

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-510929

(P2007-510929A)

(43) 公表日 平成19年4月26日(2007.4.26)

| (51) Int.Cl.                   | F I                   | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|-----------------------|-------------|
| <b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b> | GO 1 N 33/543 5 4 1 Z |             |
| <b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>  | GO 1 N 33/53 K        |             |
| <b>GO 1 N 33/15 (2006.01)</b>  | GO 1 N 33/53 P        |             |
|                                | GO 1 N 33/543 5 7 5   |             |
|                                | GO 1 N 33/15 Z        |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁)   |                       |             |

(21) 出願番号 特願2006-539689 (P2006-539689)  
 (86) (22) 出願日 平成16年11月4日 (2004. 11. 4)  
 (85) 翻訳文提出日 平成18年7月5日 (2006. 7. 5)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/037077  
 (87) 国際公開番号 W02005/045396  
 (87) 国際公開日 平成17年5月19日 (2005. 5. 19)  
 (31) 優先権主張番号 60/517, 651  
 (32) 優先日 平成15年11月5日 (2003. 11. 5)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/517, 713  
 (32) 優先日 平成15年11月5日 (2003. 11. 5)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

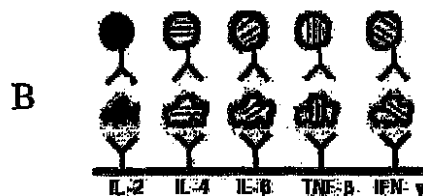
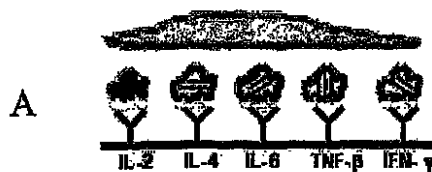
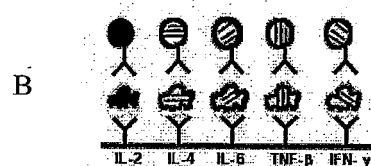
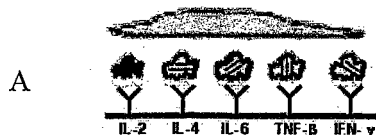
(71) 出願人 506154731  
 トレリス バイオサイエンシーズ インコーポレーティッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サン フランシスコ コーポレート  
 ドライブ 2ービー  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100128048  
 弁理士 新見 浩一  
 (72) 発明者 カウバル ローレンス エム.  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サン フランシスコ コーポレート  
 ドライブ 2ービー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物分析物の検出方法における微粒子標識の使用

## (57) 【要約】

様々な色で利用することができ、かつサブミクロンの範囲の大きさである、識別可能な微粒子標識の使用に関する新たな適用について記載する。これらの適用には、細胞成分のプロファイリング、分泌パターンの取得、クロマトグラフィーまたは電気泳動法における様々な成分の同定、および所望の免疫グロブリンを分泌する細胞の同定が含まれる。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

試料表面上に重層した透過性の膜支持体上で細胞を支持する段階、および細胞成分を、膜を透過させ試料表面上に堆積させる段階を含む、個々の細胞に結合する成分サブセットの特徴づけに使用し得る試料を取得する方法であって、それによって膜上の該細胞の位置と試料表面の位置が相関づけられ得り、それによって該個々の細胞に結合する成分の試料が得られる方法。

## 【請求項 2】

膜支持体が、膜上に堆積した細胞の位置を維持するのに十分半固体である基質でコーティングされる、請求項1記載の方法。 10

## 【請求項 3】

基質がメチルセルロースからなる、請求項2記載の方法。

## 【請求項 4】

試料表面を顕微鏡で調べて、該試料表面上に存在する成分を決定する段階をさらに含む、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 5】

3つ以上の成分を決定する、請求項4記載の方法。

## 【請求項 6】

表面上の成分が微粒子標識で標識され、該標識それぞれが、成分に特異的な結合パートナーを含みかつ特徴的な色を有する、請求項5記載の方法。 20

## 【請求項 7】

各成分の存在および量を決定して、該細胞の該成分に関するプロフィールを取得する、請求項6記載の方法。

## 【請求項 8】

成分がレポーター遺伝子の産物である、請求項4～7のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 9】

細胞がT細胞であり、成分が少なくとも3つの異なるサイトカインを含む、請求項4～7のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 10】

疾患状態を評価すべき対象のT細胞集団を代表する少なくとも50個のT細胞に対して行われる、請求項9記載の方法。 30

## 【請求項 11】

細胞を溶解する、請求項4～7のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 12】

細胞が溶解した細菌である、請求項4～7のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 13】

細胞が初代B細胞、不死化B細胞、またはハイブリドーマであり、決定すべき成分が特定の抗原またはエピトープに特異的な抗体である、請求項2～7のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 14】

基質が、抗体と非特異的に結合する物質と結合している、請求項13記載の方法。 40

## 【請求項 15】

物質がプロテインAである、請求項14記載の方法。

## 【請求項 16】

標識の前に、細胞を薬剤または他の外部刺激に曝露する段階をさらに含む、請求項6～15のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 17】

細胞が組織試料中に含まれ、および/または複数の薬剤用量が用いられる、請求項16記載の方法。

## 【請求項 18】

細胞を薬剤または刺激に曝露していない条件下で観察される微粒子標識の数および性質を、細胞を該薬剤または外部刺激に曝露した場合に観察される微粒子標識の数および性質と比較し、それにより該薬剤および外部刺激が該細胞に及ぼす影響を決定する、請求項16または17記載の方法。

【請求項19】

以下の段階を含む、単一細胞に結合する様々な細胞成分の有無を決定する方法：

該単一細胞またはその成分を、異なる色を有する様々な微粒子標識と接触させる段階であって、異なる色の粒子それぞれが、細胞成分に特異的な結合パートナーと結合しており、かつ、該単一細胞または成分が、該成分を保持するが未結合の微粒子標識を保持しない試料表面上に堆積している、段階；

10

未結合の微粒子標識を除去する段階；ならびに

顕微鏡観察手段により、試料表面上の該細胞または成分と結合している微粒子標識の数および性質を観察する段階。

【請求項20】

各成分の存在および量を決定して、該細胞の該成分に関するプロフィールを取得する、請求項19記載の方法。

【請求項21】

成分がレポーター遺伝子の産物である、請求項19または20記載の方法。

【請求項22】

細胞がT細胞であり、成分が少なくとも3つの異なるサイトカインを含む、請求項19または20記載の方法。

20

【請求項23】

疾患状態を評価すべき対象のT細胞集団を代表する少なくとも50個のT細胞に対して行われる、請求項22記載の方法。

【請求項24】

細胞を溶解する、請求項19または20記載の方法。

【請求項25】

細胞が溶解した細菌である、請求項24記載の方法。

【請求項26】

細胞が初代B細胞；不死化B細胞、またはハイブリドーマであり、決定すべき成分が特定の抗原またはエピトープに特異的な抗体である、請求項19または20記載の方法。

30

【請求項27】

接触させる前に、細胞を薬剤または他の外部刺激に曝露する段階をさらに含む、請求項19～26のいずれか一項記載の方法。

【請求項28】

細胞が組織試料中に含まれ、および/または複数の薬剤用量が用いられる、請求項27記載の方法。

【請求項29】

細胞を薬剤または刺激に曝露していない条件下で観察される微粒子標識の数および性質を、細胞を該薬剤または外部刺激に曝露した場合に観察される微粒子標識の数および性質と比較し、それにより該薬剤および外部刺激が該細胞に及ぼす影響を決定する、請求項27または28記載の方法。

40

【請求項30】

以下の段階を含む、単一細胞の成分のプロフィールを取得する方法：

該成分の試料に、それぞれ決定すべき成分に特異的な結合パートナーを有し、かつ特徴的な色を有する様々な微粒子標識を提供する段階、および

該標識と該単一細胞の成分の結合を顕微鏡で観察する段階、および

該細胞の各成分と結合している粒子の数を評価し、それにより単一細胞の成分のプロフィールを取得する段階。

【請求項31】

50

プロフィールがn次元空間における位置により表され、nは特異的結合パートナー含有微粒子標識が提供されている成分の数である、請求項30記載の方法。

【請求項 3 2】

細胞がT細胞であり、成分が少なくとも3つの異なるサイトカインを含む、請求項30または31記載の方法。

【請求項 3 3】

疾患状態を評価すべき対象のT細胞集団を代表する少なくとも50個のT細胞に対して行われる、請求項32記載の方法。

【請求項 3 4】

細胞がB細胞であり、決定すべき成分が特定の抗原またはエピトープに特異的な抗体である、請求項30または31記載の方法。 10

【請求項 3 5】

少なくとも1つの微粒子標識が抗原に特異的な抗体と結合し、少なくとも1つの標識が抗原特異性にかかわらず抗体と結合する、請求項34記載の方法。

【請求項 3 6】

標識する前に、細胞を薬剤または他の外部刺激に曝露する段階をさらに含む、請求項30～35のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 7】

細胞が組織試料中に含まれ、および/または複数の薬剤用量が用いられる、請求項36記載の方法。 20

【請求項 3 8】

細胞を薬剤または刺激に曝露していない条件下で観察される微粒子標識の数および性質を、細胞を該薬剤または外部刺激に曝露した場合に観察される微粒子標識の数および性質と比較し、それにより該薬剤および外部刺激が該細胞に及ぼす影響を決定する、請求項36または37記載の方法。

【請求項 3 9】

以下の段階を含む、所望の免疫グロブリンを分泌させるために不死化され得る細胞を同定する方法：

抗原またはエピトープに非依存的な免疫グロブリンに対する第1の特異的結合パートナーを含む少なくとも1つの第1の微粒子標識で、および該抗原またはエピトープに特異的な免疫グロブリンに対する第2の特異的結合パートナーを含む少なくとも1つの第2の微粒子標識で、個々のB細胞それぞれを処理することにより、脾臓、リンパ節、粘膜関連リンパ組織、または末梢血に由来する該B細胞を、抗原またはエピトープに対する抗体の分泌に関して試験する段階；ならびに 30

該細胞に結合している該第1および第2の微粒子標識の数を顕微鏡により決定し、それによって、該第1および第2の標識がほぼ同数結合している細胞を、該免疫グロブリンを分泌させるために不死化され得る細胞として同定する段階。

