標)が典型的である。別のブロッカーと併用する場合には、一般的な比は1%ブロッカー：0.05%界面活性剤である。
5. 「関連のない」IgG。
6. FSG(サカナ皮膚ゼラチン)、純粋なゼラチンまたはゼラチン水解物を使用することもできる。
7. 用途が多いブロッカーであり、数多くのサイズ、構成および荷電で利用可能なポリエチレングリコールを使用することもできる。
8. ウマまたはサカナ血清などの血清および交差反応しない血清はかなり不活性である。
9. 多糖および糖タンパク質。
10. 市販のブロッカー、種々の分子量の2つ以上の単独のブロック物質の複合体も広い条件範囲にわたって効果的に使用することができる。

【0086】

別のブロック方法は以下のように実施される。プローブを固相表面にスポットした後、電磁放射線を照射することによってチップ表面の残りを不活性化することができる。ブロック剤を変性するために、この段階は、上記のブロック段階の後に実施することができる。この段階は、表面薬剤の抗原性を低下し、アッセイ中の標的分子の非特異的結合が低下される。

【0087】

装置

図1Aに示すように、診断用バイオチップ装置20は、スライドなどの固相支持体26上に、マイクロウェルなどの16反応部位24などの、多重反応部位(例えば、マルチスポットまたはマルチウェル)様式の2つ以上のアレイ22を有することができる。マルチウェル装置の場合には、各マイクロウェル24は、アレイ22または「複数アレイを配列した(array of arrays)」様式でプローブを有することができる。プローブは、読み取り易い幾何学的パターン(ここでは、9スポットの四角形)で配置することができる。各マイクロウェルは、仕切られたゾーンを有するという点において範囲を定められている。仕切り操作は、プローブ配置段階の前または後に、スライド表面に、化学的処理または好ましくは疎水性のマスクを適用することによって実施することができる。仕切り操作により、ウェルのない支持体と比較して、試料保持能力が高い円筒形マイクロウェルを作製することができる。各固相支持体26は、コンピュータ制御式自動処理のための(バーコードなどの)スキャン可能なマーキング28を備えることができる。

【0088】

図1Bは、膜状のスライドなどの、固相支持体36上のマイクロウェルなどの、96の反応部位34を有する診断用バイオチップ装置30を例示する。各マイクロウェル34は、アレイ32または「複数アレイを配列した(array of arrays)」様式のプローブを有することができる。プローブは、読み取り易い幾何学的パターン(ここでは、5スポットの「X」)で配置

することができる。固相支持体36は、コンピュータ制御式自動処理のためのスキャン可能なマーキング38を備えることができる。このようなマーキングは、支持体の側面または背面を含む、支持体のどこにあってもよい。これらのマーキングにより、レーザースキャナーなどの従来のスキャン装置を使用して支持体/スライドを読み取り/スキャンすることができる。

【0089】

図2A~2Cは、追加のプロープアレイ構成を例示する。図2Aは、「X」構成のプロープを示す。図2Bは、「V」または「」構成を示し、図2Cは「+」構成を示す。

【0090】

図3A~3Cは、スライドなどの固相支持体46上にマイクロウェルなどの、16反応部位44などの、多重反応部位（例えば、マルチウェル）様式の2つ以上のアレイ42を有する別の診断用バイオチップ装置40を示す。各マイクロウェル44は、アレイ42または「複数アレイを配列した（array of arrays）」様式のプロープを有することができる。プロープは、幾何学的パターン（ここでは、5スポットの「X」）で配置される。各マイクロウェル44は、仕切られたゾーンを有するという点において範囲を定められている。ここでは、仕切り操作は、プロープ配置段階の前または後に、固相支持体46の表面に、マスク43、好ましくは疎水性物質を適用することによって実施される。仕切り操作により、ウェルのない支持体と比較して、試料保持能力が高い円筒形マイクロウェルが作製される。図3Bの断面図に示すように、マスク43は中間の有機層45の上面の支持体46に適用することができる。図3Cは、単一のマイクロウェル44の三次元図を示す。

【0091】

各固相支持体46は、コンピュータ制御式自動処理のためのスキャン可能なIDマーキング48を備えることができる。ここでは、スキャン操作に容易にアクセスするためまたは各マーキングに異なる情報を提供するために、2セットのマーキング48がある。

【0092】

バイオチップ装置の1つの問題は、試料適用段階中に形成される気泡である。円筒形状のウェルの利点は、マイクロウェルのカーブした壁により、気泡問題が少なくなるということである。長方形の形状は、通常気泡を保持する尖った角を作る。円筒形状はその問題がない。

【0093】

マイクロアレイおよびバイオチップに使用する混合装置

インキュベーション中の試料の混合はマイクロアレイアッセイにおいて重要である。異なる標的分析物のそれぞれのプロープへの結合効率は、濃度および拡散速度に直接関連する。インキュベーション中に試料を混合すると、拡散速度を増加する助けになり、良好で再現性の大きい結果が得られる。効率的な混合手段を実施することができる、結合時間を短縮することもできる。図7Aおよび7B並びに図8Aおよび8Bは、（マイクロファンおよび生物モーターなどの）マイクロモーターで駆動されるマイクロミキサーを備える固相支持体を例示する。これらのマイクロモーターは、例えば、電氣的、磁氣的、光電氣的または生化学的モーターであってもよい。混合操作は、試料中に（DynaBeads（登録商標）などの）磁気ビーズを導入し、各ウェルを攪拌するためにバイオチップの下方で攪拌器を使用することによって実施することもできる。

【0094】

図7Aは、16のマイクロウェル74を有する固相支持体76を示す。各マイクロウェル74は、マイクロファンブレード75を含むマイクロモーター73が備えられている。図7Bは単一のマイクロウェル74の拡大図およびスライドにモーターを接続し、このモーターの周りに四分円4つでプロープアレイを配置する方法を示す。他のプロープアレイ構成も可能である。電気は、例えば、スライド76の一方の端部の1つ以上の電気コネクタ79から各マイクロモーター73までつながる電線77によって通される。電気はまた、例えば、標準的なプリント回路技術を使用して固相支持体上または固相支持体内に配置した金属または他の導電体によって通すこともできる。新規小型化技法により、同様の方法でマイクロモーター全体

10

20

30

40

50

を固相支持体上に配置することができる。上記のように、スライド76はコンピュータ読み取り可能なマーキング78を備えることができる。

【0095】

図8Aは、16のマイクロウェル84を有する固相支持体86を示す。各マイクロウェル44は、マイクロファンブレード85を含むマイクロモーター83が備えられている。図8Bは単一のマイクロウェル84の拡大図および、このモーターの周りに円形にプローブアレイを配置する方法を示す。電気は、例えば、スライド86の一方の端部の1つ以上の電気コネクタ89から各マイクロモーター83までつながる電線87によって通される。上記のように、電気はまた、例えば、標準的なプリント回路技術を使用して固相支持体上または固相支持体内に配置した金属または他の導電体によって通すこともできる。新規小型化技法により、同様の方法でマイクロモーター全体を固相支持体上に配置することができる。上記のように、スライド86はコンピュータ読み取り可能なマーキング88を備えることができる。

10

【0096】

これらの態様全てにおいて、電子的および光工学的な手段などの電磁源を用いて電気モーターを駆動することができる。光を使用してスイッチを入れることができる光学的活性式スイッチを有することができるモーターもある。電磁励起の際に1つの構造から別の構造への立体変換を受けるcis-およびtrans-スチルベンなどの2つの幾何学的形状間を回転するように誘導することができる分子は、このようなモーターの一例である。ATPシンターゼなどの生物モーターは電磁源または生物反応によって駆動させることができる。例えば、ATPシンターゼをビーズに接続し（例えば、「生物機械：ミルから分子 (Biological machines: from mills to molecules)」、Nature Reviews Molecular Cell Biology 1; 149-152, 2000参照）、そのモーターを別のビーズに接続することができる。2つのビーズは、ATPなどの分子の存在下において互いに対して回転し、過程中流体を混合する。

20

【0097】

数多くの生物分子系流体マイクロミキサーが提供されている。例えば、これらのマイクロミキサーはATPaseに基づいていてもよい（例えば、Soongら、Science, 290(5496): 1555-1560, 2000, Wangら、Nature, 396: 279-282, 1998, Montemagnoら、ナノスケール生物エンジニアリングおよび輸送基 (Nanoscale Biological Engineering and Transport Group)、コーネル大学 (Cornell University)、Nanotechnology, 10: 225-231, 1999、(<http://falcon.aben.cornell.edu>)参照)。マイクロミキサーは、キネシン、キネシン関連タンパク質、ミオシン、DNAヘリカーゼおよびDNAスライディングクランプ（例えば、Bertamら、Journal of Biological Chemistry, 275(37):28413-28420, 2000, O'Donnellら、Journal of Biological Chemistry, 270(22):13358-13365, 1995, Hingoraniら、The EMBO Journal, 18(18):5131-5144, 1999参照）、核酸系ロタキサンおよび擬ロタキサン（Ryanら、化学と生物 (Chemistry and Biology), 1998)、環状3本鎖形成オリゴヌクレオチド (CTFO) および2本鎖DNA (Rehmanら、1999) 並びにこのようなタンパク質および核酸のキメラおよび誘導体に基づいてもよい。図24A~33Cは、これらが製造され、使用される方法を例示する。

30

【0098】

革新的な分子スイッチをこれらのマイクロミキサー用に設計することもできる。ヌクレオチド三リン酸の新規合成類似物をタンパク質マイクロミキサーの結合部位のアミノ酸改変と併用してこの目的に使用することができる。例えば、ショカット (Shokat) らによって種々のキナーゼの検討に使用されている、構造に基づいたアミノ酸変更を、これらのタンパク質に適用することができる (Bishopら、工作タンパク質用非天然型リガンド：化学遺伝学のための新規ツール (UNNATURAL LIGANDS FOR ENGINEERED PROTEINS: New Tools for Chemical Genetics)、Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 29: 577-606, 2000参照)。従って、これらのマイクロミキサーの動作は化学的手段を使用して綿密に制御することができる。

40

【0099】

これらの混合装置には、カバースリップまたはハイブリダイゼーションチャンバーなど

50

のバイオチップを覆う表面に組み入れることができるものもある。このような方法の利点は、混合装置は現在利用可能なチップ台と適合可能であると思われることであると思われる。

【0100】

ハイブリダイゼーションチャンバー

現在のバイオチップアッセイの重大な問題の1つは、結果の変動が大きいことである。この問題を克服する方法は、2つ以上のアレイまたは2つ以上のバイオチップで同一のアッセイを実施することによる。これは、結果の信頼レベルを改善する。この方法の欠点は、結果に影響を与えるかもしれない、アッセイ条件のわずかな変化がまだ存在しうることである。よりよい方法は、反応条件が同一であるような方法でアッセイを実施することであると思われる。新規システムは、同一反応条件下において同時に2つのチップ上でアッセイを実施することができる新規ハイブリダイゼーションチャンバーを備えることができる。2つのバイオチップは他方の上面に一方を配置し、反応性アレイは互いに直面し、薄いセパレーターで端部に沿って分離されている。中央部に残された空間は試料を収容し、スライドの両方と同時に接触する。2つのスライドおよびセパレーターはチャンバー内に封入されてもよい。または、事前に形成された側面の突出部を有するチャンバーを設計し、2つのバイオチップを挿入して、反応チャンバーを作製してもよい。図35A~Eおよび図36A~Eは、新規ハイブリダイゼーションチャンバーのいくつかの態様および全ての構成要素を例示する。これらのハイブリダイゼーションモジュールの内側チャンバーは、ピペットマン、シリンジまたは針を使用するなど、種々の方法で充填することができる。

10

20

【0101】

倒立型アレイ装置

新規倒立型アレイマイクロアレイ装置を図9A~12Dに例示する。これらの新規装置は固相支持体または台面上に存在する1つ以上の高架構造物またはカラムからなる。装置はこのような構造物を1つ以上有することができ、構造物は任意の幾何学的形状および形態であってもよい。構造物はまた垂直方向に真っ直ぐでも、曲がっていてもまたはねじれていてもよい。構造物は1つ以上のアレイの形態であってもよい。多数のプロープは高架構造物の表面にアレイ状（または複数アレイを配列したアレイ状（array of arrays））に結合される。従って、各高架構造物は（多重の）反応部位を示す。この装置は、反応を同時または逐次的に実施するために使用することができる。

30

【0102】

このような装置を作製するために既知の基材および化学のいずれかを使用することができる。例えば、ガラス、シリカ、シリコンウエハー、プラスチック、金属および金属合金は、全て固相支持体として使用することができる。高架構造物は、エッチング、機械加工、フォトリソグラフィおよび他の微細加工技法などの当技術分野において既知の数多くの技法によって製造することができる。同様に、本明細書に記載する数多くの異なる方法を使用して、プロープをこれらの装置の表面に接続することができる。

【0103】

図9A~9Cは、このような倒立型アレイ装置90の一例を示す。装置90は、スライドなどの、固相支持体96上に環状高架構造物などの、16の反応部位94などの、多重反応部位（例えば、マルチウェル）様式の2つ以上のアレイ92を有することができる。各高架構造物94は、アレイ92または「複数アレイを配列した（array of arrays）」様式のプロープを有することができる。プロープは、読み取り易い幾何学的パターン（ここでは、9スポットの四角形）で配置することができる。各高架構造物は、仕切られたゾーンを有するという点において範囲を定められている。仕切り操作は、ここではプロープ配置段階の前または後に、スライド96表面に、疎水性または親水性材料のマスク（またはコーティング）93を適用することによって実施することができる。仕切り操作により、このような構造物のない支持体と比較して、試料保持能力が高い円筒形高架支持体構造物を作製することができる。各固相支持体96は、コンピュータ制御式自動処理のための（バーコードなどの）スキャン可能なマーキング98を備えることができる。

40

50

【 0 1 0 4 】

図9Bは、側面図で見た装置90を示す。図9Cは、固相支持体96上の2つの異なる構造（立方体および円柱）の高架構造物94を三次元的に示す。

【 0 1 0 5 】

図10Aは、2種類の倒立型アレイ装置100を略図形式で示す。各装置は固相支持体106および複数の高架構造物104（立方体または円柱）を備える。固相支持体106は、バーコードまたは環状コードなどの、スキャン可能な識別マーキング108を備えることができる。図10Bは、使用するために逆さにしたときの同一の装置を示す。

【 0 1 0 6 】

図10Cは、高架構造物104の各々が、アッセイおよび読出し過程を簡単に行うことができる、埋設型毛細管状光ファイバーまたは電気的「管」105を備える態様を例示する。これらの「管」105の各々は、関連する1つのプローブまたはプローブセットが接続されうる。各管または管セットは、結果を読み出すために管から固相支持体106を通してまたは沿って装置の外部に信号を搬送する電線または光ファイバー107が（例えば、電気的または光学的に）接続されている。

【 0 1 0 7 】

いくつかの用途では、装置の表面に導入した試料流体を保持するために、倒立型アレイ装置は液状障壁または壁で囲む。他の態様では、マイクロタイタープレートなどの、チャンパー上またはチャンパー内の装置全体をインキュベーションすることによって、新規倒立型アレイ装置を使用したアッセイを実施する。これらの場合では、試料は装置に直接配置または分注されるのではなく、装置が適用される別個のマイクロタイタープレート内に保持されるので、試料の範囲を定める構造物または流出防壁はアレイ装置自体には必要ない。一態様において、アッセイを実施するために、マイクロタイタープレートなどの反応容器に装置を沈めることができる。

【 0 1 0 8 】

図11A～11Eは、倒立型アレイ装置110を逆さにし、マイクロウェルまたはマイクロタイタープレート111に挿入する方法を例示する。図11Aは、スキャン可能なマーキング118を有する固相支持体116上に96の高架構造物114を有する倒立型アレイ装置110の平面図を示す。図11Bは装置110の側面図を示す。図11Cは、マイクロウェル113を有するマイクロタイタープレート111の平面図を示す。使用時には、倒立型アレイ装置110を逆さにし、各高架構造物114を個々のマイクロウェル113に挿入するために、マイクロタイタープレート111上に配置する。各マイクロウェルは1つの試料を含有し、各マイクロウェルは同一または異なる試料を含有してもよい。2、3、4、5、10またはそれ以上のマイクロウェルのセットも同一試料を含有することができる。

【 0 1 0 9 】

図13A～13Cは、倒立型アレイ装置の別の態様を例示する。装置は、マイクロウェルプレートに有するこれらの装置の配列または位置づけを助ける端部形状構成を有することができる。これらの端部形状構成はまた、自動機器によりこれらの装置を使用する助けにもなりうる。

【 0 1 1 0 】

図14Aは、倒立型アレイ装置のさらに別の態様を示す。各高架構造物は、アレイまたは複数アレイを配列した（array of arrays）様式で数多くのプローブが接続されうる。高架構造物の表面も三次元構造を有することができる。可能性のある断面を図14B、14Cおよび14Dに示す。下部構造は、1つのプローブがこれらの下部構造または形状構成の各々に接続されるように、高架型であっても（14B）、平坦であっても（14C）または凹み/ディンプルが形成されていてもよい（14D）。

【 0 1 1 1 】

他の態様において、装置は、封入型反応チャンパー（試料流入孔等を有する）で密封型チップを形成することができる。アッセイの読出しは、光学的方法（例えば、比色および蛍光）、電気的検出、スキャノメトリー（scanometric）検出、表面プラズモン共鳴、イ

10

20

30

40

50

ンピーダンス (impedence)、電気容量および化学的検出 (例えば、酸化還元電位の変化を測定する) などの標準的な技法を使用して実施することができる。

【0112】

この種類の装置/機器の利点は多い。この装置/システムは、特に現在のロボットシステムを用いて自動化が容易である。倒立型アレイシステム/装置を、1つの反応容器から別の反応容器に容易に移動することができる。例えば、生物試料を1つのトレーに入れ、洗浄液を別のトレーに入れることができる。倒立型アレイを試料と共にインキュベーションし、次いで洗浄のために洗浄プレートに簡単に移動することができる。従って、アッセイを容易に自動化することができ、自動化は、マイクロタイタープレート様式と類似したトレーおよび装置を容易に取り扱うことができる既知の機器においても実施することができる。各装置は、選択的に、装置の移動を助ける「ハンドル」を備えることができる。ハンドルが提供されていない場合には、吸引装置の助けで、または標準的な装置および技法を使用するにぎり手 (grabbers) を用いて、ロボットアームが装置を移動させることができる。マイクロタイタープレートは、「倒立型アレイ」装置の存在下において機械的に移動または攪拌され、倒立型アレイ装置をはずさなくても機械的の混合を提供することができるので、倒立型アレイ装置はまた、アッセイ手法中に優れた混合能力を有する。

10

【0113】

また、高架構造物は互いから広く離されているので、多重アッセイを単一の装置上で実施することができる。多数の試料の同時分析を実施するために、または多数のプロブセットを用いておよび/もしくは異なる条件下において、あるいは両方で、同一試料を同時分析するために、多数の高架構造物 (倒立型アレイ) を有する装置を、多数のマイクロウェルを有するトレー内でインキュベーションすることができる。

20

【0114】

三次元多孔性アレイ装置

マイクロアレイ系バイオチップは多重化または平行アッセイの理想的な環境を提供する。しかし、システムの欠点は、分析物の拡散が遅いことにより、マイクロアレイ上では反応が遅いことである。例えば、抗原-抗体結合などの結合アッセイでは、特定のスポット/部位における反応は、選択された分子のその部位への輸送およびその部位のプロブと分析物 (または標的) との反応に依存する (例えば、Arenkovら、Analytical Biochemistry, 278, 123-131, 2000、Timofeevら、Nucleic Acids Research, 24(16), 3142-3148, 1996、Van Beuningen R., Pamgene International社副社長: ポスト-ゲノム用途のためのフロースルー多孔性基材マイクロアレイ (A Flow Through Porous Substrate Micro-Array for Post-Genomic Applications) 参照)。典型的には、マイクロアレイ上でのアッセイを含む結合アッセイにおいて、大型の標的分子の拡散は遅く、律速因子となる。この過程のこの速度は、アレイ表面上の分析物を機械的、電氣的、電子的、光学的、光電子的または他の手段で混合することによって実質的に増加することができる。本発明者らは、これらの問題に対処するために、新規三次元多孔性アッセイを考案した。

30

【0115】

新規三次元多孔性マイクロアレイ装置を図15A~21Eに例示する。これらの新規装置は、アレイまたは複数アレイを配列した (array of arrays) 様式の1つ以上の多孔性ゲル結合プロブからなる。装置はこのような構造物を1つ以上有してもよく、構造物は任意の幾何学的形状および形態であってもよい。構造物はまた垂直方向に真っ直ぐでも、曲がっていてもまたはねじれていてもよい。従って、各装置は (多重) 反応部位を示す。装置は、反応を同時または逐次的に実施するために使用することができる。このような装置を製作するために、既知の基材および化学のいずれを使用してもよい。例えば、ガラス、シリカ、シリコンウエハー、プラスチック、金属および金属合金は全て固相支持体として使用することができる (例えば、Stillman BA, Tonkinson JL, Scleicher and Schuell; Biotechniques, 29(3), 630-635, 2000、Rehmana; Mosaic Technologies Inc., Nucleic Acids Research, 27(2), 649-655, 1999参照)。

