



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102216778 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 12

(21) 申请号 200980146315. 4

G01N 33/543 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 09. 18

(30) 优先权数据

61/098, 712 2008. 09. 19 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 05. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/057532 2009. 09. 18

(87) PCT申请的公布数据

W02010/033838 EN 2010. 03. 25

(71) 申请人 神谷来克斯公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 约翰·托德

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 刘蕾 沙捷

(51) Int. Cl.

G01N 33/537 (2006. 01)

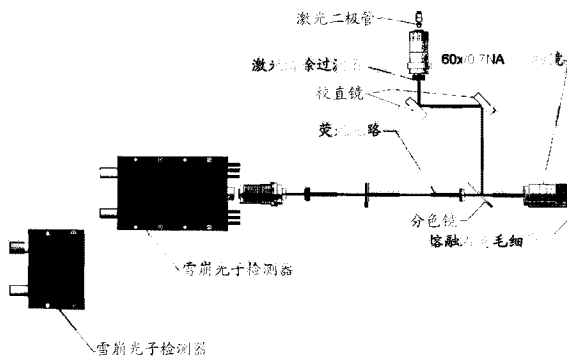
权利要求书 4 页 说明书 36 页 附图 11 页

(54) 发明名称

单分子测定

(57) 摘要

本发明公开了用于分析、诊断或预后测定的物类的单分子分析。在示例性实施方案中，该测定利用公开方法所制备的样品，提供具有出乎意料的灵敏度和鲁棒性的测定。参考细胞因子测定以非限制性方式描述了该方法。



1. 进行检测与可检测物类特异性连接到其上的分析物单分子相关联的可检测物类单分子的测定的方法,所述方法包括:

(a) 在第一容器中,

(i) 在所述分析物和特异性结合所述分析物的捕获物类之间形成复合物,其中所述捕获物类固定在磁性粒子上;和

(ii) 在 (i) 之后,将所述复合物与特异性结合到所述分析物上的所述可检测物类接触,由此形成所述可检测物类的固定的复合物;

(b) 将所述固定的复合物转移到不含所述可检测物类的第二容器中;

(c) 从所述固定的复合物中洗脱所述可检测物类;和

(d) 检测所述可检测物类的所述单分子。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述捕获物类通过选自共价和非共价相互作用的相互作用固定在所述磁性粒子上。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述捕获物类通过生物素-抗生物素蛋白链菌素相互作用固定在所述磁性粒子上。

4. 权利要求 1 的方法,其中,在 (a) (i) 之前,所述分析物的所述单分子从三层血浆样品的中间层中移出,所述三层血浆样品包含脂质上层、包含所述分析物的所述单分子的所述中间层和血纤维蛋白凝块的下层;所述分析物的所述单分子以等分形式从所述样品的所述中间层中移出。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述捕获物类选自核酸、多肽、脂质和糖类。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述捕获物类是抗体。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述可检测物类选自核酸、多肽、脂质和糖类。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述可检测物类是抗体。

9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述分析物选自细胞因子和生长因子。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述细胞因子是白介素。

11. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述细胞因子选自 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-8、IL-12、IL-21、G-CSF、GM-CSF、hTNF α 、mTNF α 、IFN γ 和 hVEGF。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述方法提供能够以小于或等于约 2pg/mL 的量检测所述细胞因子的测定。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述方法提供能够以小于或等于约 0.5pg/mL 的量检测所述细胞因子的测定。

14. 根据权利要求 13 所述的方法,其中所述细胞因子选自 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-8、IL-12、IL-21、G-CSF、GM-CSF、hTNF α 、mTNF α 、IFN γ 和 hVEGF,且所述方法提供能够以小于或等于约 0.4pg/mL 的量检测所述细胞因子的测定。

15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述细胞因子选自 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-8、IL-12、IL-21、G-CSF、GM-CSF、hTNF α 、IFN γ 和 hVEGF,且所述方法提供能够以小于或等于约 0.3pg/mL 的量检测所述细胞因子的测定。

16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述细胞因子选自 IL-1 β 、IL-21、G-CSF、hTNF α 和 hVEGF,且所述方法提供能够以小于或等于约 0.2pg/mL 的量检测所述细胞因子的测定。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述细胞因子选自 G-CSF、hTNF α 和 hVEGF,且所述方法提供能够以小于或等于约 0.1pg/mL 的量检测所述细胞因子的测定。

18. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述测定具有大于约 2log 的动态范围。

19. 权利要求 15 的方法,其中所述测定具有至少约 3log 的动态范围。

20. 权利要求 16 的方法,其中所述测定具有至少约 4log 的动态范围。

21. 权利要求 1 的方法,其中所述复合物在约 25 μ L 至约 1000 μ L 体积的缓冲溶液中形成。

22. 权利要求 1 的方法,其中所述复合物在至少约 25 μ L 体积的缓冲溶液中形成。

23. 权利要求 1 的方法,其中所述磁性粒子是以约 0.1 μ g 至约 40 μ g 的量存在于所述第一容器中的多种磁性粒子的一员。

24. 权利要求 1 的方法,其中所述磁性粒子是以至少 0.1 μ g 的量存在于所述第一容器中的多种磁性粒子的一员。

25. 权利要求 1 的方法,其中所述可检测物类包含共价结合到其上的荧光团。

26. 权利要求 1 的方法,其中所述复合物在由以下成分组成的混合物中在所述磁性粒子上形成:

约 0.1 μ g 至约 40 μ g 的多种磁性粒子和约 25 μ L 至约 1000 μ L 的缓冲溶液。

27. 权利要求 25 的方法,其中通过将约 0.5 μ g 至约 25 μ g 的所述多种所述磁性粒子与约 100 μ L 至约 1000 μ L 的血浆样品接触,由此形成所述复合物。

28. 权利要求 1 的方法,还包括:

(e) 确定所述单一可检测物类分子的群体的浓度。

29. 权利要求 27 的方法,还包括:

(f) 将所述单一可检测物类的所述浓度与所述分析物的所述单分子的群体的浓度相关联。

30. 权利要求 1 的方法,还包括:

(g) 计数所述单一可检测物类分子的群体的各个成员,由此确定所述单一可检测物类分子的数量。

31. 权利要求 15 的方法,还包括:

(h) 将所述单一可检测物类分子的所述数量与所述分析物的所述单分子数量相关联。

32. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述检测包括使用单分子分析仪,包括:

(a) 能够检测所述可检测物类的所述单分子的分析仪系统,所述分析仪包含:i. 发射电磁辐射的电磁辐射源;ii. 定位以接收该电磁辐射源发射的电磁辐射的第一探测空间;iii. 可操作地连接到该第一探测空间以测量所述可检测物类的所述单分子的第一电磁特征的第一电磁辐射检测器。

33. 根据权利要求 32 所述的方法,其中所述分析仪系统还包括:

(b) 能够自动取样至少一种样品并在样品容器与所述第一探测空间之间提供流体连通的取样系统。

34. 权利要求 32 的方法,其中所述分析仪系统还包含能够回收基本所有样品的与该第一探测空间流体连通的样品回收系统。

35. 权利要求 32 的方法,其中所述分析仪系统还包含样品制备系统。

36. 权利要求 32 的方法,其中所述电磁辐射源是连续波电磁辐射源。
37. 权利要求 32 的方法,其中所述第一探询空间具有约 0.02pL 至约 300pL 的体积。
38. 权利要求 37 的方法,其中所述第一探询空间具有约 0.05pL 至约 50pL 的体积。
39. 权利要求 38 的方法,其中所述第一探询空间具有约 0.1pL 至约 25pL 的体积。
40. 权利要求 37 的方法,其中所述第一探询空间的体积是可调的。
41. 进行检测与所述可检测抗体特异性结合到其上的分析物单分子相关联的可检测抗体单分子的测定的方法,所述方法包括:
- (a) 在第一容器中,
 - (i) 在所述分析物与特异性结合所述分析物的捕获抗体之间形成半抗原-抗体复合物,其中所述捕获抗体包含生物素,并通过所述生物素与所述抗生物素蛋白链菌素之间的相互作用固定在包含抗生物素蛋白链菌素的磁性粒子上;和
 - (ii) 在 (i) 之后,将所述复合物与特异性结合所述分析物的所述可检测抗体接触,由此形成所述可检测抗体的固定的复合物;
 - (b) 将所述固定的复合物转移到不含所述可检测抗体的第二容器中;
 - (c) 从所述固定的复合物中洗脱所述可检测抗体;和
 - (d) 检测所述可检测抗体的所述单分子。
42. 权利要求 41 的方法,其中,在 (a) (i) 之前,所述分析物的所述单分子从三层血浆样品的中间层中移出,所述三层血浆样品包含脂质上层、包含所述分析物的所述单分子的所述中间层和血纤维蛋白凝块的下层;所述分析物的所述单分子以等分形式从所述样品的所述中间层中移出。
43. 权利要求 41 的方法,其中所述生物素在选自胺部分和铰链糖基部分的位置处结合到所述捕获抗体上。
44. 进行检测与分析物单分子相关联的可检测物类单分子的样品测定的方法,所述分析物单分子是选自细胞因子与生长因子的一员,所述可检测物类特异性结合到其上,所述测定能够以小于或等于约 5pg/mL 的量检测所述可检测物类,且所述测定具有至少约 2log 的动态范围;所述方法包括:
- (a) 在第一容器中,
 - (i) 在所述分析物与特异性结合所述分析物的捕获物类之间形成复合物,其中所述捕获物类包含生物素,并通过所述生物素与所述抗生物素蛋白链菌素之间的相互作用固定在包含抗生物素蛋白链菌素的磁性粒子上;和
 - (ii) 在 (i) 之后,将所述复合物与特异性结合到所述分析物上的所述可检测物类接触,由此形成所述可检测物类的固定的复合物;
 - (b) 检测所述可检测物类的所述单分子。
45. 权利要求 44 的方法,在 (b) 之前还包括:
- (c) 将所述固定的复合物转移到不含所述可检测物类的第二容器中。
46. 权利要求 44 的方法,在步骤 (b) 之前还包括:
- (d) 从所述固定的复合物中洗脱所述可检测物类。
47. 权利要求 44 的方法,其中所述测定设计成能够在与所述对象的临床健康的、非疾病状态相关的范围内检测所述分析物。

48. 根据单分子测定的结果确定选自诊断、预后、治疗状态和治疗方法的一员的方法，所述方法包括：

(a) 在第一容器中，

(i) 在所述分析物和特异性结合所述分析物的捕获物类之间形成复合物，其中所述捕获物类固定在磁性粒子上；和

(ii) 在 (i) 之后，将所述复合物与特异性结合到所述分析物上的所述可检测物类接触，由此形成所述可检测物类的固定的复合物；

(b) 将所述固定的复合物转移到不含所述可检测物类的第二容器中；

(c) 从所述固定的复合物中洗脱所述可检测物类；

(d) 检测所述可检测物类的所述单分子；

(e) 量化多种所述单分子，由此确定所述单分子的浓度；和

(f) 将所述单分子的所述浓度与选自所述诊断、预后、治疗状态和治疗方法的一员相关联。

49. 来自测定的数据组，所述数据组包括：

至少一个与从所述分析物的单分子的测定中收集的来自分析物的信号对应的日期点，所述测定具有小于 0.5pg/mL 的检测限和至少 2.5log 的动态范围。

50. 进行检测与所述可检测物类特异性结合到其上的分析物单分子相关联的可检测物类单分子的测定的方法，所述方法包括：

(a) 在所述分析物与特异性结合所述分析物的捕获物类之间形成复合物，其中所述捕获物类固定在磁性粒子上；和

(b) 在 (a) 之后，将所述复合物与特异性结合到所述分析物上的所述可检测物类接触，由此形成所述可检测物类的固定的复合物；

(c) 将所述可检测物类的所述固定的复合物与基本上所有未结合到所述可检测物类的所述固定的复合物上的可检测物类分离；

(d) 从所述固定的复合物中洗脱所述可检测物类；和

(e) 检测所述可检测物类的所述单分子。

51. 进行检测与所述可检测物类特异性结合到其上的分析物单分子相关联的可检测物类的测定的方法，所述方法包括：

(a) 在所述分析物与特异性结合所述分析物的捕获物类之间形成复合物，其中所述捕获物类固定在磁性粒子上；和

(b) 在 (a) 之后，将所述复合物与特异性结合到所述分析物上的所述可检测物类接触，由此形成所述可检测物类的固定的复合物；

(c) 将所述可检测物类的所述固定的复合物与基本上所有未结合到所述可检测物类的所述固定的复合物上的可检测物类分离；

(d) 从所述固定的复合物中洗脱所述可检测物类；和

(e) 检测选自与所述可检测物类的单分子对应的光子、与多份所述可检测物类对应的事件光子、与多份所述可检测物类对应的总光子及其组合的一员。

52. 权利要求 1、50 或 51 的方法，其中所述分析物在样品体积内，且所述可检测物类洗脱至小于所述样品体积的洗脱体积。

单分子测定

技术领域

[0001] 本申请要求 2008 年 9 月 19 日提交的美国临时专利申请 No. 61/098,712 的权益，其内容经此引用全文并入本文。

[0002] 本发明涉及检测分析物的一个或多个离散的单分子的测定。

背景技术

[0003] 在生物医学研究、医疗诊断、预后、监测和治疗选择、生物恐怖活动侦测和涉及分析多样品中低体积和低浓度的分析物的其它领域中的进展已经指引开发出能够在越来越低的浓度下灵敏检测样品中粒子的样品分析系统。美国专利 US 4,793,705 和 5,209,834 描述了已经达到极灵敏检测的现有系统。本发明在本领域，具体为细胞因子检测、定量与表征领域提供了进一步开拓发展。

[0004] 传统的细胞因子测定包括测量血清或血浆中的细胞因子，但是各种细胞因子已经在其它生物流体中被检测。例如，Kimball, J. Immunol. 133:256-260(1984) 报道了人尿中的 IL-1 生物活性。Tamatani 等人, Immunology 65:337-342(1988) 采用色谱法和生物测定法公开了在人类羊水中存在 IL-1 α 与 IL-1 β 。同一组人用酶免疫测定法测量人类羊水水中的 IL-1 α 和 IL-1 β (Tsunoda 等, Lymphokine Res. 7:333,1988)。Wilmott 等, Lymphokine Res. 7:334(1988) 测量了与其它疾病相比囊性纤维化病中支气管肺泡灌洗液体中的 IL-1 β 与 IL-1 生物活性。Khan 等, Mol. Cell Endocrinol, 58:221-230(1988) 报道了在人类卵巢卵泡液中证实存在高水平的类 IL-1 生物活性。在类天疱疮患者的水疱液体中已经报道了淋巴毒素 (Jeffes 等人, J. Clin. Immunol. 4:31-35,1984)。在人类汗液中也已经报道了 IL-1 (Didierjean 等人, Cytokine 2:438-446,1990)。在猫 (Coceani 等人, Brain Res., 446:245-250,1988) 和人 (参见例如 Peter 等人, Neurology, 41:121-123,1991) 的脑脊髓液 (CSF) 中已经报道发现了 IL-1。在临床正常人类的齿龈液中检测具有类 IL-1 生物活性的因子 (Oppenheim 等人, Transplant. Proc. 14:553-555,1982), 该活性在发炎的齿龈区域中比在未发炎的齿龈区域中高。

[0005] 测量细胞因子水平的结合测定可以使用固相或均质形式。合适的测定方法包括夹心结合测定或竞争结合测定。夹心免疫测定的实例描述在授予 Grubb 等人的美国专利 US 4,168,146 和授予 Tom 等人的美国专利 US 4,366,241 中。竞争免疫测定的实例包括授予 Deutsch 等人的美国专利 US 4,235,601、授予 Liotta 的美国专利 US 4,442,204 和授予 Buechler 等人的美国专利 US 5,208,535 中公开的那些。

[0006] 可以采用多路测定形式——例如通过使用结合试剂阵列的多路技术、使用标记物的光谱鉴别的多路技术、通过在粒子上进行的结合测定 (例如使用点阵仪系统) 的流式细胞仪分析的多路技术——测量多种细胞因子。另一方法包括使用可以单独识别与询问的涂布在珠粒上的结合试剂。国际专利公开 W09926067A1 (Watkins 等人) 描述了使用尺寸变化的磁性粒子测定多种分析物; 属于截然不同的尺寸范围的粒子测定不同的分析物。该粒子设计为被流式细胞仪辨别并单独询问。Vignali 已经描述了多路结合测定, 其

中使用微粒子的 64 个不同珠粒组,各自具有均匀和截然不同的比例的两种染料 (Vignali, D. A. A., " Multiplexed Particle-Based Flow Cytometric Assays", J. Immunol. Meth. (2000) 243 :243-255)。已经公开了包括一组 15 个不同尺寸与荧光的不同珠粒的类似方法可用于同时检定多种肺炎球菌血清型 (Park, M. K. 等人, " A Latex Bead-Based Flow Cytometric Immunoassay Capable Of Simultaneous Typing Of Multiple Pneumococcal Serotypes(Multibead Assay)", Clin Diagn Lab Immunol. (2000) 7 :486-9)。Bishop, J. E. 等人已经描述了同时量化六种人细胞因子的多路夹心式测定 (Bishop, J. E. 等人, " Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology ", Clin Chem. (1999) 45 : 1693-1694)。

[0007] 其它方法用于量化特异性细胞因子表达。包括测量细胞因子 mRNA 或细胞因子多肽的方法。例如,PCR[™]、竞争 PCR[™]、PCR-ELISA、微阵列、基因表达珠粒基测定以及原位杂交技术可用于测量细胞因子 mRNA,免疫组织化学可用于测量细胞因子蛋白质水平。公开的美国专利申请 US 20060205012 公开了测量样品中一种或多种细胞因子水平的测定方法。

[0008] 目前仍需要用于测量具有诊断或预后价值的低浓度分析物,例如细胞因子的更灵敏的方法。此外,更有效和高效的分析物单分子检测的方法、化合物与系统代表各种背景下诊断与预后的显著进步。这些和其它需要由本发明提供。

发明内容

[0009] 本发明提供进行检测分析物的单分子的测定的方法。该方法提供在比目前可用方法更低的检测阈值水平下检测具有分析、诊断与预测意义的物类。此外,本发明的不同实施方案提供了具有比目前可用方法更宽的动态范围单分子测定。对需要高灵敏度和鲁棒的检测动态范围的快速、廉价的单一 - 和多种 - 生物标记物诊断测定的强有力的临床需求进一步增加了本发明的方法的意义。

[0010] 本发明的方法不同于微量培养板基测定。微量培养板基测定不能轻易地从检测物类与分析物之间形成的复合物中除去基本所有未结合的检测物类。在各种实施方案中,本发明提供一种方法,该方法包括通过在从夹心复合物中洗脱检测抗体之前将该捕获抗体 - 分析物 - 检测抗体夹心复合物转移到不含该检测抗体的容器中来分离未结合的可检测物类与该复合物。测定混合物产生不精确的高信号,在所述测定混合物中存在非特异性结合的检测抗体,且所述非特异性结合的检测抗体连同与该夹心复合物特异性结合的检测抗体一起洗脱到检测混合物中。

[0011] 在第一方面,本发明提供进行检测与可检测物类特异性结合到其上的分析物单分子相关的可检测物类单分子的测定的方法。该方法包括在检测该可检测物类之前将基本所有未结合的可检测物类与该捕获抗体 - 分析物 - 检测抗体夹心复合物分离。由此,在一示范性实施方案中,本发明提供包括在第一容器中在该分析物与特异性结合该分析物的捕获物类之间形成复合物的方法。该捕获物类固定在磁性粒子上。在捕获该分析物后且仍在第一容器中,该复合物与特异性结合到该分析物上的可检测物类接触,由此形成固定的可检测物类的复合物。该固定的复合物随后从第一容器中移出,并转移到不含该可检测物类的第二容器中。一旦在第二容器中,从固定的复合物上洗脱该可检测物类。使用合适的单分

子检测装置检测可检测物类单分子。

[0012] 在各种实施方案中,可检测物类单分子是多个具有基本相同结构的可检测物类的分子之一。在另一些实施方案中,存在两个或多个可检测物类的群体,每个群体包括不同结构的可检测物类。在一示例性实施方案中,该捕获物类是抗体。在各种实施方案中,该可检测物类是标记抗体,例如用荧光团标记的抗体。

[0013] 在一示例性实施方案中,本发明提供如上所述的方法,其中该可检测物类单分子与分析物单分子相关联,该分析物单分子是选自细胞因子与生长因子的一员,该可检测物类特异性结合到其上。在各种实施方案中,该测定能够以小于或等于约 5pg/mL 的量检测可检测物类。在某些实施方案中,该测定以小于或等于约 2pg/mL 的量检测可检测物类单分子。

[0014] 本发明的方法还提供具有鲁棒的动态范围的测定。例如,在各种实施方案中,本发明提供具有至少约 2log、优选至少 3log 且更优选至少约 4log 的动态范围的测定。

[0015] 在各种实施方案中,本发明提供根据单分子测定的结果决定诊断、预后、治疗状态和 / 或治疗方法的方法。该方法基本如上所述,额外要素是在逐单分子基础上(不同于平均浓度)量化可检测物类的多个单分子,并将由该量化推导出的量与诊断、预后、治疗状态或治疗方法联系起来。

[0016] 本发明还包括实施本发明的方法的试剂和试剂盒。在一种实施方案中,试剂盒包含在本发明方法中测量的分析物(例如细胞因子)抗体。该试剂盒可进一步包含测定稀释剂、标样、对照物和 / 或可检测标记物。该测定稀释剂、标样和 / 或对照物可根据特定样品基质进行优化。例如,对血液、血清或血浆样品中的测量,该稀释剂、标样和对照物可以包括 i) 人类血液、血清或血浆;ii) 动物血液、血清或血浆或 iii) 人造血液、血清或血浆代用品。

[0017] 各种细胞因子可能可用作实施诊断和 / 或监测各种疾病和筛选药物或候选药物治疗疾病的效力的本发明方法用的诊断标记物。此外,如下文中详细描述的那样,本发明的某些实施方案提供确定在这些和其它分析中充当标记物的特定候选细胞因子的效力的方法。采用本发明的方法,本领域普通技术人员之一无需过度试验即可确定一种或多种所选细胞因子或其它标记物(包括本文中未明确列举和实践中尚未发现的细胞因子与其它标记物)用作标记物的能力,该标记物的测得水平 / 概况可用于进行本发明的各种诊断与筛选方法。