【請求項 4 0】

各細胞が膜上で支持され、任意の分泌抗体が該膜の下の試料表面において収集される、請求項39記載の方法。 40

【請求項 4 1】

一連の個々のB細胞において行われ、試料表面の位置が膜上の各細胞の位置と関連づけられる、請求項40記載の方法。

【請求項 4 2】

膜が細胞を膜に固定するための基質をさらに含む、請求項40または41記載の方法。

【請求項 4 3】

基質が、抗原およびエピトープ非依存的様式で免疫グロブリンと結合する試薬を含む、請求項42記載の方法。

【請求項 4 4】

所望の免疫グロブリンを分泌すると同定されたB細胞を不死化する段階をさらに含む、 50

請求項39～43のいずれか一項記載の方法。

【請求項45】

以下の段階を含む、所望の特異性および親和性を有する免疫グロブリンを分泌する細胞を同定する方法：

膜上に細胞を提供する段階であって、該膜が、分泌された免疫グロブリンに対して透過性を有し、かつ免疫グロブリン用捕獲試薬を任意に含む試料表面を覆っている、段階；

細胞を含む膜を除去する段階；

試料表面を、それぞれ識別可能な微粒子標識で標識された様々なエピトープおよび抗原でプロービングする段階；

所望のエピトープおよび抗原と結合するが望ましくないエピトープおよび抗原とは結合しない表面の位置を選択する段階；ならびに

同定された表面の位置と膜上の細胞の位置とを相関づける段階。

【請求項46】

細胞が一連の単一細胞として膜上に配置される、請求項45記載の方法。

【請求項47】

単一細胞が、免疫化した脊椎動物の脾臓または血漿に由来するB細胞である、請求項46記載の方法。

【請求項48】

第1の粒子よりも小さな直径を有する様々な第2の粒子とその表面においてさらに結合している、特徴的な色を有する第1の粒子を含む微粒子標識であって、該第2の粒子が該第1の粒子とおおよび相互に異なる色を有する、微粒子標識。

【請求項49】

第1の粒子が直径200～500 nmを有し、第2の粒子が直径10～100 nmを有する、請求項48記載の標識。

【請求項50】

第2の粒子が共有結合により第1の粒子の表面と結合している、請求項49記載の標識。

【請求項51】

色がそれぞれ少なくとも2つのシグナル生成部分により生成される、請求項50記載の標識。

【請求項52】

シグナル生成部分がフルオロフォアである、請求項51記載の方法。

【請求項53】

色の異なる様々な第1の粒子を含む、請求項48～52のいずれか一項記載の微粒子標識の収集物。

【請求項54】

以下の段階を含む、可溶化生物試料中の様々な成分の有無を検出する方法：

可溶化生物試料の成分を、電気泳動またはクロマトグラフィーによる単一の移動経路で分離する段階であって、各成分がその微粒子標識によって結合する特徴的な色を有するよう、該成分が微粒子標識で標識されている、段階；および

顕微鏡観察手段により、該移動経路におけるそれぞれの位置で、分離された成分の特徴的な色を検出し、それによって各成分の有無を検出する段階。

【請求項55】

成分がddNTPと結合しており、分離段階が配列決定の一部として行われる、請求項54記載の方法。

【請求項56】

以下の段階を含む、組織試料を特徴づける方法：

該試料を様々な微粒子標識と接触させる段階であって、標識がそれぞれ、該組織の成分に特異的な結合パートナーを含み、かつ特徴的な色を含む、段階；ならびに

該組織試料を顕微鏡で観察して、各微粒子標識の数および位置を決定する段階。

【請求項57】

を含む、胚発生に重要な増殖因子を同定する方法であって、

少なくとも1つの第1および第2の胚様体を様々な微粒子標識で標識する段階であって、各標識が、該胚様体の細胞型に特異的な結合パートナーを含み、かつ特徴的な色を有し、該第1の胚様体が、候補増殖因子で処置された、段階；ならびに

該第1および第2の胚様体中の少なくとも2つの細胞型の数を比較し、それによって、該第2の胚様体と比較して該第1の胚様体中の細胞型の数が増加したことが、該細胞型の増殖因子として該候補化合物を同定する段階。

【請求項58】

膜の表面における乱れを最小限に抑えながら試料表面から膜を除去する方法であって、吸引を最小限に抑えるために開口部が提供された試料表面から膜を持ち上げる段階を含む方法。 10

【請求項59】

アッセイ法が細胞を含む膜を表面から除去することを含む試験を試料表面上で行うための装置であって、該試料表面に隣接した開口部が提供された試料ウェルを含む装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本発明は、識別可能な種類の範囲にわたって特有の色が調整され得るシグナル生成部分を含むサブミクロンサイズの微粒子標識を利用し、それによって様々な多重アッセイ法が可能になる方法に関する。本発明はまた、多重粒子が好ましいが限定的ではない態様を提供するアッセイ法に関する。本発明はまた、新規薬剤の臨床試験および処置手順に対する個々の対象の反応の評価の分野に関する。 20

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、2003年11月5日に出願した米国特許仮出願第60/517,651号および2003年11月5日に提出した同第60/517,713号に関する。これらの書類の内容は参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0003】

背景技術

試料を様々な試薬に対する反応性について試験することが望ましい場合が多い。例えば、サイトカイン分泌プロファイリングでは、特定の組織から分泌されたタンパク質が、関心対象と考えられるファミリーメンバーが数十から数百ある抗原ファミリーに対して産生された一群の抗体と免疫反応する能力が必要とされる。この場合、抗体-抗原複合体の存在の検出は通常、標識が複合体中の抗体に結合しているか、または標識が結合している二次抗体を一次抗体に結合させることを必要とする。次いで、標識の検出によって試料中の抗体-抗原複合体の存在が確認される。

【0004】

通常、二次抗体はビオチン化ヤギ抗一次IgGであり、これはアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼと反応し、レドックス感受性変色指示薬および基質（過酸化水素）の存在下において例えばフィルター上で変色し、抗体-抗原複合体の存在を示す。または、二次抗体をビオチン化する代わりに、<sup>125</sup>I-標識二次抗体を使用することもできる。<sup>125</sup>I-標識二次抗体を使用する場合には、フィルターをX線フィルムに曝露することで、抗体-抗原複合体の検出が可能になる。 40

【0005】

これらの標識から放出されるシグナルは、関心対象のタンパク質の発現レベルが低い場合または試料の供給量が限定されるために、検出するのに十分ではない場合が多い。さらに、それぞれの抗原に対して産生された抗体を用いて試料中のいくつかの異なる抗原の存在を検出することは可能であるが、すべての抗体の読み取りが共通しているために、前も 50

って分画するか（例えば、ゲル電気泳動による）または試料の分割量を平行してアッセイする（チップ上の別の位置での捕獲または組み合わせにより着色した粒子セットを含む）ことなしに、1つの抗原-抗体複合体を別の複合体から明らかに識別することは不可能である。感度の問題について取り組むには、抗原が少量で存在する場合でさえも試料中の抗原の検出を可能にするのに十分強いシグナルを放出する標識を得ることが有利であると考えられる。識別可能なシグナルを有する標識のファミリーにより、複合体混合物中の複数の抗原の存在を決定することもさらに有利であると考えられる。例えば、HLA抗原に関する血清学的組織適合試験では、約6つの遺伝子座を各遺伝子座において数十から数百の対立遺伝子変種に関して探索する。所与の個体は各遺伝子座について最大限で2つの対立遺伝子を発現するが、適合試験を完了するには数百の別個のアッセイが必要である。多重化することにより全アッセイを1つの試料において行うことができ、より効率的な系が提供される。このような適用では、単一の染色試薬が結合する結合表面が多重であるのとは対照的に、染色試薬自体を多重化することが重要である。

10

#### 【0006】

感度が高く、高度に多重化された検出のさらなる切迫した必要性は、単一細胞から分泌されたタンパク質を下層表面上で捕獲し、次いでインサイチューで解析するサイトカイン分泌アッセイの場合に容易に明らかである。そのようなアッセイ法はこれまで、それまでに利用可能であった多重化アプローチに付随したアッセイの複雑性の増大を避けるために、2重レベルで、大部分の研究においては1重レベルで記載されているにすぎない。多重化能を増大させることにより、24個またはそれ以上のサイトカインの対の組み合わせを調べるだけで、見い出すために膨大な労力を必要とする新規なT細胞サブタイプの同定が可能になる。より一般的には、通常は細胞間には変動があるため、細胞当たり2つまたは3つの特徴のみを判定する場合、多変量の特徴に基づいて新規な細胞型を同定することは困難である。

20

#### 【0007】

多重DNA配列決定もまた望ましい。本来、チェーンターミネーション法による配列決定は、一本鎖鋳型を用いたDNAポリメラーゼによるDNA鎖の合成を含む。低レベルの放射標識ヌクレオチド類似体（ddNTP）を伸長試薬混合物へ取り込むことで、オリゴヌクレオチドプライマーが鋳型にアニールする部位で開始された合成は終結する。dNTPおよび4つのddNTPのうちの1つの適切な混合物を使用すると、重合はそれぞれ可能な部位でランダムに終結し、ゲル電気泳動またはキャピラリー電気泳動でサイズ分離した後にDNAの配列を読むことが可能となる。4つの同時に実行した反応物を平行したレーンで分画し、それぞれ終結した長さにおける塩基を同定する。最近では、異なる色の蛍光色素と結合してあるddNTPを用いて4つの反応それぞれを終結させ、4つの反応産物すべての混合物をゲルの1レーンまたは1つのキャピラリー電気泳動チャンネルで共に分画する。したがって、本来1重アッセイであったものが4重アッセイになった。本発明のさらなる多重化能により、単一のレーンまたはキャピラリーで2つ以上のDNA鋳型を配列決定することが可能になると考えられる。

30

#### 【0008】

DNA分子の移動を乱し得るゲルまたはキャピラリーへの過負荷を避けるためには、多重DNA配列決定にとって高い検出感度もまた重要である。従来の放射性または蛍光色素に基づく標識から放出されるシグナルは、DNAの大規模な増幅なしに検出するには十分強くない場合が多く、より感度の高い標識によりアッセイの複雑度および人為的結果に関連した可能性が減少する。また、感度の高い多重化によって提供されるさらなるデータチャンネルにより、各レーン内に内部サイズラダーを含めることができる。

40

#### 【0009】

適切な多重化技術の1つの態様は、これまでに米国特許第6,642,062号および第6,492,125号において詳述されている。簡潔に説明すると、好ましい態様において、ラテックス（ポリスチレン）粒子に様々な比率で有機色素蛍光を含浸させて、組み合わせによりコード化された標識セットを作製する。または、一般に量子ドットと称される様々な種類のナノ

50

結晶半導体構造を含む蛍光標識を利用し得る。そのような粒子はまた生物学的認識分子に結合することができ、または蛍光色素の代わりに様々な比率で他の微粒子中で使用することができる。Han, M.Y., et al., Nat. Biotechnol. (2001) 19:631-635は、様々な色および強度の組み合わせで多色CdSe量子ドットを包埋したポリスチレン粒子について記載している。Nicewarner-Pena, S.R., et al., Science (2001) 294:137-141は、完全に異なる原理に基づき、多重バイオアッセイのための金属ナノバーコード技術について報告している。

#### 【0010】

単一粒子検出に十分な明るさであるサブミクロン粒子を使用することで、標識集団の積分強度を測定する従来のシグナル生成標識では得られない様々なアッセイ形式が可能になる。蛍光がシグナルであるラテックス微粒子および量子ドットに加えて、他の可能なシグナルには、リン光、NMRスペクトルおよびラマンスペクトル、ならびに修飾可能な反射特性が含まれる。