40

【0116】

50

装置は数多くの方法で製造することができる。一手段において、フォトリソグラフィ、エッチング、穿孔または当技術分野において既知の他の技法を使用して、固相三次元物体に小孔を開ける。孔は任意の幾何学的形状であってもよく、スリットまたは溝を有してもよい。ポリマー基質にプローブを埋設することを含む種々の方法を使用して、プローブをこれらの孔に固定することができる。プローブをプレポリマーゲルと別個に混合して、異なる孔の各々に注いで、または分注もしくは配置してポリマー多孔性プラグを形成することができる。その後、光重合開始剤または当技術分野において既知の他の方法を使用して、プローブ-ゲル混合物を重合することができる（例えば、Arenkovら；Analytical Biochemistry, 278, 123-131, 2000、Timofeevら；Nucleic Acids Research, 24(16), 3142-3148, 1996、Mirzabekovら；Methods in Molecular Biology, 170, 17-38, 2001およびMirzabekovら；米国特許第5,981,734号、1999年11月9日参照）。重合したプローブ-ゲル材料は、片側または両側に二次的なマスクまたは膜を適用することによって、三次元基材に固定することができる。固定材料もスリットまたは孔を有してもよい。特に孔が外側に溝を有する場合には、プローブを固定するためにダンベル形状のポリマープラグを使用することができる。この方法では、プラグは滑ったり、脱落できない。このような孔およびプラグは、スリットの入った別の膜またはスリットのない別の膜で、両側をさらに密封することができる。

【0117】

以下を含む、この種類の装置の数多くの利点がある：

(i) プローブを三次元多孔性材料に結合する。三次元プローブスポットは、二次元スポット（すなわち、平坦な表面へのプローブの結合）と比較して、スポットに結合するプローブの量および濃度が高くなる。これは、スキャンされたマイクロアレイのスポット解像度の増加に対応する。

(ii) スポットの多孔性によりスポットの多孔性アレイが形成される。これにより、スポット全体にわたっておよびアレイ状スポット周辺への標的材料の拡散が増大し、結合性能がよくなる。多孔性材料と多孔性スポット/プラグの両側のどちらかにある流体との間には固相の不浸透性の境界はない。従って、このようなアレイ上で試験中の生物試料は、パッドを通過中に、任意の不浸透性面に遭遇しない。当技術分野において既知のパッド系バイオチップは全て、パッド/スポットを通過する生物試料の拡散が悪い、任意のゲル-パッドをカバーする固相基材（Schleicher and Schuell、MotorolaおよびMosaic Technologies社製の製品など）（例えば、Stillman BA、Tonkinson JL、Schleicher and Schuell；Biotechniques, 29(3), 630-635, 2000、Rehmanら；Mosaic Technologies Inc., Nucleic Acids Research, 27(2), 649-655, 1999参照）を有する。

(iii) 新規装置の拡散性は、アレイ面と直交する方向に流体を機械的に混合することによってさらに改善することができる。例えば、真空吸引装置またはピペットマンをこの目的に使用することができる。これは、多重アッセイを実施するのにかかる時間を実質的に短縮することができる。電気泳動および他の電子的（例えば、Nanogen、米国特許第6,238,624号）または光学的手段を使用することによって、試料混合または輸送を実施または増加することもできる。

(iv) アッセイ時間が実質的に短縮されるので、特に単一のバイオチップが容器内に配置され、流体混合が機械的にコントロールされる場合には、治療現場(point-of-care)装置を製造するためにも、この種類の装置を適合させることができる（図21A~E参照）。

(v) 各プローブスポットの位置およびサイズは均一であるので、アレイのアッセイ後検出結果を簡単にし、自動化することができる。これにより、スポット間およびアレイ間変動が小さくなる。

(vi) 材料のバックグラウンド蛍光の問題は完全に排除されるので、ほとんど任意の材料を基材として使用することができる。プローブ-ゲル混合物だけの自己蛍光を考慮すればよい。

(vii) 多孔性材料にプローブを接続するために、ほとんど任意の接続化学を使用することができる。接続は共有結合であっても、共有結合以外であってもよい。従って、この種

10

20

30

40

50

類の様式は多種多様の選択を提供する。

(viii) マイクロアレイ装置にこの種類の設計を採用すると、製造費用を実質的に削減する。

【0118】

関心対象の参照文献としては他に、GeneLogic/HARC、米国特許第5,843,767号および <http://homer.hsr.ornl.gov/cbps/Genosensors.htm> が挙げられる。

【0119】

マイクロ流体コンセントレータ

新規マイクロ流体工学系装置（例えば、固相状態のアクチュエータおよびセンサーワークショップのプロシーディング（Proceedings of the Solid State Actuator and Sensor Workshop）、Hilton Head, S. C. (2000)におけるP. Chou, M. A. Unger, A. SchererおよびS. R. Quake、「チップ上に集積されたエラストマー流体実験-表面パターン化およびDNA診断(Integrated Elastomer Fluidic Lab on a Chip-Surface Patterning and DNA diagnostics)」ならびに固相状態のアクチュエータおよびセンサーワークショップのプロシーディング（Proceedings of the Solid State Actuator and Sensor Workshop）、Hilton Head, S. C. (2000)におけるP. Chou, M. A. Unger, A. SchererおよびS. R. Quake、「チップ上に集積されたエラストマー流体実験-表面パターン化およびDNA診断(Integrated Elastomer Fluidic Lab on a Chip-Surface Patterning and DNA diagnostics)」参照)をバイオチップ装置に組み入れても、または別個に使用してもよい。このようなマイクロ流体装置は、各々、相補的な分析物標的に結合するプローブのアレイを有するチャンバーまたはチャンネルを有することができる。この種類のアレイは、単一のスポット上で関連する分析物を濃縮する働きをする。結合された分析物は、プローブに切断されやすいリンカーを使用すると、放出され、第2のチャンネルまたはチャンバーに誘導されると思われる。そこで、分析物は、第2のプローブのアレイ上または毛細管状電気泳動チャンネル中のいずれかにおいてさらに分析されると思われる。従って、各分析物は2つの直交する次元で分析され、より正確な結果を提供する。マイクロ流体装置は、ガラス、ポリマー、プラスチック、ケイ素、金属および種々の他の固相基材上に作製することができる。

【0120】

一例として、この種類のシステムは、構造生物原理を使用したタンパク質プロファイリングを実施するために使用することができる。本質的に大多数のタンパク質が使用している、免疫グロブリンドメインなどの、代表的なタンパク質の折りたたみはごく限られた数しかない。特定のタンパク質の折りたたみを認識する、抗体プローブなどの特定のプローブを作製することができる。生物試料中の類似した折りたたみを有する全てのタンパク質に結合するように、このようなプローブを中央のチャンバー内に配置することができる。結合したタンパク質は、次のチャンバーにおいて、抗体またはサイトカインなどの特定の種類のタンパク質についてさらに分析することができる。従って、このマイクロ流体システムは、二次元で生物分析を実施する。

【0121】

これは、分析アッセイのためにアッセイ時間の速いマイクロ流体装置を使用する、装置内蔵装置型のシステム(a device inside a device type of a system)である。この種類の装置を実施することができる数多くの異なる方法がある。例えば(図22Aおよび22Bならびに23Aおよび23B)、1つの装置において(図22A)、中央のチャンバーは、別のチャンバーに流れ込む直交する幹線の交点に配置されたプローブセットを有する。独自であるが、少なくとも1つの類似した特徴を有する標的分子セットに結合するという点において、この交点に接続されるプローブは非特異的である。ある意味では、これらの交点は、流れの中で類似した分析物が濃縮される点において作用する。この部分のアッセイが終了すると、直交する幹線が活性化され、濃縮された標的セットを各々別個のチャンバーに輸送し、第2のセットの相互作用に基づいて、独自の位置でさらに分析される。従って、このシステムは2つの直交する検出プローブを組み入れており、はるかに良好な検出能力を有する。迅速で改善された検出器であること以外に、この種類のシステムの別の利点は、性能を

10

20

30

40

50

増大するために、他の種類のバイオチップ装置と併用できるということである。

【0122】

分子の分析および酵素活性を必要とするアッセイもある。新規方法は、このようなアッセイのために新規マイクロ流動バイオチップを使用する。それは、分子の分析のためのマイクロアレイと、酵素活性および反応生成物の分析のためのマイクロチャンネルを単一のバイオチップ上で一体化する。

【0123】

臨床的にインテリジェントな診断装置を使用する方法

新規診断装置、例えば、診断用キットは、医師、看護師、臨床医学者および/または農業研究者による使用が簡単である。被験体由来の試料（例えば、患者または患者、血液供給による血液試料、植物由来の試料）は入手が容易で、診断用キットへの適用が容易である。結果は、診断用キットリーダー装置、例えば、診断用キットのプロープから放射される蛍光または他のシグナルを読む装置により読みとることが簡単である。

10

【0124】

試料採取および精製方法（システム/装置のプロープアレイにその後結合するため）は、必要であれば、生物試料採取、精製、単離および標識などのフロント-エンド過程の全てを含む。プロトコールのほとんどは標準的なプロトコールであり、全て公開されている。それらは全て当業者に周知である。一例として、1つのプロトコールを記載する。

【0125】

体液（CSF、血液または尿等）などの生物試料を標準的な採取管に採取する。血液または血液製剤の場合には、標準的なプロトコールを使用して、血清を有核細胞から分離する。血清試料、CSF等は、以下に記載する全ての手法に使用される。採取後、血清試料は8時間より長く室温に置いてはいけない。アッセイを8時間以内に終了できない場合には、試料を2~8 で冷蔵しなければならない。アッセイを48時間以内に終了できない場合には、-20 以下で凍結しなければならない。凍結した試料は、融解後および試験前に十分に混合しなければならない。NuScreen（商標）装置では、核酸は細胞から単離され、精製される。

20

【0126】

多数のアッセイ方法が利用可能であり、当業者に既知である。ほとんどの場合、標準的なアッセイが使用される。NuScreenアッセイは、ハイブリダイゼーションによる核酸検出に基づいている。試料は多重試験部位に置かれ、結合を生じさせるためにインキュベーションされる。プロープオリゴの最後のヌクレオチドとしてのクエリー塩基（queried base）を用いる一塩基伸長（SBE）法を多型分析に使用する。化学的および酵素的ライゲーション法ならびにローリングサークル増幅法も使用することができる。SBEを実施する試薬を添加し、試験チャンパーを密封する。SBE（および他の）アッセイでは、最適化後にSBE反応を実施する（ハイブリダイゼーション、ライゲーションおよびRCAなどの他の方法も使用することができる）。次いで、試験試料を大容量のSSCまたは他の洗浄水溶液で洗浄する。これはまた、バイオチップなどのアレイ装置の表面から非特異的結合を除去する。

30

【0127】

非蛍光ヌクレオチドをSBE反応に使用する場合には、それらは、蛍光団（例えば、蛍光ストレプトアビジン/抗体、またはHRP-ストレプトアビジン/抗体共役体またはEFL-利用分子-抗体共役体または後に銀処理する金-抗体共役体等）で標識した二次分子を使用して展開される。好ましい検出方法では、PCR/IVT中にDNA/RNAをビオチン化ヌクレオチドで標識する。TSAプロトコールが検出に使用される（NEN社製）。RCAT（分子ステージング（Molecular staging / Amersham）は、信号増幅のためにTSAの代わりに使用することができる。このような技法および試薬は広く知られており、市販品を購入できる。水溶液を用いた最後の洗浄段階を実施して、未使用の蛍光団等を除去する（検出は一次であっても、二次であってもよい）。

40

【0128】

ProScreen（商標）アッセイは、主にタンパク質、ペプチド、核酸および他の生物部分

50

についての改良型ウェスタンブロット、ELISAおよび関連する方法、を含む（競合アッセイおよび他のアッセイを使用することもできる）。試料を多重試験部位に置き、結合を生じさせるために、数分～数時間インキュベーションする。バイオチップ上でのプローブの濃縮は、対応するプローブに対する種々の生物分子の結合親和性により最適化される。試験試料の核酸成分は、バイオチップアッセイの前に、別個に増幅し、（蛍光団等で）標識することができる。増幅および標識した核酸分画を核酸以外の分画と合わせて、マイクロアレイに適用することができる。結合反応の後に、試験試料を大容量のリン酸緩衝生理食塩液（PBS）または別の洗浄水溶液で洗浄する。これは、チップの表面から非特異的結合物も除去する。

【 0 1 2 9 】

10

結合反応は、蛍光団（例えば、蛍光抗体またはHRP-抗体共役体）またはEFL-利用分子-抗体共役体または後に銀処理する金-抗体共役体などのリポーター基で標識された二次分子を使用して展開される。1つの有用な方法において、ビオチン/HRPに結合させたサンドイッチELISAを使用する。TSA段階を、シグナル増幅法として使用することができる。RCAT（分子ステーキング（Molecular staging / Amersham）は、信号増幅のためにTSAの代わりに使用することができる。または、化学発光または放射性または電気活性または酸化還元活性またはIR活性剤等を使用することができる。このような技法および試薬は広く知られており、市販品を購入できる。水溶液を用いた最後の洗浄段階を実施し、未使用の蛍光団等を除去する。

【 0 1 3 0 】

20

UniScreen（商標）アッセイはProScreen（商標）アッセイに類似しているが、さらに総合的であり、さらに幅広い種類の標的分析物を含む。

【 0 1 3 1 】

結果は、スキヤニング/画像形成によって実施することができる（各装置内の）アレイ中の特定の部位への標的分子/作用物質の関連（結合/ハイブリダイゼーション/伸長）のためのバイオチップなどの診断用キットの検出および/または画像形成によってモニターされる。このような方法は広範に使用され、これらの操作を実施する装置は市販品を購入できる。改良を全く加えないか、わずかに改良した利用可能な数多くの装置が市販されている。例として、GenePix（商標）システム（Axon Instruments、カリフォルニア州ユニオンシティ）、Scanarray（Packard BioSciences、マサチューセッツ州）およびArraywork（Applied Precision、ワシントン州）が挙げられる。

30

【 0 1 3 2 】

結果は、画像を処理して、スクリーニング結果を生じる特定の分子/他の構成成分の存在および量などの標的生物試料に関する情報を判定することによって判定される。任意の試験スライドの読み出しから診断を得るために、ソフトウェアツールを使用する。GenePix Pro（Axon Instruments）、Scanarray（Packard）、Microsoft（登録商標）Excel（登録商標）（Microsoft）およびAdobe（登録商標）Photoshop（登録商標）（Adobe）などの市販利用できるソフトウェアを、例えば、わずかに改良して使用することができる。

【 0 1 3 3 】

特定種類のキット

40

ヒト診断用キット

本明細書に記載する方法およびプローブを使用して、多種多様のヒト診断用キットを作製することができる。これらのキットは、患者によって提示される特定の症状または症状群の原因についての情報を臨床医または医師に提供する。

【 0 1 3 4 】

ヒト診断用キットの具体例は以下の実施例の節に記載されており、以下を含む：頭痛/発熱/髄膜炎（髄膜炎）キット、咳/発熱/胸部不快感/呼吸困難（肺炎）キット、黄疸（肝不全）キット、再発性感染症（免疫不全症）キット、関節痛キット、および他多数。

【 0 1 3 5 】

ヒト検出キット

50

この種類のキットは、患者の免疫状態もしくは免疫適格状態または生体内における熱帯病の存在（例えば、症状をまだ示していない疾患）などの患者の状態、または血液供給もしくは提供された臓器などの医学的製品の現在の状態についての情報を提供する。

【0136】

ヒト検出用キットの具体例を以下の実施例の節に記載する。

【0137】

動物診断およびスクリーニングキット

これらのキットは、特定の症状および/または状態の動物の臨床的発現に基づいた、数多くの先天のおよび後天的疾患の、総合的で価格効果的かつ迅速な診断を可能にする。また、異なる病原または病原の製品（例えば、毒素または免疫の結果）への動物の暴露ならびに繁殖の改善に関連する特定の遺伝子および/または疾患（例えば、腹仔のサイズおよび肉/乳汁産生）を評価することができる。これらのキットは種特異的であると考えられる。例として、以下が挙げられる：実験用マウスキット、ヒツジキット、実験用ラットキット、イヌキット、サルキット、競馬ウマキット、ウシキット、ニワトリキット、ブタキット、子羊キット、サカナキット。

10

【0138】

農業キット

これらのキットは、特定の症状の植物の臨床的発現に基づいた、数多くの先天のおよび後天的疾患の、総合的で価格効果的かつ迅速な診断を可能にする。また、異なる病原への植物の暴露ならびに植物生長の改善に関連する特定の遺伝子および/または疾患（例えば、植物のサイズ、トウモロコシ/米産生等）を評価する。これらのキットは種特異的であると考えられる。これらのうちいくつかを以下に掲載する：トウモロコシキット、綿キット、タバコキットおよび米キット。

20

【0139】

他のキット

本発明は、以下のような、追加のさらに特異的なキットを含む：法医学的キット、食物が媒介する病原（ウイルスおよび微生物）および抗生物質耐性キット、輸入品検査-農業および家畜キット、殺虫剤キット、化粧品検査（例えば、狂牛病）キット、生物テロキット（天然痘、炭疽病、ペスト、ボツリヌス菌中毒、野兔病および危険な化学物質など）およびインフルエンザサーベイランスキット（インフルエンザの既知の株全てをスクリーニングする）。

30

【0140】

実施例

本発明を、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定しない、以下の実施例においてさらに記載する。

【0141】

実施例1: 種々の固相支持体上に群状に集成されたプローブアレイの製造

スライドの表面にNHS-エステル基を有する、ブランク3D-Link（商標）スライド（Surmodics）をこの実施例に使用する。プローブをスライド表面に配列するためにスライドをチャンパー内に配置する。プローブ分子（ZFPおよび他のポリペプチド）をpH 8.3の炭酸水素緩衝液に溶解し、配列装置（arrayer）を使用してガラススライドにスポットする。プローブ分子は全て、スライド表面と反応するためのアミン基を有する。スポット用溶液は、蒸気圧が低く（沸点が高い）、プローブ分子の活性を維持する（グリセロール、トレハロースおよびポリエチレングリコールなどの）化学物質を含有してもよい。スポット操作はコントロールされた条件下（湿度、一例としては相対湿度約70%、温度、例えば約4℃、圧力および気流など）において実施される。

40

【0142】

プローブをスポットした後、スライドを展開チャンパー内に1~12時間置く。チャンパーも、コントロールされた条件下に（湿度、温度、圧力および気流など）維持する。次いで、スライドをブロック緩衝液（BSAまたは他のブロック試薬を含有する緩衝水溶液、pH

50

8.3) で適当な時間処理する。次いで、スライドを洗浄し、保存する。

【0143】

ブランクEZ-Ray (登録商標) スライド (Mosaic Technologies) を、還元剤 (DTTまたはTCEPなど) を含有する緩衝水溶液で処理して、スライド表面を遊離のチオール型に活性化する。次いで、還元剤を水で洗い流すと、活性化したスライドは冷却した暗所において不活性雰囲気中で保存することができる。次に活性化したチオール表面をアミン反応性表面に変換する。N-スクシンイミジル-3-マレイミドプロピオネート (SMP)、N-(11-マレイミド-アンデカノイルオキシ)-スルホ-スクシンイミド (スルホ-KMUS) (または、一方の末端にチオール反応性マレイミド基、もう一方の末端にアミン反応性NHS-エステル基を有する同様の物質) などのヘテロ二官能性架橋剤の中性pHの緩衝水溶液 (異なるpHなどの他の反応条件も使用することができる) でこのスライドを処理する。チオールは架橋剤のマレイミド部分と反応して、チオール基をアミン反応性NHS-エステル基に変換する。プローブをスライド表面に配列するために、スライドをチャンバー内に配置する。

10

【0144】

プローブ分子 (抗体、抗原およびZFPなどのタンパク質、抗原、ハプテンおよびMGBなどのペプチド、糖タンパク質、多糖、アミン標識核酸および他のプローブ分子) をやや塩基性pHの緩衝液 (例えば、pH8.3の炭酸水素緩衝液) に溶解し、配列装置 (arrayer) を使用してガラススライドにスポットする。プローブ分子は全て、スライド表面と反応するアミン基を有する。スポット用溶液は、蒸気圧が低く (沸点が高い)、プローブ分子の活性を維持する (グリセロール、トレハロースおよびポリエチレングリコールなどの) 化学物質を含有してもよい。スポット操作はコントロールされた条件下において (常圧において相対湿度約70%および約4) 実施される。

20

【0145】

プローブをスポットした後、スライドを展開チャンバー内に1~12時間置く。チャンバー条件 (湿度、温度、圧力、気流等) もコントロールする。次いで、スライドをブロック緩衝液 (BSAを含有する緩衝水溶液、pH 8.3) で適当な時間処理し、洗浄し、保存する。