[0018] 本发明的其它目的、优点和方法将由下列详述更为显而易见。

附图说明

[0019] 包括附图与说明书的组成部分以描述本发明的某些方法。参考附图中显示的示例性和因此非限制性的实施方案,更容易看出本发明和用本发明提供的系统的部件和运行的更清楚概念,在附图中,类似标号(如果它们在多于一个视图中出现)是指相同元件。通过与本文中提出的描述一起参照这些图的一副或多幅可以更好地理解本发明。要注意的是,图中描述的特征不必是按比例绘制的。

[0020] 图 1 是用于本发明方法中的示例性光学系统的示意图。

[0021] 图 2 是显示曲线拟合精确度的曲线图;在 8 个连续测定运行中生成的 cTnI 标准曲线的反向内插(组 A,全范围,组 B,全范围,组 B,低端量化范围)。

- [0022] 图 3 是获自 100 名不同献血者的肝素锂血浆样本中 cTnI 的频率分布。
- [0023] 图 4 是获自健康人类志愿者的血浆中 IL-2、IL-5、IL-7 和 IL-21 的频率分布。
- [0024] 图 5 是采用本发明方法测得的来自健康志愿者的样品中各种白介素 (IL-2、IL-5、IL-7 和 IL-21) 浓度的表格。
- [0025] 图 6 是显示图 5 中各种白介素浓度的比例的表格。

具体实施方式

[0026] 引言

[0027] 本文中公开的是用于检测样品中具有分析、临床、预后和 / 或诊断意义的物类的单分子的本发明方法的实例。在各种实施方案中, 该样品取自受试对象。该测定可以包括测量生物试样中的分析物, 例如测量疾病标记物、炎症标记物和 / 或细胞因子, 其中该分析物的水平指示疾病的存在或严重程度。

[0028] 本发明的各种实施方案涉及检测和 / 或辨别各种疾病、预测此类疾病的进程和 / 或后果的方法, 治疗此类疾病的方法和用于预防或抑制此类疾病进展的药剂。本发明的示例性实施方案涉及通过按照本发明的测定方式施以和 / 或重复施以诊断试验以便监测患者体内的疾病进展或治疗的方法。在一实例中, 该诊断方法用于通过测量药物或候选药物对来自用药物或候选药物治疗的患者、动物模型、组织样品和细胞培养的样品中疾病特异性分析物水平的作用评价药物或候选药物治疗疾病的效力。

[0029] 在各种实施方案中, 本发明提供进行用于检测细胞因子参与或涉及其中的疾病的诊断试验的方法。一示例性实施方案是识别有诊断价值的疾病细胞因子标记物的测定。在各种实施方案中, 本发明提供测定特定候选分析物 (如特定细胞因子) 充当诊断和 / 或监测疾病和筛选药物或候选药物治疗疾病的效力的本发明方法中的诊断标记物的效力的方法。

[0030] 在各种实施方案中, 仅标记混合物中的特异性单分子。可以将目标单分子与标记结合伴侣结合以实现特异性标记, 其中该结合伴侣通过互补的结合表面特异性地与该目标单分子相互作用。伴侣之间的结合力可以是共价相互作用或非共价相互作用, 如疏水键合、亲水键合、离子键合和氢键键合、范德华引力或配位络合物形成。结合伴侣的实例是细胞膜受体的激动剂和拮抗剂、毒素和毒液、抗体和病毒表位、激素 (例如吗啡样肽、类固醇等等) 和激素受体、酶与酶底物、辅因子和目标序列、药物和药物靶标、寡核苷酸和核酸、蛋白质和单克隆抗体、抗原和特异性抗体、多核苷酸和互补的多核苷酸、多核苷酸与多核苷酸结合蛋白质; 生物素和抗生物素蛋白或抗生物素蛋白链菌素、酶和酶辅因子; 以及凝集素和特异性碳水化合物。可以充当结合伴侣的示例性的受体包括天然存在的受体, 例如甲状腺素结合球蛋白、凝集素、在细胞表面上发现的各种蛋白质 (分化的簇或 CD 单分子) 等等。

[0031] 在一种实施方案中, 样品与珠粒或微球, 例如磁性粒子反应, 其涂布有结合伴侣 (例如捕获物类), 该结合伴侣与目标单分子反应。该珠粒与样品的任何未结合成分分离。在一种实施方案中, 捕获的分析物与可检测物类接触, 接着除去未结合的材料, 将该分析物 - 可检测物类复合物转移到单独的容器中, 在该容器中其任选被洗涤并用将分析物于可检测物类离解的洗脱混合物处理。通过本发明中所用的单分子分析仪检测该可检测物类的各个分子。

[0032] 定义

[0033] 本文中使用的术语“分析物”和“结合伴侣”是指参与结合相互作用的分子。例如，分析物和结合剂可包括任何有机、无机或生物药剂。此类药剂的非限制性例子包括 DNA 或 RNA 片段（例如寡核苷酸）、适体、肽和蛋白质（例如抗体）、抗原和有机小分子（例如药剂、战争试剂、杀虫剂、除草剂、农业肥料）。在特定的测定中，分析配体与受体之间的结合相互作用。在示例性测定中，分析物与结合伴侣的结合是提供可检测物类的一个步骤，该可检测物类的一个或多个分子可以在本发明的测定中检测。该可检测物类由此是分析物的代理（proxy）；可检测物类的分子与分析物分子相关联并对应于分析物分子。尽管这种相互关联不必是一对一的，其也是可推断的或可通过实验确定的。分析物来自于任何原核或真核个体，包括动物（例如哺乳动物，例如人类；鸟类，鱼类等等）、植物、酵母、细菌、病毒、原生动物等等。在分析物或含有该分析物的样品的来源方面本发明没有限制。

[0034] 本文中使用的“样品”包括来自几乎任何相关（of interest）来源的材料。样品的非限制性实例包括选自血液、血清、血浆、支气管肺泡灌洗液体、尿、脑脊髓液、胸膜腔积液、滑液、腹膜液、羊水、胃液、淋巴液、间质液、组织匀浆、细胞提取物、唾液、痰、粪便、生理分泌物、眼泪、粘液、汗液、乳汁、精液、精液液体、阴道分泌物、来自溃疡和其它表面皮疹、脓疱和脓肿的液体、和包括正常、恶性和怀疑组织的活体检查的组织提取物，或含有该分析物的身体的任何其它成分的那些。在一些实施方案中，该样品选自血液、血浆或血清。在本发明的方法的一些实施方案中，该样品是已经与相应分析物分子的荧光标记的特异性抗体接触的血清样品；并且其中所述分析包括检测标记的分析物分子的存在、不存在和 / 或浓度。在一些实施方案中，通过计数和量化所选体积单位中可检测物类的分析物分子的数量来确定浓度。在一些此类实施方案中，该方法进一步包括根据该标记分析物分子的所述存在、不存在和 / 或浓度确定治疗、预后、治疗状态和 / 或治疗方法。

[0035] 本文中使用的“结合伴侣”是指在本发明的测定中结合到相关分析物上的物类。示例性结合伴侣包括基本上可互换使用的“捕获物类”和“可检测物类”。结合伴侣的非限制性实例包括蛋白质（例如抗体、受体）、核酸、糖类、氨基酸、脂质、毒素、毒液、药物、病毒、细菌、细胞及其任意组合。在各种实施方案中，当该结合伴侣是可检测物类时，用可检测标记物对其进行标记。当该结合伴侣是捕获物类时，在一些实施方案中，其通过共价或非共价相互作用结合到磁性粒子上。

[0036] 本文中使用的“可检测物类”是指分析物的第一可检测结合伴侣或与该分析物结合的不同结合伴侣的可检测结合伴侣。在一种示例性实施方案中，该可检测物类特异性结合到该分析物上或结合到该分析物的不同结合伴侣上。在各种实施方案中，可检测物类的单分子可以用本发明的方法检测。在许多本发明的实施方案中，与免疫测定有关的本领域基础知识（例如夹心、Elisa 等等）是可用的，示例性可检测物类是共轭到可检测标记物上的抗体。在某些实施方案中，可检测物类单分子可通过本发明的方法检测。在各种实施方案中，该可检测物类以可逆方式结合该分析物，由此，在周围环境改变时，该分析物从该可检测物类中释放。在一优选实施方案中，该可检测物类是以可推断或可通过实验确定的方式与该分析物单分子相关联的该分析物的代理。

[0037] “捕获物类”是指分析物的结合伴侣，该结合伴侣特异性识别该分析物，使得该分析物可以与样品中至少一种非分析物的污染物质分离。在各种实施方案中，该分析物与该

捕获物类之间形成的复合物在一个或多个洗涤步骤过程中是稳定的,使得该分析物能够与基本所有污染物质分离。在各种实施方案中,该捕获物类以可逆方式结合该分析物,由此,在周围环境改变时,该分析物从该可检测物类中释放。示例性捕获物类是抗体,例如细胞因子、生长因子或其它生物相关分析物的抗体。

[0038] 本文中使用的术语“磁性粒子”是指具有永久或感生偶极矩的磁性珠粒或粒子。用于本发明的示例性磁性粒子包括容许该粒子与该分析物与该粒子的结合伴侣(“捕获物类”)之间的共轭的反应性官能。基本上具有该特征的任何形式的磁性粒子均可用于本发明。例如,涂布多糖的顺磁性微球或纳米球可用于标记粒子。授予 Molday 的美国专利 US 4,452,773 描述了磁性铁-葡聚糖磁性粒子的制备,并提供了描述制备适于结合到生物材料上的粒子的各种方法的概述。用于高梯度磁分离法的磁性粒子的聚合物涂层的描述见于德国专利 3720844 和授予 Miltenyi 的美国专利 US 5,385,707 中,其内容均经此引用全文并入本文。制备顺磁性磁性粒子的方法描述在美国专利 US 4,770,183 中。

[0039] 通过任何合适的方法用结合到其上的结合伴侣分子官能化该磁性粒子。例如,磁性粒子可以根据本领域已知的方法,例如根据现有技术已知的几种偶联反应(G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques* (Academic Press, 1996); L. Ilium, P. D. E. Jones, *Methods in Enzymology* 112, 67-84 (1985)) 之一共轭到核酸,例如 DNA (寡核苷酸)或 RNA 片段、肽或蛋白质、适体和有机小分子上。在本发明的某些实施方案中,该官能化磁性粒子具有共价键合到其上的结合伴侣分子(例如 DNA、RNA 或蛋白质)。该结合伴侣分子通过非共价(例如范德华力、疏水-疏水、亲水-亲水或离子)相互作用结合到该磁性粒子上。在一种示例性实施方案中,该结合伴侣分子通过生物素-抗生物素蛋白链菌素相互作用共轭到该磁性粒子上。在各种实施方案中,用抗生物素蛋白链菌素官能化该磁性粒子,用抗生物素蛋白官能化该结合伴侣。在另一些实施方案中,用生物素官能化该磁性粒子,该结合伴侣共轭到抗生物素蛋白链菌素上。

[0040] 用结合伴侣分子官能化该磁性粒子通常需要一步或两步反应,其例如可以用标准液处理机器人技术和 96 孔格式平行进行以便将许多合意的结合伴侣连接到指定的磁性粒子上。可以取样以供 QC 测量。每批磁性粒子可能提供用于多种测定的材料,由此尽量减少测定间的变动。磁性粒子可以储存在缓冲的原悬液中直到需要的时候。

[0041] 将该分析物连接到该磁性粒子-固定的捕获物类上的具体方法对本发明的实践而言并非至关重要,多种备选方法在本领域是已知的。该粘附通常通过该分析物分子与共轭到该磁性粒子上的涂层上并提供用于该相互作用的官能团的特异性结合伴侣的相互作用。抗体是结合伴侣的实例。抗体可以偶联到高亲和性结合体系的一员(例如生物素)上,该分析物分子粘附到另一员(例如抗生物素蛋白)上。二抗识别物类——原发抗体的特异性表位,例如抗鼠免疫球蛋白和抗大鼠免疫球蛋白也可用于本发明。间接偶联法能使单一磁偶联实体(例如抗体、抗生物素蛋白等等)用于多种分析物分子。

[0042] 本文中使用的术语“标记物”是指使得一个或多个单分子或一种或多种可检测物类可以在本发明中使用的单分子分析仪中独立检测的任何物类。用于本发明的标记物包括染料标签、电荷标签、质量标签、量子点或珠粒、磁性标签、光散射标签、高分子染料和连接到聚合物上的染料。

[0043] 荧光标记物,或染料是一类用于本发明的标记物的非限制性实例。荧光标记物的

例子可以在 HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH PRODUCTS (R. Haugland, 第 9 版, Molecular Probes Pub. (2004)) 中找到。染料包括为材料增添色彩和 / 或能够发光或发荧光的极其多种的化合物。染料可以在特定波长下吸收光或发射光。染料可以插入分析物分子中, 或非共价或共价地键合到分析物分子上。染料本身可以构成检测分析物上各种结构的探针, 例如小沟结构、分析物分子的十字形、环形或其它构象要素。染料可以包括 BODIPY 和 ALEXA 染料、Cy[n] 染料、SYBR 染料、溴化乙锭与相关染料、吖啶橙、二聚体菁染料, 如 TOTO、YOYO、BOBO、TOPRO POPRO 和 POPO 及它们的衍生物、双苯甲亚胺、OliGreen、PicoGreen 与相关染料、菁染料、荧光素、LDS 751、DAPI、AMCA、Cascade Blue、CL-NERF、Dansyl、二烷基氨基香豆素、4', 5' - 二氯 - 2', 7' - 二甲氧基荧光素、2', 7' - 二氯荧光素、DM-NERF、曙红、赤藓红、荧光素、羟基香豆素、异硫蓝、丽丝胺若丹明 B、孔雀绿、甲氧基香豆素、蔡并荧光素、NBD、Oregon Green、PyMPO、苝、若丹明、Rhodol Green、2', 4', 5', 7' - 四溴砒荧光素、四甲基若丹明、Texas Red、X- 若丹明、Dyomic 染料系列、Atto-tec 染料系列、香豆素、phycobilliprotein (藻红蛋白、藻青蛋白、别藻蓝蛋白)、绿色、黄色、红色和其它荧光蛋白质、上转换荧光粉和量子点。那些本领域技术人员将认出可在本发明范围内使用的其它染料。这并非详尽名单, 可用的染料包括可用于实现用本发明方法检测标记分析物分子的所有目前已知或将来已知的染料。

[0044] 在一种示例性实施方案中, 可检测的标记物是发光标记物或光散射标记物。在一种实施方案中, 该可检测的标记物是荧光标记物。尽管可以使用其它发光标记物而不离开本发明的范围, 可用的发光标记物尤其包括荧光标记物、化学发光标记物和生物发光标记物。此外, 还可以监测荧光猝灭。此外, 可以使用其它光散射标记物而不离开本发明的范围。可用的光散射标记物尤其包括金属, 如金、银、铂、硒和二氧化钛。还可以通过该分析物分子的内在与外在属性的任意组合制造可检测标记物。

[0045] 可用于本发明的光散射标签包括金属, 如铂、金、银、硒和二氧化钛。本领域技术人员将认出也可用作光散射标签的其它微球或珠粒。其它可用标记物包括影响不能电泳分离的相同或不同尺寸的目标分析物分子的电泳速率和 / 或分离的标记物。此类标记物称为电荷 / 质量标签。电荷 / 质量标签的连接以足以影响目标分析物分子的电泳迁移率与分离的方式改变该目标分析物分子的电荷对平移摩擦阻力的比至足以影响目标分析物分子电泳迁移率与分离的程度。

[0046] 在另一实施方案中, 该标记物改变电荷、或质量、或电荷与质量的组合。结合到分析物分子上的电荷 / 质量标签可以借助于它们的行为在电场中的空间差异或借助于它们的行为在电场中的速率差异而区别于未结合的分析物分子或未结合的标签。

[0047] 标记分析物分子的结合伴侣、将该结合伴侣转化为可检测物类的方法是本领域普通技术人员公知的。将标记物连接到分析物分子上可以利用任何已知方法, 包括直接连接或使用结合伴侣。在某些情况下, 标记的方法是非特异性的。例如, 标记所有核酸而不考虑其特定核苷酸序列的方法是已知的。在另一些情况下, 该标记是特异性的, 其中标记的寡核苷酸特异性结合到目标核酸序列上。

[0048] 在一些实施方案中, 本发明的方法包括对样品中多种分析物分子进行分析。在一些此类实施方案中, 多种分析物分子的每一被检测分析物分子均包含标记物, 并且其中每一被检测分析物分子通过选自标记物标识、标记物强度、迁移率或其组合的特征彼此区分。

[0049] 本文中使用的术语“箱元 (bin)”是指检测 / 测量来自可检测物类的信号过程中的预定时间。在一种示范性实施方案中,该箱元是检测 / 测量来自荧光标记的光子过程中的时间单元。

[0050] 术语“事件光子”是指在本发明的方法中可检测的光子集合。事件光子是在检测箱元中光子时指定时间点位于该“箱元”内的那些光子。该事件光子可作为该箱元内光振幅的衡量标准量化。

[0051] 术语“总光子”是指本发明的方法中可检测的光子的集合。可以通过合计箱元中所有光子来测量该总光子。

[0052] 实施方式

[0053] 在第一方面,本发明提供进行检测与该可检测物类特异性结合到其上的分析物的分析物分子相关联的可检测物类的分析物分子的测定的方法。在本发明的这种和其它方法中,通常优选的是在检测、测量和 / 或量化可检测物类之前将基本所有未特异性结合到该分析物上的可检测物类从该测定混合物中除去。

[0054] 在各种实施方案中,本发明的方法包括在第一容器中在该分析物与特异性结合该分析物的捕获物类之间形成复合物。该捕获物类固定在磁性粒子上。在捕获该分析物后且仍在第一容器中,该复合物与特异性结合到该分析物上的可检测物类接触,由此形成固定的可检测物类的复合物。该固定的复合物随后从第一容器中移出,并转移到不含该可检测物类的第二容器中。一旦在第二容器中,将可检测物类从固定的复合物中洗脱。使用合适的单分子检测装置检测可检测物类单分子。

[0055] 在某些实施方案中,可检测物类单分子是多个具有基本相同结构的可检测物类的分子之一。在另一些实施方案中,存在两个或多个可检测物类的群体,每个群体包括可区分的不同结构的可检测物类。

[0056] 在各种实施方案中,本发明提供根据本发明的测定结果确定诊断、预后、治疗状态和治疗方法的方法。一示范性方法包括上述步骤,额外要素是在逐单分子基础上(不同于平均浓度)量化可检测物类的多个单分子,并将由该量化推导出的量与诊断、预后、治疗状态或治疗方法联系起来。

[0057] 还提供了用单分子分析仪检测至少一种分析物分子的方法。可用的单分子分析仪的特定特征是检测大范围分析物分子的能力。可以被该分析仪检测的分析物分子包括但不限于有机和无机分子以及生物制剂、超分子复合物、细胞器、珠粒、分子的缔合、超分子复合物的缔合以及有机体。可以使用该分析仪和本发明的方法检测的分析物的非限制性实例包括:生物聚合物,如蛋白质,例如细胞因子、核酸、碳水化合物和有机与无机的小分子化学实体。后者的例子包括但不限于反自身免疫缺陷综合症的物质、抗体、抗癌物质、抗生素、抗病毒物质、酶、酶抑制剂、神经毒素、阿片样物质、安眠药、抗组胺剂、安定药、抗癫痫药、肌肉松弛药和抗帕金森病药物、解痉药物和肌肉收缩剂、缩瞳药和抗胆碱能药、免疫抑制剂(例如环孢霉素)、抗青光眼溶质、抗寄生虫和 / 或抗原生动物溶质、抗高血压药、镇痛药、退热和抗炎剂(如非甾体抗炎药)、局部麻醉药、眼药、前列腺素类、抗抑郁药、治疗精神病的物质、止吐剂、显影剂、特定的靶向制剂、神经递质、蛋白质和细胞反应调节剂。

[0058] 类似地,可检测的化学实体包括小分子,如氨基酸、核苷酸、类脂、糖类、药物、毒素、毒液、底物、药效团及其任意组合。蛋白质还可用于多种治疗与诊断,如检测细胞群体、

血型、病原体、对病原体的免疫反应、免疫复合物、糖类、凝集素、天然生成的受体等等。可检测分子的其它实例包括纳米球、微球、枝聚物、染色体、细胞器、胶粒和载体分子。

[0059] 同样可以在本发明的方法中检测的是由单分子复合物、具有结合的标记物的有机体、两种或多种核酸的复合物以及结合到一个或多个抗体或抗体片段上的目标单分子的复合物组成的单一物类。其中检测两种或多种类型单分子的示例性复合物包括选自蛋白质、受体、DNA、RNA、PNA、LNA、碳水化合物、细胞器、病毒、细胞、细菌、真菌、其片段及其组合的单分子。本领域技术人员根据本文中提供的大量实施例将认识到如何调节本发明的分析仪与相关方法以检测这些和其它单分子。

[0060] 在一种实施方案中,通过本发明的方法检测的化学实体包括合成或天然存在的激素、天然药物、合成药物、污染物、过敏原、影响因子分子、生长因子、趋化因子、细胞因子、淋巴因子、氨基酸、寡肽、化学中间体、核苷酸和寡核苷酸。