10

#### 【0011】

個々の細胞成分間の空間的関係を調べるための微粒子標識の使用は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,642,062号に記載されている。この特許に記載されているように、種々の細胞成分に特異的な試薬に結合された個々の粒子は、顕微鏡によって検出できる様々な識別可能な「色」で調製することができ、細胞内成分および細胞小器官の空間的配置の像を提供する。さらに、米国特許第6,673,554に記載されているように、刺激に応じたこれらの細胞成分の空間的配置の変化を用いて、化合物の毒性を評価すること、および疾患状態の治療手順の同定を行うことができる。本発明は、1つの態様において具体的には、微粒子標識の感度および多変量の性質に依存するこれらおよびさらなる技法を用いて、これらの技法を臨床生検試料に適用することに関する。微粒子標識自体の特定の改良についても説明する。

20

#### 【0012】

微粒子標識の同一性を、例えば適切な励起光源および青色から近赤外線の波長を検出し得る蛍光フィルターを用いて蛍光標識について評価し、顕微鏡により単一の微粒子標識の位置または存在を決定することができる。したがって、複数の抗原-抗体複合体または他の生物学的特異的対を、各微粒子標識の独特の発光特性によって試料中で識別することができ、同じ物理的チャンバー内で同時に複数の平行なアッセイを行うことができる。さらに、従来の色素分子と比較して微粒子標識の検出能が高いため、利用できる試料サイズが従来の解析には小さすぎる場合でさえも、配列決定反応などを実施することができる。したがって本発明は、1つまたは複数の試料中のタンパク質、核酸などの存在を検出するためのより高感度でかつより用途の広いアプローチを提供する。微粒子標識の特定の画期的な使用を、特定の種類の多重生物学的特異的相互作用に関して開示する。簡便な微粒子標識が得られることによって開発が促されたこれらのアッセイ法のいくつかは、独自に新規である。微粒子標識は好ましい態様を提供するが、微粒子標識の使用はこのようなアッセイ法にとって厳密な必要条件ではない。

30

#### 【0013】

臨床的に関心のあるアッセイ法もまた提供する。新規な薬剤を市場にもたらすコストは現在\$800,000,000のオーダーであり、この数字は薬剤候補の高い失敗率によってもたらされていることが十分に認められている。この失敗率はそのほとんどが、この業界による前臨床試験における動物試験への依存に起因している；動物での結果からヒトでの結果への移行は、1対1の対応によって特徴づけられない。したがって、疾患状態および薬剤の有効性を評価するために生検したヒト組織試料を利用することは、一歩前進することを示すと考えられる。本発明はこのような試料の使用を促進する。

40

#### 【発明の開示】

#### 【0014】

#### 発明の開示

本発明は、顕微鏡を用いて単一細胞を調べる改良方法を提供する。本発明の方法を使用

50



することで、いくつかの態様においては他の細胞と比較して、個々の細胞の組成物のプロフィールを容易に得ることができる。このような試験の特定の適用には、臨床状況における結果の取得および処置手順の評価が含まれる。この方法によって、所望の特徴を有する単一細胞の同定も可能になり、細胞の遺伝子成分を改変するまたは細胞を不死化するなど、細胞をさらに操作することができる。本発明の改良方法では、試験した単一細胞の生存能を維持すること、および必要に応じてさらなる操作のために細胞を回収することも一般に可能である。

#### 【0015】

1つの局面において、本発明は、個々の細胞の成分サブセットの特徴づけに使用し得る試料を取得する方法に関し、この方法は、試料表面上に重層した透過性の膜支持体上で細胞を支持する段階、および細胞成分を、膜を透過させ試料表面上に堆積させる段階を含む。

#### 【0016】

次いで、細胞を支持する（または膜を透過しないその残渣を支持する）膜を試料表面から除去し、保持する。典型的には本方法において、様々な単一細胞が、少なくとも1つの試料表面上に重層した膜上に一定のパターンで支持される。細胞または透過しない細胞成分の残りを含む膜を持ち上げると、膜上の配置は試料表面上の配置と対応し、個々の試料表面の結果は特定の単一細胞の結果と相関し得る。顕微鏡により試料表面を調べ、その内容物および特徴、ならびに注目したまたは記録した各細胞に関連するデータを決定する。

#### 【0017】

得ようとする情報に応じて、1つまたは複数の細胞に単にタンパク質を分泌させ、分泌されたタンパク質の混合物の組成を決定し得る。または、1つまたは複数の細胞を破壊し、試料表面に含まれるその細胞内の内容物を試験し得る。前者の態様の特に有用な適用は、細胞が分泌する免疫グロブリンの性質に関する情報を提供することである。

#### 【0018】

上記態様はまた、アッセイで測定される成分のプロフィールの変化により測定される、薬剤または手順が細胞に及ぼす影響を試験するために使用することができる。

#### 【0019】

別の局面において、本発明は単一細胞成分の多重化された特徴を取得する方法に関し、この方法は、異なる色を示し、特定の細胞成分に特異的な結合パートナーである試薬をさらに含む様々な微粒子を、成分の試料に提供する段階を含む。微粒子標識は広視野顕微鏡または共焦点顕微鏡を用いて個々に同定することができるため、各成分に結合した個々の微粒子標識の数を決定することができる。プロフィールの結果は、様々なデータポイントを示すことでコンピュータにより標示され得る $n$ 成分それぞれに対する1つのデータポイントが評価され、 $n$ 次元空間でプロットされる—よって各細胞について空間におけるベクトルが提供される。次いで、各細胞のベクトルが3次元空間で提示され、可視の/包括的な特徴的位置が提供される。この局面においても同様に、本アッセイ法を適合化して、薬剤、手順、または毒素などの他の外部刺激が細胞成分のプロフィールに及ぼす影響を示すことができる。

#### 【0020】

さらに別の局面において、本発明は、所望の免疫グロブリンを分泌する不死化細胞を得るための改良方法に関する。この方法では、得られる感度が高いために、脾臓、末梢血、または粘膜関連リンパ組織を含むリンパ節から直接単離された個々のB細胞を、所望の抗体の分泌に関して個々に試験することができる。アッセイ法を多重化することができるため、所望の抗原認識を提供するだけでなく、単一の所望の抗原の様々なエピトープの1つまたは複数に特異的に結合する細胞を回収するため、および/または様々な抗原と結合する様々な細胞を回収するために、ハイスループットアッセイ法が実用的である。この方法では、抗体全般と免疫反応する微粒子標識を必要に応じて対照として使用し、これらの一般的な抗体と結合する微粒子標識の数を、所望の抗原またはエピトープと免疫反応する抗体に結合する標識の数と比較する。一般に、細胞はアイソタイプなどの抗原非依存的特性

10

20

30

40

50

についてスクリーニングすることができる。このようにして、特定の細胞によって分泌される抗体の親和性を順位づけることができる。これは、高い分泌率での弱い親和性と低い分泌率での強い親和性とを識別できない従来のアッセイ法に勝る重大な進歩である。

#### 【0021】

上記方法の多くは臨床状況において、および治療手順を評価するアッセイにおいて適用可能であり、本発明は本発明の方法のこれらの適用を含む。

#### 【0022】

さらなる特定の局面において、本発明は、T細胞集団のプロフィールを評価することにより薬剤性能を評価する方法に関する。移行パターン、細胞表面抗原染色などを含む他の指標を用いて、疾患状態を特徴づけることもできる。このように、T細胞および腫瘍細胞は、例えば、本発明の微粒子標識の使用によって明らかにされ得る表面抗原パターンによって特徴づけることができる。細胞内移行もまた指標として用いることができる。

10

#### 【0023】

別の局面において、本発明は、シグナル生成実体の組み合わせにより特定の色が指定された比較的大きな粒子が、それぞれ独自の色を有する規定数のより小さな粒子でコーティングされた、特定の種類の微粒子標識に関する。顕微鏡は大きさを識別することができるため、このような直列粒子により、以下に記載するように多重化の大規模な拡大が可能になる。

#### 【0024】

さらなる他の局面において、本発明は、本発明の多重標識を使用して組織を組織学的に試験し、胚発生に影響を及ぼす増殖因子の性質を決定する方法に関する。さらなる他の局面において、本発明は、クロマトグラフィーまたは電気泳動に供された可溶性生物試料を解析するために有利な方法に関する。アッセイが多重化できる性質であるため、様々な成分を単一の移動レーンにおいて決定することができる。例えば、生物試料の成分を試験するのと同じレーンにサイズラダーを含めることができる。

20

#### 【0025】

別の局面において、本発明は、試料表面から膜を除去するための改良された装置および方法に関し、表面に隣接した開口部が、吸引によって膜の上部で乱れが生じるのを妨げる。

#### 【0026】

30

#### 発明を実施するための形態

本発明のアッセイ法のいくつかでは、細胞の様々な表面抗原、細胞内抗原、および/または分泌タンパク質に基づいて個々の細胞の表現型を同定するために、微粒子標識および顕微鏡観察技法を利用する。そのようなアッセイには以下のものが含まれる：様々な条件下における単一細胞の多変量サイトカイン分泌プロフィールの特徴づけ；分泌された免疫グロブリンの互いのまたは一群の抗原に対する特異性および他の特徴（アイソタイプなど）の特徴づけ；血管新生および再生を含むパターン化された組織増殖に付随する組織環境の特徴づけ；複数の細胞型が、識別可能な微粒子標識に結合した細胞型特異的抗体との結合により、または標識の物理的捕捉により個々に認識され得る自動化病理学（組織染色）；タンパク質の細胞内局在性の特徴づけ；単一細胞レベルでのmRNA発現の特徴づけ；インサイチューでの、もしくはマイクロアレイでスポットした、またはクロマトグラフィーもしくは電気泳動による分画後の、破壊した細胞のタンパク質、核酸、炭水化物、または脂質内容物の特徴づけ；内部陽性対照と比較した、試験対の生物学的特異的相互作用の親和性の特徴づけ。

40

#### 【0027】

これらのアッセイ法の一部は文献において周知であり、他の手段によって多重解析に供されているが、微粒子標識を用いてこのようなアッセイを行う有用性はこれまでに記載されていない。サブミクロン微粒子標識の使用は、精巧な画像解析システムを必要とする。驚くべきことに、アッセイにおいて信頼性のある結果をもたらすために必要な粒子の数は、個々の粒子を画像化し得る顕微鏡の視野によって収容されるほど少ない。本明細書に記

50

載する実験は、そのようなアッセイを行う実現可能性を初めて証明するものである。例えば、抗体を分泌する細胞のフットプリントにおいて、1視野の典型的な粒子数は500粒子であり（直径300 nm）、10～50粒子のバックグラウンドを伴い、ダイナミックレンジが1.5対数単位である場合には、最大で約3,000粒子をなお分離することが可能である。直径5  $\mu$ mの粒子では、単一細胞のフットプリントは1粒子しか収容することができず、これらのアッセイには十分ではない。しかし、粒子サイズ（ひいては強度）が小さくなるにつれて、色を規定するために個々の粒子を検出する可能性はより難しくなる。要するに、大量の蛍光測定または大きな視野（例えば、一辺が100  $\mu$ mまたはそれ以上の程度であるDNAチップ位置）での測定に有用なこれまでに記載された多重試薬では、本発明の空間規模でのアッセイ（単一生体細胞の直径に匹敵する）ができない。