【0146】

Xenoslide A (商標) (Xenopore社製のアミノシランスライド) スライドはシラン化されており、受け取ったとき使用する用意ができています。それらは室温において保存することができる。スポット操作のためにプローブ溶液を調製する。核酸プローブについては、濃度は1 ng~1 µg/mlの範囲内である。スポットサイズは溶媒混合液を使用することによってコントロールすることができる。補助溶媒を適切に選択することにより、水と比較したとき、混合物の表面張力は低くなり、スポットの広がり方がコントロールされる。溶媒混合物の揮発性、従って乾燥時間も溶媒組成によってコントロールすることができる。揮発性が低い補助溶媒を使用すると、乾燥時間が延長される。

30

【0147】

DMSOは、核酸の良好な溶媒であり、あらゆる割合で水と混和し、水より表面張力が低く、揮発性が低いので、DMSOを使用することができる。典型的には、50%以下のDMSOを使用する。または、DMSOの代わりにグリセロールを使用することができる。溶液をスライドにスポットする。水だけを使用する場合には、結合を生じさせるために、数分の間、湿度75~80%を維持することが有用である。約200ミリジュール以下のUV光線照射にスライドを暴露することによって、DNAをスライドに架橋することができる。この時点でスライドはハイブリダイゼーションの用意ができる。

40

【0148】

Xenoslide N (商標) (ニッケルキレート表面) スライドおよびニッケルキレートカバースリップは、コバルトキレート表面と共に使用することができる (製造業者により)。スライドをキレート剤でコーティングし、ニッケルまたはコバルトイオンで荷電する。それらは受け取ったとき使用する用意ができています。それらは室温で保存することができる。His-標識プローブ (例えば、タンパク質、ペプチドまたは核酸) の中性pH緩衝液またはやや塩基性の緩衝液を調製する。Tris緩衝液はすぐれた選択である。溶液濃度は1~3 µg

50

/mlの範囲内になければならない。溶液をスライドまたはカバースリップにスポットし、湿潤なチャンバー内に置くことによって5~10分間湿潤な状態を維持する。こうすることにより結合を生じさせることができる。スライドを風乾する。この時点でそれらは捕獲実験に使用する用意ができた。

【0149】

Xenoslide D (商標) (アルデヒド表面) スライドを化学的修飾して、表面のアルデヒド基密度を高くする。これらの基は、シッフ塩基化学によって、アミノ標識したDNA、タンパク質およびペプチドを固定する。(アミノ標識したオリゴなどの) プローブ溶液を1~3 µg/mlの濃度で中性pH緩衝液中において調製する。Tris緩衝液は、プレート表面と反応してオリゴ結合を妨げることがある遊離のアミン基を有するので、使用してはいけない。オリゴをスライドにスポットし、相対湿度50~70%の湿潤なチャンバーに挿入することによって、スライドを5~10分間湿潤な状態を維持する。シッフ塩基反応は酸性pHでは可逆的である。安定性を増すためには、シッフ塩基を水素化ホウ素ナトリウムで還元することができる。1%水溶液、室温において30分が通常適当である。これはまた、未反応基をブロックする。還元段階を省略する場合には、未反応のアルデヒド基をエタノールアミン水溶液(1容量%)でブロックしなければならない。スライドは風乾することができ、この時点でハイブリダイゼーション試験に使用する用意ができる。

【0150】

Xenoslide E (商標) (エポキシ表面) スライドを化学修飾して、表面のエポキシ基密度を高くする。エポキシ基は、高いpHにおいて一級アミノ基およびヒドロキシ基との反応性が高い。プローブ、例えば、結合対象のオリゴまたはポリペプチドの溶液を、pH 10.5~11の溶液において1~3 µg/mlの濃度で調製する(タンパク質は、インキュベーション時間が長い場合には、低いpHにおいてスポットすることができる)。プローブ溶液をスライドにスポットし、相対湿度50~70%の湿潤なチャンバーに置くことによって、スライドを5~10分間湿潤な状態を維持する。中性pHにおけるエポキシ基の反応は極めて遅いので、スライドのブロック操作は通常必要ない。従って、DNAおよびオリゴだけがハイブリダイゼーションによって結合する。スライドを風乾すると、ハイブリダイゼーション実験の用意ができる。

【0151】

Xenoslide S (商標) (ストレプトアビジン表面) スライドは、表面に固定されたストレプトアビジンの密度が高い。結合能力は、平方cmあたりビオチン結合部位約5ピコモルである。スライドは受け取ったとき使用する用意ができている。未使用のスライドを冷蔵中の容器内に保存することができる。ビオチン化プローブ溶液(濃度1~3 µg/mlのタンパク質またはオリゴ)を、1×SSCまたはリン酸緩衝液などの中性pH緩衝液中で調製する。プローブ溶液をスライドにスポットし、相対湿度50~70%の湿潤なチャンバーに置くことによって、スライドを5~10分間湿潤な状態を維持する。スライドを風乾すると、ハイブリダイゼーション実験の用意ができる。

【0152】

UniScreen (商標) バイオチップは以下のように調製することができる。表面にチオールを有する顕微鏡ガラススライド(Mosaic社製EZ-Ray (商標) スライドまたはXenopore社製Thiolスライドなど)を遊離チオール型に活性化し、次いで水で洗浄し、冷却した暗所において窒素雰囲気下で保存する。N-スクシンイミジル-3-マレイミドプロピオネート(SMP)、N-(11-マレイミド-アンデカノイルオキシ)-スルホ-スクシンイミド(スルホ-KMUS)等のヘテロ-二官能性架橋剤でスライドを処理し、中性pHの緩衝水溶液に溶解する。チオールは架橋剤のマレイミド部分と反応して、それらをアミン反応性化合物に変換する。プローブ分子をやや塩基性pHの緩衝液(例えば、pH8.3の炭酸水素緩衝液)に溶解し、配列装置(arrayer)を使用してガラススライドにスポットする。スポット操作はコントロールされた湿度(相対湿度約70%)および温度(約16)条件下で実施される。

【0153】

プローブをスポットした後、スライドを展開チャンバー内に1~12時間置く。チャンバ

10

20

30

40

50

ーをコントロールされた条件下（相対湿度70%、16℃など）に維持する。次いで、スライドをブロック緩衝液（BSAおよび他の試薬を含有する緩衝水溶液、pH8.3）で適当な時間処理し、次いで洗浄し、保存する。

【0154】

実施例2: 黄疸（肝不全）キット

このキットは、黄疸／肝不全の患者の臨床的発現に基づいた数多くの疾患／状態の総合的で価格効果的かつ迅速な診断を可能にする。遺伝的疾患、自己免疫疾患および感染性疾患の診断は、DNA、RNAおよびタンパク質（スポットした抗原タンパク質および特異的なmAb）チップを使用した、特定遺伝子の突然変異または他のマーカー（微生物特異的配列または自己反応性抗体など）の正確な検出に基づいている。黄疸キットは、黄疸の病因の考慮に焦点を置いている。また、可能な異なる治療選択肢の試験に治療マーカーを含めてもよい。簡単に説明すると、3つの群の病因状態のうち1つ以上を評価する：A)自己免疫性肝炎、B)ウイルス性肝炎ならびにC)黄疸および／または肝肥大を生じる遺伝的疾患。例えば、フェルドマン：スレイセングー＆フォルドトランの胃腸および肝疾患（Feldman: Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease）、第6版（W. B. Saunders Company 1998）、マクファーラン（McFarlane）、「IG:自己免疫性肝炎における自己免疫マーカーと異なる臨床症候群との関係（IG:The Relationship between autoimmune markers and different clinical syndromes in autoimmune hepatitis）」、Gut 42: 599-602, 1998、自己抗体（Autoantibodies）（編集：Peter JBおよびY. Shoenfeld, Elsevier, 1996）、pp 462-466のマンズ（Manns, MP）、「肝臓／腎臓ミクロソーム自己抗原（Liver/Kidney Microsomal Autoantigens）」ならびにリー（Lee）：ウイントロブの臨床血液学（Wintrobe's Clinical Hematology）、第10版（Lippincott Williams & Wilkins, 1999）参照。

【0155】

キットは、可能な治療の標的を検出するプローブを含むことができる。

【0156】

キットは、以下の標的の少なくとも5つ以上を検出するプローブを含む：

- 1) 抗-LKM-1抗体（IgGおよびIgM） - LKM-1抗体の主要な標的抗原は、小胞体に見られるミクロソームタンパク質である、チトクロームP450 2D6として同定されている。
- 2) 抗-ミトコンドリアM2抗体 - M2抗原をプローブとして使用することができる。M2抗原は、ミトコンドリア膜内側にあり、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の一部であることが見出されており、分子量50および70kDである。
- 3) A型肝炎感染症 - このウイルスは、精製された組み換えヒトA型肝炎抗原をプローブとして使用して、IgG抗-HAV抗体を検出することによって間接的に検出することができる。
- 4) B型肝炎感染症 - 精製された組み換えヒトB型肝炎抗原（HBcAg、HBsAg、HbeAg）をプローブとして使用することができる。
- 5) C型肝炎感染症 - 精製された組み換えヒトC型肝炎抗原（NS3、NS4、NS5およびコア領域抗原）をプローブとして使用することができる。
- 6) D型肝炎感染症 - 精製された組み換えヒトD型肝炎抗原をプローブとして使用することができる。
- 7) E型肝炎感染症 - 精製された組み換えヒトE型肝炎抗原をプローブとして使用することができる。
- 8) CMV感染症 - 臓器移植レシピエントおよびAIDS患者を含む、ある種の集団におけるCMV疾患の診断を急ぐために、末梢血白血球中のCMV即時型-抗原(pp65)またはDNAをプローブとして使用することができる。

【0157】

また、キットは、ビリルビンの上昇／肝損傷を生じうる遺伝子突然変異および／または対立遺伝子変化を検出するプローブを含む。例えば、黄疸キット中のいくつかのプローブは、以下の突然変異／対立遺伝子変化を検出するように設計される：

デュビン ジョンソン症候群、I型高ビリルビン血症、急性肝性ポルフィリン症、デル

タミノレブリン酸デヒドラターゼ欠損症、ポルホピリノーゲンシンターゼ欠損症、アラジール症候群、動脈肝性 (Arteriohepatic) 異形成、末梢肺狭窄を伴う胆汁鬱滞、-1-抗トリプシン欠損症、カルバモイルリン酸シンテターゼI欠損症、カルバミルホスファターゼ欠損症、カルバミルリン酸シンテターゼ欠損症、カルニチン-アシルカルニチントランスロカーゼ欠損症、シトルリン血症、フェロケラターゼ欠損症、ヘムシンテターゼ欠損症、脂肪酸酸化障害 (不特定)、フルクトース1,6ビスホスファターゼ欠損症、ガラクトース血症、ガラクトースエピメラーゼ欠損症、ガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ欠損症、II型Nグルタリカシデミア (NGLutaricacidemia)、II型グルタリカシドゥリア (Glutaricaciduria)、I/Ia型グリコーゲン貯蔵疾患、グルコース-6-ホスファターゼ欠損症、フォン・ギールケ病、III型グリコーゲン貯蔵疾患、コーリ病、脱分枝酵素欠損症、フォーブズ病 (Forbe Disease)、IV型グリコーゲン貯蔵疾患、分枝酵素欠損症、IX型グリコーゲン貯蔵疾患、VIII型グリコーゲン貯蔵疾患、肝臓のホスホリラーゼキナーゼ欠損症、Ib型グリコーゲン貯蔵疾患、グルコース-6-リン酸トランスロカーゼ欠損症、VI型グリコーゲン貯蔵疾患、HERS疾患、遺伝性コプロポルフィリン症、コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ欠損症、ハーデロポルフィリア (Harderoporphyria)、遺伝性果糖不耐症、果糖血症、遺伝性ヘモクロマトーシス、長鎖3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症、急性脂肪肝、妊娠の疾患、HELLP、溶血、酵素および低血小板、LCHAD欠損症、三官能性タンパク質欠損症 (Trifunctional Protein Deficiency)、長鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症、LCAD欠損症、中鎖3-ケトチオラーゼ (Ketothiolase) 欠損症、MC KAT欠損症、中鎖アシル-コエンザイムAデヒドロゲナーゼ欠損症、MCAD欠損症、II型ムコ多糖症、ハンター症候群、MPS II、IIIB型ムコ多糖症、MPS IIIB、B型サンフィリポ症候群、IIIC型ムコ多糖症、MPS IIIC、C型サンフィリポ症候群、IVB型ムコ多糖症、MPS IVB、B型モルキオ症候群、VI型ムコ多糖症、アリアルスルファターゼB欠損症、MPS VI、マロトー、ラミー症候群、VII型ムコ多糖症、グルクロニダーゼ欠損症MPS、MPS VII、スライ症候群、スフィンゴミエリナーゼ欠損症を伴わないニーマン-ピック病、C型ニーマン-ピック病、D型ニーマン-ピック病、ニーマン-ピック病、ノバスコチアンタイプ (Nova Scotian Type)、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、OTC欠損症、肝臓および筋肉のホスホリラーゼキナーゼ欠損症、多嚢胞性腎疾患 (劣性)、ARPKD、乳児性PKD、劣性PKD、サラ病、シアル酸貯蔵疾患、シアリドーシス、糖タンパク質ノイラミニダーゼ欠損、ML I、ML 1、ムコリピドーシス、ウィルソン病、ウォルマン病、コレステロールエステル貯蔵疾患、および/またはツェルヴェーガー症候群、脳肝腎症候群。

【0158】

黄疸キットを使用するために、患者から採血する。血清を有核細胞から分離する。血清試料は、ポリペプチド系アレイまたはチップ上で実施されるタンパク質に基づいた手法全てに使用される。採血後、血餅から血清を分離する。血清試料は8時間より長く室温に置いてはいけない。アッセイを8時間以内に終了できない場合には、試料を2~8℃で冷蔵しなければならない。アッセイを48時間以内に終了できない場合または試料の出荷には、試料を-20℃以下で凍結しなければならない。凍結した試料は、融解後および試験前に十分に混合しなければならない。末梢血白血球 (PBL) は、パーコール勾配によって単離し、計数し、-20℃以下で凍結する。DNAおよびRNAチップについては、DNAおよびRNAをこれらの細胞から精製する。

【0159】

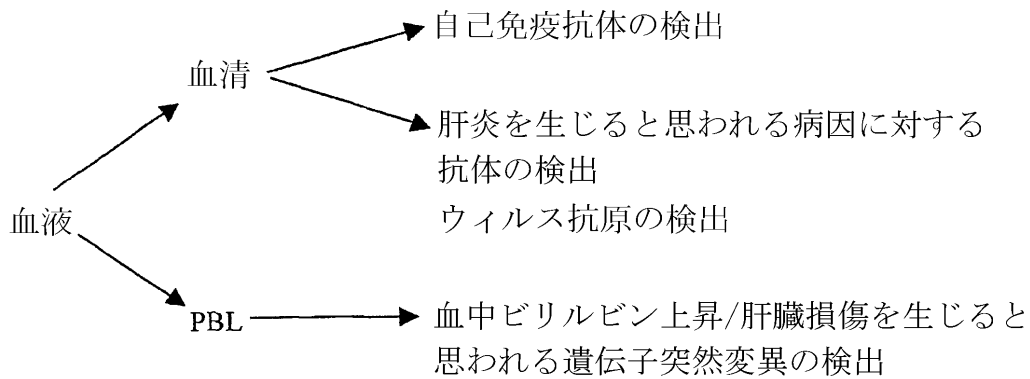
以下のダイアグラムは、血液試料を試験する方法を示す：

10

20

30

40



10

【0160】

タンパク質チップ技術：黄疸キットを作製するために、密着焼付け(contact-printing)ロボットを使用して、ガラススライド上に固定されたタンパク質の密集したアレイを作製する。アルデヒド誘導化ガラスへの共有結合は、いくつかのタンパク質表面位置におけるシッフ塩基により生じる。リン脂質層により過剰反応性を抑える。リン脂質層はまた非特異的結合を低下する助けもする(ペプチドおよび小さいタンパク質アレイが活性化したリン脂質単層上に形成される)。タンパク質/ペプチドは安定な構造物を有する。それらはポリスチレンマイクロウェルプレートのウェルに接続されてからも、未変性の状態で抗原性を保持し続ける(例えば、これらのプローブは、患者血清由来の自己反応性および/または抗ウイルス抗体によって十分に認識される)。血液試料をプローブアレイの表面に適用した後、試料を洗浄し、プローブに結合した標的分析物だけを残す。その後、蛍光標識(例えば、FITCおよびローダミン)などの標識またはリポーター基に接続した標準的な抗体、例えば、モノクローナル抗体またはIgMもしくはIgM抗体をアレイに適用し、標準的なELISAアッセイの方法で、プローブに接続した任意の分析物に結合する。

20

【0161】

一例として、ガラススライドの表面に結合した精製した全長の組み換えヒトチトクロームP450 2D6抗原を使用して、標的分析物LKM-1抗体を検出する。希釈した患者血清を添加し、存在する任意のLKM-1抗体を、固定した抗原に結合させる。未結合の試料を洗い流し、FITC(緑色)-標識した抗ヒトIgG抗体およびローダミン(赤色)-標識ヒトIgMを添加する。任意の未結合の抗ヒトmAbを洗い流した後、標準的な技法および機器を使用して色の強度を測定する。患者試料中に形成する色の強度と対照試料の色を測定して比較することによってアッセイを評価する。

30

【0162】

支持体に結合した精製したミトコンドリアM2抗原(ピルビン酸デヒドロゲナーゼとしても既知)を使用して、M2抗体を同様の方法で検出することができる。

【0163】

ガラススライドの表面に結合した精製した組み換えヒトA型肝炎抗原を使用して、抗A型肝炎抗体を検出することができる。希釈した患者血清を添加し、存在する任意のA型肝炎抗体を、固定した抗原に結合させる。未結合の試料を洗い流し、FITC(緑色)-標識した抗ヒトIgG抗体およびローダミン(赤色)-標識抗ヒトIgMを添加する。任意の未結合の抗ヒトmAbを洗い流した後、色の強度を測定する。上記のように、アッセイを評価することができる。他の肝炎抗体を検出するために同様の方法を使用する。

40

【0164】

臓器移植レシピエントおよびAIDS患者を含む、ある種の集団におけるCMV疾患の診断を急ぐことができる、末梢血白血球中のCMV即時型-抗原(pp65)またはDNAを検出することによって、CMV感染症を検出することができる。ポリメラーゼ連鎖反応による脳脊髄液中のCMV DNAの検出は、CMV脳炎または多発神経根障害の診断に有用である。一方、CMVウイルス血症の検出は急性感染症の優れた予測因子である。

【0165】

50

黄疸の種々の遺伝的原因は、上記に掲載した黄疸の原因に関連することが既知の遺伝子または対立遺伝子の突然変異形態に特異的に結合する核酸プローブまたはタンパク質もしくはポリアミド系プローブを使用して検出される。これらのプローブは、標準的な技法を使用して作製され、次いで本明細書に記載する他の黄疸症状特異的プローブと共に支持体または基材にスポットされる。

【0166】

実施例3: 発熱 / 皮膚発疹 / 体重低下 (自己免疫) キット

このキットは、自己免疫 (全身自己免疫疾患は、発熱、皮膚発疹、皮膚変色および体重低下からなる重複することが多い臨床像を有する) の患者の臨床的発現に基づいた数多くの疾患 / 状態の総合的で価格効果的かつ迅速な診断を可能にする。自己免疫疾患の診断は、DNA、RNA、生細胞およびタンパク質 (スポットした抗原性タンパク質および特異的なmAb) チップを使用した、自己反応性抗体、特異的な遺伝子突然変異または他のマーカー (自己免疫易発性HLAなど) の正確な検出に基づく。簡単に説明すると、3つの群の病因状態の1つ以上を評価する: A) 全身および臓器特異的自己免疫疾患、B) 特異的な自己免疫疾患に関連するHLA、c) 自己免疫症候群を生じる遺伝子突然変異の検出、D) 自己免疫疾患に関連する早期および後期補体成分の欠損およびE) 可能な治療選択肢を試験する治療マーカー。例えば、ルディ: ケレイのリウマチ病学教本 (Ruddy: Kelley's Textbook of Rheumatology)、第6版 (W. B. Saunders Company 2001)、アレルギー: 原理と実践 (Allergy: Principles and Practice)、第5版、ミドレトン (Middleton) ら (編)、(Mosby-Year Book, 1998) およびリー: ウイントローブの臨床血液学 (Lee: Wintrobe's Clinical Hematology)、第10版、(Lippincott Williams & Wilkins 1999) 参照。

【0167】

自己免疫疾患キットは、以下の標的の少なくとも5つ以上を検出するプローブを含む:

A. 以下の「自己」抗原に対する抗体:

抗カルジオリピン - 精製したカルジオリピン抗原をプローブとして使用する; ANA (抗核抗体-抗原)、SM、RNP、SS-A、SS-B、Scl-70 (DNA-トポイソメラーゼ-1)、Jo-1 (ヒスチジル-tRNAシンテターゼ)、ASCA's マンノース (抗-サッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 抗体)、2糖タンパク質 (アポリポタンパク質H)、コラーゲン3 (IV) コラーゲン鎖)、カテプシンG、陽イオン性タンパク質57 (CAP-57)、エラスターゼ、ヒストン (H2A-H2B-H3-H4)、グリアジン、IgA、IgG、IgM、ラクトフェリン、LKM-1 (チトクロームP450 2D6)、LKM-2 (チトクロームP450 2C9)、LKM-3 (ウリジンジホスフェートグルコノシルトランスフェラーゼ) 2型、ミトコンドリアM2、M5またはM6、ミエロペルオキシダーゼ (MPO)、PARTポリ-ADP-リボースポリメラーゼ、ホスホタンパク質 (SLAの診断)、P0、P1、P2、リボソームP (カルボキシル-末端22アミノ酸ペプチド)、セリンプロテアーゼ3 (PR3)、ssDNA、dsDNA、甲状腺M (甲状腺ミクロソーム抗原)、甲状腺T (サイログロブリン)、甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO)、TMおよび/または組織トランスグルタミナーゼ (tTG)。

B. HLAおよび自己免疫疾患:

多数の自己免疫疾患では、ある種の疾患患者集団において特定のHLA抗原の関連がある。プローブは、HLA B27、HLA B38、HLA DR8、HLA DR5、HLA Dw4/DR4、HLA Dw3、7HLA DR3、HLA DR4、HLA B5、HLA Cw6、HLA A26、HLA B51、HLA B8、HLA Dw3、HLA B35、HLA DR2、HLA B12およびHLA A3などのHLAを検出するように設計される。

C. Fas、FasLおよびカナレ-スミス (Canale-Smith) 症候群などの自己免疫症候群を生じる遺伝子の突然変異の検出。

D. 自己免疫疾患に関連する早期および後期補体成分の欠損。このリストは、補体カスケードの異なる成分の機能の欠損を生じる既知の突然変異を含む。これらの突然変異は、自己免疫症候群に関連する: C1 (C1q、C1r、C1s)、C4、C2、C1阻害剤、C3、D、プロパージン、I、P、C5、C6、C7、C8およびC9。

【0168】

これらのキットはまた以下のマーカーを含んでもよい:

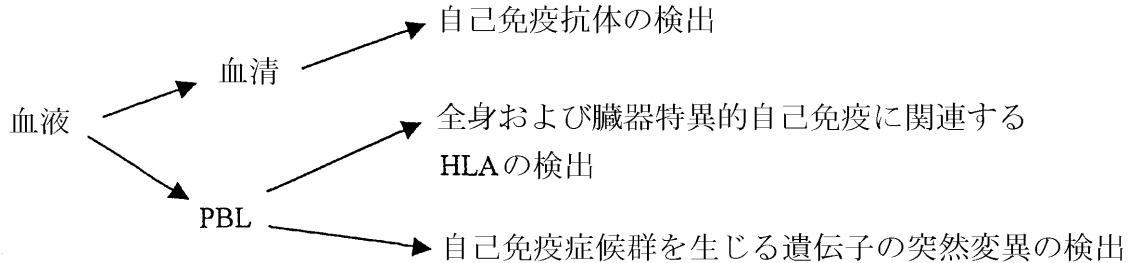
E. 可能な治療選択肢を試験する治療マーカー。

【0169】

これらの標的分析物全てについて、対応する抗原は既知であり、単離し、精製し、プローブとして使用することができる。

【0170】

自己免疫キットを使用するためには、患者から採血し、実施例2に記載するように処理する。以下のダイアグラムは、血液試料を試験する方法を示す：



10

【0171】

全身および臓器特異的自己免疫疾患は、患者血清中の抗体および抗原を検出するための、実施例2に記載するものと同様のタンパク質、生細胞、DNAまたはRNAチップ技術を使用してアッセイされる。全身自己免疫は、自己反応が単一の臓器または臓器システムに限定されない自己免疫状態を含む。この定義は、全身性エリテマトーデス(SLE)、全身性硬化症(強皮症)、関節リウマチ(RA)、慢性移植片対宿主疾患(GVHD)および種々の形態の脈管炎を含む。疾患が自己免疫であるという推測は、自己抗体の存在ならびに異常組織における抗体および補体の局在化に基づいて行われる。

20

【0172】

実施例2に記載するように、特定の抗原および自己抗原(プローブとして)を支持体にスポットする。標的分析物に対する自己-IgGおよびIgM自己抗体は、本明細書に記載するように、プローブに対する結合または標的分析物を可視化するために使用される。

【0173】

HLAおよび自己免疫疾患を検出するためには、上記のように、タンパク質、生細胞、DNAまたはRNAチップを使用することができる。自己免疫疾患に関連する異なるクラスIおよびクラスII HLAに対する全てのmAbが利用可能である。従って、ヒトHLAに対するこれらのmAbを支持体にスポットする。これらのmAbは、有核細胞の表面から単離されるHLAクラスIおよびクラスIIタンパク質に特異的に結合する(これらのタンパク質は、以前に記載されているように、酵素反応によって細胞表面から取り出される)。検出に使用する二次mAbは、クラス内の全ての対立遺伝子を認識する、mAb抗pan-クラスIおよびpan-クラスIIである。

30

【0174】

実施例4:再発性感染症(免疫不全症)キット

このキットは、免疫不全症/再発性感染症の患者の臨床発現に基づいた、数多くの疾患/状態の総合的で価格効果的かつ迅速な診断を可能にする。再発性感染症小児は、プライマリケア担当医が見る患者の中でも、最も頻度の多い種類の1つである。再発性感染症患者はほとんどが識別できるような免疫不全障害を認めない。免疫機能の評価は、特定の免疫障害の臨床発現が認められる小児または(1)2つ以上の全身細菌感染症(例えば、敗血症、骨髄炎または髄膜炎)、(2)3つ以上の重篤な呼吸器系感染症または記録されている細菌感染症(例えば、蜂巣炎、排液性中耳炎または病歴1年以内のリンパ節炎)、(3)通常ではない部位に生じる感染症(例えば、肝臓または脳膿瘍)、(4)通常見られない病原の感染症(例えば、アスペルギルス spp(Aspergillus spp)、セラチア マルセッセンス(Serratia marcescens)、ノカルジア spp(Nocardia spp)、またはシュードモナス セパシア(Pseudomonas cepacia)および(5)一般的な小児感染症の病原によるが、重症度が通常でない感染症、などの通常でない慢性もしくは再発性感染症が認められる小児に開始されるべきで

40

50

ある。

【 0 1 7 5 】

免疫不全疾患の診断の新規免疫不全症キットアプローチは、特定の遺伝子突然変異および/または他のマーカー（免疫グロブリンまたは補体成分の存在など）などの抗-ウィルス抗体および遺伝子マーカーなどの感染症の正確な検出に基づいている。以下の病因状態を評価する：A)免疫不全症を生じるウィルスの検出、B)免疫グロブリンクラスの検出、C)一般的な抗原に対する特異性を有する特定の免疫グロブリンの検出、D)免疫不全症を生じる突然変異/対立遺伝子変化の検出、E)補体欠損を引き起こす遺伝子突然変異の検出、およびF)可能な治療選択肢を試験する治療マーカーの検出。例えば、骨：肺&クリティカルケアメディシン(Bone: Pulmonary & Critical Care Medicine)(Mosby-Year Book, Inc., 1998)、アレルギー：原理と実践(Allergy: Principles and Practice)、第5版、ミドレトン(Middleton)ら(編)(Mosby-Year Book, 1998)およびリー：ウィントローブの臨床血液学(Lee: Wintrobe's Clinical Hematology)、第10版(Lippincott Williams & Wilkins 1999)参照。

10

【 0 1 7 6 】

免疫不全症キットは、以下の標的の少なくとも5つを検出するプローブを含む：

A. 免疫不全症を生じるウィルスの検出：HIV感染症；エプスタインバーウイルス(EBV)感染症。

B. 免疫グロブリンクラスの検出：IgA、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4および/またはIgM。

C. 一般的な抗原に対する特異性を有する特定の免疫グロブリンの検出：スポットした（spotted）破傷風抗原、スポットしたジフテリア抗原、スポットしたヘモフィルスインフルエンゼ(Haemophilus influenzae)抗原および/またはスポットした肺炎球菌抗原。

20

D. 免疫不全症を生じる突然変異/対立遺伝子変化の検出：A)サイトカインシグナリング欠損-ガンマ(gammac)に関連するSCID、Jak3、IL-2、IL-2RaおよびIL-7Ra、B)TCR関連欠損に関連するSCID - CD3g、CD3eおよびZAP70、C)HLAクラスII欠損症 - CIITA、RFX5およびRFXB、D)HLAクラスI欠損症（不全白血球症候群(bare leukocyte syndrome)）- TAP1およびTAP2、E)キナーゼ以外の酵素の欠損に関連する免疫不全症 - ADA欠損症およびPNP欠損症、F)X-結合ハイパー-IgM-CD40リガンド、G)X-結合無ガンマグロブリン血症(Bruton)-Btk、H)非-X-結合無ガンマグロブリン血症-m重鎖、I)ウイスコット-オールドリッチ症候群-WASP、J)毛細血管拡張性運動失調-ATM、K) デイジージョー奇形-21q、L) 自己免疫性リンパ組織増殖性症候群-Fas、M)XLP-SH2D1A/SAP、N)TRAPS-TNFRSF1Aおよび/またはO)微生物(microbacterial)感染症に対する感受性 - IFN-ガンマR1、IFN-ガンマR2、IL-12p40。

30

E. 補体欠損症を生じる遺伝子突然変異の検出：C1(C1q、C1r、C1s)、C4、C2、C1阻害剤、C3、D、プロパージン、I、P、C5、C6、C7および/またはC8。

【 0 1 7 7 】

これらのキットはまた以下のマーカーを含んでもよい：

F. 可能な治療選択肢を試験する治療マーカーの検出。

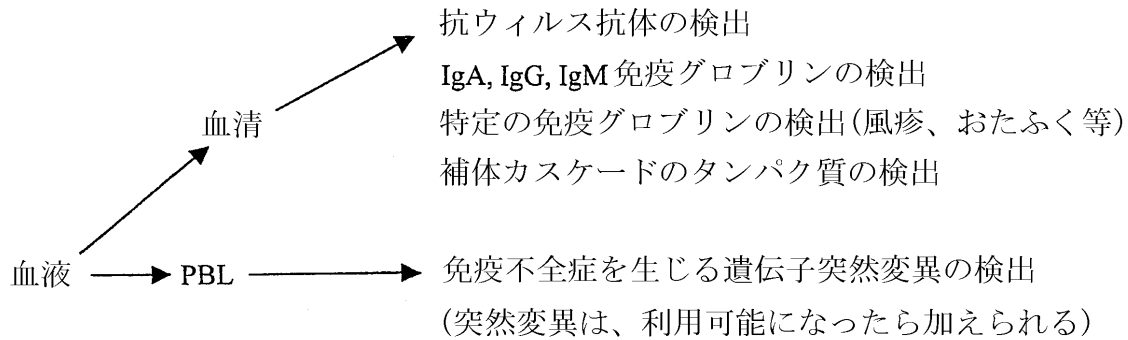
【 0 1 7 8 】

これらの標的分析物全てについて、対応する抗原、抗体および/または核酸は既知であり、単離、精製し、プローブとして使用することができる。

40

【 0 1 7 9 】

再発性感染症キットを使用するためには、実施例2に記載するように、患者から採血し、処理する。以下のダイアグラムは、血液試料を試験する方法を示す：



10

【0180】

免疫不全症を生じるウイルスおよび遺伝子突然変異は、本明細書に記載する技法を使用して患者試料中の抗体、抗原、遺伝子突然変異および対立遺伝子変化を検出するために、実施例2に記載するものと同様のタンパク質、生細胞、DNA、RNAチップ技術を使用してアッセイされる。

【0181】

実施例5: 咽喉炎(咽頭炎)キット

このキットは、咽喉炎の患者の臨床発現に基づいた総合的で価格効果的かつ迅速な診断を可能にする。このキットは、細菌、ウイルスおよび他の病原を含む可能な感染剤を試験する。また、このキットは、いくつかの抗生物質に対する細菌の耐性のようなものを含む異なる治療を試験する。咽喉炎/咽頭炎の疼痛を生じる特定の病原の診断は、特定の抗原、特定の微生物DNA/およびまたはRNAならびに抗生物質に対する抗微生物耐性を示す特定の微生物DNAの正確な検出に基づいている。以下の病因状態群の1つ以上を評価する：A) 咽喉炎を生じるウイルス性疾患、B) 咽喉炎を生じる細菌および他の病原ならびにC) 可能な治療選択肢を試験する治療マーカー。例えば、骨：肺&クリティカルケアメディシン(Bone: Pulmonary & Critical Care Medicine)(Mosby-Year Book, Inc., 1998)参照。

20

【0182】

キットは、以下の標的の5つ以上を検出するプローブを含む：

A. ウィルス検出 - ほとんどの例において、キットは、科特異的試薬を含む(適用できる場合には、種類およびサブタイプが検出される)：ライノウィルス、コロナウィルス、アデノウィルス(3、4、7、14型)、単純ヘルペスウイルス(1および2型)、パラインフルエンザウィルス(1~4型)、インフルエンザウィルス(AおよびB型)、コクサッキーウィルス(2、4~6、8、10型)、エプスタインバーウィルス、サイトメガロウィルスおよび/またはHIV-1。

30

B. 細菌および他の病原 - ほとんどの例において、キットは科特異的な試薬を含む(適用できる場合には、種類およびサブタイプが検出される)：

I. 細菌検出：化膿レンサ球菌(*Streptococcus pyogenes*)(グループAベータ-溶血連鎖球菌、グループCベータ-溶血連鎖球菌、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、コルネバクテリウムジフセリエ(*Corynebacterium diphtheriae*)、コルネバクテリウムウルセランス(*Corynebacterium ulcerans*)、アルカノバクテリウムヘモリテカム(*Arcanobacterium haemolyticum*)(コルネバクテリウムヘモリテカム(*Corynebacterium haemolyticum*))、エルシニアエンテロコリチカ(*Yersinia enterocolitica*)、梅毒トレポネーマ(*Treponema pallidum*)、クラミジアニューモニエ(*Chlamydia pneumoniae*)、肺炎マイコプラズマ(*Mycoplasma pneumoniae*)、および/またはマイコプラズマホミニス(*Mycoplasma hominis*)(1型)。

40

II. -溶血性ランフィールドグループAストレプトコッカスに対する抗体の検出：ストレプトザイム(*Streptozyyme*)、抗デオキシリボヌクレアーゼ-Bおよび/または抗ストレプトリジン-0。

【0183】

これらのキットはまた以下のマーカーを含んでもよい：

50

C. -ラクタマーゼなどの、可能な治療選択肢を試験するための治療マーカー。

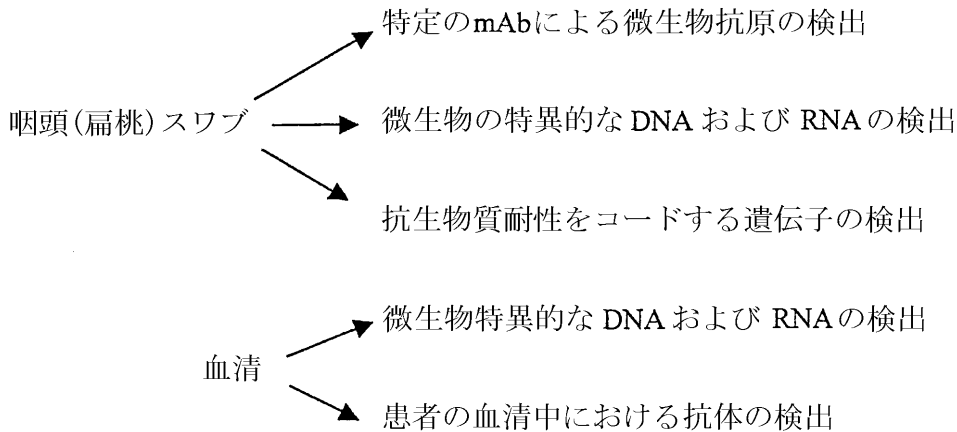
【0184】

これらの標的分析物全てについて、対応する抗原、抗体および/または核酸は既知であり、単離、精製して、プローブとして使用することができる。

【0185】

新規咽喉炎キットを使用するためには、咽頭スワブを患者の扁桃から採取する。採血もしてもよい。血清を有核細胞から分離する。支持体にスポットした適当なプローブを含むタンパク質、DNAおよびRNAバイオチップ上で実施されるタンパク質、DNAおよびRNA全てに基づいた手法のために血清試料およびスワブ材料を使用する。採取の後、血清および核酸を、実施例2に記載されたように処理する。以下のダイアグラムは、血液試料を試験する方法を示す：

10



20

【0186】

微生物抗原、DNA、RNA、遺伝子および抗体を検出するためには、本明細書に記載するタンパク質、生細胞、DNAおよびRNAバイオチップを使用することができる。

【0187】

実施例6: 咳 / 発熱 / 胸部不快感 / 呼吸困難 (肺炎) キット

このキットは、下気道症状の患者の臨床発現に基づいた総合的で価格効果的かつ迅速な診断を可能にする。このキットは、感染症の可能性 (細菌、ウイルスおよび他の病原) および下気道症状を生じるとされる遺伝的成分の両方を試験する。また、このキットは、ある種の抗生物質に対する細菌の耐性のようなものを含む異なる治療を試験する。気道症状は診察室で見られる最も一般的な急性問題であり、大半は上気道に限られている。下気道疾患に随伴することがある咳、発熱、胸部不快感および呼吸困難は患者の大きな問題となる。この新規キットは、下気道症状を生じることが既知の病原のプローブのパネルを有する。簡単に説明すると、以下の病因状態を生じる群を評価する：A) 肺炎 / 気管支炎を生じる細菌性疾患、B) 肺炎 / 気管支炎を生じるウイルスおよび他の病原、C) 肺組織の炎症を生じる自己免疫疾患、(D) 肺組織の炎症 / 刺激 / 破壊を生じる毒および化学物質および (E) 可能な治療選択肢を試験するための治療マーカー (抗生物質耐性遺伝子など)。例えば、骨 (Bone) 1998 およびアレルギー：原理と実践 (Allergy: Principles and Practice)、第5版、ミドleton (Middleton) ら (編)、(Mosby-Year Book, 1998) 参照。

30

40

【0188】

特に、肺炎は肺実質の感染症である。種々の細菌種、マイコプラズマ、クラミジア、リケッチア、ウイルス、真菌および寄生虫が肺炎を生じる。病因となる微生物の同定は、適当な抗微生物治療のキーであるので、一番に重要である。しかし、感染症の重篤性のために、しばしば原因菌の従来の臨床検査による確認を行う前に、一般に抗微生物治療を即座に開始しなければならない。生物戦争または生物テロに関連する原因菌を検出するためにも新規キットを使用することができる。

【0189】

このような下気道症状キットは、以下の標的の5つ以上を検出するプローブを有する：

50

A. 細菌は（これらの病原またはDNAもしくはRNA特異的プローブに対するスポットしたmAb）を含む。ほとんどの例において、科特異的試薬を使用する（適用できる場合には、種類およびサブタイプが検出される）：肺炎レンサ球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、グループA連鎖球菌、ヘモフィルス インフルエンザ(*Haemophilus influenzae*)、クレブシエラ ニューモニエ(*Klebsiella pneumoniae*)、プロテウス ミラビリス(*Proteus mirabilis*)、大腸菌(*E. coli*)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、モラクセラ（ブランハメラ）カタラーリス(*Moraxella(Branhamella) catarhalis*)、レジオネラ ニューモフィラ(*Legionella pneumophila*)、ポリフィロモナス ジンジパリス(*Porphyromonas gingivalis*)、プレボテラ メラニノゲニカ(*Prevotella melaninogenica*)、フソバクテリウム スクレアタム(*Fusobacterium nucleatum*)、アクチノマイセス spp. (*Actinomyces spp.*)、スピロヘータ(*Spirochetes*)、嫌気性連鎖球菌、フソバクテリウム(*Fusobacteria*)、マイコプラズマ ニューモニエ(*Mycoplasma pneumoniae*)、マイコバクテリウム ツベルクローシス（結核菌）(*Mycobacterium tuberculosis*)、バシラス アンスラシス（炭疽菌）(*Bacillus anthracis*)、エルシニア ペスティス（ペスト菌）(*Yersinia pestis*)、フランシセラ ツラレンシス(*Francisella tularensis*)、コクシエラ ブルネッティ(*Coxiella burnetii*) (Q熱) および / またはエルシニア エンテロコリチカ(*Yersinia enterocolitica*)。 10