[0061] 本发明的方法包括检测样品中具有共同关联或提供所需信息的多种类型的单分子(即“组”)的存在、不存在和/或浓度。本文中所用的“组”包括可以通过本发明的测定法检测其存在的一组分析物分子。该分析物分子可具有使它们能够被本发明的系统检测的固有特性,或需要标记以便被检测。由此,本发明的方法包括用合适的用于检测一组分析物分子的一个或多个成员的存在、不存在和/或浓度的标记物或多种标记物接触样品。此类分析物分子的组可用于例如生物恐怖主义样品分析、体格检查、诊断、预后、监测和/或治疗选择;生物医学研究、取证、农业分析和工业应用。例如,组可以与特定类型的诊断相关联,例如传染性有机体的组、疾病,如心血管病、癌症或特定类型的癌症、糖尿病、关节炎、阿尔茨海默氏病等等的标记物的组,或者为了评估各系统的机能,例如内分泌组,组可以与生物恐怖相关联,例如可能的生物恐怖生物体或毒素的组;组可用于医药筛选,例如与特定遗传多态性或突变相关的蛋白质组,所述特定遗传多态性或突变与特定疾病或病理学症状相关,或与正常或超常症状相关;组可以与预后相关联,例如与特定综合征、疾病或失调症(例如癌症)相关联的标记物组可用于在欲根除该综合征、疾病或失调症的治疗后确定该综合征、疾病或失调症的复发和/或进展。组还可用于筛选血液样品,并可以包括该血液筛选所针对的多种传染物和/或抗体。类似地,可在本发明的方法中分析单一样品以检测多种滥用物质、环境物质或兽医学上重要的物质。本发明的优点在于能够组合一组试验,它们可以在怀疑患有失调症、疾病或综合征的个体上进行以同时检测该失调症、疾病或综合征的病原体。组可用的其它领域包括用于研究。

[0062] 本发明还包括实施本发明的方法的试剂和试剂盒。在一种实施方案中,试剂盒包含在本发明方法中测量的该分析物(例如细胞因子)的抗体。该试剂盒可进一步包含测定稀释剂、标样、对照物和/或可检测标记物。该测定稀释剂、标样和/或对照物可根据特定样品基质进行优化。例如,对血液、血清或血浆样品中的测量,该稀释剂、标样和对照物可以包括 i) 人类血液、血清或血浆;ii) 动物血液、血清或血浆或 iii) 人造血液、血清或血浆代用品。

[0063] 作为可通过本发明检测的分析物蛋白质分子的实例,要注意的是多种细胞因子可能用作进行诊断和/或监测多种疾病和筛选药物或候选药物治疗疾病的效力的本发明的诊断标记物。实际上,如下文中更详细地描述的那样,本发明的某些实施方案提供确定特定候选细胞因子充当此类诊断标记物的效力的方法。采用本发明的方法,本领域普通技

术人员将在无需过度试验的情况下能够确定一种或多种所选细胞因子或其它标记物,包括没有具体列举在本文中和实际上尚未发现的细胞因子与其它标记物用作其测得水平 / 概况可用于实施本发明的各种诊断与筛选方法的标记物的能力。

[0064] 细胞因子

[0065] 在各种实施方案中,使用本发明的测定方法检测的该分析物分子包括炎性标记物,如细胞因子、参与免疫反应调节的分泌蛋白质。细胞因子包括白介素 (IL)、干扰素 (IFN)、趋化因子、肿瘤坏死因子 (TNF) 和多种集落刺激因子 (CSF)。对研究与诊断而言,细胞因子用作多种病症、疾病、病理学等等的标记物,并可以包括在几种不同的组中。当前存在超过 100 种其协调或不协调调节具有临床意义的细胞因子 / 趋化因子。目前用于标记物检测群体中并可用于在本发明的方法与组合中使用的检测群体中的示例性细胞因子包括但不限于 BDNF、CREBpS133、CREB Total、DR-5、EGF、ENA-78、Eotaxin、脂肪酸结合蛋白、FGF-basic、G-CSF、GCP-2、GM-CSF、GRO-KC、HGF、ICAM-1、IFN- α 、IFN- γ 、IL-10、IL-11、IL-12、IL-12p40、IL-12p40/p70、IL-12p70、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-1ra/IL-IF3、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IP-10、JE/MCP-1、KC、KC/GRO α 、LIF、Lymphotacin、M-CSF、MCP-1、MCP-1 (MCAF)、MCP-3、MCP-5、MDC、MIG、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-1 γ 、MIP-2、MIP-3 β 、OSM、PDGF-BB、RANTES、Rb (pT821)、Rb (total)、Rb pSPT249/252、Tau (pS214)、Tau (pS396)、Tau (total)、Tissue Factor、TNF- α 、TNF- β 、TNF-RI、TNF-RII、VCAM-1、VEGF。本文中使用的术语细胞因子还包括可溶性细胞因子受体。

[0066] 如那些技术人员将认识到的那样,细胞因子是可以通过本发明的方法检测的可用标记物的代表性实例。关注于细胞因子是为了清楚地举例说明,且本文参照细胞因子阐述的方法同样适用于检测其它标记物的分析物分子。

[0067] 在各种实施方案中,为了使具体疾病过程与细胞因子水平的改变相关联,有前途的途径使用本发明的方法分析各样品中的多种细胞因子。

[0068] 按照本发明的各种实施方案,在从临床诊断患有或怀疑患有疾病(例如使用常规诊断方法,如医生面诊、内窥镜检查、透视显像和 / 或活组织检查)的个体和从健康个体收集的样品中测量细胞因子或其它候选疾病标记物的水平。在本发明的非限制性实施例中,可以采用检视数据,例如绘制在一维或多维图上的数据,或通过利用统计分析的方法,如对照个体与患病患者之间的统计权重差异 (statistically weighted difference) 和 / 或 Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲线分析,由此识别可用作区别正常人和患病患者的标记物的特异性细胞因子。用在本发明的此类和其它实施方案重的数据分析的其它模式在下文中陈述。

[0069] 在本发明的某些实施方案中,确定疾病的存在或程度可以包括将一种或多种细胞因子的水平与指示该疾病的不存在、存在或程度的细胞因子概况比较。在一实例中,将血液、血清和血浆样品中一种或多种细胞因子的水平与指示该疾病的存在或程度的细胞因子概况比较。在一种示例性实施方案中,比较步骤可以包括将细胞因子水平与检测临界值比较,比较细胞因子水平的比率与检测临界比率值;将两种细胞因子的水平与细胞因子与两种分析物的相关图中的检测临界线比较,将多种细胞因子的水平与多分析物相关图中的检测临界曲线或表面比较和 / 或将多种细胞因子的水平与多分析物相关图中的检测区(例如检测面积或检测体积)比较。

[0070] 本发明的一种实施方案包括诊断疾病的方法。该方法包括采用本文中所述的单分子检测测量样品中细胞因子的水平；并由测得的水平诊断该疾病存在或不存在于该研究对象体内。

[0071] 在本发明的各种实施方案中，提供检测疾病的方法，包括：测量样品中，例如获自怀疑患有该疾病的患者的样品中细胞因子的水平；并由测得的水平诊断该患者体内存在或不在于该疾病。

[0072] 在本发明的某些实施方案中，该方法包括由测得的细胞因子水平确定该患者是否患有炎性疾病和/或由测得的细胞因子水平确定炎性疾病导致的炎症程度和/或获得并测量不同时间下的样品以监控炎性疾病的进展或对此类疾病的治疗效力。在一种实施方案中，该方法包括测量细胞因子水平。

[0073] 在某些实施方案中，本发明提供包括测量多种细胞因子的方法，还可包括将这些细胞因子的水平与确定指示该疾病的细胞因子概况比较。可以分析多种样品。在某些实施方案中，该样品可以通过非外科手术过程从人类患者获得，并可例如包括血液、血清、血浆、粪便或尿液样品。

[0074] 可以根据由不同群体测得的水平确定特定细胞因子的特定水平是高或是低。示例性群体包括但不限于强直性脊柱炎患者、关节外受累患者、枢关节破坏患者以及健康个体的群体。与特定的综合症、疾病或失调症联系在一起的其它细胞因子对本领域技术人员是已知的，并可用于本文中公开和列举的方法。

[0075] 本领域中认识到，表现出类似病症的患者在他们的血清、血浆、滑液、组织、脑脊髓液或其它体液样品中可具有不同的特定细胞因子水平。因此，确定外周血液、血清、血浆、滑液、组织、脑脊髓液或其它体液细胞因子概况可用于确定每名个体患者的正确治疗方案。例如，具有类似症状的两名患者在他们的血清中可以具有不同的 IL-10 水平。具有低水平的患者可以受益于 IL-10 的治疗，而具有高 IL-10 水平的患者可以受益于用 IL-10 抑制剂，如抗 -IL-10 抗体药物（一类称为生物药物的药物）的治疗。由此，确定患者的细胞因子概况可以有助于向医生与患者提供可用于确定适当治疗并测量个别患者的治疗反应的信息。

[0076] 本发明的一种实施方案包括一种方法，其包括：测量第一细胞因子的水平，例如，在获自患有或怀疑患有炎性疾病的患者的样品中测量；测量一种或多种另外的细胞因子的水平，其中一种或多种另外的细胞因子不同于该第一细胞因子；并由测得水平确定来自该疾病的炎症程度。

[0077] 将分析物细胞因子分子类型彼此区分的示例性方法描述在本文中。特别地，检测与分析物单分子相互关联的可检测物类单分子的方法可以使用组合标记物信号强度（例如不同单分子上标记物的不同数量）、标记物标识（例如不同单分子上的不同标记物）和原动力为电动时的标记物迁移率（例如不同单分子的不同迁移率）或其组合。

[0078] 本发明的方法的某些实施方案可以根据所选细胞因子的测得水平进一步区分第一疾病与第二疾病。例如，区分第一疾病与第二疾病的示例性方法包括将测得的细胞因子水平与辨识临界值比较，其中低于辨识临界值的测得水平被认为指示克罗恩氏病，高于辨识临界值被认为指示溃疡性结肠炎。

[0079] 在一种示例性实施方案中，由第一细胞因子水平和由一种或多种另外的细胞因子的水平确定患者是否患有疾病包括将一种或多种细胞因子水平与确定为指示该疾病的细

胞因子概况比较。比较的步骤可以包括将细胞因子水平与检测临界值比较,将水平的比率与检测临界比率值比较和 / 或将水平与多分析物相关图中的检测临界线、曲线或表面比较。

[0080] 比较的步骤可以包括将水平与辨识临界值比较、将水平的比率与辨识临界比率值比较和 / 或将水平与辨识临界线比较。

[0081] 在一种实施方案中,通过将细胞因子水平与细胞因子辨识临界值比较来区分第一疾病与第二疾病,其中低于该细胞因子辨识临界值的细胞因子水平被认为指示该第一疾病,高于该细胞因子辨识临界值被认为指示该第二疾病。在又一实施方案中,通过比较细胞因子水平与细胞因子辨识临界线来区分溃疡性结肠炎与克罗恩氏病,其中低于细胞因子辨识临界值的细胞因子水平被认为指示克罗恩氏病,高于细胞因子辨识临界线被认为指示溃疡性结肠炎。

[0082] 在又一实施方案中,通过比较测得的细胞因子水平与定义为位于相关图上第一检测临界线与第二辨识临界线之间区域的细胞因子概况,由此区分第一疾病和第二疾病。

[0083] 在又一实施方案中,提供确定处于炎性或自身免疫性疾病状态的患者是否倾向于出现严重的炎性或自身免疫性疾病状态的方法,包括 (a) 获得患者样品 ;(b) 按照本发明的方法测量患者样品中一种或多种细胞因子的水平 ;(c) 比较测得的细胞因子水平与预先确定的出现 (developing) 或患有严重的炎性或自身免疫性疾病状态的患者体内发现的细胞因子水平比较 ;和 (d) 确定所述患者是否倾向于出现严重的炎性或自身免疫性疾病状态。

[0084] 在一种实施方案中,通过比较患者体内测得的两种或多种细胞因子与指示患有溃疡性结肠炎的患者、患有克罗恩氏病的患者和健康个体的这两种或多种细胞因子的概况,例如在相关图上的值、比率、线或区域,由此区分溃疡性结肠炎与克罗恩氏病。

[0085] 在一种实施方案中,高于细胞因子检测临界值的第一细胞因子水平和低于细胞因子检测临界值的另外的细胞因子水平被认为指示疾病。在另一实施方案中,高于检测临界比率值的第一细胞因子水平对一种另外的细胞因子水平的比率被认为指示疾病。在又一实施方案中,高于细胞因子检测临界线的细胞因子水平被认为指示疾病。

[0086] 在本发明的另一些实施方案中,提供评价药物或候选药物治疗疾病的功效的方法。例如,本发明包括评价药物和 / 或候选药物功效的方法,其包括 :将患有疾病的人类或非人类动物和 / 或模型体系,例如组织、细胞培养或生化系统暴露于药物或候选药物 ;测量获自人类或非人类动物或模型体系的样品中细胞因子的水平 ;由通过本发明的方法测得的该细胞因子水平确定该药物或候选药物的功效。

[0087] 在另一实施例中,本发明包括评价药物或候选药物的功效的方法,其包括 :将患有疾病的人类或非人类动物和 / 或模型体系,例如组织、细胞培养或生化系统暴露于药物或候选药物 ;测量获自人类或非人类动物或模型体系的样品中第一细胞因子的水平 ;测量相同样品或获自相同人类或非人类动物或模型体系的不同样品中一种或多种另外的细胞因子的水平,其中该一种或多种另外的细胞因子不同于该第一细胞因子 ;并由测得的水平确定该药物或候选药物的功效。

[0088] 该方法还包括将一种或多种细胞因子水平与没有用该药物或候选药物治疗的对照人类或非人类动物中的水平比较。这些药物评价方法中的人类或非人类动物可以用体外疾病模型体系,例如模拟疾病行为的组织、细胞培养或生化体系来代替。

[0089] 同样提供的是炎性或自身免疫性疾病状态的治疗的评估方法,包括 (a) 对炎性或自身免疫性疾病状态患者施以治疗;(b) 从所述患者处获得样品;(c) 测量该患者样品中多种细胞因子的水平;(d) 将多种细胞因子的水平与预先确定的细胞因子水平比较;和 (e) 确定该治疗是否有效。

[0090] 该方法可进一步包含根据功效测定作出关于更改治疗方案的决定。在各种实施方案中,患者样品包括外周血液、血清、血浆、脑脊髓液、组织样品、皮肤或其它体液样品。预先确定的水平可以包含关于患者样品中发现的细胞因子中值水平的信息。预先确定的水平可以包含一种或多种细胞因子的治疗前水平、健康对象和 / 或患有该疾病的患者中观察到的一种或多种细胞因子的水平。在一种示例性实施方案中,患者样品来自患有关节外受累和 / 或患有主要关节破坏的患者。

[0091] 按照本发明的一种实施方案,诊断上有价值的细胞因子可以选自下述的组。此外,按照该实施方案,与这些细胞因子相关的各种迹象的诊断、预后以及疗程可以用本发明的方法确定。

[0092] 通过人类角质形成细胞大量表达白介素-1 α (IL-1 α)。IL-1- α 还可以通过来自不同来源 (肺泡巨噬细胞、肝巨噬细胞、粘附的脾和腹膜巨噬细胞) 的活化巨噬细胞和通过外周血中性粒细胞、内皮细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞、角质形成细胞、皮肤的郎格罕氏细胞、破骨细胞、星形细胞、胸腺和角膜的上皮细胞、T 细胞和 B 细胞来制造。

[0093] IL-1 的合成可以通过包括 TNF- α 、IFN- α 、IFN- γ 和 IFN- β 的其它细胞因子以及还通过细菌内毒素、病毒、促细胞分裂剂和抗原来引发。在人类皮肤成纤维细胞中,IL-1 α 和 TNF- α 引发 IL-1 β 的合成。人类单核细胞对细菌内毒素非常敏感,并响应 pg/mL 量的内毒素合成 IL-1。在人类单核细胞中,细菌脂多糖对 IL-1 β 引发了比对 IL-1 α 多大约 10 倍的 mRNA 和各自的蛋白质。

[0094] IL-1 的主要生物活性是刺激 T 协助细胞,其被引发以分泌 IL-2 和表达 IL-2 受体。病毒感染的巨噬细胞产生大量 IL-1 抑制剂 (IL-1ra),该抑制剂可支持机会性传染病和患有 T 细胞成熟缺陷的患者体内的细胞转化。

[0095] IL-1 刺激自然杀伤细胞和成纤维细胞、胸腺细胞、成胶质细胞瘤细胞的增殖和活化。其还有助于星形胶质细胞和小胶质细胞的增殖,并可以介入病理过程,如星形胶质细胞增生和脱髓鞘。IL-1 似乎是人类胃癌细胞与甲状腺癌细胞的自分泌生长调节剂。IL-1 还对某些肿瘤细胞类型具有抗增殖和杀细胞活性。IL-1 在如静脉血栓形成、动脉硬化、脉管炎和弥散性血管内凝血的病理过程中起重要的作用。IL-1 显著提高了花生四烯酸 (特别是环前列腺素和 PGE₂) 在如成纤维细胞、滑膜细胞、软骨细胞、内皮细胞、肝细胞和破骨细胞的炎性细胞中的代谢。IL-1 激活破骨细胞并因此抑制新骨的形成。但是低浓度的 IL-1 有助于新骨生长。IL-1 抑制脂肪细胞中的酶脂蛋白脂肪酶。在血管平滑肌细胞和皮肤成纤维细胞中,IL-1 引发 bFGF 的合成,其是这些细胞的促细胞分裂剂。类似白介素-2 (IL-2),IL-1 也调节神经元的电生理学行为。IL-1 还直接影响中枢神经系统。

[0096] IL-2 越来越多地用于治疗患有常规治疗难以治愈的癌症的患者 (Waldmann 等人, *Annals of the New York Academy of Sciences* 685:603-10,1993)。在一定比例黑色素瘤或急性骨髓性白血病患者中也表现出客观与长期的临床反应 (Broom 等, *British Journal of Cancer*. 66:1185-7,1992)。

[0097] IL-4 被认为是何杰金氏淋巴瘤的自分泌生长调节剂 (Okabe 等人, *Lymphoma* 8 : 57-63, 1992)。

[0098] IL-4 在炎症疾病和自身免疫性疾病的治疗中具有临床重要性, 因为其通过单核细胞和 T 细胞抑制炎症细胞因子, 如 IL-1、IL-6 和 TNF- α 的产生。IL4 抑制结肠与乳腺癌的生长 (Toi 等人, *Cancer Research* 52 :275-9, 1992)。其已被证明增强了淋巴因子激活杀伤细胞 (LAK 细胞) 的生长。IL-4 可以在慢性淋巴细胞性白血病的发病机制中起基本的作用, 这可以通过在它们分化的中间阶段通过防止恶性 B 细胞增殖与死亡而阻止的慢分裂与长寿命单克隆 B 细胞的积聚来表征。其保护慢性淋巴细胞性白血病 B 细胞不会通过细胞凋亡而死亡, 并上调保护性基因——BCL-2 的表达 (Dancescu 等人, *Journal of Experimental Medicine* 176 :1319-26, 1992)。

[0099] 测定 IL-6 血清水平可用于监测骨髓瘤的活性和用于计算肿瘤细胞团块。在单株丙种球蛋白病和在闷烧骨髓瘤中观察到低 IL-6 血清水平, 而在进行性疾病患者中以及在血浆细胞白血病患者中 IL-6 血清水平显著提高 (Van Oers 等人, *Ann. Hematology* 66 : 219-23 (1993))。

[0100] IL-6 的解除管制的表达可能是涉及多种疾病发病机制的主要因素之一 (Leger-Ravet 等人, *Blood*, 78 :2923-30, 1991)。已经在多种病理症状, 如类风湿性关节炎、多发性骨髓瘤、Lennert 综合征 (组织细胞淋巴瘤)、Castleman 病 (具有血浆细胞大规模浸润、超 γ -球蛋白血症、贫血和急性期蛋白质的提高浓度的淋巴结病)、心脏粘液瘤和肝硬化中观察到 IL-6 的过度生产过剩 (Hsu 等人, *Hum. Pathol.*, 24 :833-9, 1993)。IL-6 通过成胶质细胞瘤的组成性合成和 IL-6 分泌到脑脊髓液中可以解释急性期蛋白质的提高的水平和该血清中的免疫复合物 (Mule 等人 *Research Immunology*, 143 :777-9, 1991)。

[0101] IL-6 可能还在慢性多关节炎的发病机制中起作用, 因为在该滑液中发现过量浓度的 IL-6。因其对造血细胞的作用, 已经提出 16 适用于治疗某些类型的贫血和血小板减少症 (Brach 等人, *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, 22 : 143-51, 1992)。采用 IL-3 的预处理和随后服用 IL-6 已经显示提高了血小板数。与其它细胞因子 (例如, IL-2) 一起, IL-6 可用于治疗某些类型的肿瘤 (Dullens 等人, *In vivo*, 5 : 567-70, 1991)。

[0102] 在细菌和病毒性脑膜炎中常常观察到脑脊髓液中极高水平的 IL-6。检测移植患者尿液中 IL-6 的提高了的浓度可以是移植物抗宿主反应的早期指标 (Kishimoto 等人, *Blood* 74 :1-10, 1990)。检测羊水水中的 IL-6 可能是羊膜腔内感染的迹象。在炎症肠道疾病中, IL-6 的提高了的血浆水平可能是疾病状况的指标 (Wolvekamp 等人, *Immunology Letters*, 24 :1-9, 1990)。在系膜增生性肾小球肾炎患者体内, IL-6 的提高了的尿液水平也是疾病状况的指标 (Van Snick 等人, *Annual Review of Immunology*, 8 :253-78, 1990)。监测手术后的血清 IL-6 水平可能比监测 C-反应蛋白水平更有助于评估炎症状况和早期检测急性期反应 (Ohzato 等人, *Surgery*, 111 :201-9, 1992)。血清和尿液 IL-6 水平已经证明是川崎病活性的预测因素 (Furukawa 等人, *European Journal of Pediatr.*, 151 :44-7, 1992)。

[0103] 因此已经提出, IL-7 单独或与 IL-2 一起可用作自体骨髓移植后患者体内恶性肿瘤的巩固免疫治疗。

[0104] 通过 IL-7 的促生长作用及其由角质形成细胞合成猜测 IL-7 参与了炎症性皮肤病和

皮肤 T 细胞淋巴瘤的发病机制。

[0105] IL-8 可能在银屑病和类风湿性关节炎中具有临床相关性。在银屑病患者的鳞屑中观察到提高的浓度,这可以解释在这些细胞中观察到的高增生速度 (Gillitzer 等人, *Journal of Investigative Dermatology*, 97 :73-9, 1991)。IL-8 也可以是不同炎症过程的标记物。