10

#### 【0028】

例えば分泌タンパク質のアッセイなどこれらのアッセイ法のうちのいくつかでは、細胞とアッセイ表面との間に多孔質膜を置くことが有利である。それによって細胞を除去し、「フットプリント」を解析することができる。所望の抗体を分泌するBリンパ球のような関心対象の細胞をフットプリントにより同定し、次いで膜上の相当する位置から細胞を回収することができる。本発明のこの局面は伝統的な膜に基づくアッセイ法（フィルターリフト、ウェスタンおよびサザンブロットなど）からの逸脱を示し、これはフットプリントの解析に微粒子標識を使用することとは無関係である。

#### 【0029】

この局面は、細胞を膜上の確定した位置に固定するが細胞の生存能を阻害しない手段によってさらに改善され得る。したがって1つの態様において、細胞はメチルセルロースなどの基質形成物質の存在下で膜の上面に堆積する。例えば遠心などにより膜に対して下方への圧力を与えた場合、細胞は半固形基質中を移動し、膜の表面のあるべき位置に保持される。メチルセルロースによって例証したが、挙動が類似している任意のポリマーすなわち、例えば冷却、pH変化、または穏やかな下向きの圧力を与えた場合により硬化するポリマーで代用してもよい。さらに、試料表面上への細胞成分の蓄積の完全性は、単に基質を形成する物質に結合パートナーを混合することにより、またはその物質に結合パートナーを共有結合させることにより、関連成分の結合パートナーを基質物質に添加することで改善し得る。例えば、試料表面上で評価する成分が免疫グロブリンである場合には、プロテインAを結合パートナーとして使用することができる。本アプローチの改良法では、結合パートナーを含むデキストラン基質などのさらなる基質を、試料細胞を含む膜の上面に重ね得る。この特徴によりアッセイのバックグラウンドが減少する。

20

30

#### 【0030】

本アッセイ法では、試料表面から除去する場合に膜の上面上で乱れが生じないように構築された装置を提供することによって、さらなる改良を実現し得る。これは、吸引によってこの乱れが生じないように、試料表面に隣接した開口部を利用することで達成し得る。これを図11に図解する。

#### 【0031】

一般に、分泌タンパク質、細胞内成分、細胞表面マーカーなどの細胞パラメータを調べるアッセイ法は、微粒子標識の多重化能および単一細胞においてこれらのパラメータを測定する能力を利用するが、このアッセイ法は上記の膜に基づく技術を用いて行うことができ、または細胞を包埋するかもしくは別の方法で結合した表面上で単に行うことができる。顕微鏡観察および本発明の微粒子標識を用いることにより、単一のアッセイで複数の細胞成分を列挙し同定することができる。これは、薬剤などの外部刺激が試験対象の細胞に及ぼす影響を決定する上で特に有用である。このようなアッセイでは、外部刺激に供していない対照細胞を調べ、その成分のプロフィールを外部刺激で処理した細胞から得られたものと比較する。プロフィールの比較により、刺激に対する細胞反応の性質が明らかになる。1つの態様において、刺激が薬剤である場合、個々の細胞を様々なレベルの薬剤に曝露し、それぞれのレベルを対照と比較することで、用量反応曲線を得ることができる。このようなアッセイは、特定の薬剤または手順に対する個体の反応を評価することが重要で

40

50

ある、ヒト組織を含む様々な動物組織で行い得る。

#### 【0032】

本発明はまた、生物分析物の検出において生物学的特異的プローブに結合した微粒子標識を用いる方法に関する。微粒子標識は個々に検出可能かつ識別可能であり、必要に応じて相互に空間的關係に位置づけることができる。タンパク質、抗体、ddNTP、プライマー、またはマーカなどの生物学的認識部分を微粒子標識と結合することによって、微粒子標識を非放射性生物標識として使用することができる。例示的な微粒子標識は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,492,125号に記載されているような、有機色素蛍光を含浸したラテックス粒子である；他の微粒子標識、例えば量子ドットを使用する微粒子標識もまた、以下でさらに説明するように使用し得る。微粒子標識はまた、リン光、電気化学発光、およびNMRシグナルまたはラマンシグナルなどの蛍光以外の検出可能な特性を用いて構築することもできる。さらに、自己組織化デンドリマーは、あらかじめ組織化された微粒子標識に等しい物体をインサイチューで形成し得る。以下に記載するように、微粒子標識はまた、様々な小さな粒子がその表面に結合した比較的大きな粒子からなっており、小さな粒子はそれぞれそれ自体で異なる色を有する。

#### 【0033】

微粒子標識の光学特性は、2つまたはそれ以上の個々のシグナル生成部分を様々な比率で使用して様々な色を作製することができるため、多重化にとって理想的である。シグナル生成部分の数は、要望通りに拡大することができる。例えば、6色それぞれについて強度レベル10で、理論的には100万個の核酸またはタンパク質配列をコードし得る。10~300 nmの大きさの範囲にある微粒子標識は、生体高分子（例えば、核酸、タンパク質、およびリボソームまたはウイルスなどのタンパク質複合体）との寸法類似性を有する。この類似性から、文献において周知である組み合わせにより着色したはるかに大きな粒子（5~50 μm）と比較して、ナノ材料と生体分子との統合が改善される。しかし、これらの大きな粒子もまた本発明のいくつかの局面で使用することができる。この小さな粒子は、最終的な位置がアッセイの読み取りを提供する拡散性試薬のタグとして使用した場合、免疫測定法、医学診断、標的療法、およびハイスループット薬剤スクリーニングにおいて利点を有する。これは、例えば、特徴的な標識を有する粒子を用いて特定の分析物を同定し、分析物自体に結合した別の標識により分析物の量を決定する、米国特許第6,492,125号に記載されているアッセイ法とは対照的である。本発明の方法のいくつかの適用は多重標識を用いて以前に記載されているものの、個々の粒子の計数に基づくアッセイ法における微粒子標識の使用は、集団からの強度を積分するのとは対照的に、個々の粒子を顕微鏡で検出する能力によって可能になる。

#### 【0034】

多重化のさらなる増大は、色に加えて大きさを識別する顕微鏡技法の能力によって得られ得る。この概念の特に有利な態様を図1A~図1Cに図示する。例として示したように、4つのフルオロフォアのセットを様々な組み合わせで簡便に使用し、例えば10~100 nm、典型的には50~100 nmという比較的小さな大きさの粒子上で20色を生成することができる。したがって、このような粒子20個により異なる20個の標識が提供される。図1Bに示すように、例えば直径200~500 nmのより大きな粒子もまた、必要に応じて同じ4つのフルオロフォアと同様にコードして、20色の別の粒子セットを作製することができる。図1Aおよび図1Bの粒子をアッセイで共に使用すれば、2つの大きさを20色という全部で40個の識別可能な粒子が利用できることになる。図1Cに示すように、大きな粒子の表面に小さな粒子を吸着するかまたは共有結合することにより、異なる色を有する20×20すなわち400個の「直列」粒子が提供される。アッセイの読み取りが2つのこのような粒子の近接を必要とする場合には、 $400 \times 400 = 160,000$ の識別可能なアッセイを行うことができる（例えば、ゲノム規模のDNAアッセイに適している）。

#### 【0035】

当技術分野において周知である様々な結合法により、例えば各粒子に反応基を提供し、二官能性リンカーを提供することにより、大きな粒子に小さな粒子を付着させることがで

きる。または、小さな粒子にアミノ基を含む置換基を提供し得り、大きな粒子がカルボキシル基を有する置換基を含み；次いで、アミド結合の形成により所望の結合が得られる。または、小さな粒子に共有結合したビオチンが提供され、大きな粒子に共有結合したアビジンが提供され得り、ビオチン/アビジン相互作用により所望の結合が提供される。これらの粒子を結合する多種多様な方法が、当技術分野において利用できる。

#### 【0036】

この種類の粒子の調製には成功している。図2は図1Cに示した態様の顕微鏡写真を示す。

#### 【0037】

単一の微粒子標識の大きさの数を増大させることによって、直列粒子をより複雑にすることができる。例えば、例えば1~50 $\mu\text{m}$ 、好ましくは約10 $\mu\text{m}$ という大きな粒子の表面に、例えば500 nm~800 nmという中程度の大きさの粒子および約100~200 nmというさらなるより小さな粒子を結合するか、またはその内部に包埋することができる。異なる色を有する小さな大きさのおよび中程度の大きさの粒子をそれぞれ提供することで、直列粒子の多重化はさらに増大する。

#### 【0038】

このような直列粒子は、小さな粒子をポリマーに懸濁して、これを拡張してより大きなホスト粒子を作製するというインクジェットプリントを含む、様々な手段によって調製し得る。または、大きな粒子を最終的な大きさの約半分の大きさに構築し、次いで小さな粒子を表面に固着させ、その後重合を再開してもよい。これらの複合直列粒子を調製するさらなる3つめの方法は、小さな粒子が内部で拡散し得るように、大きな粒子を有機溶媒中で膨潤するというものである。さらなる別のアプローチでは、「高性能」ポリマーすなわち、小さな粒子を収容できるように大きな粒子の透過性を変化させるため、温度およびpHなどの条件に応じて鋭敏な相転移を起こすポリマーを使用し得る。

#### 【0039】

1つの適用において本発明は、細胞内、表面提示、または分泌であろうとなかろうと、様々な細胞成分のプロファイリングに適用する。これらの局面において本発明は、識別可能な粒子に結合した、所望の成分から選択された生物学的認識部分を有する上記の微粒子標識による、所望の様々な細胞成分の標識化に関する。選択されるタンパク質は、例えば単一のT細胞のサイトカイン分泌パターンであってよい。本方法はまた、所望の特異性および親和性を有する免疫グロブリンを分泌する単一のB細胞またはハイブリドーマコロニーを同定するために使用し得る。別の特定の適用においては、細胞の表面上に提示されたHLAタンパク質と相互作用するように、生物学的認識部分が選択される。他の特定の適用には、分泌タンパク質として発現され得る、または細胞の溶解に際して決定され得る多くのレポーター遺伝子の決定が含まれる。したがって、遺伝子発現を調節する因子の様々な影響を同時に決定することができる。同様に、本発明のプロファイリング方法は、酵母、細菌、植物細胞などを含む全細胞型に適用することができる。

#### 【0040】

さらに別の適用では、本発明の方法を用いて、組織学的試料を粒状標識、すなわち本発明において有用な多色微粒子標識で「染色する」ことができる。粒状標識は、標準的な組織学的色素よりもより容易に可視化される。この種類の画像化はインビボにおいても有用である。

#### 【0041】

微粒子標識は、DNA配列決定反応などのキャピラリー電気泳動解析、および一本鎖DNA高次構造多型（SSCP）などの変異検出解析方法において使用することも可能であり、単一粒子を顕微鏡で検出する能力において感度が高いことにより、核酸およびアミノ酸変異を高感度で検出することができる。このようにして、試料中の分析物の存在は、クロマトグラフィと、任意にフィルターへの転写およびその後のプロービングを利用するウェスタン解析（抗体）、サザン解析（DNA）、およびノーザン解析（mRNA）を併せて使用して検出することができる。このような適用では、微粒子標識の多重化能により、物質中に存在す