B. ウィルスおよび他の非細菌性病原は以下を含んでもよい - ほとんどの場合、科特異的試薬を使用する（適用できる場合には、種類およびサブタイプが検出される）：インフルエンザAおよびB、アデノウィルス、RSウィルス、パラインフルエンザウィルス、サイトメガロウィルス、水痘（水痘-帯状疱疹ウィルス）、大痘瘡（天然痘）、麻疹、ブラストミセス spp. (*Blastomyces spp.*)、クラミジア シッタシ(*Chlamydia psittaci*)、コクシエラ ブルネッティ(*Coxiella burnetii*)、アスペルギルス(*Aspergillus*)、ノカルジア(*Nocardia*)、カンジダ(*Candida*)、ニューモシスティス カリニ (*Pneumocystis Carinii*)、ヒストプラスマ症および / またはコクシジオイデス症(*Coccidioidomycosis*)。 20

C. ヴェグナー肉芽腫症などの肺組織の炎症を生じる自己免疫疾患の検出 - 抗-PR3抗体の検出。

D. 以下などの肺組織の炎症 / 刺激 / 破壊を生じる化学物質および毒の検出：

I. リシン毒素などの毒、および

II. 蒸留マスタード(HD)、ルイサイト(L)、マスタードガス(H)、ナイトロジェンマスタード(HN-2)、ホスゲンオキシム(CX)、シアン化水素、塩素(CL)、ジホスゲン(DP)、窒素酸化物(NO)、パーフルロイソブチレン(Perfluorobutylene)(PHIB)、ホスゲン(CG)、赤リン(RP)、三酸化硫黄-クロロスルホン酸(FS)、テフロンおよびパーフルロイソブチレン(Perfluorobutylene)(PHIB)、四塩化チタン(FM)および / または酸化亜鉛(HC)などの化学兵器。 30

【0190】

これらのキットは以下のマーカーを含んでもよい：

E. -ラクターゼなどの可能な治療選択肢を試験するための（抗生物質耐性遺伝子などの）治療マーカー。 40

【0191】

これらの標的分析物全てについて、対応する抗原、抗体および / または核酸は既知であり、単離、精製し、プローブとして使用することができる。

【0192】

下気道症状キットを使用するために、喀痰および / または気管支洗浄液を患者から採取する。採血もする。血清は、実施例2に記載するように処理する。タンパク質、DNAおよびRNAチップ上で実施されるタンパク質、DNAおよびRNA全てに基づいた手法に血清試料およびスワブ材料を使用する。本明細書に記載する技法を使用して、患者試料中の抗体、抗原、遺伝子突然変異および対立遺伝子変化を検出するために、本明細書に記載するタンパク質、DNAおよび / またはRNAチップ技術を使用して、咽喉炎を生じるウィルスおよび遺伝子突然変異ならびに細菌および他の病原をアッセイする。 50

【0193】

実施例7: 関節痛キット

このキットは、関節痛症状の患者の臨床発現に基づいた総合的で価格効果的かつ迅速な診断を可能にする。このキットは、感染性自己免疫の可能性および関節痛症状を生じると思われる遺伝的成分の両方を試験する。また、このキットは、異なる治療を試験する。このキットは、以下の病因群の1つ以上の標的を含む：A) 関節痛を生じる全身および臓器特異的自己免疫疾患および感染性疾患、B) 特定の関節疾患/疼痛に関連するHLA、およびC) 関節疾患/疼痛を生じる遺伝子突然変異、およびD) 可能な選択肢を試験する治療マーカー。例えば、ルディ：ケリーのリウマチ病学教本(Ruddy: Kelley's Textbook of Rheumatology)、第6版(W. B. Saunders Company 2001)参照。

10

【0194】

特に、関節痛は、一般に炎症性または非炎症性と分類される筋骨格系障害によって生じることが多い。炎症性障害は、感染性(ナイセリア ゴノレエ(淋菌)(*Neisseria gonorrhoea*)またはマイコバクテリウム ツベルクローシス(結核菌)(*Mycobacterium tuberculosis*)感染症)、結晶体性(痛風、偽性痛風)、免疫関連性[関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)]、反応性(リウマチ熱、ライター症候群)または特発性である。非炎症性障害は、外傷(回旋腱板裂傷)、効果の見られない回復(骨関節炎)、細胞の過剰増殖(色素性絨毛結節性滑膜炎)または疼痛増幅(線維筋痛)に関連しうる。リウマチ因子、抗核抗体、補体レベルライム病抗体、抗ストレプトリジンO(ASO)抗体またはIgリウマチ因子の多数の血清学的試験は、これらの疾患を検出するために実施される。

20

【0195】

これらのキットは、以下の標的の5つ以上を検出するように設計されたプローブを含む：

A. 関節痛を生じる全身および臓器特異的自己免疫疾患：

1. 以下の「自己」抗原に対する抗体の検出：ストレプトザイム、抗デオキシリボヌクレアーゼ-B、抗ストレプトリジン-O、ヒトIgA、ヒトIgG、ヒトIgM、抗カルジオリピン、ANA(抗核抗体-抗原)、SM、RNP、SS-A、SS-B、Scl-70(DNA-トポイソメラーゼ-1)、Jo-1(ヒスチジル-tRNAシンテターゼ)、ssDNA、dsDNA、ASCA'sマンノース(*S. cerevisiae*)、LKM-1、LKM-2、LKM-3および/またはミトコンドリアM2。

2. 関節痛を生じると思われる病原による感染症の検出：

ボレリア ブルグドルフェリ(*Borellia burgdorferi*)、トレポネーマ パリダム(*Treponema pallidum*)、エルシニア(*Yersinia*)、カンピロバクター(*Campylobacter*)、サルモネラ(*Salmonella*)、シゲラ(*Shigella*)、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、ヘモフィルス インフルエンゼ(*Haemophilus influenzae*)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、グラム陰性細菌(すなわち、グラム-科特異的プローブ)、ストレプトコッカス ニューモニエ(肺炎レンサ球菌)(*Streptococcus pneumoniae*)、ストレプトコッカス(科特異的プローブ)および/またはナイセリア ゴノレエ(淋菌)(*Neisseria gonorrhoeae*)。

30

B. 関節疾患/関節痛に関連するHLA：HLA-B27および/またはDRw52。

C. 関節疾患を生じる遺伝子突然変異：HGPT-遺伝子(「レッシューナイハン症候群またはヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損症)、遺伝子C282Yおよび/または遺伝子H63D。

40

【0196】

これらのキットはまた、以下のマーカーを含んでもよい：

D. 可能な治療選択肢を試験する治療マーカー。

【0197】

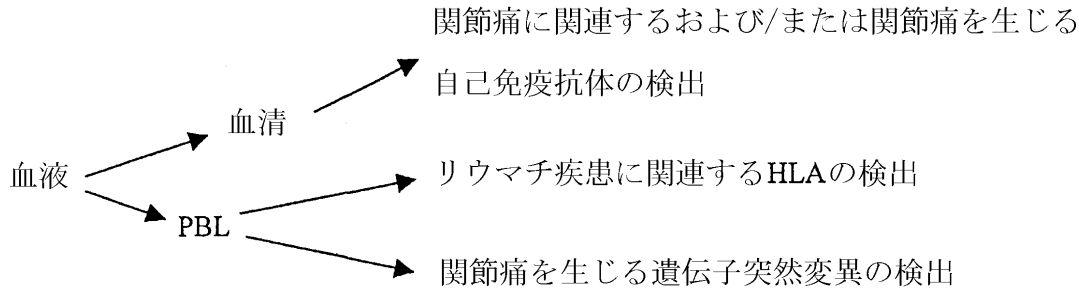
これらの標的分析物全てについて、対応する抗原、抗体および/または核酸は既知であり、単離、精製し、プローブとして使用することができる。

【0198】

関節痛キットを使用するために、患者から採血し、実施例2に記載するように処理する

50

。以下のダイアグラムは、血液試料を試験する方法を示す：



【0199】

10

本明細書に記載する技法を使用して、患者試料中の抗体、抗原、遺伝子突然変異および対立遺伝子変化を検出するために、本明細書に記載するタンパク質、生細胞、DNAおよび/またはRNAチップ技術を使用して、関節痛を生じるウイルスおよび遺伝子突然変異ならびに細菌および他の病原をアッセイする。

【0200】

実施例8:頭痛/発熱/髄膜炎(髄膜炎)キット

このキットは、頭痛、発熱および髄膜炎(項強直)の患者の臨床発現に基づいた総合的で価格効果的かつ迅速な診断を可能にする。このキットは、頭痛、発熱および髄膜炎の症状発現を生じると思われる、感染性要素(ウイルス、細菌および他の病原)および遺伝的成分の両方を試験する。また、このキットは、抗生物質耐性のようなものを含む異なる治療を試験する。細菌性髄膜炎に罹患した成人患者の典型的な臨床発現には、頭痛、発熱および髄膜炎が挙げられ、脳機能障害の徴候を伴うことが多い。悪心、嘔吐、硬直、発汗過多、虚弱、筋肉痛および羞明も一般的である。このキットは、以下の病因群の標的のためのプローブを含む：A)感染マーカー：髄膜炎を生じるウイルス、細菌および他の病原、B)遺伝子マーカー：末端の補体カスケードの欠損症の診断(C5~C9、プロパージン)、C)可能な治療を試験する治療マーカー。例えば、ゴエツ；臨床神経学教本(Goetz: Textbook of Clinical Neurology)、第1版、(W. B. Saunders Company 1999)参照。

20

【0201】

新規頭痛/発熱/髄膜炎キットは以下の標的の少なくとも5つ以上を検出するプローブを有する：

30

A. 感染マーカー：

1. 細菌および他の病原：ヘモフィルス インフルエンゼ(Haemophilus influenzae)、ナイセリア メニンジティディス(髄膜炎菌)(Neisseria meningitidis)、ストレプトコッカス ニューモニエ(肺炎レンサ球菌)(Streptococcus pneumoniae)、リステリア モノサイトゲネス(Listeria monocytogenes)、ストレプトコッカス アガラクティエ(Streptococcus agalactiae)、プロピオニバクテリウム アクネス(Propionibacterium acnes)、スタヒロコッカス エピデルミディス(Staphylococcus epidermidis)、エンテロコッカス フェーカリス(Enterococcus faecalis)、大腸菌(Escherichia coli)、クレブシエラ ニューモニエ(Klebsiella pneumoniae)、シュードモナス エルジノーサ(緑膿菌)(Pseudomonas aeruginosa)、サルモネラ spp.(Salmonella spp.)、ノカルジア spp.(Nocardia spp.)、マイコバクテリウム ツベルクローシス(結核菌)(Mycobacterium tuberculosis)、スピロヘータ(Spirochetes)(トレポネマ パリダム(梅毒)(Treponema pallidum)、ボレリア ブルグドフェリ(Borrelia Burgdorferi)(ライム病、レプトスピラ spp.(Leptospira spp.))など)およびリケッチア(リケッチア リケッチイ(Rickettsia rickettsii)(ロッキー山紅斑熱)、リケッチア コノリイ(Rickettsia conorii)、リケッチア プロワツェキイ(Rickettsia prowazekii)(流行性またはシラミ媒介性チフス)、リケッチア チフィ(Rickettsia typhi)(発疹チフスまたは発疹熱)、リケッチア ツツガムシ(Rickettsia tsutsugamushi)(ツツガムシ病)、エールリキア spp.(Ehrlichia spp.))。

40

2. ウィルス：非ポリオエンテロウィルス(エコーウィルス11、エコーウィルス9

50

、コクサッキーウイルスB5、エコーウイルス30、4および6、コクサッキーウイルスB2、B4、B3およびA9、エコーウイルス3、7、5および21、ならびにコクサッキーウイルスB1、エンテロウイルス70および71)、おたふくかぜウイルス、アルボウイルス(フラビウイルス科、蚊媒介性カリフォルニア脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルスおよびマダニ媒介性コロラドダニ熱)、ヘルペスウイルス(主に2型単純ヘルペスウイルスだが、1型単純ヘルペスウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルスおよびヒトヘルペスウイルス6も)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、アデノウイルス、2型および3型パラインフルエンザウイルス、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルスおよびノボリオウイルス。

10

B. 末端の補体成分：C5、C6、C7、C8、C9およびプロパージン(Properidin)などの遺伝子マーカー。

【0202】

これらのキットは以下のマーカーを含んでもよい：

C. -ラクタマーゼなどの可能な治療を試験する治療マーカー。

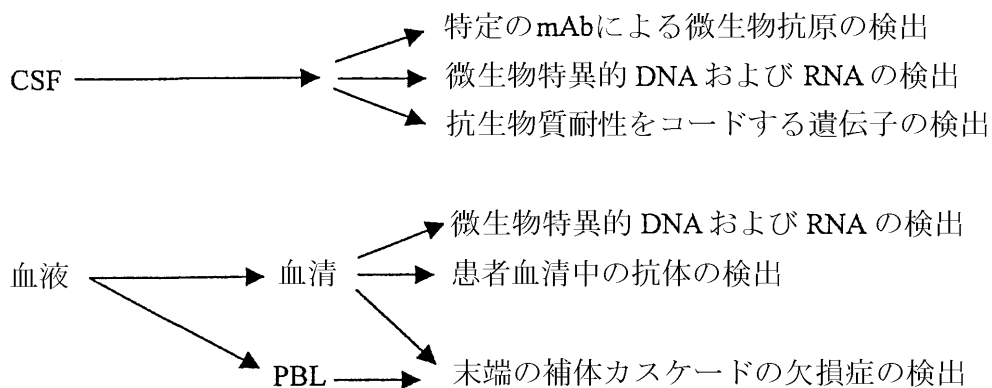
【0203】

これらの標的分析物全てについて、対応する抗原、抗体およびノボリオまたは核酸は既知であり、単離、精製し、プローブとして使用することができる。

【0204】

髄膜炎キットを使用するために、脳脊髄液(CSF)および血液を患者から採取する。実施例2に記載するように血液を処理し、標準的な技法を使用して、CSFを処理する。以下のダイアグラムは、血液試料を試験する方法を示す：

20



30

【0205】

本明細書に記載する技法を使用して、患者試料中の抗体、抗原、遺伝子突然変異および対立遺伝子変化を検出するために、本明細書に記載するタンパク質、生細胞、DNAおよびノボリオまたはRNAチップ技術を使用して、頭痛ノボリオ髄膜炎を生じるウイルスおよび遺伝子突然変異ならびに細菌および他の病原をアッセイする。

【0206】

実施例9: 下痢キット

40

このキットは、下痢の患者の臨床発現に基づいた総合的で価格効果的かつ迅速な診断を可能にする。このキットは、下痢を生じる可能性のある、細菌、ウイルスおよび他の病原を含む感染因ならびに遺伝的および自己免疫成分を試験する。また、このキットは、いくつかの抗生物質に対する細菌の耐性のようなものを含む異なる治療を試験する。化学物質の存在も評価する。これらの症状に関連する既知の標的を検出するために、プローブを本明細書に記載するように選択し、使用する。

【0207】

以下の病因状態群を評価する：A)下痢を生じる細菌、B)下痢を生じるウイルスおよび他の病原、C)下痢に関連する遺伝的因子、D)下痢を生じる自己免疫疾患、E)下痢を生じる化学物質、F)可能な治療選択肢を試験する治療マーカー。

50

【0208】

これらの下痢キットは、以下の標的の5つ以上を検出するプローブを有する：

A. 下痢を生じる細菌：バシラス セレウス(*Bacillus cereus*)、スタヒロコッカス アウレウス(黄色ブドウ球菌)(*Staphylococcus aureus*)、クロストリジウム パーフリンジェンス(*Clostridium perfringens*)、ビブリオ コレレ(*Vibrio cholerae*)、腸毒素原性大腸菌(*Escheria coli*)、クレブシエラ ニューモニエ(*Klebsiella pneumoniae*)、アエロモナス(*Aeromonas*)種、腸病原性および腸管附着性大腸菌(*E. coli*)(0157:H7)、ジアルジア生物、クロストリジウム ディフィシレ(*Clostridium difficile*)、出血性大腸菌(*E. coli*)、サルモネラ(*Salmonella*)、カンピロバクター(*Campylobacter*)、アエロモナス(*Aeromonas*)種、ビブリオ パラヘモリティカス(腸炎ビブリオ)(*Vibrio parahaemolyticus*)、エルシニア(*Yersinia*)、シゲラ(*Shigella*)種、腸管侵入性大腸菌(*E. coli*)、バシラス アンスラシス(炭疽菌)(*Bacillus anthracis*)、クロストリジウム ボツリナム(*Clostridium botulinum*)

10

B. 下痢を生じるウィルスおよび他の病原：サイトメガロウィルス、単純ヘルペスウィルス、腸病原性のアデノウィルス、ロトウィルス(グループA、B、C)、カリシウィルス、アストロウィルス、クリプトスポリジウム、セプタタ インテスティナリス(*Septata intestinalis*)、ミクロスポリジウム、エンテロサイトゾーン ビエヌシ(*Enterocytozoon bieneusi*)、イソスポーラ ベリ(*Isospora belli*)、サイクロスポーラ(*Cyclospora*)種、ジアラジア ランブリア(*Giardia lamblia*)、赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)、ドノバンリーシュマニア(*Leishmania donovani*)、ブラストシスチス ホミニス(*Blastocystis hominis*)、ニューモシスティス カリニ(*Pneumocystis carini*)、ヒストプラズマ(*Histoplasma*)、コクシディオデス(*Coccidioides*)、カンジダ アルビカンス(*Candida albicans*)、クリプトコックス(*Cryptococcus*)

20

C. 下痢に關与する遺伝的疾患：急性肝性ポルフィリン症、 δ -アミノレブリン酸デヒドラターゼ欠損症、ポルホピリノーゲンシンターゼ欠損症、I型アミロイド沈着症、アンドレード(Andrade)型またはポルトガル(Portugese)型のアミロイド多発性神経障害、ポルトガル型アミロイド沈着症、スウェーデン型アミロイド沈着症、ベックウィズ-ヴィーデマン症候群、嚢胞性繊維症、CF、デュピン ジョンソン症候群、II型高ビリルビン血症、幽門閉塞を伴う先天性表皮水痘症(*Epidermolysis Bullosa Letalis*)、胃腸管閉塞を伴う先天性皮膚形成不全症、カルミ(Carmi)症候群、赤芽球増殖性プロトポルフィリン症、赤血球肝性プロトポルフィリン症、フェロケラターゼ欠損症、ヘムシンテターゼ欠損症エチルマロン性(ethylmalonic)脳症、家族性腺腫性ポリポーシス、APC、腺腫様多発結腸ポリープ、FAP、ガードナー症候群、家族性自律神経失調症、ライリー-デイ症候群、家族性胃癌、家族性ヒベルニア(*Hibernia*)熱、家族性周期熱、TRAPS、家族性地中海熱、再発性多発性漿膜炎、遺伝性コプロポルフィリン症、コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ欠損症、ハーデロポルフィリア(*Harderoporphyria*)(含む)、遺伝性非ポリポーシス結腸癌、HNPPC、リンチ症候群、ヘルマンスキー-ブドゥラック症候群、HPS、多発性内分泌腫瘍Typ、MEN1、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、OTC欠損症、ピアソン症候群、鉄芽球性貧血w/骨髓細胞空胞化&脾臓外分泌機能不全、ポイツ-イエーガー症候群、過誤腫性腸ポリープ症、PJS、ホスホグリセリン酸キナーゼ欠損症、PGK欠損症、弾性線維性偽性黄色腫、優性、PXE、優性弾性線維性偽性黄色腫、劣性、PXE、劣性、ピルビン酸キナーゼ欠損症、タウンズ-ブックス(Townes-Brocks)症候群、TBS、ウォルマン病、コレステロールエステル貯蔵疾患フォンヒッペル-リンダウ症候群、VHL

30

40

D. 下痢を生じる自己免疫疾患：下痢を生じる自己免疫疾患に關連する以下の「自己」抗原に対する抗体

ASCA'sマンノース(抗-サッカロミセス セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)抗体)など

【0209】

これらのキットは以下のマーカーを含んでもよい：

E. アダムサイト(DM)、ジフェニルクロロアルシン(DA)、ジフェニルシアノアルシン(DC)

50

)などの下痢を生じる化学物質

F. -ラクタマーゼなどの可能な治療選択肢を試験する治療マーカー。

【0210】

実施例10: 膣帯下および/または出血/腹部/疼痛/悪心/嘔吐/体温(膣炎/PID)キット

このキットは、膣炎/骨盤痛の患者の臨床発現に基づいた総合的で価格効果的かつ迅速な診断を可能にする。このキットは、細菌、ウイルスおよび他の病原を含む考えられる感染因を試験する。また、このキットは、いくつかの抗生物質に対する細菌の耐性のようなものを含む異なる治療を試験する。咽喉炎/咽頭痛発現を生じる特定の病原の診断は、特定の抗原、特定の微生物DNA/およびまたはRNAならびに抗生物質に対する抗微生物耐性を示す特定の微生物DNAの正確な検出に基づいている。以下の病因状態群の1つ以上を評価する：A)膣炎/骨盤痛を生じるウイルス性疾患、B)膣炎/骨盤痛を生じる細菌および他の病原、C)可能な治療選択肢を試験する治療マーカー。