[0106] 已经在活性非霍奇金淋巴瘤患者的分组血清中检测到 IL-10。IL-10 水平似乎与中度或高度非霍奇金淋巴瘤患者中的低存活相关 (Blay 等人, *Blood*, 82 :2169-74, 1993)。

[0107] IL-12 的最强有力的诱导剂是细菌、细菌产物和寄生虫。IL-12 已表明在多种症状中,包括在毛细胞白血病患者体内加强天然杀伤细胞介导的细胞毒性 (Bigda 等人, *Leuk. Lymphoma*, 10 :121-5, 1993)。

[0108] IL-13 在高度纯化的表面 IgD⁻ 阳性或总 B⁻ 细胞培养物中在活化的 CD4(+) T⁻ 细胞无性系存在下诱发相当大的 IgM 和 IgG 水平,但没有 IgA。IL-13 已经证明强烈抑制了细菌脂多糖引发的组织因子表达并降低了 IL-1 或 TNF 的发热效应,由此保护内皮和单核细胞表面免受炎症介质引发的促凝血变化。IL-13 在体外抑制主要 (primary) 血源性人类巨噬细胞中的人类 1 型免疫缺陷病毒生成。

[0109] IL-13 在体内抑制原发性血源性人类巨噬细胞中的人类 1 型免疫缺陷病毒生成。

[0110] IL-15 刺激 T 细胞的增殖。此外,IL-15 还能够引发细胞溶解型细胞和 (淋巴因子激活杀伤) LAK 细胞的生成。IL-15 似乎起到了 NK 细胞特异性成熟因子的作用。其还被证实体内起自然杀伤细胞存活因子的作用。已经在许多类型的淋巴样细胞 (包括外周血液单核细胞和自然杀伤细胞) 上观察到高亲和力 IL-15 结合。

[0111] 白介素 -17 (IL-17) 充当血管生成的介质,其刺激血管内皮细胞迁移和索的形成并调节促进血管生成的多种生长因子的产生 (Numasaki 等人, *Blood*, 101 (7) :2620-7, 2002)。

[0112] 白介素 -18 (IL-18) 编码通过 T 细胞 (Okamura 等人, *Nature*, 378 :88-91, 1995 ; Micallef 等人, *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 43 :361-367, 1996) 和天然杀伤细胞 (Tsutsui 等人, *J Immunology*, 157 :3967-3973, 1996) 产生 IFN- γ 的诱导剂,其是比 IL-12 更有力的诱导剂 (Kikkawa 等人, *Biochemical Biophysical Research Communications*, 281 (2) :461-7, 2001), 已经证明,单核细胞和巨噬细胞产生大量的各种 IL-18 物类。

[0113] 在急性免疫反应过程中由巨噬细胞和未成熟树突细胞产生 IL-18。

[0114] IL-18 被认为是促炎性细胞因子之一。IL-18 的一个重要功能是调节细胞介导免疫反应所需 T 辅助细胞的不同功能的亚类 (Nakanishi 等人, *Annual Reviews of Immunology*, 19 :423-74, 2001)。IL-18 充当 Th1 细胞的生长和分化因子。

[0115] 粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 由单核细胞、巨噬细胞与中性白细胞在细胞活化后分泌 (Demetri 等人, *Blood*, 78 :2791-2808, 1991)。其也可由基质细胞、成纤维细胞和内皮细胞产生。上皮癌、急性骨髓性白血病细胞与各种肿瘤细胞系 (膀胱癌、髓母细胞瘤) 也表达该因子。G-CSF 的合成由细菌内毒素、TNF、IL-1 和 GM-CSF 引发。在采髓前用重组人 G-CSF 预处理可以改善移植。用 G-CSF 治疗的一般效果似乎是明显减少了通常观察到发生在柯士文综合征患者中的严重感染与发热 (Jakubowski 等人, *New England Journal of*

Medicine, 320 :38-42, 1989)。G-CSF 治疗还能够用各种抗肿瘤药物制度剂量强化 (Gianni 等人, Journal of CUn. Oncol., 10 :1955-62, 1992)。

[0116] GM-CSF 可用于所有特征在于血细胞异常成熟或白细胞生产减少的疾病中的造血生理重组。GM-CSF 还可用于矫正化疗引发的血细胞减少和用于抵消与血细胞减少相关的感染与出血的倾向 (Fan 等人, Invivo, 5 :571-8, 1991)。一些研究已经证实, 使用 GM-CSF 提高了对细胞毒类药治疗的容限, 并可用于防止细胞毒类药治疗的副作用所迫使的剂量减少 (Negrin 等人, Advances in Pharmacol., 23 :263-296, 1992)。目前, GM-CSF 代表了骨髓移植方面的重要进展, 并已成为一种标准疗法 (Armitage 等人, Semin. Hematology, 29 :s14-8, 1992)。GM-CSF 提高了接受自体或异体骨髓抑制的患者和骨髓抑制后患有延迟植入的患者体内的造血系统重建 (Schuster 等人, Infection, 20 :S95-9, 1992)。

[0117] IFN- α 抑制了某些肿瘤细胞类型在体外的生长, 其还可刺激肿瘤相关细胞表面抗原的合成。在肾癌中, IFN- α 降低 EGF 的受体的表达。IFN- α 还抑制成纤维细胞和单核细胞在体外的生长。IFN- α 还抑制 B 细胞在体外的增殖, 并阻断抗体的合成。IFN- α 还选择性阻断某些线粒体基因的表达。

[0118] IFN- β 提高了低亲和力 IgE 受体 CD23 的合成。在活化的单核细胞中, IFN- β 引发新喋呤的合成。其还提高了 β 2- 微球蛋白的血清浓度。IFN- β 选择性抑制某些线粒体基因的表达。

[0119] 像其它干扰素那样, IFN- γ 可用作抗病毒和抗寄生虫剂 (Stuart-Harris 等人, Med. Journal of Aust., 156 :869-72, 1992)。IFN- γ 已经证实可以有效地治疗慢性多关节炎 (Machold 等人, Ann. Rheum. Dis., 51 :1039-43, 1992)。该治疗 (其可能包括调节巨噬细胞活性) 显著减轻了关节疼痛, 并改善了各临床参数, 并能够降低皮质类固醇剂量。IFN- γ 可以在 AIDS 患者机会性感染的治疗中价值。其还被证明降低了严重过敏性皮炎中的炎症、临床症状和嗜酸粒细胞增多 (Hanifin 等人, Am. Acad. Dermatology, 28 :189-97, 1993)。

[0120] 肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 由巨噬细胞、单核细胞、中性白细胞、T 细胞、天然杀伤细胞在它们被细菌脂多糖刺激后分泌 (Beutler 等人, Annual Review of Biochemistry, 57 :505-18, 1988)。与化学治疗药物相反, TNF- β 特异性攻击恶性肿瘤细胞。广泛的临床前研究已经记载了 TNF- α 在无毛 (免疫缺陷) 小鼠中针对人类皮下异种移植和淋巴结转移的直接抑制细胞与细胞毒效应, 以及对各种免疫效应细胞 (包括中性白细胞、巨噬细胞和 T 细胞) 的多种免疫调节作用 (Gifford 等人, Biotherapy, 3 :103-11, 1991)。

[0121] 巨噬细胞趋化性蛋白质 -1 (MCP-1), 现在称为 CCL2, 在体内激活单核细胞与巨噬细胞的破坏肿瘤活性。其调节细胞表面抗原 (CD11c、CD11b) 的表达和细胞因子 IL-1 与 IL-6 的表达 (Jiang 等人, 1992)。CCL2 是强有力的人嗜碱细胞活化剂, 引发脱粒和组胺的释放 (Bischoff 等人, Journal of Experimental Medicine, 175 :1271-5, 1992)。在被 IL-3、IL-5 或 GM-CSF 活化的嗜碱细胞中, CCL2 提高了白细胞三烯 C4 的合成 (Bischoff 等人, European Journal of Immunology, 23 :761-7, 1993)。CCL2 已证明表现出除趋化性之外的生物活性。其可以引发称为 CHAK (CC- 趋化因子激活的杀伤细胞) 的杀伤细胞的增殖与活化, 其类似于被 IL-2 激活的细胞 (LAK 细胞) (Hora 等人, Proc Natl Acad Science USA, 89 :1745-9, 1992)。CCL2 也是最强的组胺诱发因素之一。

[0122] 血管内皮生长因子 (VEGF) 在神经元与其它肿瘤的药理学中是重要的, 可能充当

人神经胶质瘤的血管生成的有效促进剂。也可以通过缺氧引发其合成。作为对 VEGF 的响应观察到的细胞外渗可以是决定远距离位置定殖的重要因素。因其对血管通透性的影响, VEGF 还可以涉及在正常和病理条件下改变血脑屏障功能。

[0123] 表皮生长因子 (EGF) 控制和刺激表皮和上皮细胞, 包括成纤维细胞、肾小管上皮细胞、人神经胶质细胞、卵巢颗粒细胞和甲状腺细胞的增殖。EGF 单独和与其它细胞因子一起是介导伤口愈合过程的重要因素。EGF 可以是胃肠道黏膜的营养物质并因其刺激黏膜细胞增殖的能力而起保护胃的作用。EGF 已经被证明在不会抑制胃酸合成的浓度下有效地促进了溃疡的愈合。

[0124] 与可通过本发明的方法检测的特定细胞因子相关的示例性、非限制性标志如下文所述。所述每种示例性细胞因子可以在单分子基础上检测, 或它们可以通过计数事件光子或总光子来检测。

[0125] 在各种示例性实施方案中, 该病状是强直性脊柱炎, 检测的细胞因子选自 CCL4、CCL2、CCL11、EGF、IL-1 β 、IL-2、IL-5、IL-6、IL-7、CXCL8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、TNF- α 、IFN γ 、GM-CSF、G-CSF 及其组合。

[0126] 在各种示例性实施方案中, 该病状是银屑病关节炎, 检测的细胞因子选自 GM-CSF、IL-17、IL-2、IL-10、IL-13、IFN- γ 、IL-6、CCL4/MIP-1 β 、CCL 11/Eotaxin、EGF、CCL2/MCP-1 及其组合。

[0127] 在各种示例性实施方案中, 该病状是反应性关节炎, 检测的细胞因子选自 IL-12、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-13、IL-17、CCL4/MCP-1、TNF- α 、IL-4、GM-CSF、CCL11/Eotaxin、EGF、IL-6 及其组合。

[0128] 在各种示例性实施方案中, 该病状是肠病性关节炎, 检测的细胞因子选自 CXCL8/IL-8、IL-10、IL-4、G-CSF、CCL2/MCP-1、CCL11/Eotaxin、EGF、IFN- γ 、TNF- α 及其组合。

[0129] 在各种示例性实施方案中, 该病状是溃疡性结肠炎 (UC), 检测的细胞因子选自 IL-7、CXCL8/IL-8、IFN- γ 、TNF- α 、EGF、VEGF、IL-1 β 及其组合。

[0130] 在各种示例性实施方案中, 该病状是克罗恩氏病 (CD), 检测的细胞因子选自 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6、IL-7、IL-13、IL-2、IL-4、GM-CSF、G-CSF、CCL2/MCP-1、EGF、VEGF、CXCL8/IL-8 及其组合。

[0131] 在各种示例性实施方案中, 该病状是类风湿性关节炎, 检测的细胞因子分子选自 IFN- γ 、IL-1 β 、TNF- α 、G-CSF、GM-CSF、IL-6、IL-4、IL-10、IL-13、IL-5、CCL4/MIP-1 β 、CCL2/MCP-1、EGF、VEGF、IL-7 及其组合。

[0132] 在各种示例性实施方案中, 病状是系统性红斑狼疮, 检测的细胞因子分子选自 IL-10、IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 、CCL2/MCP-1、CCL4/MIP-1 β 、CXCL8/IL-8、VEGF、EGF、IL-17 及其组合。

[0133] 在各种示例性实施方案中, 病状是家族性地中海热 (FMF), 检测的细胞因子分子选自 G-CSF、IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、CXCL8/IL-8 及其组合。

[0134] 在各种示例性实施方案中, 病状是肌萎缩侧索硬化 (ALS), 检测的细胞因子分子选自 CCL2/MIP-1 β 、CXCL8/IL-8、IL-12、IL-1 β 、VEGF、IL-13 及其组合。

[0135] 在各种示例性实施方案中, 病状是肠易激综合征 (IBS), 检测的细胞因子分子选自 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6、IL-7、GM-CSF、G-CSF、CCL2/MCP-1、CXCL8/IL-8 及其组合。

[0136] 在各种示例性实施方案中,病状是青少年类风湿性关节炎(JRA),检测的细胞因子分子选自 IFN- γ 、IL-1 β 、TNF- α 、G-CSF、GM-CSF、IL-6、IL-4、IL-10、IL-13、IL-5、IL-7 及其组合。

[0137] 在各种示例性实施方案中,病状是舍格伦综合征,检测的细胞因子分子选自 CCL2/MCP-1、IL-12、CXCL8/IL-8、CCL11/Eotaxin、TNF α 、IL-2、IFN α 、IL-15、IL-17、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、GM-CSF 及其组合。

[0138] 在各种示例性实施方案中,病状是早期关节炎,检测的细胞因子分子选自 CCL4/MIP1 β 、CXCL8/IL-8、IL-2、IL-12、IL-17、IL-13、TNF α 、IL-4、IL-5、IL-10 及其组合。

[0139] 在各种示例性实施方案中,病状是神经发炎,检测的细胞因子分子选自 CCL2/MCP-1、IL-12、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、IL-6、IL-17 及其组合。

[0140] 在各种实施方案中,在本发明的测定中测量的特异性细胞因子包括但不限于 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-8、IL-12、IL-21、G-CSF、GM-CSF、hTNF α 、mTNF α 、IFN γ 和 hVEGF。按照本发明的一个方面,有利地在通过非外科手术收集技术获得的样品中,如在来自患有或怀疑患有细胞因子参与其中或其检测和/或量化产生诊断或预后价值(yield)的疾病的患者的血液、血清、血浆、粪便或尿液样品中测量该分析物。

[0141] 在一些实施方案中,该方法包括使用本发明的检测方法确定超过一种,例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 或更多种细胞因子的水平。

[0142] 在一种示例性实施方案中,本发明提供如上所述的方法,其中该可检测物类单分子与其为选自细胞因子和生长因子的一员的分析物单分子相关,所述可检测物类特异性结合到该分析物单分子上。在各种实施方案中,该测定能够以小于或等于约 5pg/mL 的量检测所述可检测物类。在某些实施方案中,该测定以小于或等于约 2pg/mL 的量检测该可检测物类单分子。

[0143] 本发明还提供鲁棒动态范围的测定。在示例性实施方案中,该动态检测范围为至少约 2log、优选至少约 3log 和更优选至少约 4log。

[0144] 本发明的测定对细胞因子和其它疾病标记物高度敏感。例如,在一种实施方案中,该方法提供能够以小于或等于约 5pg/mL、4pg/mL、3pg/mL、2pg/mL、1pg/mL、0.5pg/mL 和甚至小于或等于约 0.1pg/mL 的量检测至少一种细胞因子的测定。

[0145] 在各种实施方案中,本发明提供在小于约 2pg/mL、小于约 1pg/mL、小于约 0.8pg/mL、小于约 0.6pg/mL、小于约 0.4pg/mL 或小于约 0.3pg/mL 的浓度下检测 IL-2 的方法。在各种实施方案中,检测的量对应于在健康对象体内发现的 IL-2 的量。

[0146] 在一种示例性实施方案中,本发明提供对 IL-2 的灵敏度(检测限(LOD))为小于或等于约 0.1pg/mL,例如约 0.07pg/mL 的 IL-2 的测定。在各种实施方案中,本发明的测定在约 0.1pg/mL 至约 2pg/mL、优选约 0.16pg/mL 至约 1.5pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-2。示例性测定具有小于或等于约 0.1pg/mL(例如约 0.07pg/mL)的 IL-2 的 LOD,并在约 0.1pg/mL 至约 2pg/mL、优选约 0.16pg/mL 至约 1.5pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-2。在一种实施方案中,该血浆来自健康的对象。

[0147] 在各种实施方案中,本发明提供在小于约 20pg/mL、小于约 10pg/mL、小于约 8pg/mL、小于约 6pg/mL 或小于约 4pg/mL 浓度下检测 IL-5 的方法。在各种实施方案中,检测的量对应于在健康对象体内发现的 IL-2 的量。

[0148] 在一种示例性实施方案中,本发明提供对 IL-5 的灵敏度(检测限(LOD))为小于或等于约 1.2pg/mL,例如约 0.9pg/mL 的 IL-5 的测定。在各种实施方案中,本发明的测定在约 1.5pg/mL 至约 19.5pg/mL、优选约 2.0pg/mL 至约 19pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-5。示例性测定具有小于或等于约 1.2pg/mL(例如约 0.9pg/mL)的 IL-5 的 LOD,并在约 1.5pg/mL 至约 19.5pg/mL、优选约 2.0pg/mL 至约 19pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-5。在一种实施方案中,该血浆来自健康的对象。

[0149] 在各种实施方案中,本发明提供在小于约 3pg/mL、小于约 2pg/mL、小于约 1pg/mL、小于约 0.8pg/mL 或小于约 0.6pg/mL 的浓度下检测 IL-7 的方法。在各种实施方案中,检测的量对应于在健康对象体内发现的 IL-2 的量。

[0150] 在一种示例性实施方案中,本发明提供对 IL-7 的灵敏度(检测限(LOD))为小于或等于约 0.02pg/mL,例如约 0.012pg/mL 的 IL-7 的测定。在各种实施方案中,本发明的测定在约 0.5pg/mL 至约 3pg/mL、优选约 0.4pg/mL 至约 2.7pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-7。示例性测定具有小于或等于约 0.02pg/mL(例如约 0.012pg/mL)的 IL-7 的 LOD,并在约 0.5pg/mL 至约 3pg/mL、优选约 0.4pg/mL 至约 2.7pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-7。在一种实施方案中,该血浆来自健康的对象。

[0151] 在各种实施方案中,本发明提供在小于约 12pg/mL、小于约 10pg/mL、小于约 8pg/mL、小于约 6pg/mL 或小于约 4pg/mL 的浓度下检测 IL-21 的方法。在各种实施方案中,检测的量对应于在健康对象体内发现的 IL-2 的量。

[0152] 在一种示例性实施方案中,本发明提供对 IL-21 的灵敏度(检测限(LOD))为小于或等于约 0.1pg/mL,例如约 0.06pg/mL 的 IL-21 的测定。在各种实施方案中,本发明的测定在约 2pg/mL 至约 10pg/mL、优选约 1.8pg/mL 至约 9.3pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-21。示例性测定具有小于或等于约 0.1pg/mL(例如约 0.06pg/mL)的 IL-21 的 LOD,并在约 2pg/mL 至约 10pg/mL、优选约 1.8pg/mL 至约 9.3pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-21。在一种实施方案中,该血浆来自健康的对象。

[0153] 在各种实施方案中,本发明提供在小于约 12pg/mL、小于约 0.4pg/mL、小于约 0.3pg/mL、小于约 0.2pg/mL 或小于约 0.1pg/mL 的浓度下检测 IL-1b 的方法。在各种实施方案中,检测的量对应于在健康对象体内发现的 IL-1b 的量。

[0154] 在一种示例性实施方案中,本发明提供对 IL-1b 的灵敏度(检测限(LOD))为小于或等于约 0.1pg/mL,例如约 0.06pg/mL 的 IL-21 的测定。在各种实施方案中,本发明的测定在约 0.03pg/mL 至约 0.3pg/mL、优选约 0.05pg/mL 至约 0.2pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-1b。示例性测定具有小于或等于约 0.1pg/mL(例如约 0.06pg/mL)的 IL-1b 的 LOD,并在约 0.03pg/mL 至约 0.3pg/mL、优选约 0.05pg/mL 至约 0.2pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-1b。在一种实施方案中,该血浆来自健康的对象。

[0155] 在各种实施方案中,本发明提供在小于约 7pg/mL、小于约 6pg/mL、小于约 5pg/mL、小于约 4pg/mL 或小于约 3pg/mL 的浓度下检测 IFN γ 的方法。在各种实施方案中,检测的量对应于在健康对象体内发现的 IL-1b 的量。

[0156] 在一种示例性实施方案中,本发明提供对 IFN γ 的灵敏度(检测限(LOD))为小于或等于约 0.1pg/mL,例如约 0.09pg/mL 的 IFN γ 的测定。在各种实施方案中,本发明的测定在约 7pg/mL 至约 2pg/mL、优选约 6.7pg/mL 至约 2.6pg/mL 的范围内量化血浆中的 IFN γ 。示

例性测定具有小于或等于约 0.1pg/mL(例如约 0.06pg/mL)的 IFN γ 的 LOD,并在约 7pg/mL 至约 2pg/mL、优选约 6.7pg/mL 至约 2.6pg/mL 的范围内量化血浆中的 IFN γ 。在一种实施方案中,该血浆来自健康的对象。

[0157] 在各种实施方案中,本发明提供在小于约 9pg/mL、小于约 6pg/mL、小于约 3pg/mL、小于约 2pg/mL 或小于约 1pg/mL 的浓度下检测 IL-6 的方法。在各种实施方案中,检测的量对应于在健康对象体内发现的 IL-1b 的量。

[0158] 在一种示例性实施方案中,本发明提供对 IL-6 的灵敏度(检测限(LOD))为小于或等于约 0.01pg/mL,例如约 0.003pg/mL 的 IL-6 的测定。在各种实施方案中,本发明的测定在约 9pg/mL 至约 0.5pg/mL、优选约 8.9pg/mL 至约 0.48pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-6。示例性测定具有小于或等于约 0.01pg/mL(例如约 0.06pg/mL)的 IL-6 的 LOD,并在约 9pg/mL 至约 0.5pg/mL、优选约 8.9pg/mL 至约 0.48pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-6。在一种实施方案中,该血浆来自健康的对象。