10

20

30

40

50

る複数の分析物を吸着剤の同じレーンで同時に解析することが可能である。可溶化した生物試料中の少なくとも1つの分析物の存在は、可溶化した生物試料をクロマトグラフィーまたは電気泳動によって分離し、分離前または分離後に成分を微粒子標識で標識し；分析物の存在を示す微粒子標識からの蛍光発光などのシグナルを顕微鏡により検出することで検出し得る。可溶性成分はまた、上記のように膜を通した拡散および下層表面上での捕獲後に解析することもできる。原型のまたは破壊した個々の細胞のフットプリントを解析することができる；同様に、膜上に保持された不溶性成分を解析することもできる。

#### 【0042】

本発明を明白にするために以下の用語を定義し得る：「1つの」および「任意の」はそれぞれ、単数形および複数形の両方を含むことを意図している。

10

#### 【0043】

本発明は、微粒子標識を個々の分析物と結びつける手段として、分析物の「特異的結合パートナー」を利用する。特異的結合パートナーの一般的な形態は、抗体または免疫グロブリンである。特定の抗原に特異的な古典的な「抗体」は、適切な脊椎動物の免疫化および血漿もしくは血清からのポリクローナル抗体の回収、またはハイブリドーマもしくは組換え技術によるモノクローナル抗体の回収によって得られる。このような方法で得られる抗体は結合特異性にその全体が必要なのではなく；可変領域のみの存在が必要であることが周知である。したがって、本明細書で用いる「抗体」という用語には、 $F_{ab}$ および $F_{ab}$ 断片などの抗体断片が含まれる。さらに、組換え技法が利用できることで、一本鎖 $F_v$ 「抗体」などの、特異的結合領域の改変型および種適合型が可能になる。「特異的結合パートナー」には、可変結合領域を含み得る一般的なタンパク質もまた含まれる。そのようなタンパク質中の溶媒露出ループを変異誘発技法により改変して、広範な結合特異性を提供することができる (Napolitano, E.W., Chem. & Biol. (1996) 3:359-367)。特異的結合剤のこのカテゴリーには、Schepartzら (国際公開公報第01/81375号) によって記載されているトリ胨臓ペプチドの変種などのミニタンパク質も含まれる。タンパク質に加えて、例えばSelex法 (米国特許第5,567,588号) により、異なる結合特異性のオリゴヌクレオチドを作製することができる。他の特異的結合パートナーには、リガンドとその対応する受容体、アビジン/ビオチン、および逆のメンバーと特異的に相互作用し得る任意の他の部分が含まれる。

20

#### 【0044】

「蛍光」とは、1つの波長 (励起) での放射の吸収、および通常そのほぼ直後に起こる異なる波長 (発光) での再放射によって生じる光の放出である。典型的に、有機蛍光色素がこれに関連して用いられる。「発光」とは、物体から電磁放射線 (光) を放射する過程を指す。発光は、エネルギーを光子の形態で見合う分だけ放出して励起状態からより低い状態に「緩和する」系から生じる。これらの状態は、電子、振動、回転、またはこの3つの任意の組み合わせであってよい。発光の原因となる遷移は、化学的に系に保存されるかまたは外部供給源から系に付加されたエネルギーの放出により促進され得る。外部のエネルギー源は、化学、熱、電気、磁気、電磁気、物理的形式、または基底状態より高い状態に系を励起し得る任意の他の形式を含む様々な形式であり得る。例えば、系は、光の光子を吸収することにより、電場中に置くことにより、または化学的酸化還元反応を介して励起され得る。発光過程で放出される光子のエネルギーは、低エネルギーのマイクロ波放射から高エネルギーのX線放射までの範囲であり得る。典型的に、発光とはUVからIR放射までの範囲の光子を指す。

30

40

#### 【0045】

「生物試料」とは、DNAまたはRNAなどの細胞成分、これらに限定されるわけではないが、例えば血漿、血清、髄液、精液、リンパ液、皮膚、気道、腸管、および尿生殖路の外部切片、涙液、唾液、乳汁、血液細胞、腫瘍、器官を含む単離された細胞、組織、または体液の試料、ならびにまたインビトロ細胞培養成分の試料 (これらに限定されるわけではないが、細胞培養液中での細胞の増殖により得られる馴化培地、ウイルスに感染したと推定される細胞、組換え細胞、および細胞成分を含む) を指す。

50

## 【0046】

本明細書においてアッセイに関連して用いる「フットプリント」という語は、特定の意味を有する。これは、細胞の成分（分泌成分を含む）またはそのサブセットのプロフィールを提供するための、単一細胞または所定のクローンに関連する成分補完物を蓄積した試料表面上の成分の収集物である。好ましい態様において、成分補完物は、単一細胞または所定のクローンから透過性膜を介してろ過されている。したがって、本発明の1つの方法において、細胞は透過性膜上で個々にまたは所定のクローン中で支持され、その下の試料表面上でフットプリントが収集される。細胞の混合物を用いてフットプリントを作製し、次いで単一細胞ではなく混合物を特徴づけることも可能である。

## 【0047】

「微粒子標識」とは、生物学的認識部位（すなわち、分析物の特異的結合パートナー）と結合し得り、シグナルの放出、必ずしもそうである必要はないが典型的に発光により検出可能な、典型的にナノメートルの大きさの、例えば5~800 nm、10~500 nm、または約50~200 nmの粒子を指す。好ましい大きさは約300 nmである。微粒子標識は、特徴的なシグナルと定義される「色」を有する。本明細書に記載するように、その特徴的なシグナルまたは「色」は場合によって、粒子上に特定の比率で存在する様々な、典型的に2~4個またはそれ以上のシグナル生成部分によって生成される。シグナルを生成するには典型的にフルオロフォアが用いられる。量子ドットを用いることも可能である。量子ドットを用いる場合には、非常に鋭い発光ピークを有するため、単一の量子ドットで任意に生物学的認識部分と結合した微粒子標識を構成するのに十分であると考えられ、その結果この微粒子標識はその量子ドットの特徴的な色を有する。

## 【0048】

図3は、これまで用いられた有機色素ローダミン6GとCdSe量子ドットとの間の(a) 励起プロフィールおよび(b) 発光プロフィールの比較を示す。量子ドット発光スペクトルはほぼ対照的で、ピーク幅がより狭い。その励起プロフィールは広く持続的である。対照的に、有機色素ローダミン6Gは広く非対称的な発光ピークを有し、狭い波長範囲でのみ励起される。量子ドットの大きさおよび組成を変えることで、発光波長は青色から近赤外に変化する。この差異にもかかわらず、同じフィルターセットを用いてどちらの蛍光も読むことができる。原理上は、CdSe標識の発光プロフィールがより狭いことにより、それぞれわずかに大きさが異なり、よってわずかに異なる波長で発光するような標識のファミリーを作製することができるはずである。実際には、製造過程での厳密なサイズ分布を達成する能力により、種類の多様性は限定される。

## 【0049】

または、シグナル生成手段として量子ドットを使用し、より複雑な色を有する粒子を構築することができる。これらの方法では、典型的に1~5  $\mu\text{m}$ というオーダーのより大きな粒子を特定の比率の2、3、または4種の量子ドットと結合させ、利用できる別の色の数を増やす。この大きな粒子は状況によってはその大きさのせいで厄介である；大部分の生物試料に必要な解像度は十分に細かい粒度であり、いくつかの方法では5  $\mu\text{m}$ 粒子は不都合である。

## 【0050】

特定のセット中の非常に小さな微粒子標識に関しては、微粒子標識セットのすべてのメンバーについて同じエネルギーおよび同じ強度の均一な「固定値」シグナル生成部分を有することもまた有利であると考えられる。これにより、解像度が検出空間を単一粒子の大きさに限定するのに十分ではない場合でさえも、特定の検出空間に結合する粒子の数を決定することが可能になる。この「固定値」パラメータの性質は、参照により本明細書に組み入れられるPCT公報第US2003/031818号）にさらに記載されている。

## 【0051】

「標識された成分に特有の色」とは、その成分が結合している微粒子標識の色を指す。したがって、特定の成分と特定の微粒子標識との対形成により様々な成分が様々な微粒子標識で標識されている場合、成分は特定の標識に結合した特有の色を備える。

10

20

30

40

50

## 【0052】

したがって、「微粒子標識」という用語は2つの状況で用いられ得る；1つには、標識は、特有のシグナルまたはシグナル群を放出して特有の色を与える粒子自体であり、標識はそれ自体、試薬または生物学的認識部分に結合していると言われる。もう一方の状況では、「微粒子標識」は生物学的認識部分をさらに含み、生物学的認識部分が特異的に結合するさらなる成分を標識するために用いられる。

## 【0053】

本発明において有用な微粒子標識は、ある程度変化に富んでいてよい。1つの態様において、微粒子標識は、含浸させる有機色素蛍光の比率を変えることで色を調節することができるナノスケールの球体である。様々な色を生成するためにシグナル生成部分、特にフルオロフォアの組み合わせと結合させたラテックスおよび同様の粒子、およびこれらの粒子と生物学的認識分子との結合については、上記の米国特許第6,642,062号および第6,492,125号に詳述されている。上記の微粒子標識の種類を用いて、それぞれ異なる色を有する様々な小さな粒子を、それ自体色を有するより大きな粒子の表面上に分布させ、非常に多数の可能な色を生成することができる。

10

## 【0054】

他の態様においては、発光量子ドット標識を用いることができ、その標識の発光は量子ドットの大きさおよび物質組成に基づいて調節することができる。半導体量子ドットを生物学的認識分子に結合させることができる。これらのナノメートルサイズの複合物は一般に水溶性ではないが、溶解度および生体適合性を改善するために適切に修飾することができる。金属および半導体ナノ粒子は1~10 nmの大きさの範囲で得られ、ペプチド、タンパク質、およびDNAなどの生体分子と結合することができる。シグナル生成部分が、リン光、反射率、電気化学発光、およびNMRまたはラマンシグナルを含む、蛍光と識別可能なシグナルを放出する類似した微粒子を用いることも可能である。例えばラテックス微粒子ではなく、微粒子標識に等しい物体をインサイチューで形成する自己組織化デンドリマーを使用することも可能である。

20

## 【0055】

微粒子標識は可視光の最小波長よりも小さくてよく（すなわち、その検出はそれが放出するシグナルに依存し、位相差または吸収を含む従来の受動的方向での画像化に依存しない）、微粒子集団から生じる全強度を積分するのとは対照的に、単一粒子が顕微鏡で計数できるのに十分「明るく」（すなわち、十分に検出可能で）なくてはならず、いくつかの適用においては少なくとも5個、好ましくは10個の識別可能な種類で利用できるべきである。

30

## 【0056】

量子ドットを利用する態様に関連して、これらの物質は典型的に周期表のIIおよびVI（またはIIIおよびV）群の原子から構成され、励起子ボーア半径よりも小さい物理的大きさを有する粒子と定義される。球状CdSe粒子の場合、これは粒子直径が約10 nm未満である場合に起こる。シリコンなどのIV群原子の使用により、炭素含有成分との結合の化学が単純化される；さらに、荷電部分を生じるために炭素含有成分を酸化することで、水溶性形態の作製が単純化される。II-VI群（例えば、CdSe、CdTe、CdS、およびZnSe）およびIII-V群（例えばInPおよびInAs）ナノ結晶はいずれも、広範に合成され研究がなされている。