10

【0211】

キットは、以下の標的の5つ以上を検出するプローブを含む：

A)ウイルス検出 - ほとんどの場合、キットは科特異的試薬を含む(適用できる場合には、種類およびサブタイプが検出される)：ヒトパピローマウイルス(HPV)、伝染性軟属腫、1型および2型単純ヘルペスウイルス(HSV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、毛様白斑症(エプスタイン バーウイルス)

B)細菌および他の病原 - ほとんどの場合、キットは科特異的試薬を含む(適用できる場合には、種類およびサブタイプが検出される)：トレポレーマ パリダム(*Treponema pallidum*)、クラミジア トラコマチス(*Chlamydia trachomatis*)、N. ゴノレエ(*N. gonorrhoeae*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、バクテロイデス(*Bacteroides*)種、嫌気性球菌、カリマトバクテリウム グラヌロマトイス(*Calymatobacterium granulomatis*)、H. デュクレイイ(*H. ducreyi*)、マイコプラズマ ホミニス(*Mycoplasma hominis*)、ウレアプラズマ ウレアリティカム(*Ureaplasma urealyticum*)、C. トラコマチス(*C. trachomatis*)、カンジダ アルビカンス(*Candida albicans*)

20

【0212】

これらのキットはまた以下のマーカーを含んでもよい：

C) -ラクタマーゼなどの可能な治療選択肢を試験する治療マーカー。

30

【0213】

実施例11: 皮膚変色/疼痛/潰瘍(皮膚)キット

このキットは、皮膚発疹の患者の臨床発現に基づいた総合的で価格効果的かつ迅速な診断を可能にする。このキットは、皮膚発疹を生じる可能性のある細菌、ウイルスおよび他の病原を含む感染因ならびに遺伝的および自己免疫成分を試験する。また、このキットは、いくつかの抗生物質に対する細菌の耐性のようなものを含む異なる治療を試験する。また、化学物質の存在を評価する。これらの症状に関連する既知の標的を検出するために、本明細書に記載するようにプローブを選択し、使用する。

【0214】

以下の病因状態群を評価する：A)皮膚発疹を生じる細菌、B)皮膚発疹を生じるウイルスおよび他の病原、C)皮膚発疹に関与する遺伝的要因、D)皮膚発疹を生じる自己免疫疾患、E)皮膚発疹を生じる化学物質、F)可能な治療選択肢を試験する治療マーカー。

40

A)皮膚発疹を生じる細菌：ほとんどの場合において、キットは科特異的試薬を含む(適用できる場合には、種類およびサブタイプが検出される)：スタヒロコッカス アウレウス(黄色ブドウ球菌)(*Staphylococcus aureus*)、グループA連鎖球菌；炭疽菌、トレポレーマ パリダム(*Treponema pallidum*)、クラミジア トラコマチス(*Chlamydia trachomatis*)、N. ゴノレエ(*N. gonorrhoeae*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、バクテロイデス(*Bacteroides*)種、嫌気性球菌、カリマトバクテリウム グラヌロマトイス(*Calymatobacterium granulomatis*)、H. デュクレイイ(*H. ducreyi*)、C. トラコマチス(*C. trachomatis*)、カンジダ アルビカンス(*Candida albicans*)、エルシニア ペスティス(ペスト菌)(*Y*

50

ersinia pestis)、白癬、カンジダ症(モニリア疹)、癩風、ピチロスポルム毛包炎。

B) 皮膚発疹を生じるウイルスおよび他の病原：ほとんどの場合において、キットは科特異的試薬を含む(適用できる場合には、種類およびサブタイプが検出される)：ヒトパピローマウイルス(HPV)、伝染性軟属腫、1型および2型単純ヘルペスウイルス(HSV)、毛様白斑症(エプスタインバーウイルス)、大痘瘡(天然痘)、アレナウイルス、フィロウイルス、ブニヤウイルスおよびフラビウイルス

C) 皮膚発疹に関連する遺伝的疾患：ヘルマンスキー-ブドゥラック症候群*、乳酸デヒドロゲナーゼ欠損症*、LDH欠損症、弾性線維性偽性黄色腫、劣性*、PXE、劣性ポイツ-イエーガー症候群*、過誤腫性腸ポリープ症、PJS先天性爪肥厚症*、ジャクソン-ラウラー(Jackson-Lawler)症候群、ヤーダツソーンレーヴァンドヴスキー

眼-皮膚白皮症1型(チロシナーゼ関連)*、OCA1、眼皮膚弾性線維性偽性黄色腫、優性*、PXE、優性神経線維腫症I型*、NF1、フォンレックリングハウゼン病神経線維腫症II型*、NF2

D) 皮膚発疹を生じる自己免疫疾患：

抗カルジオリピンなどの以下の「自己」抗原に対する抗体 - 精製カルジオリピン抗原をプローブとして使用する、ANA(抗核抗体-抗原)、SM、RNP、SS-A、SS-B、Scl-70(DNA-トポイソメラーゼ-1)、Jo-1(ヒスチジル-tRNAシンターゼ)、 α 2糖タンパク質(アポリポタンパク質H)、コラーゲン3(IV)コラーゲン鎖)エラスターゼ、ヒストン(H2A- H2B- H3- H4)、グリアジン、IgA、IgG、IgM、ラクトフェリン、PARTポリ-ADP-リボースポリメラーゼ、ホスホタンパク質(SLAの診断)、P0、P1、P2、リボソーム P(カルボキシル-末端22アミノ酸ペプチド)

【0215】

これらのキットはまた以下のマーカーを含んでもよい：

E：蒸留マスタード(HD)、ルイサイト(L)、マスタードガス(H)、ナイトロジェンマスタード(HN-2)、ホスゲンオキシム(CX)、フェノジクロロアルシン(Phenodichloroarsine)(PD)、セスキマスタードなどの皮膚発疹を生じる化学物質、

F) -ラクターマーゼなどの可能な治療選択肢を試験する治療マーカー。

【0216】

実施例12:免疫化/免疫適格性キット

免疫化は、感染性疾患を予防する手段として、成功率が高く、非常に価格効果的である。定期的な幼児期免疫化により、かつては一般的であった接触伝染病の発生は、20世紀後半においては米国および他の国において顕著に低減した。ワクチン化に基づいた公衆衛生計画により、天然痘は世界的に根絶され、小児マヒは米国からは排除され、おそらく近い将来世界中から排除されるだろうし、侵襲性ヘモフィルスインフルエンザ(Haemophilus influenzae)b型(Hib)疾患の米国および他の国における減少は95%を超える。米国では、免疫化により先天性風疹症候群、破傷風およびジフテリアをほとんど排除しており、風疹および麻疹の発生頻度を低下し、低い率を記録している。

【0217】

この国の幼児および小児は、10種類の病気に対するワクチンを定期的に受ける：ジフテリア、破傷風、百日咳、小児マヒ、麻疹、おたふくかぜ、風疹、Hib感染症、B型肝炎および水痘。全体の免疫化にはさらに時間と供給源が必要であるということに気づいて、ロタウイルスワクチンも推奨されている。A型肝炎ワクチンは一部の小児群に推奨されている。50種を超える免疫生物学的製品が米国において許可されている。この顕著な成功にもかかわらず、多数の人々は免疫化が十分ではない。この結果の理由として、特に、(1)小児期において適当な免疫化を受けていない、(2)投与されたワクチンの品質の悪さおよび(3)ワクチン接種時の宿主の免疫不適格性が挙げられる。

【0218】

10

20

30

40

50

新規装置および方法は、患者の免疫適格状況および種々の病原に対する免疫応答性の両方を評価するために使用することができる。また、免疫系の他のパラメーターを評価することができる。このような分析のためのキットは、a)ワクチンを用いて投与されるウィルスおよび細菌病原に対する抗体、b)ワクチンとして投与されるウィルスおよび細菌抗原、およびc)再発性感染症に関連する遺伝子のプローブ（再発性感染症キットを参照）、の1つ以上へのプローブを有する。これらの症状に関連する既知の標的を検出するために、本明細書に記載するように、プローブを選択し、使用する。

【0219】

実施例13:血液アッセイ用キット（血液銀行/輸血）キット

臨床的にインテリジェントな血液銀行スクリーニング診断キットは、本明細書に記載する新規方法を使用して製造される。これらのキットは、血液輸血/臓器提供を不可能にする数多くの疾患/遺伝的特徴の総合的で価格効果的かつ迅速な診断/スクリーニングを可能にする。

【0220】

試験する必要がある病原/遺伝子マーカーのリストは、食品医薬品局(FDA)によって厳密に規制/要求されている。新規キットは、FDAおよび米国血液銀行協会(American Association of Blood Banks)により要求および/または推奨されている試験を全て含む。また、キットは価格効果的であるので、病原および遺伝子マーカーについて推奨されている他のアッセイまたは検討中の他のアッセイを含むことができる。FDAによる現在の要件は、血液は、採血後に単位ごとに試験しなければならないということである。試験は、ABO群（血液型）、Rh型（+または-）およびレシピエントに問題を生じる可能性のある任意の予期しない赤血球抗体のアッセイを含む。スクリーニング試験はまた、B型およびC型肝炎ウィルス、1および2型ヒト免疫不全症ウィルス(HIV)、ヒトT-リンパ指向性ウィルス(HTLV)IおよびIIならびに梅毒の感染ドナーを証明するためにも実施される。血液銀行キットは、血液輸血/臓器移植を妨害および/または血液輸血/臓器移植に影響を与えらる、異なる感染性疾患（HIV、梅毒、HBV、HCV、CMV）、遺伝的特徴（HLA、Rh抗原）を診断するために、全て科学的に許容されたスクリーニング試験のパネルを有する。これらの血液分析のためのキットは、以下の標的の1つ以上を検出するプローブを有する：(1)血液/臓器移植を不可能にするウィルスおよび細菌病原、(2)HLA、血液グループおよびRh(および他の関連のある)血液グループの特徴づけ。試験結果が陽性の血液は全て廃棄される。

【0221】

キットは、UniScreen、ProScreenおよび/またはNuScreenチップを使用して分析される以下の標的の5つ以上を検出するように設計されたプローブを含む：

I. ウィルス：A型肝炎ウィルス、B型肝炎ウィルス、C型肝炎ウィルス、1型および2型HIV、ヒト-Tリンパ指向性ウィルス、I型およびII型（抗-HTLV-I、-II）、トレポレーマ パリダム(*Treponema pallidum*)、ボレリア ブルグドフェリ(*Borrelia burgdorferi*)、CMV、マラリア、エプスタイン バーウィルス(EBV)、バベシア症および/またはシャーガス病、

II. 血液グループ、ドナー血清のRh型またはHLA：HLA型分け、ABO血液グループシステム、Rhシステム(Rh d、Rh eおよびRh c)、他の血液グループ(Kell(K)、Duffy(Fy)、Kidd(jK)、MN、P、ルイス(Le)、ルター(Lutheran)(Lu)、ベル システム(Vel system)および/またはライト(Wra)。

【0222】

これらの標的分析物全てについて、対応する抗原、抗体および/または核酸は既知であり、単離、精製して、プローブとして使用することができる。

【0223】

新規血液スクリーニングキットを使用するために、提供された血液を採取する。血清を有核細胞から分離する。血清試料は、タンパク質チップ上で実施されるタンパク質に基づいた全ての手法に使用される。採取後、血清を血餅から分離し、実施例2に記載するよう

10

20

30

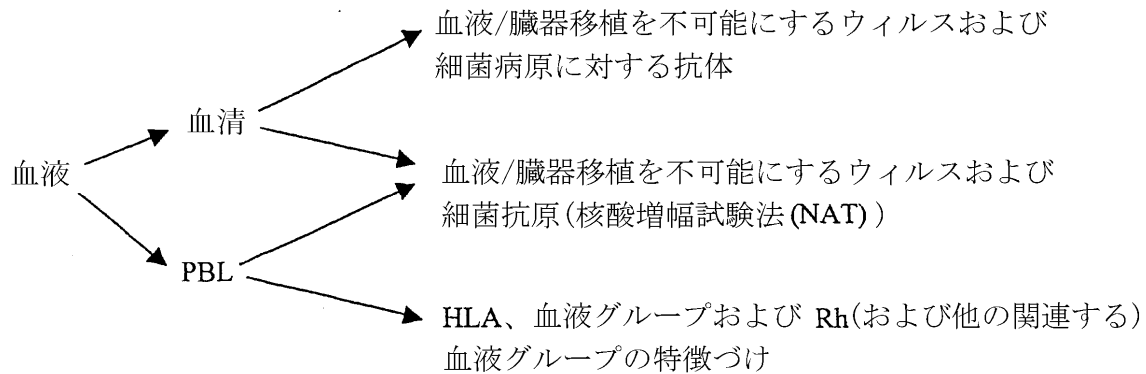
40

50

に処理しなければならない。

【0224】

以下のダイアグラムは、血液試料を試験する方法を示す：



10

【0225】

本明細書に記載する技法を使用して、患者試料中の抗体、抗原等を検出するために、本明細書に記載するタンパク質、DNAおよび/またはRNAチップ技術を使用して、血液提供/臓器移植を不可能にするウイルスおよび細菌病原ならびにHLA、Rhおよび他の血液グループをアッセイする。

20

【0226】

他の態様

本発明は、本発明の詳細な説明と併せて記載されているが、上記の説明は例示する意図のものであって、添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の範囲を限定するものではないことが理解される。他の局面、利点および改良も以下の特許請求の範囲の範囲内である。

【0227】

例えば、他の特定の症状発現のキットとして以下が挙げられる：倦怠感/頭痛/筋肉痛/背部痛(脳炎)キット、結膜充血/目蓋の浮腫/水様および/または粘液膿性の分泌物/耳介前方のリンパ節症(結膜炎)キット、発熱/頻脈/呼吸亢進/白血球増多症/末梢白血球応答の不良/乏尿(敗血症)キット、BMT後の敗血症/免疫抑制キット、発熱/悪寒/局所的骨痛および圧痛/白血球増多症/骨奇形(骨髓炎)キット、尿道または恥骨上領域の圧痛/体温/悪寒戦慄、悪心(膀胱炎/腎盂腎炎/尿道炎)キット、男性の恥骨領域の圧痛、頻尿、切迫および排尿困難(前立腺炎/副睾丸炎(epididimitis))キット、不妊、両性的(ambiguous)性器キット、難聴(聴力)キット、視力損失(盲目)キット、精神発育遅滞キット、筋無力症/疼痛/しびれ(神経筋)キット、筋無力症/疼痛/しびれ/精神発育遅滞/振戦(神経)キット、骨奇形/疼痛(骨)キット、心臓性呼吸困難(心不全)キット、尿毒症(腎不全)キット、吸収不良/体重低下(胃)キット、副鼻腔痛/発熱(副鼻腔炎)キットならびに熱帯病キット。

30

【図面の簡単な説明】

【0228】

【図1A】症状特異的で、臨床的にインテリジェントな診断用バイオチップ装置の略図である。

40

【図1B】症状特異的な診断用バイオチップ装置の略図である。

【図2】各々が「複数アレイを配列した(arrays of arrays)」様式の異なる構成のプロープを有する、症状特異的な3つの診断用バイオチップ装置の略図である。例えば、図2Aは「X」構成のプロープを例示し、図2Bは「V」構成のプロープを示し、図2Cは「+」構成のプロープを示す。

【図3】16-マイクロウェル様式を使用した症状特異的な診断用バイオチップ装置の略図である。図3Aは拡大したマイクロウェルおよび固相支持体の平面図であり、図3Bは断面図であり、図3Cは1つのマイクロウェルの三次元図である。

50

【図4】プローブを固相支持体に接続するための、ポリエチレングリコール(PEG)などの分子リンカーを使用する新規プローブ接続技術の略図である。この新規接続技術を新規症状特異的診断用バイオチップ装置と併用して使用することができる。

【図5】三次元的に共有結合されたストレプトアビジンのメッシュを使用する別の新規接続技術の略図である。図5Aは、保護材料を備えるが、プローブが接続されていない固相支持体を示す。図5Bは、架橋されていないプローブおよび保護材料を備える固相支持体(無秩序な配列)を示す。図5Cは、秩序ある配列で架橋されている保護材料を備える固相支持体を示す。

【図6】保護層(6A)および長さが異なる分子リンカーの使用、ならびに架橋してあるリンカー(6C)と架橋していないリンカー(6B)との差を示す、ストレプトアビジン接続技術の略図である。

【図7A】マルチウェルバイオチップ装置に組み込まれた混合システムの略図である。

【図7B】図7Aのマルチウェルバイオチップ中の単一のウェルの拡大図である。

【図8】図7Aおよび図7Bの混合システムの別の形態である。

【図9】症状特異的診断用バイオチップ装置に使用することができる、マルチウェル装置の新規倒立型アレイシステムの略図である。基材は、円筒などの隆起または高架構造物を備え、その上に特定のプローブアレイまたは複数アレイを配列したもの(arrays of arrays)を配置することができる。図9Aは、図9Bに示すマルチウェル装置の拡大したウェルを示す。図9Bは断面図を示し、図9Cはマルチウェル装置のウェルの三次元図を示す。

【図10A-B】それぞれ、直立および逆さにした状態のマルチウェル症状特異的診断用バイオチップ装置の新規倒立型アレイシステム対の略図である。

【図10C】各構造が、電氣的または光学的読出しを提供するための、埋設型キャピラリー、電線または光ファイバーを備える高架構造物アレイのダイアグラムである。

【図11】マイクロタイタープレート(平面図、図11C、断面図、図11D)に使用される別の倒立型アレイシステムの一連の略図(平面図、図11A、断面図、図11B)である。図11Eは、マイクロタイタープレートに挿入された倒立型アレイを示す。

【図12】図11の倒立型アレイおよびマイクロタイタープレートシステムの一連の略図である。

【図13】倒立型アレイ装置の略図である。高架構造物は各々、アレイ様式または複数アレイを配列した(array of arrays)様式で数多くのプローブを接続させることができる。図13Aは、装置内の96の高架構造物のアレイを示す。図13Bは、装置内の16の高架構造物のアレイを示す。図13Cは、装置内に30のこのような構造を有する四角形の高架構造物を示す。装置はまた、マイクロウェルプレートを用いてこれらの装置を適切に配列させるまたは自動化様式でこれらの装置を使用する助けとなる端部形状構成を有してもよい。

【図14】倒立型アレイ装置の略図である。図14Aは、装置内の96の高架構造物のアレイを示す。高架構造物は各々、アレイ様式または複数アレイを配列した(array of arrays)様式で数多くのプローブを接続させることができる。高架構造物の表面も三次元性を有してもよい。断面では、1つのプローブが以下の下部構造または形状構成の各々に接続されるように、図14Aのアレイは高架下部構造(14B)、平らな下部構造(14C)または凹んだ/ディンプルのある下部構造(14D)を有してもよい。

【図15-16】三次元多孔性アレイの略図である。このような三次元多孔性アレイは数多くの方法で製造することができる、これらの図は、三次元固相基材が一面に孔を有するアレイである、一方法を例示する。孔は、ゲル様基質またはニトロセルロース膜などの他の材料が充填されている。プローブは基質に事前結合されても、基質配置段階の後に配置されてもよい。

【図17】カートリッジ型装置の内側に配置された三次元多孔性アレイの略式のダイアグラムである。

【図18-19】別の三次元多孔性アレイのダイアグラムである。このような三次元多孔性アレイは数多くの方法で製造することができる、これらの図は1つの方法を例示している。

。

10

20

30

40

50

【図20】別の三次元多孔性アレイに基づいた倒立型アレイ装置の略式のダイアグラムである。高架構造物は各々3-D多孔性アレイ様式に基づくことができる。

【図21】3-D多孔性アレイ様式の治療現場 (point-of-care) における装置実施の代表例である。これは、この様式を治療現場 (point-of-care) におけるバイオチップ装置にどのように使用することができるかということに関する、ほんの一例である。

【図22】2つの異なるマイクロ流体コンセントレータバイオチップの略図である。

【図23】多重分析用マイクロアレイおよびマイクロチャネル組み合わせチップである2つの異なるマイクロ流体バイオチップの略図である。

【図24 - 29】種々のATPアーゼに基づいた流体マイクロミキサーの略図である。

【図30 - 33】追加の生物分子に基づいた流体マイクロミキサーの一連の略図である。

【図34】鎖-インベダー (invader) 分子がどのようにハイブリダイゼーション増大を実施することができるかを示す一連の代表例である。

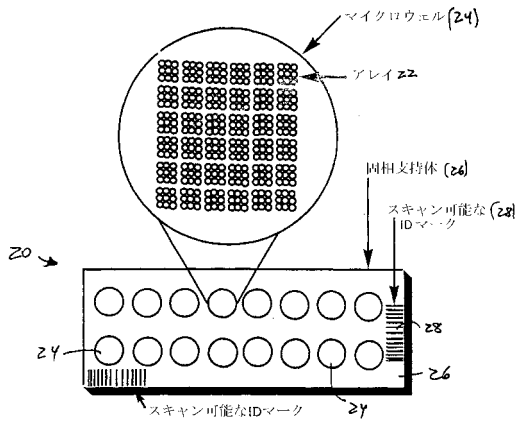
【図35 - 36】新規ハイブリダイゼーションチャンバーおよびそれらの種々の部品の一連の略図である。