[0159] 在各种实施方案中,本发明提供在小于约 1pg/mL、小于约 0.8pg/mL、小于约 0.6pg/mL、小于约 0.4pg/mL 或小于约 0.1pg/mL 的浓度下检测 IL-17A 的方法。在各种实施方案中,检测的量对应于在健康对象体内发现的 IL-17A 的量。

[0160] 在一种示例性实施方案中,本发明提供对 IL-17A 的灵敏度(检测限(LOD))为小于或等于约 0.1pg/mL,例如约 0.08pg/mL 的 IL-17A 的测定。在各种实施方案中,本发明的测定在约 0.7pg/mL 至约 0.05pg/mL、优选约 0.6pg/mL 至约 0.06pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-17A。示例性测定具有小于或等于约 0.1pg/mL(例如约 0.06pg/mL)的 IL-17A 的 LOD,并在约 0.7pg/mL 至约 0.05pg/mL、优选约 0.6pg/mL 至约 0.06pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-17A。在一种实施方案中,该血浆来自健康的对象。

[0161] 在各种实施方案中,本发明提供在小于约 3pg/mL、小于约 2pg/mL、小于约 1pg/mL、小于约 0.8pg/mL 或小于约 0.6pg/mL 的浓度下检测 TNF α 的方法。在各种实施方案中,检测的量对应于在健康对象体内发现的 TNF α 的量。

[0162] 在一种示例性实施方案中,本发明提供对 TNF α 的灵敏度(检测限(LOD))为小于或等于约 0.01pg/mL,例如约 0.006pg/mL 的 TNF α 的测定。在各种实施方案中,本发明的测定在约 0.3pg/mL 至约 0.5pg/mL、优选约 2.7pg/mL 至约 0.6pg/mL 的范围内量化血浆中的 TNF α 。示例性测定具有小于或等于约 0.01pg/mL(例如约 0.08pg/mL)的 TNF α 的 LOD,并在约 0.3pg/mL 至约 0.5pg/mL、优选约 2.7pg/mL 至约 0.6pg/mL 的范围内量化血浆中的 TNF α 。在一种实施方案中,该血浆来自健康的对象。

[0163] 在各种实施方案中,本发明提供在小于约 1.5pg/mL、小于约 1pg/mL、小于约 0.75pg/mL、小于约 0.5pg/mL 或小于约 0.4pg/mL 的浓度下检测 IL-4 的方法。在各种实施方案中,检测的量对应于在健康对象体内发现的 IL-4 的量。

[0164] 在一种示例性实施方案中,本发明提供对 IL-4 的灵敏度(检测限(LOD))为小于或等于约 0.15pg/mL,例如约 0.11pg/mL 的 IL-4 的测定。在各种实施方案中,本发明的测定在约 1pg/mL 至约 0.1pg/mL、优选约 0.8pg/mL 至约 0.2pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-4。示例性测定具有小于或等于约 0.15pg/mL(例如约 0.11pg/mL)的 IL-4 的 LOD,并在约 1pg/mL 至约 0.1pg/mL、优选约 0.8pg/mL 至约 0.2pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-4。在一种实施方案中,该血浆来自健康的对象。

[0165] 在各种实施方案中,本发明提供在小于约 1pg/mL、小于约 5pg/mL、小于约 0.3pg/mL、小于约 0.2pg/mL 或小于约 0.1pg/mL 的浓度下检测 IL-1a 的方法。在各种实施方案中,检测的量对应于在健康对象体内发现的 IL-1a 的量。

[0166] 在一种示例性实施方案中,本发明提供对 IL-1a 的灵敏度(检测限(LOD))为小于或等于约 0.1pg/mL,例如约 0.06pg/mL 的 IL-1a 的测定。在各种实施方案中,本发明的测定在约 0.6pg/mL 至约 0.05pg/mL、优选约 0.5pg/mL 至约 0.07pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-1a。示例性测定具有小于或等于约 0.1pg/mL(例如约 0.06pg/mL)的 IL-1a 的 LOD,并在约 0.6pg/mL 至约 0.05pg/mL、优选约 0.5pg/mL 至约 0.07pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-1a。在一种实施方案中,该血浆来自健康的对象。

[0167] 在各种实施方案中,本发明提供在小于约 2pg/mL、小于约 1.5pg/mL、小于约 1pg/mL、小于约 0.8pg/mL 或小于约 0.5pg/mL 的浓度下检测 GM-CSF 的方法。在各种实施方案中,检测的量对应于在健康对象体内发现的 GM-CSF 的量。

[0168] 在一种示例性实施方案中,本发明提供对 GM-CSF 的灵敏度(检测限(LOD))为小于或等于约 0.05pg/mL,例如约 0.03pg/mL 的 GM-CSF 的测定。在各种实施方案中,本发明的测定在约 1.3pg/mL 至约 0.2pg/mL、优选约 1.1pg/mL 至约 0.3pg/mL 的范围内量化血浆中的 GM-CSF。示例性测定具有小于或等于约 0.05pg/mL(例如约 0.06pg/mL)的 GM-CSF 的 LOD,并在约 1.3pg/mL 至约 0.2pg/mL、优选约 1.1pg/mL 至约 0.3pg/mL 的范围内量化血浆中的 GM-CSF。在一种实施方案中,该血浆来自健康的对象。

[0169] 在各种实施方案中,本发明提供在小于约 2pg/mL、小于约 1pg/mL、小于约 0.5pg/mL、小于约 0.2pg/mL 或小于约 0.1pg/mL 的浓度下检测 IL-12 的方法。在各种实施方案中,检测的量对应于在健康对象体内发现的 IL-12 的量。

[0170] 在一种示例性实施方案中,本发明提供对 IL-12 的灵敏度(检测限(LOD))为小于或等于约 0.008pg/mL,例如约 0.01pg/mL 的 IL-12 的测定。在各种实施方案中,本发明的测定在约 1.2pg/mL 至约 0.05pg/mL、优选约 1pg/mL 至约 0.08pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-12。示例性测定具有小于或等于约 0.008pg/mL(例如约 0.01pg/mL)的 IL-12 的 LOD,并在约 1.2pg/mL 至约 0.05pg/mL、优选约 1pg/mL 至约 0.08pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-12。在一种实施方案中,该血浆来自健康的对象。

[0171] 在各种实施方案中,本发明提供在小于约 150pg/mL、小于约 100pg/mL、小于约 80pg/mL、小于约 60pg/mL 或小于约 40pg/mL 的浓度下检测 G-CSF 的方法。在各种实施方案中,检测的量对应于在健康对象体内发现的 G-CSF 的量。

[0172] 在一种示例性实施方案中,本发明提供对 G-CSF 的灵敏度(检测限(LOD))为小于或等于约 0.2pg/mL,例如约 0.12pg/mL 的 G-CSF 的测定。在各种实施方案中,本发明的测定在约 110pg/mL 至约 30pg/mL、优选约 97pg/mL 至约 25pg/mL 的范围内量化血浆中的 G-CSF。示例性测定具有小于或等于约 0.2pg/mL(例如约 0.01pg/mL)的 G-CSF 的 LOD,并在约 110pg/mL 至约 30pg/mL、优选约 97pg/mL 至约 25pg/mL 的范围内量化血浆中的 G-CSF。在一种实施方案中,该血浆来自健康的对象。

[0173] 在各种实施方案中,本发明提供在小于约 50pg/mL、小于约 40pg/mL、小于约 30pg/mL、小于约 20pg/mL 或小于约 10pg/mL 的浓度下检测 IL-22 的方法。在各种实施方案中,检测的量对应于在健康对象体内发现的 IL-22 的量。

[0174] 在一种示例性实施方案中,本发明提供对 IL-22 的灵敏度(检测限(LOD))为小于或等于约 0.03pg/mL,例如约 0.02pg/mL 的 IL-22 的测定。在各种实施方案中,本发明的测定在约 40pg/mL 至约 3pg/mL、优选约 39pg/mL 至约 4pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-22。示例性测定具有小于或等于约 0.03pg/mL(例如约 0.01pg/mL)的 IL-22 的 LOD,并在约 40pg/mL 至约 3pg/mL、优选约 39pg/mL 至约 4pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-22。在一种实施方案中,该血浆来自健康的对象。

[0175] 在各种实施方案中,本发明提供在小于约 40pg/mL、小于约 30pg/mL、小于约 20pg/mL 或小于约 10pg/mL 的浓度下检测 IL-10 的方法。在各种实施方案中,检测的量对应于在健康对象体内发现的 IL-10 的量。

[0176] 在一种示例性实施方案中,本发明提供对 IL-10 的灵敏度(检测限(LOD))为小于或等于约 0.5pg/mL,例如约 0.4pg/mL 的 IL-10 的测定。在各种实施方案中,本发明的测定在约 40pg/mL 至约 8pg/mL、优选约 35pg/mL 至约 10pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-10。示例性测定具有小于或等于约 0.5pg/mL(例如约 0.4pg/mL)的 IL-10 的 LOD,并在约 40pg/mL 至约 8pg/mL、优选约 35pg/mL 至约 10pg/mL 的范围内量化血浆中的 IL-10。在一种实施方案中,该血浆来自健康的对象。

[0177] 在各种实施方案中,本发明提供在小于约 70pg/mL、小于约 60pg/mL、小于约 50pg/mL、小于约 40pg/mL 或小于约 30pg/mL 的浓度下检测 MIP-1a 的方法。在各种实施方案中,检测的量对应于在健康对象体内发现的 MIP-1a 的量。

[0178] 在一种示例性实施方案中,本发明提供对 MIP-1a 的灵敏度(检测限(LOD))为小于或等于约 0.3pg/mL,例如约 0.2pg/mL 的 MIP-1a 的测定。在各种实施方案中,本发明的测定在约 65pg/mL 至约 25pg/mL、优选约 63pg/mL 至约 22pg/mL 的范围内量化血浆中的 MIP-1a。示例性测定具有小于或等于约 0.3pg/mL(例如约 0.2pg/mL)的 MIP-1a 的 LOD,并在约 65pg/mL 至约 25pg/mL、优选约 63pg/mL 至约 22pg/mL 的范围内量化血浆中的 MIP-1a。在一种实施方案中,该血浆来自健康的对象。

[0179] 此外,本发明的检测方法提供具有宽动态范围的鲁棒的测定。例如,本发明的方法提供具有至少 1log、1.5log、2log、2.5log、3log、3.5log 和最高 4log 和高于至少 4log 的动态范围的测定。

[0180] 在一种示例性实施方案中,本发明提供确定患者是健康还是受疾病、综合征或其它疾病(malady)侵害的方法。该方法包括制备分析物的样品并如本文中所述那样检测与该分析单分子相应的可检测物类。在各种实施方案中,检测的细胞因子是选自 IL-2、IL-5、IL-7、IL-21 及其组合的一员(图 5)。将测得的细胞因子浓度与细胞因子的浓度参考标准,或相应于健康个体的临界细胞因子浓度比较。如果测得的样品中细胞因子浓度从该参考标准或从临界健康细胞因子值离散超过一预定值,这表明对象被疾病、综合征或其它疾病侵害。

[0181] 在这些实施方案的变体中,取第一细胞因子浓度与第二细胞因子浓度的比。随后将该比与参照比(例如相应于健康对象体内细胞因子浓度的比)比较,如果样品中测得的细胞因子浓度的比值从该参考离散超过一预定量,这表明对象被疾病、综合征或其它疾病侵害。在示例性实施方案中,该比选自 [IL-5]/[IL-2]、[IL-5]/[IL-7]、[IL-5]/[IL-21] 及其组合(图 6)。在示例性实施方案中,指示健康对象的 [IL-5]/[IL-2] 比为约 30 或更小、

约 20 或更小、约 15 或更小、约 10 或更小或约 8 或更小。在示例性实施方案中,指示健康对象的 [IL-5]/[IL-7] 比为约 25 或更小、约 15 或更小、约 10 或更小、约 5 或更小、约 3 或更小。在各种实施方案中,指示健康对象的 [IL-5]/[IL-21] 比为约 5 或更小、约 4 或更小、约 3 或更小、约 2 或更小或约 1 或更小。

[0182] 样品制备

[0183] 本发明的各种实施方案基于这样的认识:某些样品参数实现具有提高的灵敏性和动态范围的测定。通常,现有技术认识到这样做的优点:以小体积制备测定样品,由此尽量减少导致测定灵敏度损失的转移损失。本发明提供通过使用比业内公认为有用的体积大的体积提高测定灵敏度的方法。使用更高液体体积改变的测定特性包括由测定混合物内的非分析物物类的非特异性基质效应结合造成的对灵敏度的有害作用。在一种示例性实施方案中,本发明提供其体积足以提供比更低体积下相同的测定混合物更低量级的机制结合作用的测定混合物。

[0184] 例如,在某些实施方案中,以至少约 25 μL 、例如约 25 μL 至约 1000 μL 、约 40 μL 至约 800 μL 、约 60 μL 至约 500 μL 和约 75 μL 至约 300 μL 的缓冲溶液量形成该分析物与该捕获物类之间的复合物。

[0185] 类似地,本发明人认识到,在该磁性粒子固定捕获物类与使用特定重量范围的磁性粒子固定捕获物类的该分析物之间形成复合物提高了该测定的灵敏性与动态范围。在一种示例性实施方案中,使用共轭到该捕获物类上的至少约 0.1 μg 、例如约 0.1 μg 至约 40 μg 、约 0.5 μg 至约 20 μg 和约 1.0 μg 至约 10 μg 的磁性粒子。

[0186] 在各种实施方案中,通过控制用于将该可检测物类从包含该分析物、该捕获物类和该可检测物类的复合物中洗脱的体积量级来提高本发明的测定的灵敏性。由此,在一种实施方案中,该可检测物类的洗脱体积小于原始样品量。在各种实施方案中,该洗脱体积比原始样品体积小约 2 倍至约 100 倍,例如比原始样品体积小约 2 倍至约 20 倍。在各种实施方案中,该洗脱体积比原始样品体积小约 5 倍至约 15 倍。

[0187] 在一种示例性实施方案中,约 200 μL 的样品量在本发明的方法的过程中降低至比原始样品体积小约 2 倍至约 20 倍的洗脱体积。在另一种示例性实施方案中,约 100 μL 的样品量在本发明的方法的过程中降低至比原始样品体积小约 2 倍至约 20 倍的洗脱体积。在另一些示例性实施方案中,约 100 μL 至约 200 μL 的原始样品体积降低至约 1 μL 至约 40 μL ,例如约 5 μL 至约 30 μL 或约 10 μL 至约 20 μL 的体积。

[0188] 在一种示例性实施方案中,在包含加入到约 25 μL 至约 1000 μL 的缓冲溶液中的约 0.1 μg 至约 40 μg 的多种磁性粒子的混合物中形成该捕获物类与该分析物之间的复合物。在某些实施方案中,通过将约 0.5 μg 至约 25 μg 的多种磁性粒子与约 100 μL 至约 1000 μL 的血浆样品形成该复合物。

[0189] 在一种实施方案中,提供的该方法类似于夹心式测定。由此,单克隆抗体用作结合伴侣。初级抗体连接到磁性粒子上以充当捕获抗体(“捕获物类”)。随后添加该样品,具有由该抗体识别的抗原表位的单分子在表面上结合到该抗体上。洗掉未结合的分析物分子,基本上仅留下特异性结合的分析物分子。结合的分析物分子/抗体与含有可检测标记物的检测抗体(“可检测物类”)反应。在允许(allow)该检测抗体与分析物分子之间反应的培育后,洗掉非特异性结合的检测抗体。在一种示例性实施方案中,通过将磁性粒子转移

到不存在其它测定组分,特别是该可检测物类的容器中,使该分析物-抗体-可检测物类复合物基本不含污染性的未结合的可检测物类。使用洗脱缓冲液分离该单分子与检测抗体,该可检测物类在该单分子分析仪中。或者,仅可以释放和检测结合到该可检测物类上的标记物,由此间接检测该单分子。如本领域技术人员将认识到的那样,抗体用作捕获和/或可检测物类是为了说明清楚,基本任何其它捕获或可检测物类可以代替该实施例中混入的抗体,而不偏离本发明的精神。此外,本领域技术人员将理解,将未结合的可检测物类与该分析物-抗体-可检测物类复合物分离的其它方法在本发明的范围内。

[0190] 在各种实施方案中,通过使用可重复组成的样品提高本发明的精确度。因此,在一种示例性实施方案中,将样品分离成具有更高和更低的样品成分浓度的区域,或将样品均化以制造均匀样品。在一种实施方案中,该样品是分离成其各种组分的浓度梯度的血清样品。例如,将一个样品离心以制造可检测地分离为三层或更多层的样品。在一实例中,该样品分离为三个可检测的层,包括脂质层(例如脂质上层)、含有相关分析物的中间层和含有血纤维蛋白凝块的层(例如血纤维蛋白下层)。在各种示例性实施方案中,相关分析物停留(resides in)在该中间层中。本发明提供其中从中间层中提取样品的测定。

[0191] 检测

[0192] 本文中所述方法能够在单分子通过该探询空间时一次一个地计数该单分子。可以由固定时间长度内的计数的单分子数和通过该探询空间的样品体积确定该样品的浓度。在探询空间包括该样品流的整个横截面的情况下,仅需要在固定时间长度内的计数的单分子数和流经该样品流横截面的体积以计算该样品的浓度。当探询空间小于该样品流时,可以通过由采用标准浓度的对照样品生成的标准曲线的内插确定该单分子的浓度。在各种实施方案中,通过比较测得的单分子与内部单分子标准确定该单分子的浓度。可以从计数的单分子数推出浓度。例如,已知样品稀释度,可以计算起始样品中的单分子浓度。

[0193] 根据本发明的方法检测单分子的示例性装置公开在共同拥有的公开的美国专利申请 No. 20060078998 和 20080171352 中。合适的系统的其它实施例是 Singulex, Inc. 制造的光学系统,图 1。

[0194] 在一种示例性实施方案中,单分子检测使用单分子分析仪。示例性单分子分析仪包括发射电磁辐射的电磁辐射源。该源任选是连续波辐射源。该分析仪还包括定位以接收该电磁辐射源发射的电磁辐射的第一探询空间。该探询空间是任选可调的,并在一些实施方案中具有约 0.02pL 至约 300pL、约 0.05pL 至约 50pL 或约 0.1pL 至约 25pL 的体积。

[0195] 该分析仪还包括可操作地连接到第一探询空间以测量所述可检测物类单分子的第一电磁特征的第一电磁辐射检测器。在各种实施方案中,该分析仪还包括能够对至少一种样品自动取样并在样品容器与所述第一探询空间之间提供流体连通的取样系统。在某些实施方案中,该分析仪系统进一步包括与第一探询空间流体连通的样品回收系统。理想地,该回收系统能够回收基本所有样品。该分析仪可任选包括样品制备系统。

[0196] 有助于本发明的方法的极高灵敏性的特征是检测和计数在一些实施方案中连接到待检测的单分子上或对应于待检测的单分子的可检测物类的方法。简而言之,在一种示例性实施方案中,向给定探询空间施以来自于在适于该标记物用荧光部分的激发波长下发光的激光器的 EM 辐射一段预定时间,并检测该时间过程中发射的光子,由此将流经该检测设备的处理样品有效地分为一系列检测事件。将检测器检测的信号分为各自具有预先选择

的时间长度（箱元宽度）的任意时间片段（箱元）。尽管可以使用其它箱元宽度而不偏离本发明的范围，在一种实施方案中在大约 10 微秒至约 5 毫秒的范围内选择该箱元宽度。示例性的箱元宽度为 1。确认 (established) 每个片段中所含的信号。

[0197] 每个预定的时间段为一个“箱元 (bin)”。如果在给定箱元中检测到的光子总数超过预定的阈值水平，则对该箱元记录为检测事件，即检测到标记物。如果光子的总数未达到预定的阈值水平，则不记录检测事件。在一些实施方案中，处理样品浓度被充分稀释，对于大部分检测事件而言，检测事件仅代表一个可检测物类通过窗口，其对应于原始样品中的相应单分子，也就是说，极少的检测事件代表单个箱元中超过一个标记物。在一些实施方案中，应用进一步的精制以便在待精确检测的处理样品中获得更高的标记物浓度，即两个或多个标记物检测为单一检测信号的可能性不再微乎其微。

[0198] 在一种示例性实施方案中，该方法提供仅通过计数单分子的检测。本发明的方法还包括计数单个箱元中的多份可检测物类。由此，在另一种实施方案中，本发明提供通过计数选自来自单分子的光子、事件光子、总光子及其组合的一员的检测。

[0199] 在一种实施方案中，首先分析检测的信号以确定噪音水平，并在利用该数据前选择高于阈值的信号。在一种实施方案中，通过平均大量箱元中的信号来确定噪音水平。在另一些实施方案中，由平均噪音水平和根均方噪音确定该背景水平。在其它情况下，选择典型噪音值或统计值。在大多数情况下，噪音预计呈泊松分布。

[0200] 在各种实施方案中，确定阈值以区别真实信号（峰、碰撞、单分子）与噪音。必须仔细选择阈值以尽量减少来自随机噪音的假阳性信号数，同时尽量减少被排除的真实信号数。选择阈值的方法包括测定高于噪音水平的固定值，并根据噪音信号的分布计算阈值。在一种实施方案中，阈设定为高于背景水平的标准偏差的固定值。假定噪音为泊松分布，采用该方法可以估算试验的整个事件过程内假阳性信号数。