40

## 【0057】

形態学的に、量子ドットは滑らかな球状粒子ではなく、多くの平面および端面をもつ。化学的に修飾したタンパク質を用いて表面をコーティングおよび「不動態化」することにより、可溶化量子ドットの凝集および沈殿の低減が達成されている。タンパク質層は、生物学的特異的プローブと共有結合するための複数の官能基（アミン、カルボン酸、およびシステイン残基）を提供する。

## 【0058】

生物学的特異的プローブの量子ドットへの結合は、図4に模式的に図示した、生物学的特異的結合アッセイの分野において周知である多くの方法によって達成され得る。反応性

50



官能基には、一級アミン、カルボン酸、アルコール、およびチオールが含まれる。これらの部分の1つを保有する水溶性量子ドットは、周知の方法により誘導体化され得る。単一量子ドットの表面積は大きいため、2~5個のタンパク質分子および50個またはそれ以上の小分子（オリゴヌクレオチドまたはペプチド）を単一の例えば4 nmの量子ドットに結合することができる。量子ドットを生体分子と結合する生物結合法の例には以下のものが含まれる：(a) メルカプト酢酸などの二官能性リガンドの使用（Chan, W.C.W., et al., Science (1998) 281:2016-2018）；(b) 疎水性力により改良アクリル酸ポリマーに結合したT0 P0キャップ量子ドット；(c) メルカプトシラン化合物の使用（Bruchez, M., Jr., et al., Science (1998) 281:2013-2015）；(d) 静電引力による、正の電荷をもつ生体分子の負の電荷をもつ量子ドットへの結合（Mattoussi, H., et al., J. Am. Chem. Soc. (2000) 122:12142-12150）；および(e) 反応基を有する微粒子およびナノ粒子への量子ドットの取り込み（Han, M.Y., et al., Nat. Biotechnol. (2001) 19:631-635）。 10

#### 【0059】

単一の量子ドットは、ローダミンまたはフルオレセインなどの単一の有機色素分子の約20倍明るい、量子ドットの大きさは色素分子の5~10倍であり、よってシグナルの増大はより大きな色素によって模倣され得る。Bawendiら（Murray, C.B. et al., J. Am. Chem. Soc. (1993) 115:8706-8715、およびDabbousi, B.O., et al., J. Phys. Chem. B. (1997) 101:9463-9475）は、CdSe量子ドットのモル吸光係数が、多発色団蛍光タンパク質であるフィコエリトリンの吸収断面積と類似していると推定した。実際に、以前に開示された色素を含浸させたラテックス粒子は匹敵する輝度であり、容易に利用できる製造法を用いて、量子ドット技術が提供するよりもさらに多くの識別可能な物体を作製することが可能である。 20

#### 【0060】

有機色素、発光物質、または量子ドットであろうとなかろうと、光を放出するシグナル生成部分は、光電子増倍管または写真用フィルムを含む、特定波長または波長範囲の光の強度を感知し得る標準的な検出器によって検出され得る。すなわち、量子ドットからの放射光は、標準的な蛍光からの放射光と比較して顕著ではない。好ましい市販の検出器は、広視野顕微鏡または共焦点蛍光顕微鏡で用いられるような、標準的な色フィルターを備えた電荷結合素子（CCD）、3つの空間的次元、複数の色次元において高解像度を提供し、かつさらに高時間分解を提供するように適合化され得る機器である。商業的供給業者には、John W. Sedatをリーダーとするグループによって記載された多くの先駆的出版物を有するApplied Precision（ワシントン州、シアトル）が含まれる。これらの出版物には、Ura ta, Y., et al., J. Cell Microbiol. (1995) 131:279-295；Paddy, M.R., et al., J. Cell Sci. (1996) 109:591-607；Chen, H., et al., J. Structural Biol. (1996) 116:56-60；およびKam, Z., et al., BioImaging (1997) 5:40-49が含まれる。さらに、これらの技法の概要は、「Deconvolution of Images in Spectra」、第2版、(1997) Academic Press、286~307ページのSwedlow, J.R.らによる章に提供されている。 30

#### 【0061】

以下に示すアッセイ様式は、本発明の特徴の多くを例証する。最初の4つの様式は、単一細胞または細胞の所定の混合物の成分を特徴づける能力の様々な適用を例証する。そのような能力の適用には、例えばT細胞のサイトカインプロファイルを解析することによる臨床研究、モノクローナル抗体を調製するための適切な細胞の取得における改善、細胞表面マーカーの解析、および手順の有効性を試験するため、または異常な表現型特性を有する細胞を同定するためのこれらのアッセイ法の使用が含まれる。サイトカインプロファイルの取得および特定の特異性を有する抗体の分泌に関する試験について例証するが、本発明のアッセイ法はまた、最も簡便には遺伝子発現の調節因子に応答して分泌タンパク質として発現され得るレポータータンパク質を含む、様々な細胞成分にも有用である。したがって、様々な発現調節因子の影響を同時に調べることができる。さらに、本方法は脊椎動物細胞ばかりでなく、細菌、真菌、植物などを含む任意の細胞にも適用可能である。ペリプラズム空間を有する細菌に関しては、アッセイの過程で細胞壁を破壊し、本発明の方法 40 50

に従ってペリプラズム空間の内容物を調べることができる。本方法はまた、ファージディスプレイを用いて発現させた様々な成分の決定にも適用できる。

#### 【0062】

アッセイ法の多重性質のために、3種またはそれ以上の細胞成分に関するデータを含むプロフィールを同時に得ることができる。好ましくは、4種、5種、10種、またはそれ以上の成分をこの方法で決定し得る。

#### 【0063】

アッセイ法のいくつかは、試料表面フットプリントが重層した膜上の1つの細胞または細胞の組み合わせと相関する、本発明の特徴を利用する。他の態様では単に、表面上に個々に固定化された細胞を利用する。膜と試料表面上の対応する位置を使用するなど、これらのアッセイ法の個々の特徴のいくつかは、標識の性質にかかわらず適用可能である。しかし多くの場合、アッセイ法は本発明の微粒子標識の使用により実用的となる。これは例えばアッセイ様式5~7の状況の場合であり、微粒子標識の性質により極めて少ない試料が可能となる、または通常であれば得られないアッセイ法の変更が可能になる。

#### 【0064】

本発明で使用する微粒子標識は小さく、明るく、かつ多様であるため、単一細胞解析のような本質的に顕微鏡的規模であるアッセイ法、および脱落した腫瘍細胞の検出のような、検体に限りがあるかまたは検体に多くの妨害分析物種が大量に混入しているアッセイ法に有用である。

#### 【0065】

##### アッセイ様式1. 単一T細胞のサイトカインプロファイリング

1つの例示的なアッセイ法では、微粒子標識を用いて単一細胞から分泌されたタンパク質を特徴づける。分泌タンパク質の一般的なアッセイ形式はELISPOT法（スポットでのELISA法）として知られている。基本的な技法は数十年もの間知られているが、ELISPOTアッセイ法におけるいくつかの改良点が米国特許第6,410,252号に記載されている（主に分泌タンパク質の捕獲表面としての膜の使用）。ELISPOTアッセイ法はこれまでは、1つまたは2つの分泌タンパク質を決定するように設計されていた。最初に、関心対象の分泌タンパク質に対する抗体を含む捕獲表面を調製するか、または表面自体を非特異的捕獲媒体として使用する。検出試薬として微粒子標識を用いる場合、その後の最終的な多重化は無限であるため、その実験における関心対象の分泌タンパク質と同じ数の捕獲抗体または他の特異的結合パートナーをウェル表面上に堆積させることができる。次いで、細胞懸濁液をマイクロプレートウェル上に堆積させる。必要に応じて特定の細胞刺激物をウェルに添加し、関心対象の細胞応答を誘発する。インキュベーション期間の後にウェルを洗浄し、細胞を除去し、ウェル表面上のそれぞれの抗体に結合している関心対象の分泌タンパク質を残しておく（細胞の「分泌フットプリント」）。従来のELISPOTアッセイ法では、アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼなどの高増幅検出タグと結合させた抗体を使用して、捕獲されたタンパク質をプロービングし、その後酵素基質を添加することがシグナルを発生させる。

#### 【0066】

微粒子標識の使用によりこのアッセイ法が簡単になり、またアッセイ法が大幅に拡張される。細胞周囲またはフットプリント中の分泌タンパク質を同定するには、古典的な「サンドイッチ」アッセイ形式で（1つの抗原であるが2つの重複しないエピトープー捕獲抗体認識部位および検出抗体認識部位）、第2の抗体セットで標識した粒子の懸濁液をウェルに添加する。または、抗原/サイトカインを保持する試料表面の一般的な接着特性に依存して、単に微粒子標識を抗原の特異的結合パートナーと結合させる。それぞれに結合されている特徴的な色をした粒子はそれぞれの分泌タンパク質に結合し、したがって以前にその部位に位置した特定の細胞の分泌フットプリントにおいてその存在が同定される。多重分泌プロフィールに基づいて、ウェル中の多くの細胞を自動的様式で特徴づけ、分類することができ、したがって免疫学的試験において強力でかつ質的に新しい能力が提供される。

10

20

30

40

50

## 【0067】

これを図5に図示する。段階1（図5A）では、マイクロプレートプレートウェルなどの固体表面に吸収させるかまたは別の方法で結合させた抗体収集体上に、単一細胞を存在させる。分泌されたタンパク質は、表面上のそれぞれの抗体と結合する。洗浄により（または細胞が膜上に含まれる場合には、膜を持ち上げることににより）細胞を除去した後、段階2（図5B）において、それぞれ異なるサイトカインに特異的であり、かつそれぞれ結合している抗体に特徴的である識別可能な色を有する微粒子で標識されたサンドイッチ形成抗体でプロービングする。次いで、表面をプロファイリングして個々の粒子の数および種類を同定する。

## 【0068】

10

図6は、IL-2の分泌に関してプロファイリングした単一細胞の顕微鏡写真を示す。この写真の取得においては、まずIL-2に対して免疫特異的な抗体をウェル表面上にコーティングし、個々の細胞が観察できるように十分希釈した試料をウェルに添加し、IL-2が分泌される条件下でウェルをインキュベートした。細胞を洗浄除去した後、蛍光粒子と結合させた対応する抗IL-2抗体でウェルを処理した。示したように、個々の粒子は、細胞自身の実際の位置から放射するために識別が可能である。低い粒子濃度では中央部分の粒子密度が十分に低く、個々の粒子を認識することができる。この解像度により、3つまたはそれ以上のサイトカインを容易に測定することができる。

## 【0069】

図7および図8に図示したように、5つの分泌サイトカインが同時に検出される：IL-2、IFN- $\gamma$ 、およびTNF- $\beta$ （ $T_H1$ サブタイプに標準的なサイトカイン）、ならびにIL-4およびIL-5（ $T_H2$ サブタイプに標準的なサイトカイン）。このアッセイ法で有用な多色粒子は、図7に図示したように容易に識別することができる。示したように、緑色蛍光と赤色蛍光の組み合わせにより色が生成され、粒子種はそれぞれ所定の比率によって識別される。図7の参照色チャートから、純粋な各種粒子について2つの色チャンネルのそれぞれにおける強度が示される。5種類を超える粒子種を十分に識別することができる（精度>98%）。この5重アッセイ法を達成するために使用した手順と同様の手順は、より高度の多重化に容易に拡張することができる。