【図37】DNA、RNAおよびタンパク質などの任意の分析物の単一の多重アッセイにおける検出を可能にする新規UniScreen技術の原理の一連の代表例である。

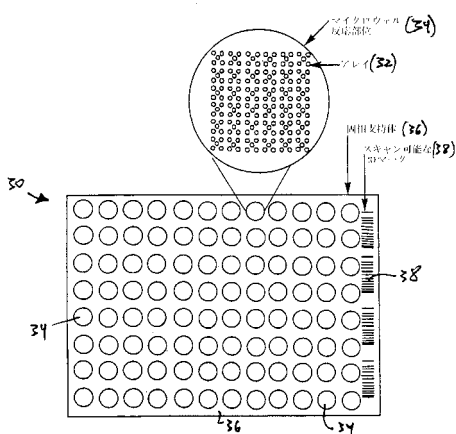
【図38】プローブが多孔性基材に接続された三次元多孔性アレイ装置の代表例である。

10

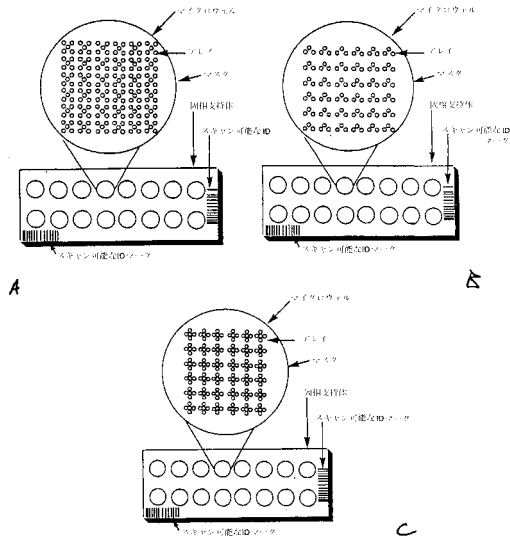
【図1A】



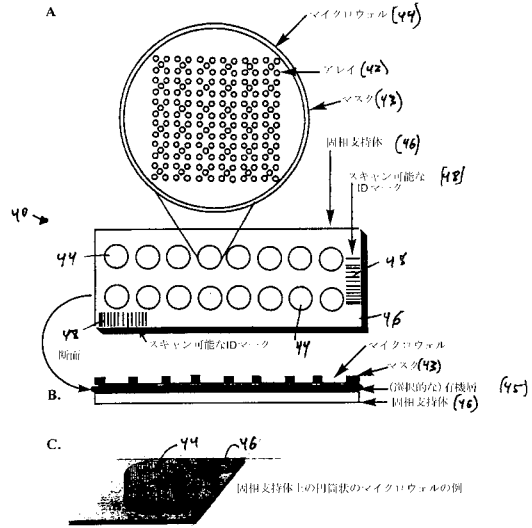
【図1B】



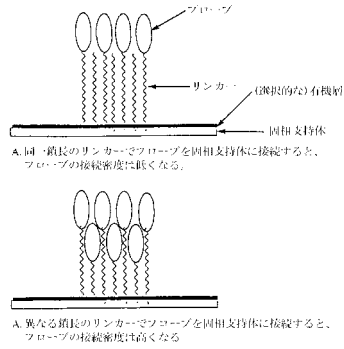
【図2】



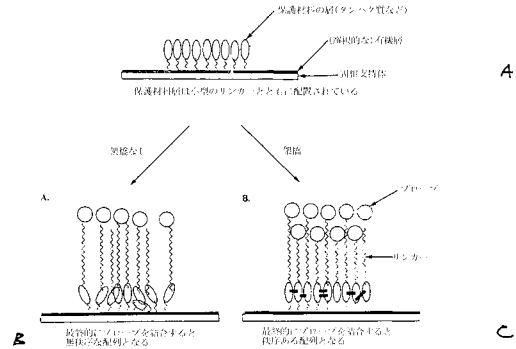
【図3】



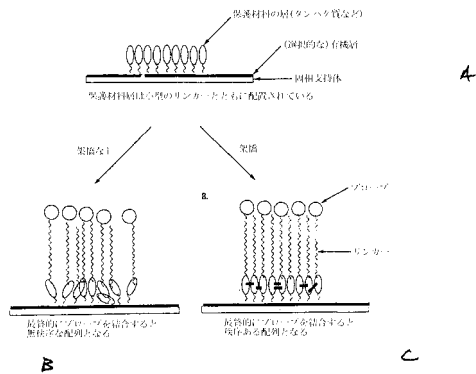
【図4】



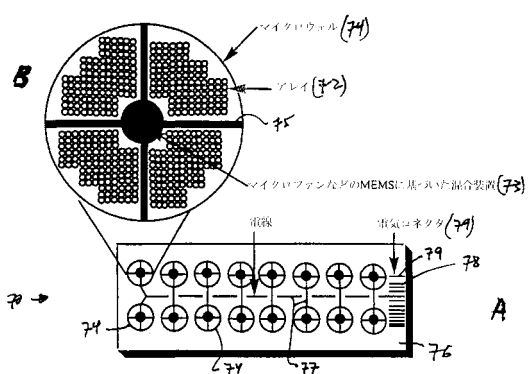
【図6】



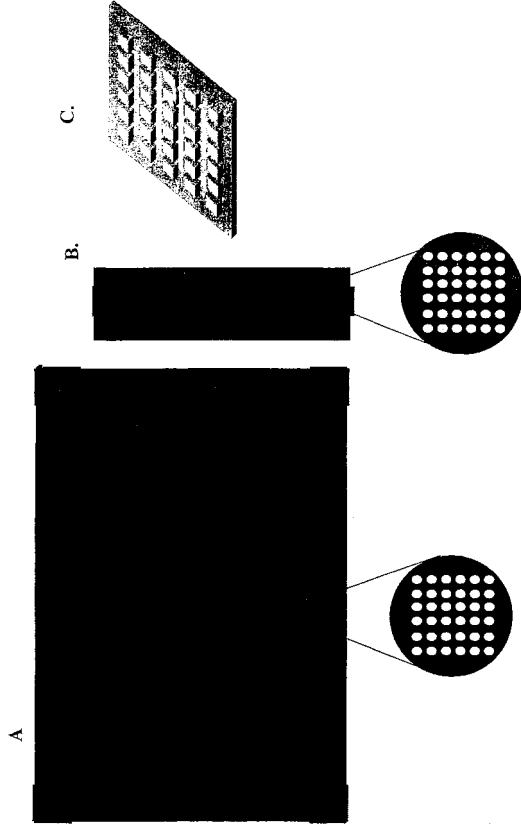
【図5】



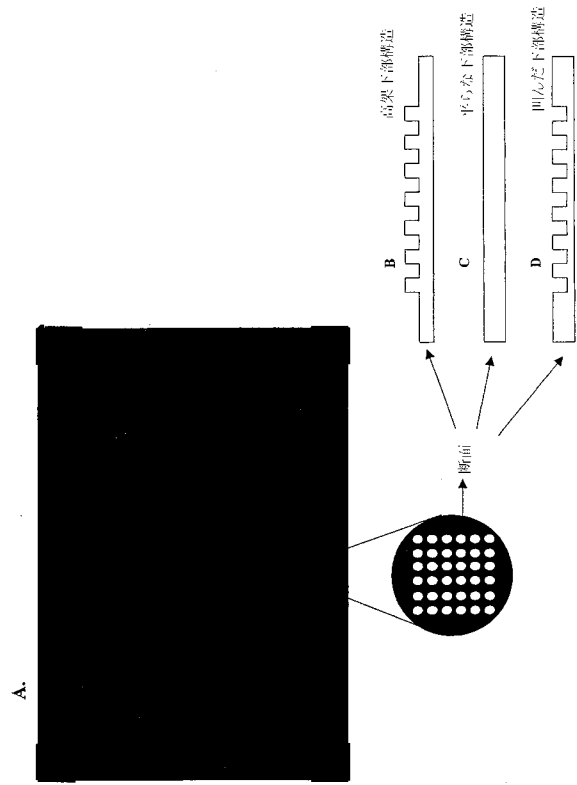
【図7】



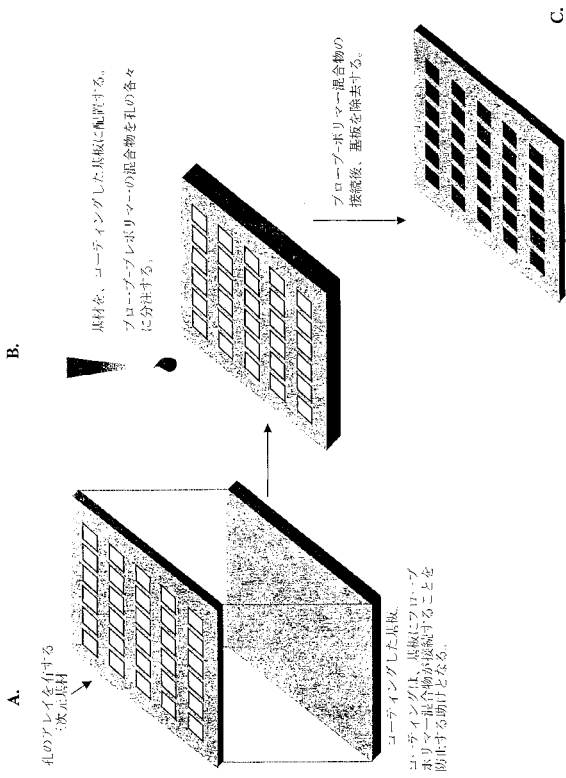
【図13】



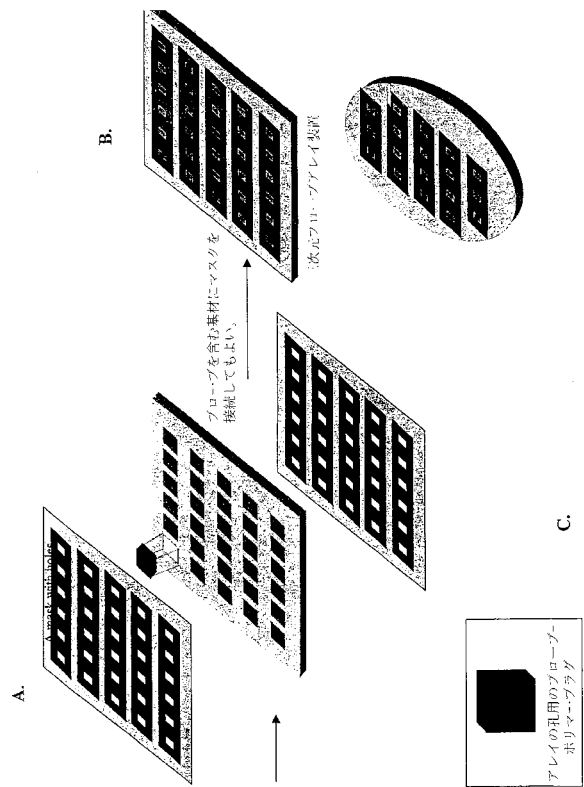
【図14】



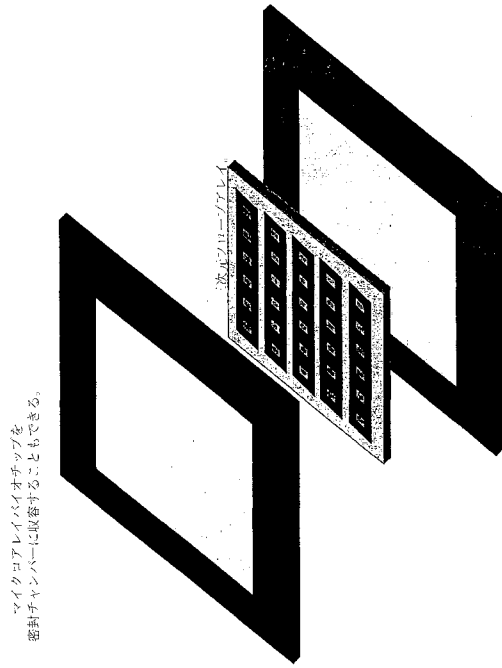
【図15】



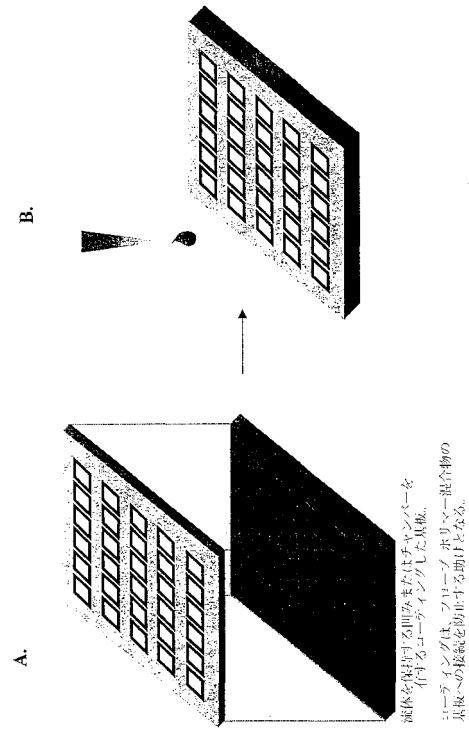
【図16】



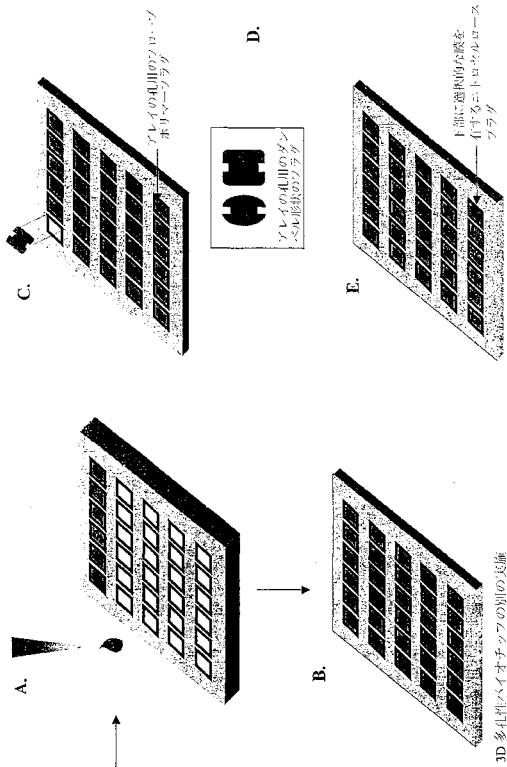
【図17】



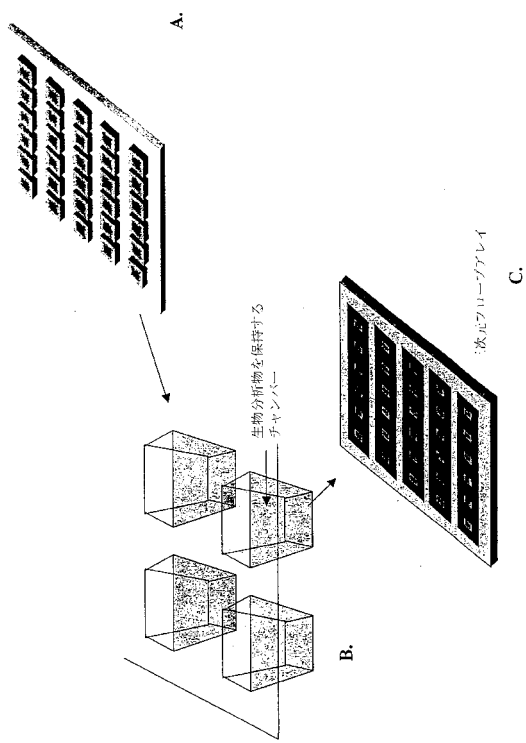
【図18】



【図19】

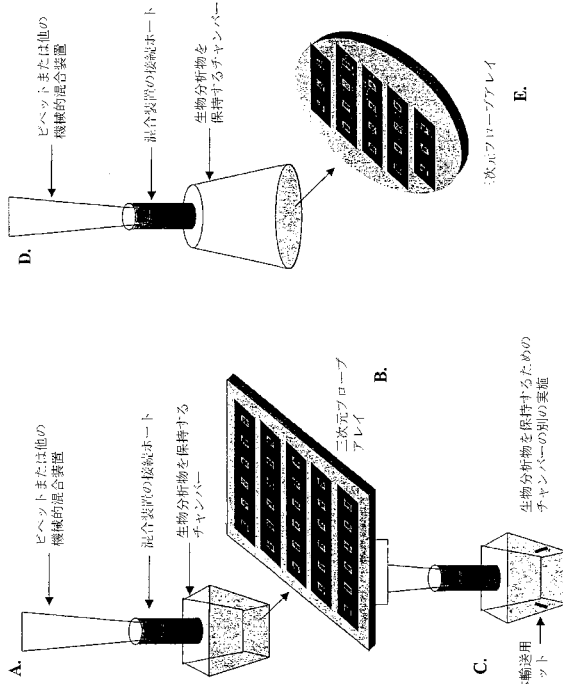


【図20】



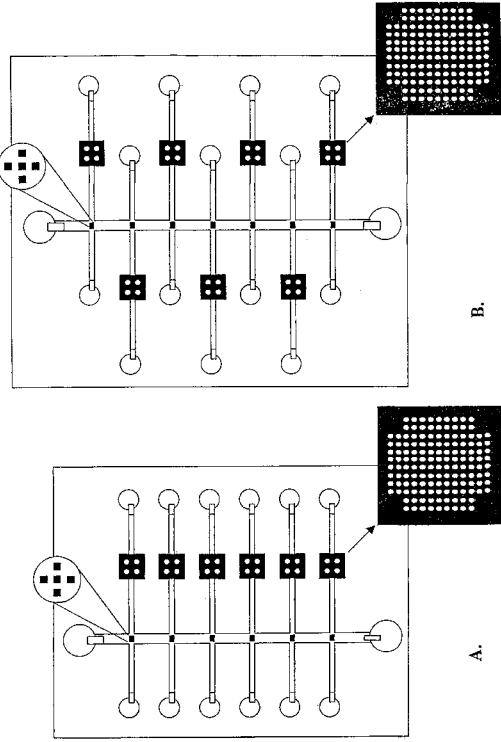
各層は別構造上のアレイが3D多孔性アレイである、側面アレイ表面の別の実施

【図 2 1】



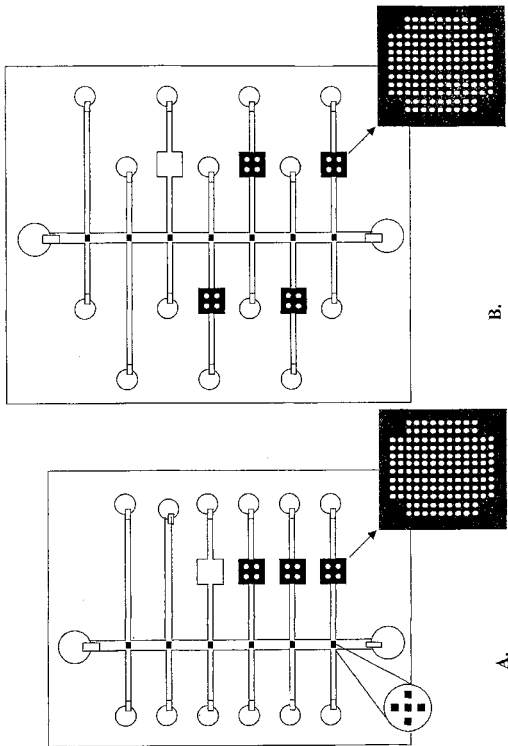
【図 2 2】

中央のマイクロ流体チャンバーに於ける各アレイは、それに接続した1つ以上のフローブを有しうる。フローブは、安定なリンカーまたは切断可能なリンカーを用いて接続することができる。切断可能なリンカーは、一次分析のためにフローブ-橋的複合体を橋接チャンバーに移動する助けとなることができる。