[0201] 在一些实施方案中，本发明中使用的分析仪或分析仪系统能够在小于 1 纳摩尔、或 1 皮摩尔、或 1 毫微微摩尔、或 1 微微微摩尔、或 1 仄摩尔 (zeptomolar) 的水平下检测分析物，例如生物标记物。在一些实施方案中，当该生物标记物以小于 1 纳摩尔、或 1 皮摩尔、或 1 飞摩尔 (femtomolar)、或 1 渺摩尔 (attomolar)、或 1 仄摩尔 (zeptomolar) 的浓度存在于该样品中，且当各样品量小于约 100、50、40、30、20、10、5、2、1、0.1、0.01、0.001 或 0.0001 μL 时，该分析仪或分析仪系统能够检测由一种样品到另一种样品的小于约 0.1、1、2、5、10、20、30、40、50、60 或 80% 的该分析物或多种分析物，例如一种或多种生物标记物的浓度变化。在一些实施方案中，当该分析物以小于约 1 皮摩尔的浓度存在时，且当各样品量小于约 50 μL 时，该分析仪或分析仪系统能够检测由第一样品到第二样品的小于约 20% 的该分析物的浓度变化。在一些实施方案中，当该分析物以小于约 100 飞摩尔的浓度存在时，且当各样品量小于约 50 μL 时，该分析仪或分析仪系统能够检测由第一样品到第二样品的小于约 20% 的该分析物的浓度变化。在一些实施方案中，当该分析物以小于约 50 飞摩尔的浓度存在时，且当各样品量小于约 50 μL 时，该分析仪或分析仪系统能够检测由第一样品到第二样品的小于约 20% 的该分析物的浓度变化。在一些实施方案中，当该分析物以小于约 5 飞摩尔的浓度存在时，且当各样品量小于约 50 μL 时，该分析仪或分析仪系统能够检测由第一样品到第二样品的小于约 20% 的该分析物的浓度变化。在一些实施方案中，当该分析物以小于约 5 飞摩尔的浓度存在时，且当各样品量小于约 5 μL 时，该分析仪或

分析仪系统能够检测由第一样品到第二样品的小于约 20% 的该分析物的浓度变化。在一些实施方案中,当该分析物以小于约 1 飞摩尔的浓度存在时,且当各样品量小于约 5 μ L 时,该分析仪或分析仪系统能够检测由第一样品到第二样品的小于约 20% 的该分析物的浓度变化。

[0202] 可以通过检测一种或多种可检测物类上的一种或多种标记物来检测该分析物的单分子。在本发明的示例性实施方案中,通过至少两个标记物提供令该可检测物类单分子可检测的非本征性质。例如,目标单分子用两种或多种标记物进行标记,可以由有别于其它标记物的在一个或多个波长下的检测的发射区分每种标记物。在这种实例中,该单分子通过在两个或多个波长下的检测的发射的比区别于游离标记物(或偶然键合到分析物或样品组分上的标记物)。在另一实施例中,用两种或多种标记物标记该单分子,且该标记物的至少两种在相同的波长下发光。在该实例中,根据检测到的来自于连接到每个单分子上的两种、三种或多种标记物的发射所产生的荧光强度区别单分子。

[0203] 在另一实施方案中,该染料具有相同或重叠的激发光谱,但是具有可区别的发射光谱。优选选择染料以使它们具有基本不同的发射光谱,优选具有相隔超过约 10nm 的发光最大值,更优选具有相隔超过约 25nm 的发光最大值,再更优选相隔超过约 50nm。当合意的是使用仪器方法区分两种染料时,多种滤光器和光栅使得能够独立检测各自的发射光谱。还可以通过选择具有窄带宽而非宽带宽的染料提高仪器的辨识度;但是,此类染料必须具有高振幅发光或以积分信号强度损失不损害信号检测的足够浓度存在。

[0204] 在使用超过一种标记物的各种实施方案中,第二标记物可以猝灭第一标记物的荧光,导致双重标记的单分子的荧光信号损失。合适的荧光/猝灭对的例子包括 5' 6-FAMTM/3' Dabcyl、5' Oregon Green® 488-XNHS Ester/3' Dabcyl、5' Texas Red® -X NHS Ester/3' BlackHole Quencher™-1(Biosearch Technologies, Novato, CA)。

[0205] 在另一实施例中,两种标记物用于荧光共振能量转移("FRET"),其为两种染料单分子的激发态之间的距离依赖性相互作用。在这种情况下,激发从给体转移到受体单分子,而不会由给体发射光子。该给体和受体单分子必须密切接近(例如在约 100 埃)。合适的给体、受体对包括荧光素/四甲基若丹明、LAEDANS/荧光素、EDANS/dabcyl、荧光素/QSY7(R. Haugland, "Molecular Probes", 第九版, 2004) 和本领域技术人员已知的许多其它给体/受体对。

[0206] 可以用超过一种类型的标记物——如染料标签和质量标签标记单分子以帮助检测和/或辨别。例如,分析物可以用两种可检测物类(例如两种可区分的抗体)标记,其一未标记并充当质量或质量/电荷标签,另一个具有染料标签。在一些实施方案中,该蛋白质与仅结合到具有染料标签的抗体上的另一大小类似的蛋白质的区别在于其在使用例如电泳作为原动力时的较慢速度(由另外的结合抗体的提高的质量或质量/电荷造成)。

[0207] 数据处理

[0208] 在收集样品中的单分子检测数据后,在各种实施方案中,将该数据与在相同实验条件下获得的参考数据组比较以确定在该分析物的单分子检测中是否存在代表分析、诊断或预后价值差异的变化。在示例性实施方案中,试验与参考数据之间的差值指示病状、病状的进展、病状的阶段或治疗方法对该病状的效力。进行该比较的多种方法均有效。在一种示例性实施方案中,使用多变量分析。

[0209] 获自具有微妙变化的样品的数据之间的辨别需要采用鲁棒和灵敏的分析方法。这些方法必须将由各种原因引起的非线性建模并考虑仪器设置的逐日偏移。样品处理错误、噪扰带、基线位移、批次变化、非诊断性碎片的存在以及不利地影响辨别的所有其它因素也优选充分考虑和建模。最后,对于提供鲁棒性的方法,其必须区分质量好和质量差的数据,并排除不代表参考组(reference set)的样品。非代表性样品称为离群样品(outlier sample)。离群样品是统计上不同于该参考组中所有其它样品的样品。在如细胞因子的物类的单分子检测情况下,离群数据组来自于具有小于最佳数量副本的单分子和/或富含非诊断性碎片的样本的样品。

[0210] 在各种实施方案中,参考数据组代表所选单分子的数据组中所有的预期变化。随后使用例如光谱数据分析或多变量分析的经典方法的方法处理所有样品的数据。

[0211] 多变量分析已经用于分析生体试样。例如,Robinson 等人在美国专利 US 4,975,581(1990年12月4日公布)描述了使用多变量分析确定已知生物流体中生物分析物相似性的定量方法。

[0212] 主成分分析(PCA)和判别分析用于区分正常和不正常的生物样品。参见 Ge, 等人, Applied Spectroscopy 49:432-436(1995)。Haaland, 等人在美国专利 US 5,596,992(1997年1月28日公布)教导了使用多变量法检测正常细胞与恶性肿瘤细胞样品之间的差异。

[0213] 在本发明中,当使用多变量分析时,可以通过偏最小二乘法(PLS)或主成分分析(PCA)统计方法对可被预处理(即平滑和/或衍生)、或未平滑和未衍生的数据进行单分子检测数据的比较。优选使用 PCA 进行使用主成分回归(PCR)的比较。进行这些统计方法的大量计算机程序是可得,包括 PCR-32®(来自 Bio-Rad, Cambridge, Mass., USA)和 PLS-PLUS®和 DISCRIMINATE®(来自 Galactic Industries, Salem, NH, USA)。基本理论和计算的讨论可以在例如 Haaland, 等人, Anal. Chem. 60:1193-1202(1988); Cahn, 等人, Applied Spectroscopy, 42:865-872(1988); 和 Martens, 等人, MULTIVARIATE CALIBRATION, John Wiley and Sons, New York, NY(1989)中找到。PCR 和 PLS 均使用来自于参考单分子样品的单分子的数据组以创造参考组,其中在基本相同的条件下获得每个数据组。数据分析技术由数据压缩(在 PCR 的情况下,该步骤称为 PCA)和线性回归组成。利用因素或主成分的线性组合,导出重构数据组。重构数据组与充当分类基础的未知试样的数据组比较。

[0214] 在本发明的某些方面中,在对检测的单分子的特定物类获得的数据组上“平均”各个数据组生成的预测分数。在该样品群上“平均”来自样品上的各个数据组的“平均”分数。“平均”法可包括简单地取预测分数的算术平均值,或可以依靠本领域已知的确定群体分布的其它统计方法。该方法包括例如,确定该预测分数群的中值和平均值。通过建立分散的度量标准(例如标准偏差、四分位数间距、距离偏差(range)和平均偏差)来评估群体在确定的中心任一侧上的离散程度。用于实施本发明的建立预测分数群的“平均值”和群体离散程度的其它方法是本领域技术人员显而易见的。

[0215] 在分析未知样品之前,可以使用相同单分子的另一组数据来验证和优化该参考。第二组数据通过确定模型的等级(rank of the model)提高了 PCR 或 PLS 模型的预测精确度。通过将 PCR 或 PLS 预测与已知诊断进行比较,从一定范围的等级中确定最佳等级。由被确定为最佳的等级提高或降低会不利地影响该 PLS 或 PCR 预测。例如,当该等级从最佳

逐渐降至次最佳时,PCR 或 PLS 会造成参考光谱中越来越小的变化。相反,超过被确定为最佳的等级的等级逐渐提高会造成 PCR 或 PLS 法模拟随机变化而非参考光谱中的有效信息。

[0216] 通常,参考组包括越多单分子检测数据,该模型就越好,将由仪器偏移和折光指数变化引起的批次间变化、基线偏移和非线性计入考虑的几率越好。由差样品操作与制备、样品杂质和操作人员错误引起的误差也可计入考虑,只要参考数据实现未知样品的真实表示。

[0217] 使用 PCR 和 PLS 分析的另一优点在于这些方法测量未知样品相对于参考数据的数据噪音水平。生物样品常常遇到许多来源扰动。某些扰动强烈影响数据质量,并不利地影响“诊断”结果。因此,优选区分符合参考数据的数据和那些不符合的数据(例如离群样品)。F 比是检测数据组(样品)与参考数据的符合度或欠符合性的有力工具。通常显著大于参考值的 F 比表明“欠符合”,并应从分析中排除。排除离群样品的能力增加了 PCR 和 PLS 的鲁棒性和可靠性,因其避免由低劣和损坏的数据产生“诊断”。可以通过 Haaland 等人,Anal. Chem. 60 :1193-1202(1988) 和 Cahn 等人,Applied Spectroscopy 42 :865-872(1988) 中描述的方法计算 F 比。

[0218] 当辨别来自不同样品的单分子数据时,该生物材料不再具有已知的组分浓度。结果,在示例性实施方案中,参考数据确定了允许样品被归为参考成员的变动范围,还应包括预处理算法以将样品组成的多样性计入考虑。

[0219] 其它数据处理算法用于本发明。例如在本发明的一种示例性实施方案中,具有诊断价值的细胞因子(或其它标记物)可以首先使用对照物个体和疾病患者之间的统计加权差分进行识别(identify),以 $D - N \sigma D^* \sigma N$ 形式计算,其中 D 是诊断为患有特定疾病的患者体内细胞因子的中值浓度, N 是对照物个体的中值, D^* 是 D 的标准偏差, σN 是 N 的标准偏差。量级越大,患病和正常群体之间的统计差异越大。

[0220] 按照本发明的一种实施方案,导致对照物个体和疾病患者之间的统计加权差分大于 0.2、0.5、1、1.5、2、2.5 或 3 的细胞因子被认定为有诊断价值的标记物。

[0221] 如本领域技术人员将认识的那样,患者本身可以是“对照物”。例如,如果该测定是监测治疗或疾病进展的过程的一部分,在治疗过程开始时或在发现或诊断疾病时获自该患者的数据可以充当评价治疗或疾病进展导致的疾病标记物变化用的参考数据组。其中来自提供本发明测定用样品的患者的数据充当参考数据组或基线数据组的另一些实施方案对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0222] 用于测定充当诊断标准物的特定候选分析物,如特定细胞因子的效力的本发明方法中使用的另一种统计分析方法是受试者工作特征(ROC)曲线分析。ROC 曲线是考察取舍标准(例如对诊断标志,如测定信号或分析物水平的取舍值)对正确鉴别阳性与阴性样品或对象的诊断能力的作用的图形化方式。在示例性分析中,ROC 曲线的一条轴是真阳性率(TPR,真阳性样品/对象被正确识别为阳性的概率)或者假阴性率($FNR = 1 - TPR$,真阳性样品/对象被不正确地识别为阴性的概率)。另一轴是真阴性率(TNR,真阴性样品被正确识别为阴性的概率)或假阳性率($FPR = 1 - TNR$,真阴性样品被不正确地识别为阳性的概率)。使用样品/对象群体测定结果,通过改变用于鉴别样品为阳性或阴性的诊断取舍值并对每一取舍值的 TPR(或 FNR)和 TNR(FPR)的计算值绘图,由此生成该 ROC 曲线。曲线下方的面积(本文中称为 ROC 面积)是该诊断分离阳性和阴性样品/对象的能力的一个指标。

[0223] 诊断测定和数据统计分析领域的技术人员在本文中提供的教导和指导下能够在

没有不必要的负担的情况下选择最适于满足特定用途的需要（例如灵敏性和特异性）的取舍值、线、比率、区域等等。多种统计工具，如受试者工作特征（ROC）曲线，可用于评估取舍值的调节对测定性能（例如预测的真阳性率、假阳性率、真阴性率和假阴性率）的影响。或者，患者群体的统计分析能够将特定分析物值转化为患者患有或不患有疾病的概率。关于用于确定参考范围的个体群的选择和分析的背景，参见 Boyd J. C. "Reference Limits in the Clinical Laboratory" in Professional Practice in Clinical Chemistry :A Companion Text ;D. R. Dufour Ed., 1999, Washington D. C ;American Assoc. CLIN. CHEM. , 第 2 章, 第 2-1 至 2-7 页。关于决定限（即取舍值）的选择或由试验结果计算疾病可能性的背景，参见 Boyd J. C. "Statistical Aids for Test Interpretation" in Professional Practice in Clinical Chemistry :A Companion Text ;D. R. Dufour Ed., 1999, Washington D. C. ;American Assoc. CLIN. CHEM. , 第 3 章, 第 3-1 至 3-11 页。

[0224] 在本发明的教导下，本领域技术人员也会认识到第一标记物（例如第一细胞因子）和一种或多种另外的标记物（例如第二细胞因子）的选择可以调换相关图轴（correlation plot axes）和因此调换用于确定是落在特定取舍比、线和/或概图上方还是下方的测得的患者样品标记物水平指示病状的标准，并能够相应地调节该分析。

[0225] 本发明还提供获自分析物单分子分析的数据组。在一种示例性实施方案中，该数据组包括与收集自所述分析物的单分子测定的来自分析物的信号对应的至少一个数据点，所述测定具有小于 0.5pg/mL 的检测限和至少 2.5log 的动态范围。

[0226] 在另一方面，本发明提供商业方法。在一种实施方案中，本发明提供一种营业方法，包括由一个实体使用本发明的方法获得样品测定结果，报告所述结果，并为该结果报告向该实体付款。在一些实施方案中，该实体是临床实验室改进修正（CLIA）实验室。在一些实施方案中，该实体是非 CLIA 实验室的实验室。该样品可以是能够被单一粒子检测器分析的任何类型的样品。在一些实施方案中，该样品来自个体。该个体可以是如本文所述的任何类型的个体。在一些实施方案中，该个体是需要筛选、诊断、预后、监测和/或确定治疗方法的患者（例如动物，例如人类）。在一些实施方案中，该个体是参与临床试验或临床前试验研究的个体（例如动物，例如人类）。在一些实施方案中，该样品来自作为研究项目，例如医学研究、农业研究、工业研究、教育研究、生物恐怖主义研究等等的一部分的个体。在一些实施方案中，可以由接收该结果报告的个体，例如医疗保健专家和/或被抽取样品的个体，向进行该分析的实体，例如 CLIA 实验室付费，或者可以由被抽取样品的个体向从进行分析的实体接收报告的个体付费和/或向该实体本身付费，或其一定的组合。在另一实施方案中，本发明提供一种营业方法，包括由卫生保健提供者使用能够检测单一粒子的具有两个探测空间的检测器获得来自个体的样品的测定结果，将所述结果报告给该个体或他们的代表；并由该个体为所述结果报告付费。

[0227] 试剂盒

[0228] 本发明还提供进行本发明的分析的试剂盒。在一种示例性实施方案中，该试剂盒包括一种或多种捕获物类、可检测物类和磁性粒子。该试剂盒还包括用于实施本发明的方法的反应物或试剂。还提供进行本发明的测定的使用说明。实施例 2 中描述了示例性试剂盒及其在检测 IL-6 中的用途。

[0229] 提供下列实施例以阐述本发明的某些实施方案，并且这些和本发明的任何其它实

施方案是非限制性的。

[0230] 实施例

[0231] 实施例 1

[0232] 材料与方法

[0233] 材料

[0234] 抗体与分析物（重组体）获自 R&D Systems (Minneapolis, MN)。制造商建议是遵循匹配的抗体对。荧光染料和生物素琥珀酰亚胺酯（用于标记抗体）获自 Invitrogen (Carlsbad, CA)。大鼠、狗和猴 cTnI 从天然来源提纯，获自 Hytest (Sweden)。人柠檬酸锂血浆标本购自 Interstate 血库 (St. Louis, MO)。抗生物素蛋白链菌素涂布的顺磁性微粒 (MPs) 获自 Invitrogen (MyOne, #650-01)。采用制造商建议，抗体用荧光染料（检测抗体，通常为多克隆的）和生物素（捕获抗体，通常为单克隆的）标记。MPs 在饱和条件下用生物素化抗体涂布（按照制造商的建议），洗涤并储存在测定缓冲液中。测定缓冲液由 1% BSA、Tris- 缓冲盐水 (pH 7.4, 0.05% TritonX-100) 和异嗜白细胞 /HAMA 抗体阻断剂（购自 Scantibodies Laboratories, Roche Life Sciences）组成并按照制造商建议使用。

[0235] Erenna 免疫测定系统

[0236] 除非另行规定，如下进行典型的 Erenna 免疫测定。样品或标样（例如 50 μ L-100 μ L）用含有捕获抗体涂布的 MPs 的测定缓冲液稀释（例如 150 μ L），并在 96 孔板在 25°C 下在摇振下培育一至二小时。所有血浆或血清样品不经预处理而纯地测试。使用磁体床 (Ambion, Texas) 分离 MPs。移去上清液，MPs 洗涤一次并随后加入 20 μ L 的检测抗体 (50-500 μ g/mL，在测定缓冲液中稀释) 并在 25°C 下在摇振下培育 60 分钟。再次磁性分离该 MPs 并用 Tris- 缓冲盐水加 0.05% 的 Triton X-100 洗涤六次。在除去剩余的洗涤缓冲液后，加入 20 μ L 洗脱缓冲液 (4M 脲)。该试剂妨碍抗体 - 分析物相互作用，导致检测抗体从该 MPs 中释放。在每一 96- 孔中的溶液随即转移到 384- 孔滤板 (0.2 微米, AcroPrep, East Hills NY) 并在 3,000RPM 下离心 3 分钟以便令洗脱缓冲液中的检测抗体与 MPs 分离。384- 孔板中的洗脱和过滤的材料随后放置到该 Erenna 免疫测定系统 (Singulex, Inc.) 中。

[0237] Erenna 免疫测定系统

[0238] 该 Erenna 免疫测定系统基于单分子计数技术。液体从该 384 孔板的每个孔中吸出并泵送经过直径为 100 微米的毛细管流动池。液体流经该毛细管中的探测空间。如图 1 中所述，激光器发出的光经分色镜和共焦显微镜透镜导入该探测空间。当染料标记的抗体流经该空间时，它们发射荧光，经共焦显微镜透镜和光子探测器测量该荧光。来自该探测器的输出是一系列脉冲，每个脉冲代表检测到的一个光子。将这些脉冲发送到电子计数设备 (counting electronics)，在此计数 1 毫秒箱元中的脉冲。使用输出信号的组合获得 4.5+log 的动态报告范围。首先，确定背景水平，并基于该水平创造高于该背景 5 标准偏差阈。仅计数高于该阈的闪光。这些单个峰（无信号强度）在一分钟间隔内求和或直到获得 1,000 个峰。最终的信号是所有此类测得的事件的和，并称为检测事件 (DE)。第二输出称为事件光子 (EP)，是在所有检测事件中计数的光子的和。当两个分子在相同的 1 毫秒计数箱元内经过该探测器的概率相当大时，在更高的浓度下使用该测量。在最高的分析物浓度下，EP 事件开始饱和，使用总光子 (TP)，所有光子事件的总和。DE、EP 和 TP 信号用于生

成适于每种信号类型的加权四参数逻辑曲线。为了评估未知的浓度,从每个标准曲线上内插掉该 DE、EP 和 TP 信号以获得三个单独的浓度评估值。根据标准曲线的斜率用加权平均值结合这三个浓度。这提供了 $> 4.5 \log$ 的线性报道范围。

[0239] 结果

[0240] 这一部分陈述来自使用不同分析物的一系列不同试验的代表性数据,意在提供 Erenna 免疫测定系统的性能的概览。

[0241] 报道范围、线性、精确性和可重现性

[0242] 用人 IL-17 测定生成的典型信号数据的实施例显示在表 1 中。用于构造标准曲线的 DE、EP 和 TP 信号以粗体显示。为了确定曲线拟合的精确度,表 1 中的信号值用曲线拟合算法回插,结果显示为实测值 vs 预期值皮克 / 毫升。

[0243] 表 1. 来自人 IL-17Erenna 测定标准曲线的信号、回插值和回收率

[0244]