20

## 【0070】

実際の結果を図8に示す。上記の5つのサイトカインそれぞれに対する抗体を含む捕獲表面を用いて調製したマイクロタイターウェル中に、脾臓細胞を堆積させた。不均一な脾臓細胞混合物を抗CD3および抗CD28の組み合わせで刺激し、サイトカイン分泌応答を誘発した。図8に示すように、サイトカイン分泌のパターンは試験した6つの細胞間で異なる。

30

## 【0071】

図9は、2つのマウス株、C57/BlackおよびBalb/Cの脾臓に由来するT細胞のサイトカインプロファイル为例証する。細胞を標準的な免疫学手順の後にPMA-イオノマイシンで刺激し、 $Th1$ （IFN- $\gamma$ 、IL-2）または $Th2$ （IL-4、IL-5、IL-6）T細胞サブタイプの代表的なものを含むとされている一式の、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-5、およびIL-6に対する捕獲抗体であらかじめコーティングしたポリスチレン表面上にプレーティングした。一晚インキュベートした後、細胞を洗浄除去し、ポリスチレン表面を、それぞれ異なる粒子種と結合してある5つのサイトカインに対する検出抗体に曝露した。洗浄した後、高い粒子密度の領域を低倍率で同定し、広視野蛍光顕微鏡において高倍率で粒子自身を画像化した。各細胞の「フットプリント」における各粒子の色の数を記録した。

40

## 【0072】

各マウス株について、約1,000個の細胞フットプリントを解析した。各細胞のプロファイル（すなわち、5つのサイトカイン検出粒子種それぞれの粒子数）を5次元（5-D）空間において点としてプロットした。IL-2を検出する粒子の数はx軸に、IL-4種に関する数はy軸にプロットしたと考えられ、以下同様である。5-D空間は容易に視覚化することができないため、得られたデータは最も有益である3次元に投影したが、これは主な成分解析を5次元データセットに適用することにより決定された。これは多変量解析の標準的手段であ

50

る。

#### 【0073】

図9は、縮小した3次元（3-D）空間における2つの株の5-D細胞プロフィールを示す（それぞれ黒色および灰色の点）。この解析から2つの結論が支持される。第一に、細胞表現型は、Th1およびTh2という2つの種に分類されるとして広く受け入れられているT細胞の説明に反し、Th1およびTh2に対応する2つの集団ではなく種の範囲を示す。第二に、しかしTh1対Th2パラダイムは完全に誤っているわけではない。2つのマウス株はTh1またはTh2応答への偏りが異なることが知られており、実際に、2つの株の細胞プロフィールの分布はこの偏りを反映する偏差である。

#### 【0074】

いくつかの適用では、表現型を実証するだけでなく、解析後に分泌細胞を回収することが重要である。この性質は、コロニーを膜上にプレーティングし、分泌されたタンパク質が膜を透過した後にこれを捕獲することによって達成される。驚くべきことに、膜を介した拡散によって持ち込まれるフットプリントの拡大は許容範囲であり、捕獲されたタンパク質を上位置する細胞に関連づけることが可能である。本技術のこの局面により、薬剤がサイトカイン分泌プロフィールに及ぼす影響を調べる機会が提供される。T細胞集団を膜上にプレーティングし、分泌タンパク質を膜の下でプレート上で捕獲する。次いで、膜を新たなプレートに移し、細胞を薬剤に曝露した後に、分泌されるタンパク質を再度プレート上で捕獲する。その後、誘導された変化の頻度および特徴を記録する。例えばホルモン、他の細胞、毒素といった他の攪乱剤も、この方法で解析することができる。例えば、攪乱剤は、試験対象から採取したT細胞集団を動物試験の代用として用いて皮膚刺激特性について試験中である化粧品であってよい。

#### 【0075】

単にT細胞によって分泌されるサイトカインばかりでなく、この方法で分泌タンパク質の任意のアレイを同定し、解析することができる。したがって、微粒子標識に結合させる生物学的認識分子として抗体または他の特異的結合パートナーを適切に選択することにより、様々なパラ分泌および自己分泌因子を決定することができる。この技法は哺乳動物細胞に限定されず、この技法を用いて、原核植物および一般的な動物細胞の形質転換表現型を含む表現型を調べることができる。さらにこれは分泌成分に限定されず、個々の細胞の処理に応じて他の成分にも適用することができる。

#### 【0076】

##### アッセイ様式2. 単一B細胞またはハイブリドーマコロニーのIgGプロファイリング

単一のBリンパ球またはハイブリドーマから分泌されるIgGもまた、本発明の方法を用いて解析し得る。B細胞集団または個々のB細胞を多くの抗原に対して同時にスクリーニングし、特異性および親和性について選択することができる。抗体単離において有用であるためには、単にそれらの表現型を実証するだけでなく、解析後に分泌細胞を回収することが重要である。この性質は、細胞を膜上で支持し、分泌されたタンパク質が膜を通過した後にこれを捕獲することによって達成される。

#### 【0077】

関心対象の抗体を単離する方法として、本発明のこの局面は実質的な利点を提供する。過去50年間、生物分析物アッセイにおいて、未精製血清から高度に精製された組換えポリペプチドにわたる抗体調製物が使用されてきた。天然の抗血清は典型的に極めて有用な抗体種を含むが、そのような抗原特異的な抗体は、大過剰量の非特異的抗体中にわずかな量存在するのみである。抗原でコーティングした吸着剤上での親和性精製によって特異的抗体を単離する技法が開発されている。この工程の鍵は、例えば抗体-抗原複合体を穏やかに破壊する低いpH緩衝液を用いるなど、溶出後に活性抗体を回収するための条件の同定であった。

#### 【0078】

親和性精製により（1つの抗原に結合する）単一特異的試薬が得られるが、基礎をなす抗体集団はポリクローナルであり、したがって工業的規模のアッセイを規格化すること

10

20

30

40

50

、または治療としての使用に適した規模での製造は困難である。モノクローナル抗体の開発は、アッセイ試薬としての抗体の使用において大きな一歩を示し、所定の親和性で抗原上の単一エピトープを認識する抗体がもたらされた。モノクローナル抗体を作製する標準的なアプローチ、ハイブリドーマ技術は多大な時間を要しかつ大きな労力を要し、免疫化した宿主に由来するB細胞のわずかなサブセットにしか適用し得ない。この過程は、免疫化した動物（一般的にマウス）から脾臓細胞を単離する段階、およびそれら骨髄腫細胞と融合する段階を含む。よく理解されていないという理由から、得られたハイブリドーマ中には抗原刺激されたB細胞が優先的に示される。さらに、ハイブリドーマの培養、スクリーニング、および精製に関与する作業量のために、基礎をなすポリクローナル応答の非常にわずかな割合、典型的に1%よりもはるかに低い割合のみがハイブリドーマ工程において効率的に試料抽出されるという結果になる。したがって、最も有用であると考えられる稀なクローンは失われる。

10

#### 【0079】

本発明の1つの局面は、所望のハイブリドーマの優れた同定を可能にするスクリーニング法である。免疫化および細胞融合は通常の様式で行う。融合した細胞を、底に膜を有する大きな培養ウェル中に高密度で分注する。膜は、細胞を保持するが分泌されたタンパク質が自由に通過するように設計されている。有用な孔の大きさは0.1~3ミクロンである。膜チャンバーは、ポリスチレンのように高いタンパク質結合能を有する、または他の適切なタンパク質吸収物質のより大きな固体支持体上に置く。固体支持体は、例えば宿主種の免疫グロブリンに対して産生された抗体（例えば、ヤギ抗マウス）などのIg捕獲試薬であ

20

20

#### 【0080】

一連の結合試薬には、全長抗原、特定のエピトープを含む抗原断片、交差反応する可能性のある分子、および任意に抗免疫グロブリン（捕獲された抗体の量を定量するため）、ならびにアイソタイプ同定試薬（より有用なIgG分泌細胞と他のアイソタイプを分泌する細胞を識別するため）が含まれ得る。試料表面が所望の結合プロファイルを有する状態で見出された場合（試料表面が結合した標識セットおよび結合しなかった標識セットにより特徴づけられる）、好ましくは自動顕微鏡によりスポットの物理的座標を記録する。次いで、その座標に存在するハイブリドーマを、膜を敷いた培養プレートから回収する。存在する微粒子標識の数および種類の両方が情報となる。

30

#### 【0081】

微粒子標識に基づく検出系が高感度であるため、図10に例証するように、単一細胞から分泌されたIgをプロービングすることが可能であることが判明した。したがって、捕獲された微粒子標識の数は、個々のウェルの上清を解析する際に特定クローンの異なる増殖速度および異なる分泌速度が交絡変数となるハイブリドーマスクリーニングの場合よりも、相互作用の固有の親和性により直接関連する。緩衝液の条件を調節することにより、陽性としてスコアリングする細胞の分泌Igに親和性の閾値を課すことができる。

40

#### 【0082】

これを実証するため、2つのハイブリドーマ株をATCCから入手した。一方はmycペプチドに対する抗体を分泌し、もう一方はPSAに対する抗体を分泌する。mycペプチドをBSAと結合し、次いでこれを微粒子種1（緑色）と結合した；PSAは直接微粒子種2（赤色）と結合した。さらに、マウスIgGに対するヤギ抗体を微粒子種3（ピンク色）と結合した。いずれの場合も、微粒子表面はアルデヒド基を含み、還元的アミノ化によりタンパク質を共有結合した。抗myc分泌細胞株を様々な希釈で抗PSA株に添加した。

#### 【0083】

図10に示したのは、明視野顕微鏡を用いて画像化した膜上の細胞である（左上角の灰色の円）。基礎をなす1つの細胞の「フットプリント」を黒および灰色の点（緑色およびピ

50

ンク色の粒子に相当する)を有する大きな円として示すが、円の外側では密度はバックグラウンドレベルまで減少している。高倍率の挿入図において、個々の黒色および灰色の物体は緑色およびピンク色の粒子に相当する。

#### 【0084】

詳細には、ハイブリドーマ細胞を、プロテインAでコーティングした下層のポリスチレン表面と接触している0.4 $\mu$ m孔を有する膜上に堆積させた(図10の上部の円)。細胞は2%メチルセルロース中に懸濁した。すべての細胞が膜にしっかりと定着できるように、プレートを短時間遠心した。遠心後、メチルセルロースが細胞を一定の位置に保持する働きをする。

#### 【0085】

分泌されたIgGがハイブリドーマ細胞から拡散するに従い、一部は膜を通過し、コーティングしてあるポリスチレン表面上に捕獲された。これらの実験では、ポリスチレンから膜を静かに除去することができるようにするプラスチックホルダーを使用して、膜を支持した。膜が実際に下層のポリスチレンと接触できるようにホルダーを低くすることで、Costar(登録商標)のTranswell(登録商標)をこの目的に適合化させた。膜を通過する前に側方に拡散したIgGによるノイズを減少させるため、プロテインAを結合したデキストランをメチルセルロースに含めた。