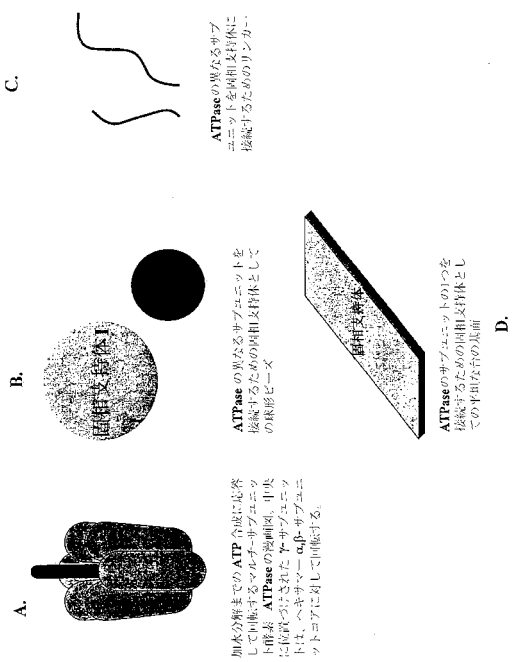
【図 2 3】

多重分析のためのマイクロ流体マイクロアレイおよびマイクロチャネル組み込みチップ

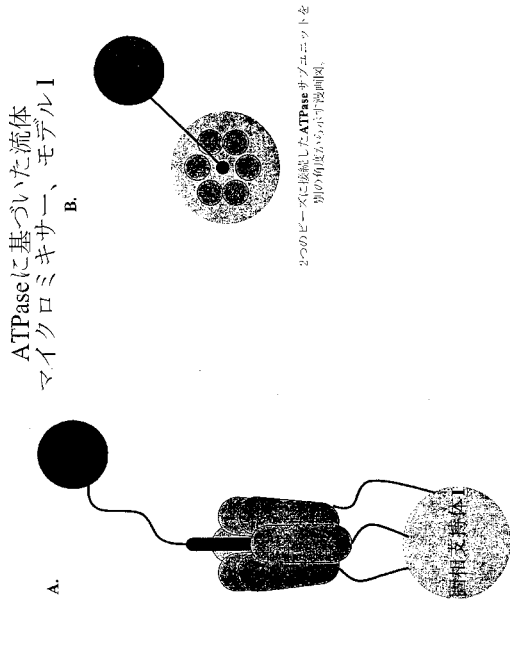


【図 2 4】

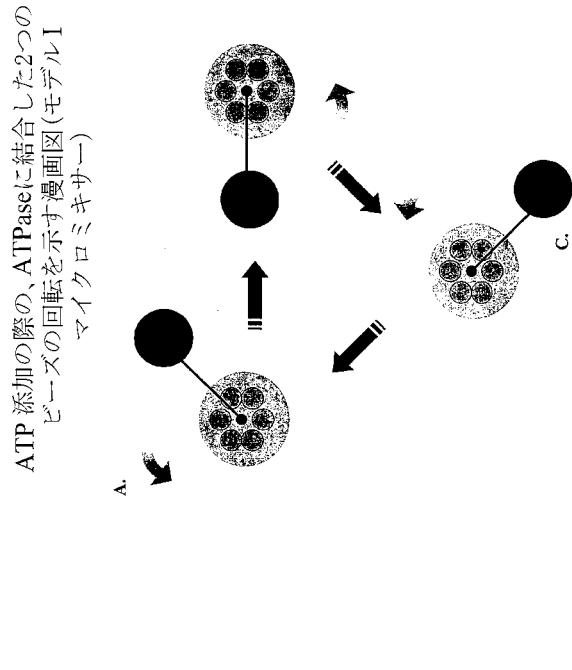
ATPaseに基づいた流体マイクロミキサー



【 図 2 5 】

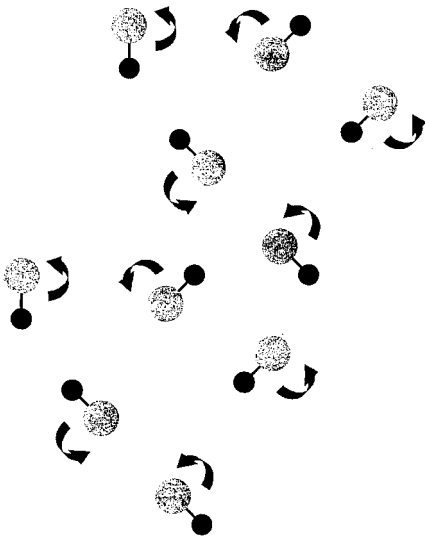


【 図 2 6 】



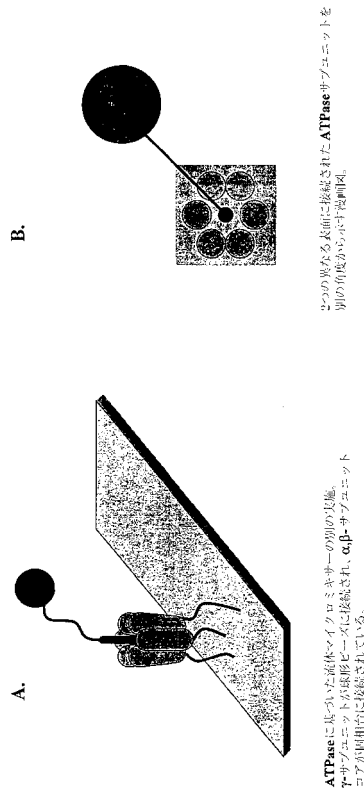
【 図 2 7 】

溶液中で活動中の多重モデル I
マイクロミキサーを示す漫画図



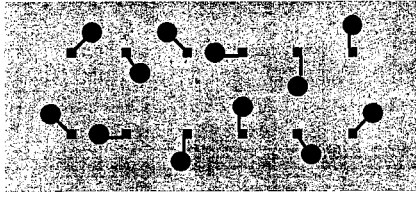
【 図 2 8 】

ATPase に基づいた流体マイクロミキサー、モデル II



【図 29】

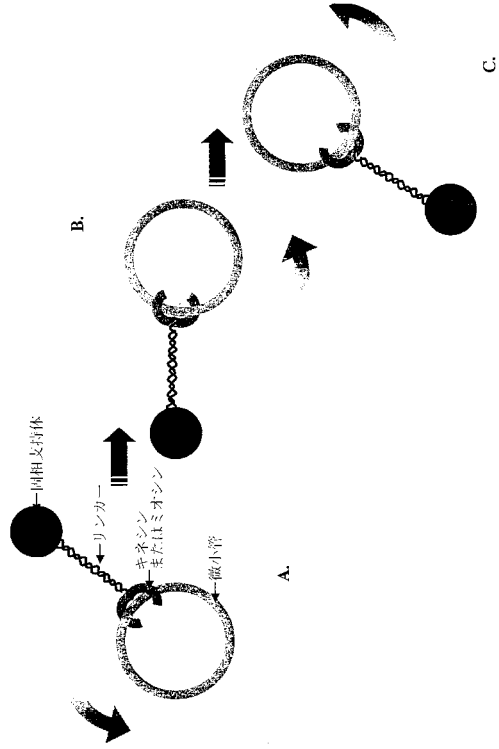
溶液中で活動中の多重モデルII
マイクロミキサーを示す漫画図



全てのミキサーは互いに反対方向に動いている

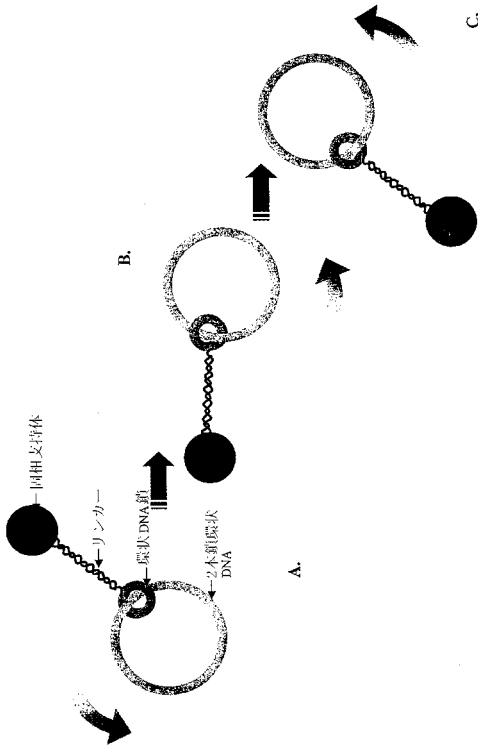
【図 30】

キネシンおよびミオシンに基づいた流体マイクロミキサー



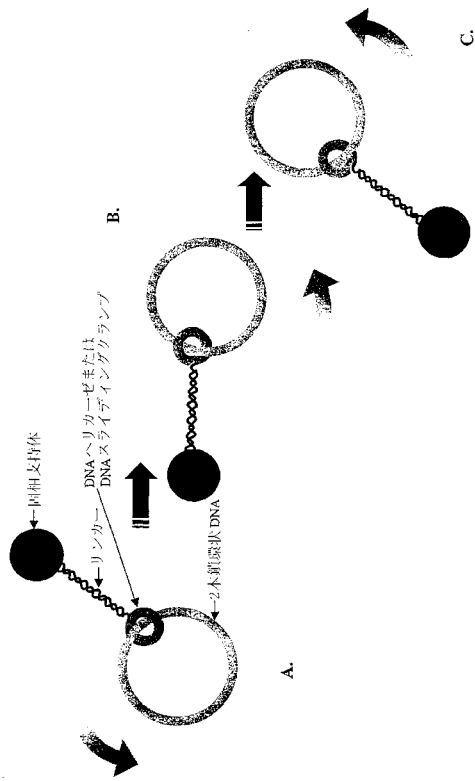
【図 31】

環状3本鎖形成オリゴ(CTFO)DNAおよび他の擬ロタキサランに
基づいた流体マイクロミキサー



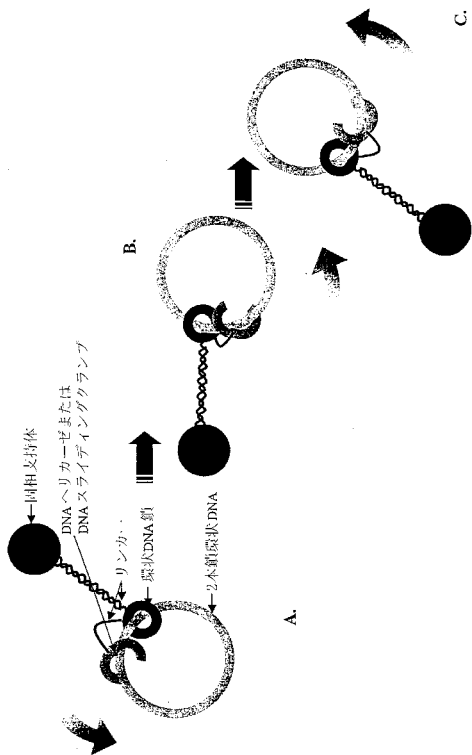
【図 32】

DNAヘリカーゼおよびDNAスライディングクランプに
基づいた流体マイクロミキサー



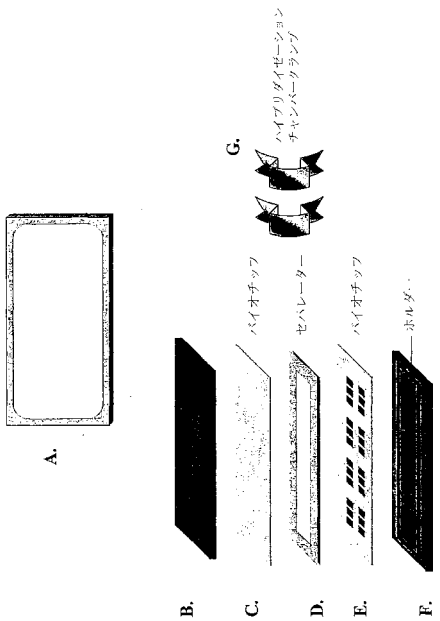
【図 3 3】

DNAヘリカーゼ(環状3本鎖形成オリゴ(CFO)またはスライディングクランプに結合している)に基づいた流体マイクロミキサー



【図 3 5】

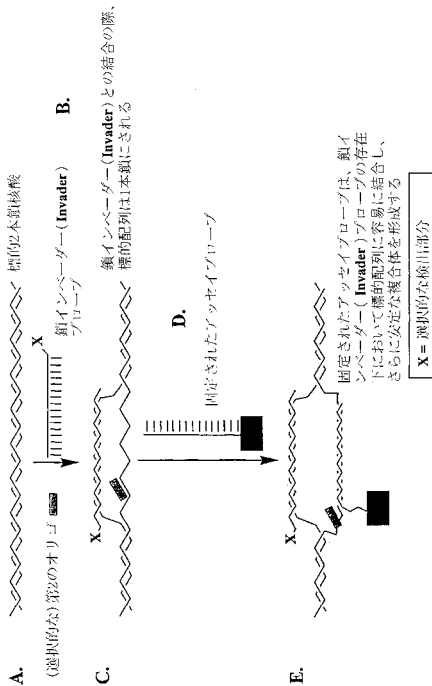
二重実験のために2つのバイオチップを単一のチャンバー内で互いに
向面して配置するために、ガスケット/セパレーターを
今のハイブリダイゼーションチャンバーに使用することができる



新規ハイブリダイゼーションチャンバーの一例のスケッチ。
ハイブリダイゼーションチャンバーは、2つのバイオ
チップに適当するように構築することができる。

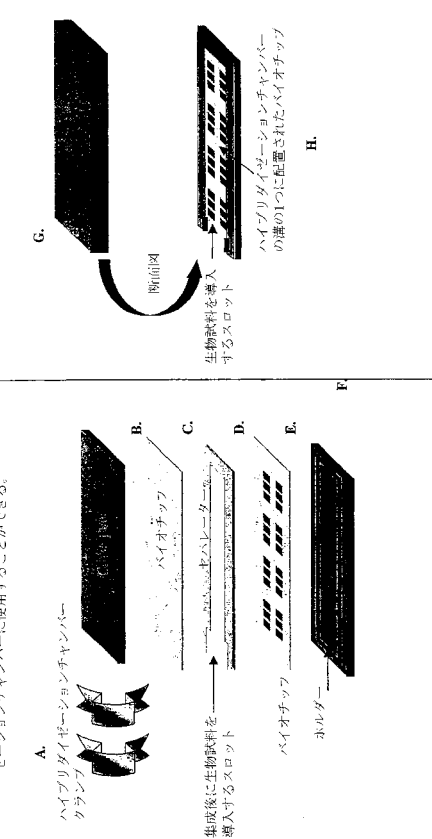
【図 3 4】

鎖インバーダー(Invader)分子を使用した
ハイブリダイゼーション増大



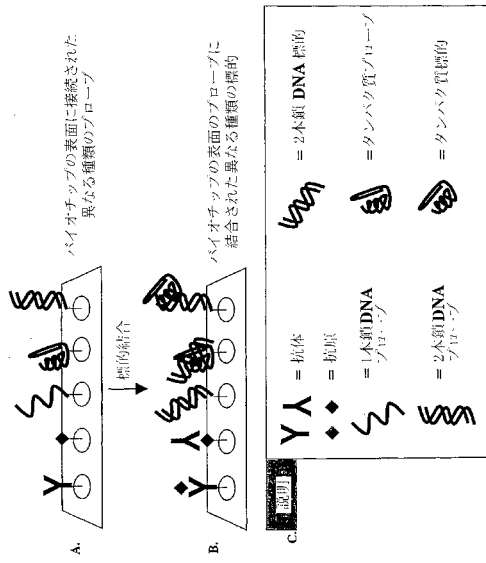
【図 3 6】

二重実験のために2つのバイオチップを単一の
チャンバー内で互いに向面して配置するために、
ガスケット/セパレーターを今のハイブリダイ
ゼーションチャンバーに使用することができる。



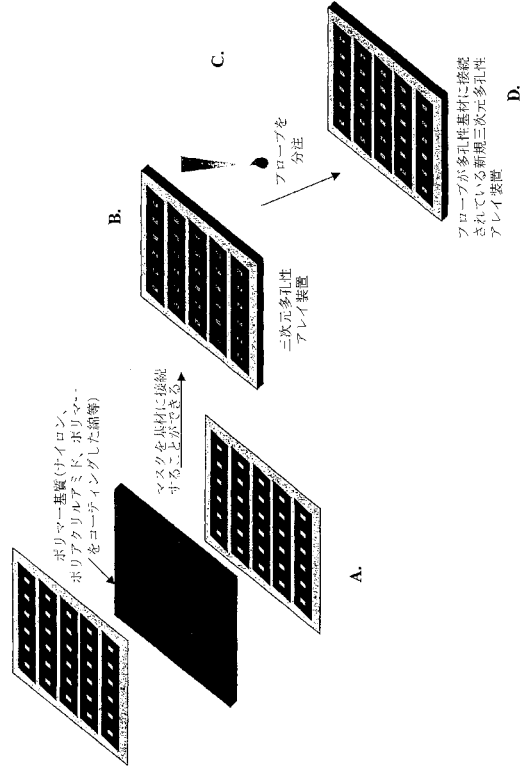
新規ハイブリダイゼーションチャンバーのさらなる2つの例のスケッチ

【図 37】



UniScreen 技術の原理を、DNA、RNA およびタンパク質などの任意の分析物を単一の多重アレイにおいて検出することが可能になる。

【図 38】



プローブはマスク中の孔を通じて多孔性基質上に分注することができる

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/547 (2006.01)		G 0 1 N 33/545	Z
G 0 1 N 33/551 (2006.01)		G 0 1 N 33/547	
G 0 1 N 33/552 (2006.01)		G 0 1 N 33/551	
G 0 1 N 33/553 (2006.01)		G 0 1 N 33/552	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)		G 0 1 N 33/553	
		G 0 1 N 37/00	1 0 2

- (31)優先権主張番号 60/308,870
 (32)優先日 平成13年7月30日(2001.7.30)
 (33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

- (74)代理人 100124855
 弁理士 坪倉 道明
- (72)発明者 ジャコブス アリス アン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン ピーエイチ ニューバリー ストリート 330
- (72)発明者 ニコリック ボリス
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 チャールズタウン ホールデン ロー 6
- (72)発明者 グブタ ビニート
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブルックリン アpartment #732 フリーマン
 ストリート 185

審査官 白形 由美子

- (56)参考文献 特開2000-232883(JP,A)
 国際公開第99/504688(WO,A1)
 特開平10-314566(JP,A)
 特開平08-110292(JP,A)
 国際公開第98/029736(WO,A1)
 国際公開第99/013313(WO,A1)
 国際公開第99/039829(WO,A1)
 国際公開第01/057249(WO,A1)
 国際公開第00/055629(WO,A1)
 国際公開第99/044062(WO,A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 G01N 33/48-33/98
 G01N 37/00

专利名称(译)	临床智能诊断设备和方法		
公开(公告)号	JP4179876B2	公开(公告)日	2008-11-12
申请号	JP2002544663	申请日	2001-11-27
[标]申请(专利权)人(译)	智能医疗通过迪种子有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	智能医疗Dibaishizu萨尔瓦多, 萨尔瓦多.海.		
当前申请(专利权)人(译)	智能医疗Dibaishizu萨尔瓦多, 萨尔瓦多.海.		
[标]发明人	ジャコブスアリスアン ニコリックボリス グプタビニート		
发明人	ジャコブス アリス アン ニコリック ボリス グプタ ビニート		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/545 G01N33/547 G01N33/551 G01N33/552 G01N33/553 G01N37/00 B01F13/00 B01F13/08 B01J19/00 B01L3/00 B81B1/00 C40B40/06 C40B40 /10 C40B40/12 C40B40/18 C40B60/14 C40B70/00 G01N33/543		
CPC分类号	B01F13/0088 B01F13/08 B01F13/0809 B01J19/0046 B01J2219/00315 B01J2219/00317 B01J2219 /00481 B01J2219/00497 B01J2219/00509 B01J2219/00511 B01J2219/00527 B01J2219/00547 B01J2219/00585 B01J2219/00596 B01J2219/00605 B01J2219/0061 B01J2219/00612 B01J2219 /00621 B01J2219/00626 B01J2219/0063 B01J2219/00637 B01J2219/00659 B01J2219/00662 B01J2219/00664 B01J2219/00677 B01J2219/00689 B01J2219/00702 B01J2219/0072 B01J2219 /00722 B01J2219/00725 B01J2219/00731 B01J2219/0074 B01J2219/00745 B01L3/5027 B01L3/50273 B01L3/5085 B01L3/50857 B01L3/563 B01L2300/021 B01L2300/0636 B01L2300/069 B01L2300/0819 B01L2300/0864 B82Y30/00 C12Q1/6837 C40B40/06 C40B40/10 C40B40/12 C40B40/18 C40B60/14 C40B70/00 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/54366		
FI分类号	G01N33/53.M G01N33/53.D C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/545.Z G01N33/547 G01N33/551 G01N33/552 G01N33/553 G01N37/00.102		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 Masarushin大崎		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	60/253284 2000-11-27 US 60/287994 2001-05-01 US 60/308870 2001-07-30 US		
其他公开文献	JP2005509127A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及临床智能设计的诊断装置(例如微阵列)以及制造这种装置的方法以及用于特定临床症状或症状组的鉴别诊断的方法。在一个方面,本发明的装置包括用于进行多种分析物的平行筛选的各种探针。基于与特定疾病和病症相关的症状的已知临床表现,将探针组装成装置上的组。