IL-17 pg/mL	# 检测事件/分钟			#光子事件/分钟			# 总光子/分钟			测得的IL IL-17 pg/mL			偏差	
	平均	SD	CV	平均	SD	CV	平均	SD	CV	平均	SD	CV		
1.000	8,920	2,268	25%	13,879,788	157,439	1%	159,161,873	2,366,288	1%	843	23.00	3%	84%	
500	10,538	78	1%	10,910,741	285,636	3%	88,854,604	233,442	0%	468	1.23	0%	94%	
250	10,185	171	2%	7,515,849	104,214	1%	46,946,733	3,717,269	8%	238	20.03	8%	95%	
125	10,250	217	2%	5,237,108	363,085	7%	25,753,075	1,564,066	6%	119	9.74	8%	96%	
63	10,005	45	0%	3,485,980	178,040	5%	14,781,797	870,996	6%	59	4.79	8%	94%	
31	9,639	182	2%	2,406,459	91,291	4%	9,325,716	326,061	3%	32	1.59	5%	102%	
16	8,507	103	1%	1,564,471	103,417	7%	6,690,690	176,886	3%	18	1.39	8%	116%	
7.8	6,428	211	3%	915,104	47,403	5%	5,043,196	52,626	1%	9.6	0.57	6%	123%	
3.9	3,999	54	1%	459,594	16,948	4%	4,077,945	30,411	1%	4.2	0.14	3%	108%	
1.95	2,111	192	9%	212,996	20,496	10%	3,634,021	33,976	1%	1.73	0.19	11%	88%	
0.98	1,189	33	3%	113,214	457	0%	3,414,771	10,274	0%	0.88	0.02	3%	90%	
0.24	342	14	4%	31,199	628	2%	3,256,437	6,346	0%	0.22	0.01	5%	92%	
0.12	211	8	4%	17,901	870	5%	3,236,763	24,896	1%	0.13	0.01	5%	103%	
0.06	125	15	12%	10,823	1,176	11%	3,203,629	3,476	0%	0.06	0.01	19%	99%	
0	64	12	19%	6,013	2,235	37%	3,211,483	8,892	0%	ND	-	-	1.	
													平均值	99%

[0245] 平均偏差 (实测值 / 预期值) 为 99% (范围 84-123%), 并从 60fg/mL 至 1ng/mL 观察到线性响应 ($R^2 = 0.99$; $y = 0.86 + 5.4x$), 在 $4.3 \log$ 报道范围上显示精确的曲线拟合。通过测量进入人血浆组 (5 和 50spike 皮克 / 毫升) 的分析物 (IL-17、IL-6 和人心肌肌钙蛋白 -I、cTnI) 的加标回收率, 测定生物样品中的量化精确度。在这两种浓度 (数据未显示) 下的平均%回收率均为 90% 至 110%。采用该 Erenna cTnI 免疫测定经八次连续运行 (经 6 天, 使用一批试剂和每天新鲜制备的校准剂) 并回插标准曲线的曲线拟合算法的精确度显示在图 2 中。在这些试验中, 所用最高浓度标准为 100 皮克 / 毫升。在显示的标准曲线的高端和低端均观察到线性 ($R^2 = 0.99$) 响应。在 > 0.78 皮克 / 毫升的所有值下, 用于校准剂的回插测定的这 8 个测定运行的 $CV < 10\%$ 。对 0.39 和 0.2 皮克 / 毫升的值该 CV 分别为 16% 和 23% (表 2)。使用被已知量的分析物掺杂的血浆或血清进行批间测定和批内测定精确度研究。作为用这些试验获得的结果的实例, 人 IL-17 测定产生 3-8% (IL-17 > 0.4 皮克 / 毫升) 和 10% (0.2 皮克 / 毫升) 的批内测定 (重复 4 次) CVs 以及 3-9% (IL-17 > 0.4 皮克 / 毫升) 和 11% (0.2 皮克 / 毫升) 的批间测定 (6 次测定运行) CVs。

[0246] 表 2. 人 cTnI 测定校准体系在 8 个测定运行 (6 天) 中的可再现性

cTnl									平均值		
	pg/mL	1轮	2轮	3轮	4轮	5轮	6轮	7轮	8轮	pg/mL	SD
100	101	101	104	96	97	99	99	98	100	3	3%
50	46	55	50	53	51	51	51	50	51	3	6%
25	26	24	24	26	26	27	24	25	25	1	4%
12.5	11.4	12.3	12.5	12.7	12.7	12.2	12.6	12.6	12.4	0.5	4%
6.3	6.6	6.1	6.2	6.2	6.5	6.5	6.6	6.3	6.4	0.2	3%
3.1	3.0	3.1	3.2	2.9	3.4	3.2	3.2	3.1	3.2	0.2	5%
1.6	1.7	1.7	1.6	1.6	1.8	1.8	1.4	1.5	1.7	0.1	8%
0.78	0.93	0.91	1.16	0.94	0.66	0.87	0.97	0.74	0.92	0.15	16%
0.39	0.38	0.49	0.30	0.40	0.25	0.44	0.32	0.49	0.37	0.08	23%
0.2	0.12	0.50	0.19	0.29	0.34	0.44	0.34	0.52	0.32	0.13	42%
0.1	0.00	0.03	1.02	0.26	0.11	0.05	0.05	0.23	0.22	0.36	168%

[0248] 灵敏度

[0249] Erenna 免疫测定系统的分析灵敏度或检出限 (LoD ;是指来自零分析物“背景”的信号的两个标准偏差除以 DE 信号的线性部分的斜率 ;这代表可以以 95% 置信度与背景信号区分的最低分析物浓度水平) 随分析物而变并取决于所用样品 (标准) 的体积。表 3 描述了在每个测定中使用两种不同样品体积的 10 个不同的 Erenna 人免疫测定的 LoD。

[0250] 表 3. 样品体积对 Erenna 系统免疫测定灵敏度 (LoD) 的影响

分析物	LoD		LoD		比例性
	体积 (μ L)	(pg/mL)	体积 (μ L)	(pg/mL)	
MCP-1	200	0.03	20	0.25	120%
RANTES	100	0.05	20	0.3	120%
VEGF	100	0.12	20	0.55	109%
IL-8	50	0.12	20	0.3	100%
IL-1a	200	0.01	20	0.1	100%
IL-7	200	0.02	10	0.3	133%
11-6	100	0.01	10	0.13	78%
TNF-a	200	0.02	10	0.4	100%
11-IB	150	0.02	10	0.3	100%
cTnl	100	0.11	10	1.2	92%

[0252] 较大的样品体积始终导致较低的 LoDs 和提高的灵敏度。例如,大于 50 μ L 的样品体积导致 0.01pg/mL (人 IL-6) 至 0.12pg/mL (人 VEGF) 的 LoDs。当样品体积降低时,LoDs 以成比例方式提高 (平均比例关系 105%)。我们已经发现,需要以测定特有方式改变测定缓冲液对样品 (血浆) 的体积比以实现最佳灵敏度,加标到样品中的分析物回收率和稀释线性度。表 3 中显示的测定体积显示了此类优化。所有测定以两步方式用 1-2 小时捕获和 1 小时检测来进行。

[0253] 进行试验以理解测定培育时间对测定灵敏度的影响。这些试验的目的在于理解在快速测试环境中使用该 Erenna 系统的潜在可用性。为此,培育步骤合并为单一步骤,使用 50 μ L 样品 (加 150 μ L 测定缓冲液) 进行 cTnI 测定并同时进行捕获和检测 (10 μ g/孔 MPs 和 100ng/mL 检测抗体) 反应。当培育时间提高时,测定灵敏度提高。这归因于作为时间函数的斜率响应的改善 (15 分钟,64 斜率 ;30 分钟,90 斜率 ;60 分钟,102 斜率 ;120 分钟,152 斜率),而测定背景 (零分析物校准剂的 DE 信号) 随时间保持恒定。要注意,使用 NIST 参考材料 (数据未显示) 时,即使培育 15 分钟,仍实现 0.61pg/mL 的 LoD。

[0254] 使用人 cTnI 测定的灵敏度确定获自 100 名捐血人的人血浆中 cTnI 范围 (50 μ L 样品量)。结果显示在图 3 中。该值为 < 2pg/mL 至 39pg/mL, 平均值为 2.19+/-4.1pg/mL。三种血浆具有 < 0.2pg/mL 的值, 该值为 LoD。第 99 百分点的值为 9pg/mL。如果从数据组中除去一个 39pg/mL 的明显的离群值, 该群体的平均值为 1.83+/-1.9pg/mL, 第 99 百分点的值为 8pg/mL。

[0255] 实施例 2

[0256] 材料与amp;方法

[0257] 材料

项目 #	描述	运送条件
1.	人 IL-6 标准稀释剂	冷装
2.	人 IL-6 捕获试剂	冷装
[0258] 3.	人 IL-6 检测试剂	冷装
4.	Eraenna TM 人 IL-6 免疫测定试剂盒说明书	N/A
5.	人 IL-6 标样(冷冻, 在单独的盒子中运送)	在干冰上
6.	10X 洗涤缓冲液	冷装
7.	洗涤缓冲液	冷装

[0259] 额外用品

[0260]

项目##	描述	制造商	部件编号	产品用途	包装细节
1.	Erenna™ 10X 系统缓冲液	Singulex	02-0111-00, 02-0111-01	系统(分析)缓冲液,用于运行 Erenna 系统的流体	1L(10L 混合) 2L(20L 混合)
2.	用于 12 通道移液管的储液器	VWR	80092-466	试剂转移	10/pkg
3.	96 孔 V 形底 PP 板, 500μL	Axygen	P-96-450V-C 或 P-96-450V-C-S	附加测定板,稀释	10 板/单位 5 单位/箱
4.	96 孔 深孔 PP 板 (2.2 毫升, 1.64 毫升或 1.09 毫升)	Axygen	P-2ML-SQ-C, PDW-20-C 或 P-DW-11-C	制备标准曲线(选择尺寸)	不定
5.	384 孔 圆底 PP, 120μL	Nunc	264573	接收器 / 分析板	20/pk 或 120/cs
6.	AcroPrep™384 滤板, 100μL, 用于样品制备和检测	Pall	5070	从测定中移出 MPs	10/pkg
7.	高级可刺穿密封盖, 聚乙烯	Nunc	235306	分析板用固定密封盖, 在 Erenna 运行铅使用	10 单位/pk 1000pks/cs
8.	AxySeal—PCRSP 板密封膜系列	Axygen	PCR-SP	培育 / 混合 / 储存过程中的密封板	100 薄膜 / 箱

[0261]

[0262] 磁性粒子

[0263]

项目##	描述	制造商	组成部件##	产品用途	包装细节
1.	Dynal MPC® -96S	Dynal™	120.27	稀土磁体,洗涤过 程中捕获 MP	1 板
2.	微孔板清洗站	-----	-----	捕获在磁体上之 后洗涤 MP	-----
3.	离心机 w/板转 子	-----	-----	经滤板移除 MP ~1,200xg	1
4.	离心机转换器 套	Pall	5225	使得适合于 b/n 384 孔滤板 384 孔测定板	2/pkg
5.	真空泵	Welch	2511B-01	脱气 系统缓冲	1
6.	微孔板培育器 /摇振器	Boekel Scientific	#130000 The Jitterbug™	培育板	1
7.	板密封辊, VWR 板辊, 膜+箔 CS1#	VWR	60941-118	固定板密封 永久板密封	1

[0264] 方法

[0265] 将捕获试剂 (100 μ L) 加入 96 孔聚丙烯板的每个孔中,接着加入 75 μ L 的标样 / 样品。覆盖该板并在室温下培育 / 摇振两小时。除去覆盖物,并将该板防止在磁体上一段足以令 MP 沉淀 / 积聚的时间。除去上清液。该板在磁体上时,加入洗涤缓冲液 (250 μ L)。2 分钟后,除去缓冲液。该板从磁体上移开,加入 IL-6 检测试剂 (20 μ L)。该板在 120x g 下脉冲离心,随后覆盖并在室温下培育 / 摇振 1 小时。将该板放置在磁体上大约 2 分钟,此时 MP 积聚。除去上清液。加入洗涤缓冲液 (250 μ L) 并除去 (3 \times), MP 通过磁力积聚在磁体附近。在各周期之间抽出缓冲液之前,粒子用每次施加的洗涤缓冲液培育 2 分钟。除去该磁体,加入洗涤缓冲液 (250 μ L) 并将该板摇振 10 秒钟以重新悬浮 MP。将该板的全部内容物转移到新的 96 孔板中。转移后,将该板放置在磁体上,2 分钟后除去上清液。将该板从磁体上移开,加入洗涤缓冲液 (250 μ L)。将该板摇振 10 秒钟。重复洗涤步骤。将该板从磁体上移开,向每个孔中加入洗脱缓冲液 (20 μ L)。该板在 120x g 下脉冲离心。覆盖该板,并在室温下培育 / 摇振 30 分钟。将滤板放置在 384 孔板上,并将该 96 孔板的内容物转移到该 384 孔板中。覆盖该滤板组合,并在 1200x g 下离心 1 分钟。将顶部滤板移开并丢弃。移开顶部滤板,用贯通板封盖覆盖该 384 孔板,将测定混合物转移到光学读数器中 (例如 Erenna System, Singulex)。

[0266] 结果

[0267] 下列是示例性曲线标准 IL-6 曲线。

[0268]

IL-6 [pg/ml]	平均 DE's	标准 差	%CV	平均EP's	标准差	%CV	平均 TP's	标准差	%CV	平均	Est[C] 标准差	%CV
37	9,828	57	1	2,728,786	93615	3	9,688,040	843,592	9	37.9	1.7	4
18.5	7,462	200	3	1,442,595	85859	6	6,603,869	178,146	3	17.4	1.0	6
9.25	5,350	379	7	856,045	36887	4	5,839,034	109,781	2	9.9	0.7	7
4.63	3,016	249	8	420,548	36860	9	5,271,331	103,553	2	4.3	0.7	17
2.31	1,587	57	4	206,927	8213	4	4,961,905	1,033	0	2.3	0.1	4
1.16	922	30	3	118,740	5344	5	5,050,734	253,349	5	1.1	0.22	20
0.58	507	44	9	61,654	6614	11	4,903,511	49,051	1	0.58	0.07	12
0.29	310	30	10	37,029	5315	14	4,852,156	48,862	1	0.28	0.04	15
0.14	209	7	3	25,680	6027	23	4,798,611	18,735	0	0.14	0.01	8
0.07	178	14	8	18,455	1217	7	4,826,107	127,787	3	0.09	0.02	25
0.036	148	12	8	16,506	1485	9	4303,060	29,556	1	0.06		
0	108	8	7	11,956	363	3	4,787,510	23,021	0	ND		

[0269] 本发明提供检测细胞类型之间化学差异和辨别正常与患病细胞样品的基本新型的方法。虽然已经提供了特定实施例,上面的描述是说明性的而非限制性的。审查该说明书后,公开的方法的许多变体是本领域技术人员显而易见的。因此本发明的范围不应参照上述说明书确定,而是应参照所附权利要求及其整个等同物范围确定。

[0270] 对本领域技术人员而言显而易见的是,上述技术,特别是诊断相关物类的单分子检测将可用于除本文中例举的那些之外的其它诊断物类。本文中所述的列举的技术作为实例且无意将本发明的范围限制为以明确的诊断物类形式使用。

[0271] 本说明书中提到的所有公开文献、专利和专利申请经此引用并入本说明书,完全就像各个公开文献、专利或专利申请明确地逐一被指出出于各种目的全文经此引用并入本文。

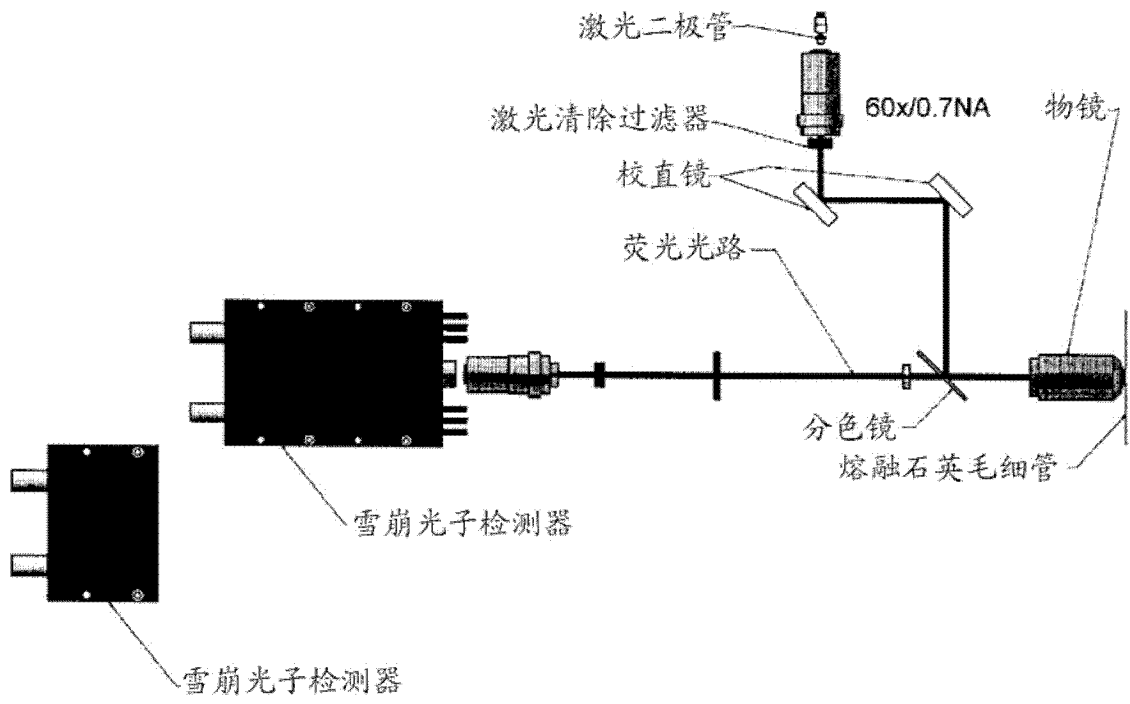


图 1

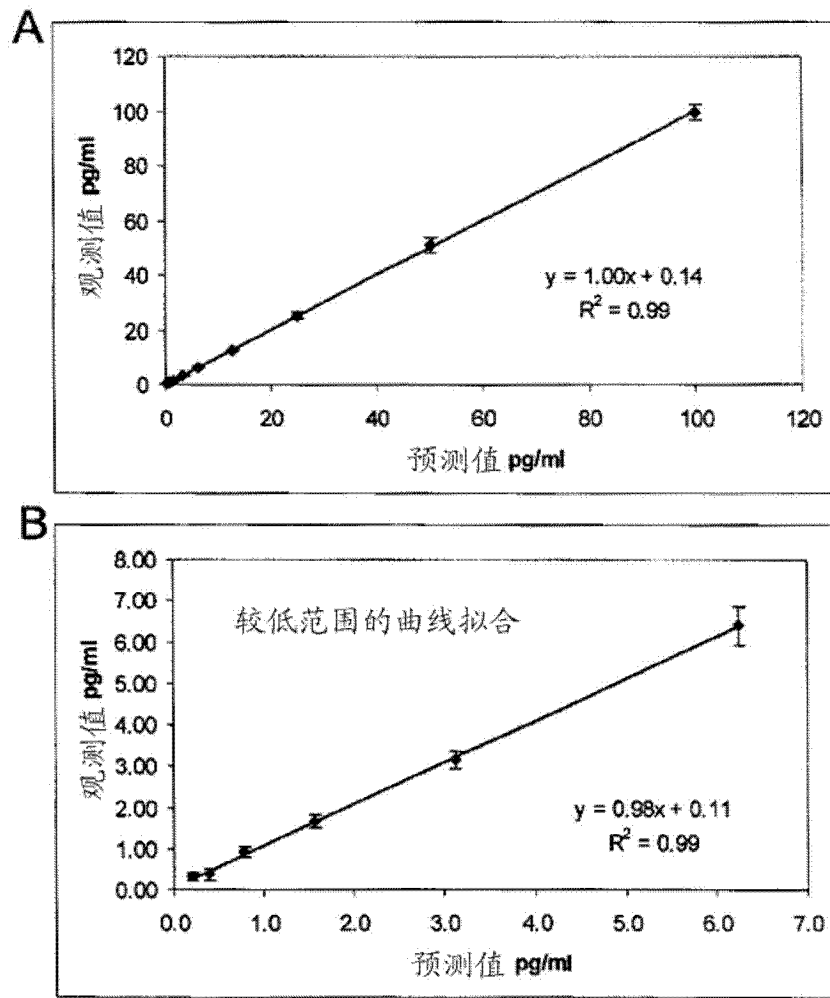


图 2

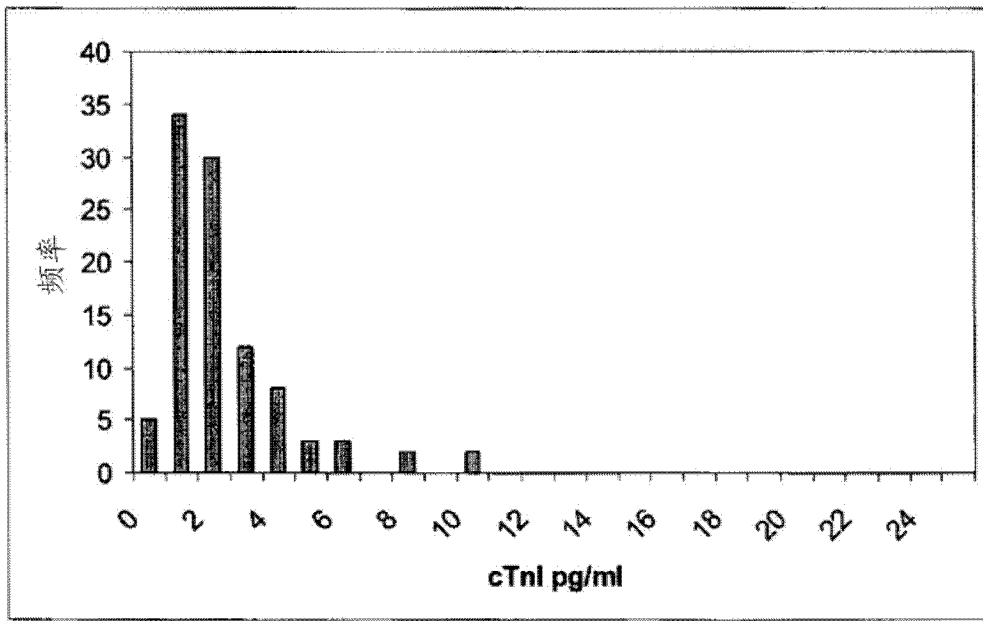


图 3

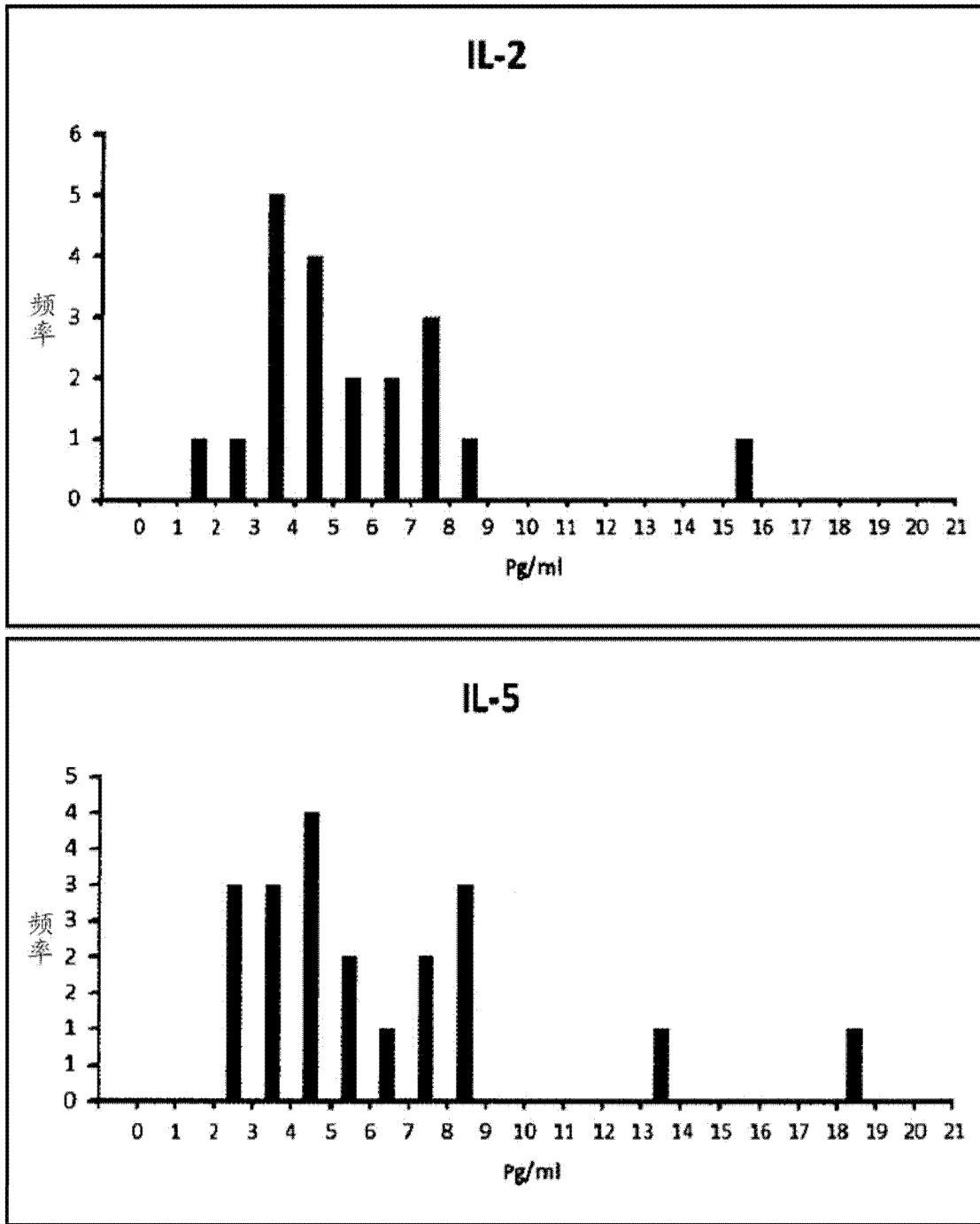


图 4A

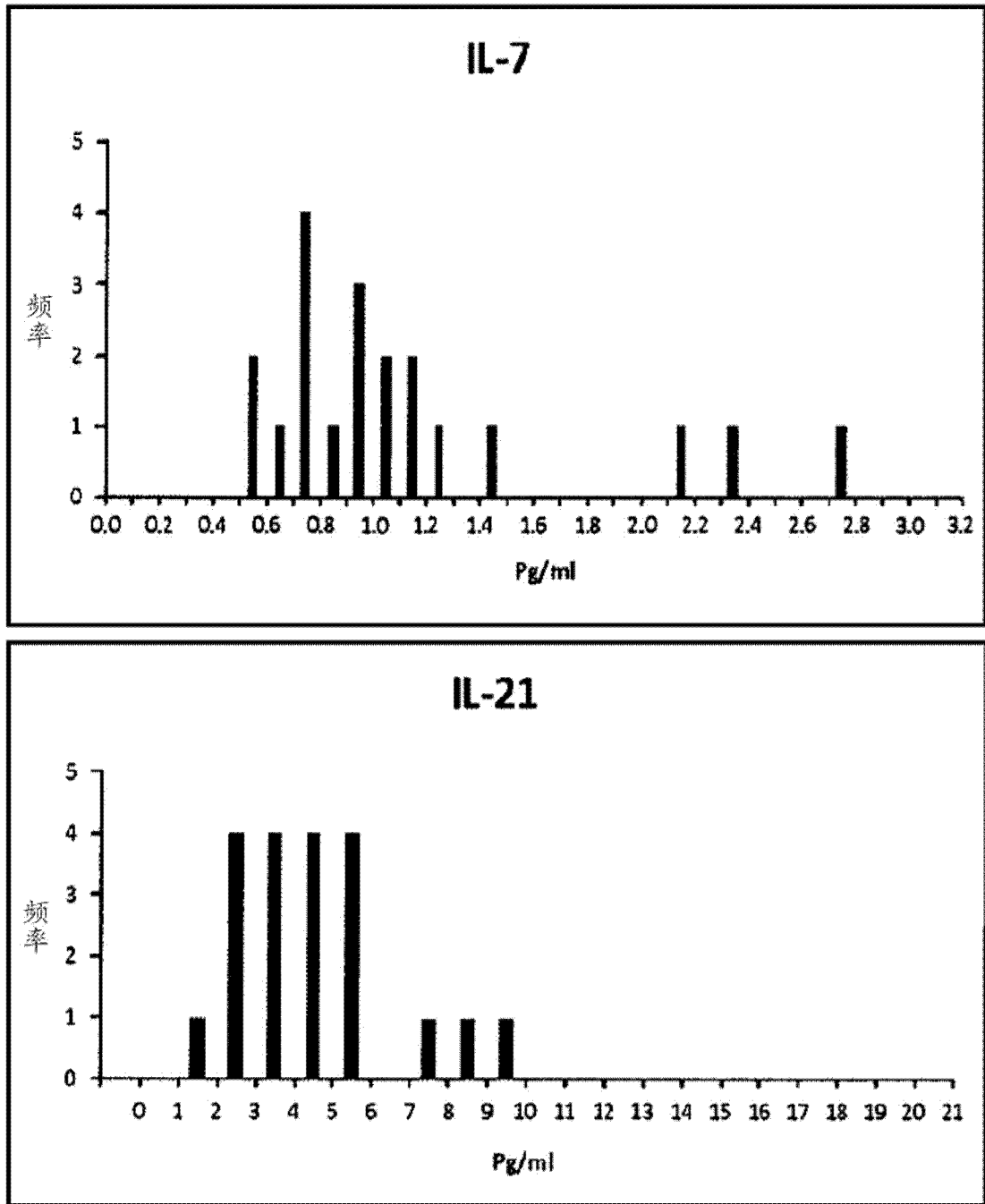


图 4B

样品号	性别	年龄	n	IL-2			IL-5			IL-7			IL-1b		
				[IL-2] pg/ml	SD	CV%	[IL-5] pg/ml	SD	CV%	[IL-7] pg/ml	SD	CV%	[IL-1b] pg/ml	SD	CV%
1	F	48	3	0.35	0.01	3	2.93	0.28	9	0.64	0.01	1	0.07	0.00	6
2	M	33	3	0.72	0.03	4	7.02	0.21	3	0.70	0.03	4	0.06	0.02	27
3	F	41	3	0.37	0.02	5	8.29	0.06	1	0.90	0.10	11	0.11	0.01	13
4	F	45	3	0.39	0.02	5	4.28	0.46	11	0.82	0.03	3	0.10	0.02	16
5	M	40	3	1.51	0.09	6	5.13	0.89	17	2.23	0.18	8	0.08	0.01	15
6	M	52	3	0.48	0.02	4	4.33	0.05	1	0.94	0.02	2	0.05	0.00	4
7	M	58	3	0.32	0.02	6	3.25	0.23	7	2.07	0.15	7	0.07	0.01	15
8	M	50	3	0.27	0.01	5	2.83	0.32	11	1.10	0.03	2	-	-	-
9	M	41	3	0.48	0.04	9	14.60	0.79	5	1.44	0.10	7	0.07	0.01	11
10	M	37	3	0.46	0.06	13	8.30	1.65	20	0.66	0.05	8	0.19	0.03	15
11	M	20	3	0.69	0.03	5	18.82	1.41	7	0.88	0.06	7	0.12	0.02	15
12	M	42	3	0.16	0.02	13	2.05	0.06	3	0.75	0.02	3	0.06	0.01	22
13	M	23	3	0.66	0.04	6	5.37	0.16	3	0.49	0.03	7	0.05	0.01	27
14	M	48	3	0.85	0.05	6	6.53	0.74	11	1.07	0.05	5	0.22	0.00	2
15	M	47	3	0.75	0.07	9	8.91	1.38	16	0.55	0.02	3	0.05	0.00	5
16	M	40	3	0.37	0.00	1	3.37	0.20	6	0.82	0.03	4	0.08	0.00	6
17	F	34	3	0.58	0.12	20	4.15	0.24	6	0.70	0.02	3	-	-	-
18	M	45	3	0.72	0.06	8	4.04	0.78	19	1.13	0.05	5	0.10	0.01	14
19	M	27	3	0.41	0.02	5	7.35	1.11	15	0.42	0.04	9	0.16	0.02	15
20	M	45	3	0.57	0.02	4	3.71	0.17	5	2.70	0.21	8	0.12	0.02	20

图 5A

样品号	性别	年龄	n	IFN- γ			IL-21			IL-6			IL-17A		
				[IFN γ] pg/ml	SD	CV%	[IL-21] pg/ml	SD	CV%	[IL-6] pg/ml	SD	CV%	[IL-17A] pg/ml	SD	CV%
1	F	48	3	3.07	0.18	6	1.85	0.20	11	1.07	0.02	1	ND	-	-
2	M	33	3	5.07	0.63	12	3.81	0.44	11	4.09	0.49	12	0.34	0.03	8
3	F	41	3	3.38	0.18	5	5.73	0.44	8	8.90	1.38	15	0.23	0.01	4
4	F	45	3	3.49	0.52	15	4.98	0.19	4	1.94	0.03	2	0.07	0.01	13
5	M	40	3	3.20	0.10	3	7.18	0.38	5	0.83	0.07	9	0.10	0.01	14
6	M	52	3	2.75	0.12	4	5.17	0.10	2	4.30	0.27	6	ND	-	-
7	M	58	3	2.68	0.25	9	5.53	1.63	30	2.91	0.04	1	ND	-	-
8	M	50	3	2.66	0.11	4	2.12	0.05	2	0.48	0.06	12	ND	-	-
9	M	41	3	5.13	0.55	11	4.72	0.24	5	1.26	0.04	3	ND	-	-
10	M	37	3	4.65	0.16	3	9.26	0.87	9	0.81	0.08	9	0.18	0.03	16
11	M	20	3	4.18	0.30	7	8.76	0.34	4	0.56	0.02	3	0.35	0.03	9
12	M	42	3	2.56	0.21	8	2.83	0.52	18	2.88	0.34	12	0.51	0.62	122
13	M	23	3	5.01	0.44	9	3.45	0.34	10	0.79	0.14	17	ND	-	-
14	M	48	3	6.65	0.40	6	5.85	0.53	9	0.85	0.05	6	0.06	0.03	41
15	M	47	3	4.82	0.39	8	3.61	0.24	7	1.84	0.48	26	0.27	0.04	15
16	M	40	3	2.95	0.08	3	2.28	0.47	21	1.08	0.07	6	ND	-	-
17	F	34	3	5.02	0.01	0	3.49	0.24	7	0.84	0.09	14	0.10	0.00	4
18	M	45	3	3.68	0.32	9	4.43	0.59	13	1.22	0.10	8	0.16	0.03	17
19	M	27	3	3.79	0.08	2	2.93	0.24	8	0.99	0.02	2	ND	-	-
20	M	45	3	3.80	0.29	8	4.41	0.32	7	2.16	0.09	4	0.58	0.08	13

图 5B

样品号	性别	年龄	n	TNF-a			IL-4			IL-1a			GM-CSF		
				[TNFa] pg/ml	SD	CV%	[IL-4] pg/ml	SD	CV%	[IL-1a] pg/ml	SD	CV%	[GM-CSF] pg/ml	SD	CV%
1	F	48	3	1.21	0.14	11	ND	-	-	0.30	0.04	15	0.33	0.05	16
2	M	33	3	1.42	0.20	14	0.29	0.04	14	ND	-	-	0.73	0.03	4
3	F	41	3	0.93	0.04	5	0.19	0.01	3	0.27	0.04	16	0.63	0.07	11
4	F	45	3	1.12	0.03	3	0.48	0.05	10	0.12	0.05	39	0.56	0.06	10
5	M	40	3	0.95	0.09	9	0.47	0.10	21	0.15	0.04	26	0.46	0.11	23
6	M	52	3	2.07	0.15	7	0.49	0.05	9	0.07	0.00	6	0.81	0.04	5
7	M	58	3	0.63	0.03	4	0.29	0.04	15	0.47	0.03	6	0.70	0.01	2
8	M	50	3	0.99	0.05	5	0.35	0.06	17	ND	-	-	0.35	0.01	2
9	M	41	3	0.94	0.09	10	ND	-	-	0.10	0.00	3	0.71	0.02	2
10	M	37	3	0.68	0.02	3	0.74	0.05	7	0.21	0.03	15	0.69	0.09	13
11	M	20	3	1.47	0.04	3	0.77	0.21	28	0.48	0.01	3	1.10	0.09	8
12	M	42	3	0.67	0.04	6	0.33	0.09	28	ND	-	-	0.59	0.12	21
13	M	23	3	0.83	0.05	6	0.60	0.09	14	ND	-	-	0.67	0.09	13
14	M	48	3	1.50	0.13	9	0.44	0.20	45	0.13	0.06	44	0.47	0.04	9
15	M	47	3	1.37	0.21	16	0.46	0.16	34	ND	-	-	1.07	0.03	3
16	M	40	3	1.19	0.10	9	ND	-	-	ND	-	-	0.43	0.02	4
17	F	34	3	1.00	0.05	5	0.63	0.07	11	0.28	0.06	19	0.44	0.02	4
18	M	45	3	2.08	0.06	3	0.68	0.07	10	0.14	0.03	21	0.83	0.05	6
19	M	27	3	1.15	0.03	3	0.75	0.06	8	0.16	0.01	8	0.65	0.07	10
20	M	45	3	2.68	0.34	13	0.40	0.06	16	0.26	0.03	10	0.76	0.02	2

图 5C

样品号	性别	年龄	n	IL-12			G-CSF			IL-22			IL-10		
				[IL-12] pg/ml	SD	CV%	[G-CSF] pg/ml	SD	CV%	[IL-22] pg/ml	SD	CV%	[IL-10] pg/ml	stdev	CV%
1	F	48	3	0.11	0.01	10	31.14	1.92	6	9.09	0.28	3	11.96	0.06	0
2	M	33	3	0.14	0.02	15	52.88	3.74	7	11.91	0.18	2	19.39	0.67	3
3	F	41	3	0.17	0.03	18	SAT	SAT	SAT	28.16	2.28	8	22.09	0.67	3
4	F	45	3	0.18	0.03	14	30.85	2.67	9	7.90	0.31	4	16.16	1.37	8
5	M	40	3	0.17	0.02	15	35.60	2.74	8	9.21	0.46	5	29.80	0.39	1
6	M	52	3	0.10	0.00	3	39.82	2.72	7	5.48	0.19	4	35.29	0.89	3
7	M	58	3	0.16	0.01	8	59.99	4.95	8	4.33	0.26	6	17.56	1.44	8
8	M	50	3	0.08	0.02	20	25.09	2.38	9	3.83	0.41	11	13.43	0.79	6
9	M	41	3	0.22	0.04	19	44.69	1.70	4	16.11	0.40	2	14.20	0.85	6
10	M	37	3	0.42	0.04	10	26.38	1.36	5	6.02	0.47	8	16.05	1.17	7
11	M	20	3	0.96	0.13	14	24.91	0.27	1	8.61	0.52	6	18.53	0.03	0
12	M	42	3	0.10	0.00	0	36.06	2.08	6	14.35	1.09	8	15.96	0.63	4
13	M	23	3	0.22	0.02	10	45.76	2.21	5	6.30	0.71	11	22.39	0.46	2
14	M	48	3	0.19	0.04	21	51.72	1.39	3	8.59	0.45	5	13.87	0.38	3
15	M	47	3	0.19	0.04	21	48.38	0.79	2	7.75	0.25	3	29.21	0.95	3
16	M	40	3	0.12	0.03	26	25.45	3.21	13	6.96	0.20	3	11.44	0.45	4
17	F	34	3	0.09	0.03	33	96.85	1.36	1	30.83	1.82	6	10.67	1.35	13
18	M	45	3	0.14	0.03	21	93.75	5.14	5	38.74	1.77	5	24.87	0.31	1
19	M	27	3	0.14	0.03	20	53.82	2.12	4	6.52	0.14	2	15.59	0.18	1
20	M	45	3	0.22	0.02	11	88.52	3.96	4	14.52	0.77	5	10.16	0.37	4

图 5D

样品号	性别	年龄	MIP-1a			IL-15			IL-22			IL-10		
			[MIP-1a] pg/ml	stdev	CV%	[IL-15] pg/ml	stdev	CV%	[IL-22] pg/ml	SD	CV%	[IL-10] pg/ml	stdev	CV%
1	F	48	34.08	2.50	7	1.31	0.22	17	9.09	0.28	3	11.96	0.06	0
2	M	33	24.10	0.32	1	1.74	0.24	14	11.91	0.18	2	19.39	0.67	3
3	F	41	26.68	1.18	4	2.19	0.23	11	28.16	2.28	8	22.09	0.67	3
4	F	45	63.24	3.96	6	2.17	0.35	16	7.90	0.31	4	16.16	1.37	8
5	M	40	39.12	3.19	8	1.24	0.18	14	9.21	0.46	5	29.80	0.39	1
6	M	52	46.23	2.59	6	2.40	0.23	10	5.48	0.19	4	35.29	0.89	3
7	M	58	33.07	0.95	3	1.43	0.13	9	4.33	0.26	6	17.56	1.44	8
8	M	50	27.64	0.86	3	1.26	0.09	7	3.83	0.41	11	13.43	0.79	6
9	M	41	29.13	0.67	2	2.80	0.76	27	16.11	0.40	2	14.20	0.85	6
10	M	37	56.91	2.49	4	2.71	0.13	5	6.02	0.47	8	16.05	1.17	7
11	M	20	24.38	0.95	4	3.88	0.16	4	8.61	0.52	6	18.53	0.03	0
12	M	42	24.32	1.28	5	1.49	0.38	25	14.35	1.09	8	15.96	0.63	4
13	M	23	33.62	1.76	5	2.85	0.21	7	6.30	0.71	11	22.39	0.46	2
14	M	48	27.77	1.26	5	2.20	0.49	22	8.59	0.45	5	13.87	0.38	3
15	M	47	36.52	1.03	3	2.40	0.43	18	7.75	0.25	3	29.21	0.95	3
16	M	40	57.71	0.28	0	1.65	0.23	14	6.96	0.20	3	11.44	0.45	4
17	F	34	26.58	1.48	6	1.78	0.24	13	30.83	1.82	6	10.67	1.35	13
18	M	45	30.58	1.19	4	3.30	0.35	11	38.74	1.77	5	24.87	0.31	1
19	M	27	22.26	2.36	11	1.50	0.12	8	6.52	0.14	2	15.59	0.18	1
20	M	45	45.56	2.36	5	2.05	0.29	14	14.52	0.77	5	10.16	0.37	4

图 5E

样品号	性别	年龄		IL-5/IL-2	IL-5/IL-7	IL-5/IL-21
1	F	48	3	8.5	4.6	1.6
2	M	33	3	9.7	10.1	1.8
3	F	41	3	22.3	9.2	1.4
4	F	45	3	10.8	5.2	0.9
5	M	40	3	3.4	2.3	0.7
6	M	62	3	9.0	4.6	0.8
7	M	58	3	10.1	1.6	0.6
8	M	50	3	10.7	2.6	1.3
9	M	41	3	30.3	10.2	3.1
10	M	37	3	18.0	12.5	0.9
11	M	20	3	27.3	21.4	2.1
12	M	42	3	12.9	2.7	0.7
13	M	23	3	8.2	10.9	1.6
14	M	48	3	7.7	6.1	1.1
15	M	47	3	11.9	16.1	2.5
16	M	40	3	9.1	4.1	1.5
17	F	34	3	7.1	5.9	1.2
18	M	45	3	5.6	3.6	0.9
18	M	27	3	17.9	17.4	2.5
20	M	45	3	6.6	1.4	0.8

图 6

专利名称(译)	单分子测定		
公开(公告)号	CN102216778A	公开(公告)日	2011-10-12
申请号	CN200980146315.4	申请日	2009-09-18
[标]申请(专利权)人(译)	神谷来克斯公司		
申请(专利权)人(译)	神谷来克斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	神谷来克斯公司		
[标]发明人	约翰托德		
发明人	约翰·托德		
IPC分类号	G01N33/537 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/6827 G01N33/54333 G01N33/6869 G01N33/74 G01N2333/46 G01N2333/4712 G01N2333/475 G01N2333/525 G01N2333/535 G01N2333/54 G01N2333/5412 G01N2333/5418 G01N2333/545 G01N2333/555		
代理人(译)	刘蕾		
优先权	61/098712 2008-09-19 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了用于分析、诊断或预后测定的物类的单分子分析。在示例性实施方案中，该测定利用公开方法所制备的样品，提供具有出乎意料的灵敏度和鲁棒性的测定。参考细胞因子测定以非限制性方式描述了该方法。