#### 【0086】

4時間インキュベートした後、膜を除去し、これを新鮮な増殖培地中でインキュベートした。下層のポリスチレン表面を、検出粒子(緑色、赤色、ピンク色)と共にインキュベートした。洗浄した後、Kramer M2デジタル顕微鏡を用いて表面を低倍率(マクロレンズ、1.5 $\times$ ズーム)でスキャンした(図10の中央の円)。自動化ソフトウェアにより、高濃度の微粒子が存在する領域が容易に同定された。高倍率(10 $\times$ レンズ、4 $\times$ ズーム)に切り替えた後、それらスポットを2色チャンネルで画像化した(図10の下部の円)。ソフトウェアにより、個々の粒子種が緑色、赤色、またはピンク色と同定され、各種粒子の数が計数された。緑色粒子がピンク色粒子とほぼ等しい数であり、赤色粒子が少なくとも10~100倍低い(バックグラウンドノイズ)場合に、細胞は抗myc抗体を分泌すると見なした。

#### 【0087】

本実験では、抗myc細胞は、10,000個の細胞に1個の割合でハイブリドーマ混合物中に添加した場合に容易に同定され得た。抗myc分泌細胞の位置を同定した後、いくつかの細胞をコンピュータ制御マイクロピペットにより膜上の対応する位置から回収した。画像化したポリスチレンおよび膜上の細胞位置合わせは、細胞の幾何学的関係を一致させることにより容易に達成された。選択した細胞を培養した後、myc抗原に対する特異性を従来のElisa法により確認した。

#### 【0088】

微粒子標識検出は非常に感度が高いため、プレーティングする細胞の密度はかなり高くてもよい。すなわち、非分泌または低親和性細胞は一次アッセイでは目に見えず、脾臓全体のB細胞集団をスクリーニングすることができる。この特徴は従来のハイブリドーマ技術を超える大きな進展を表し、ポリクローナル血清と比較した場合のハイブリドーマの大きな制限が排除される。これらの多数の細胞をスクリーニングするには、膜を使用しない前スクリーニングにより陽性クローンを有するウェルを同定し、次いでこれを膜上に低密度で再度プレーティングして単一細胞の回収を容易にする。さらに、膜貫通フットプリントにおけるバックグラウンドは、膜上にIgの吸収剤(例えば、プロテインAデキストラン)を含めることにより減少し得る;これによって、Igは細胞下の膜を通して直接拡散する方を選び、膜を通して拡散する前に側方に拡散するIgは最小限に抑えられる。B細胞は非接着細胞であるため、細胞を膜上に堆積させた後、細胞を粘稠性培地、好ましくは半固体培地中に包埋することが有用である。それにより、膜を動かした際に細胞はその空間的位置を保持する。メチルセルロースはこの目的に有効な物質であることが判明した。したがって、メチルセルロース中の細胞の希釈懸濁液として細胞を膜に供し、次いで、遠心により細胞を膜上に堆積させる。メチルセルロースは半固体であり、細胞を定位置に保持する

10

20

30

40

50

。マイクロマニピュレーターを用いた細胞の回収は、この物質によって妨げられない。または、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を用いて所望の細胞を回収することができる。いずれの方法も自動化に適している。

#### 【0089】

得られたフットプリントに焦点を合わせ、近接する細胞のフットプリントの重複を避けるため、非特異的な捕獲試薬をメチルセルロース基質中に含めるか、またはその上に堆積させることができる。試料表面上で免疫グロブリンをアッセイする場合、プロテインAがこの目的に適した試薬である。プロテインAはまた、基質に共有結合させてもよい。

#### 【0090】

存在する微粒子標識の種類は、抗体の特異性に直接対応する。上記のように、ポリクローナル血清の魅力的な特徴の1つは、高度に特異的な抗体種が存在する場合が多いことである。標準的なハイブリドーマスクリーニングでそれらの種を回収することは、二次スクリーニング基準の特異性による試料抽出率が低いことから困難である。さらに、本方法では、特異性局面が一次スクリーニングに容易に取り込まれるため、ファミリー内交差反応性の低い抗体ファミリーの調製が簡単になる。

#### 【0091】

10個またはそれ以上の異なる抗原で単一マウスを免疫化することで、さらなる効率の改良が達成できる。関心対象の特定のクローンは十分稀であるため、スクリーニング過程に過度の負荷を課すことも、または各抗原に対して最終的に作製されたクローンの質を落とすこともなく、集団内でそれぞれを同定することが可能である。さらに、スクリーニング過程の初期に特異性を評価することができる。1つの実験において、単一タンパク質に由来する7つのペプチドを同時免疫原として使用した。これらのペプチドのうち2つのみが十分に強い応答を誘発して、標準的なアッセイ法で検出可能な血清抗体をもたらしたが、7つのペプチドそれぞれを認識する抗体を分泌する細胞が、免疫化したマウスの初生脾臓集団中に認められた。原型タンパク質による免疫化は、インビボでその断片の提示を引き起こすため、このアプローチにより稀な特異性を獲得することができる。

#### 【0092】

特異性についてアッセイする十分なIgを得るために骨髓腫細胞と融合することは必要ではないため、回収した関心対象の細胞を不死化する別の方法が可能である。1つのアプローチは、PEGまたはセンダイウイルスを使用する大量ハイブリドーマ形成とは異なる、レーザーの使用による個々のB細胞と骨髓腫との融合である。別のアプローチは、コードするDNAのクローニングである。同様に、例えば微生物から分泌されたタンパク質、または溶解した細胞から捕獲されたIg様分子（最初に生細胞の複製プレートを調製した後）に対して、この全工程を適用することができる。本発明のこの局面における組換え抗体は、B細胞またはハイブリドーマスクリーニングの産物であってよく、またはランダムな特異性を有する一次供給源としてのライブラリーであってよい。

#### 【0093】

組換えによって調製した非Igファミリーのタンパク質も同様に、パートナーと特異的に結合する能力について評価することができる。それらはそれ自体でまたは担体と融合して解析し得る。好ましい担体はIgのFc部分である。この担体は、組換えによってタンパク質を調製する場合に高分泌レベルを達成するのに、および下層の表面上で分泌細胞を容易に捕獲するのに有用である。有用な非Igタンパク質ファミリーの例として、本発明者らは、Schepartzら（国際公開公報第01/81375号）に記載されているトリ胛臓ペプチドを使用した。この36アミノ酸ペプチドは自発的に折りたたんで、融解温度65℃を有する非常に安定な三次構造を形成する。ミニタンパク質の安定性に著しく影響を及ぼすことなく、ランダム化したアミノ酸で溶媒露出残基を置換することができる。Fcと融合することで、組換えによって産生された突然変異タンパク質を、ハイブリドーマのスクリーニングと類似した方法でスクリーニングすることが可能になる。

#### 【0094】

このように、膜上の細胞を利用し、膜を除去した後に膜貫通フットプリントを解析する

ことは、関心対象の細胞を同定するのに有用であり、次いで除去した膜からこの細胞を回収することができる。この方法の使用は微粒子標識の使用に依存していないが、微粒子標識は好ましい態様を提供する。フットプリントの所望の成分が免疫グロブリンを含む場合、フットプリントは膜上にプロテインAを含めることによって改善される。

#### 【0095】

##### アッセイ様式3. 細胞表面抗原群の解析

サイトカイン分泌は、複数の異なる種類のT細胞（ナイーブ、記憶、キラー）、および樹状細胞などの他の免疫系細胞型の表現型である。これらの様々な細胞型を区別する表面抗原マーカーが認められている。したがって、サイトカイン分泌プロファイルを経細胞表面マーカーと関連づけることは有用である。分泌プロファイルは膜上にプレーティングした細胞で行うことができるため、細胞はさらなる解析のために依然として利用できる。 10

#### 【0096】

細胞表面染色の特定の適用はHLA型の同定である。この状況では、特定の細胞は、遺伝子座当たり2種類の微粒子標識とのみ結合することになる（母性対立遺伝子および父性対立遺伝子）。しかし、いくつかの遺伝子座は数百の対立遺伝子を有するため、高多重化能を有することは有用である。

#### 【0097】

細胞表面抗原における高多重化能の同様の必要性は、血液（または尿、便、肺洗浄液など）中の脱落腫瘍細胞の検出である。多くの腫瘍は、正常細胞表面抗原の特徴的な組み合わせ、および特定の抗原の変異型を有する。したがって、単一の細胞表面マーカーに関する染色は、細胞を腫瘍細胞と同定するには十分ではない。しかし、もし血液試料が同じ異常な抗原群を有する細胞を20個含むならば、それらは単一の腫瘍前駆細胞に由来するクローン子孫である可能性が非常に高い。十分な多重化能により、正常細胞型をすべて同定することができ、よって異常細胞の認識の信頼性がより高まる。 20

#### 【0098】

腫瘍の特徴づけに関して関心の対象となる正常細胞抗原の中には、治療法の選択に関連する抗原が含まれる。MDRポンプは腫瘍細胞内で高レベルで発現される場合、ポンプの基質である薬剤に関する予後不良と関連づけられる。同様に、エストロゲン受容体が発現される場合、細胞はタモキシフェンなどの薬剤に応答する可能性が高い。したがって、多重細胞染色を用いて、正常な細胞型を規定すること、異常な細胞型を規定すること、および機能的に関連性のある抗原を特徴づけることができる。 30

#### 【0099】

したがって、膜上の単一細胞または一連の個々の細胞を、それぞれ異なる色を有する微粒子標識と結合したこれらのマーカーの特異的結合パートナーの複雑な混合物中に入れることができる。このような方法で、単一細胞上で得られる受容体の複雑な補完物を確定することができ、特定組織に由来する複数の細胞試料を異質性に関して分類することができる。

#### 【0100】

##### アッセイ様式4. 臨床試料の特徴づけ

疾患状態および治療手順による処置に対するその反応は、細胞内のタンパク質移行、表面抗原プロファイルの変化、および分泌プロファイルの変化を含む様々なパラメータにより特徴づけられる。疾患状態に特徴的な細胞はこのような典型的なパターンを示し得る。例えば、任意の特定の種類の腫瘍に関する腫瘍細胞は、表面抗原の特徴的なパターンを有する；処置の進行は、このパターンを有する細胞の運命によってモニタリングすることができる。以下の例は、臨床試料に適用した場合に、本発明の方法によって可能となる特徴づけの種類を例証する。 40

#### 【0101】

疾患状態は、罹患対象のT細胞集団の変化によって特徴づけることができる。そのような対象は任意の哺乳動物であってよい；この方法はヒトに適用する場合に特に関心が高いが、特に家畜に対する獣医学的状況においても同様に適用することができる。疾患状態を 50



特徴づける1つの態様では、対象のT細胞プロフィールを取得する。プロフィールは処置手順に応じてモニタリングすることができ、よって得られたデータは、処置の進行および有効性を医師に知らせるのにも、およびより大きな工業規模では、候補薬剤および将来の臨床的使用の手順を評価するのにも有用である。

#### 【0102】

細胞を回収し、次いで様々な手順により処置することができるため、単一の薬剤または薬剤の組み合わせが細胞に及ぼす影響を調べることができる。または、ヒト試料の一定分割量を平行した実験で処理して、異なる条件について探索することができる。例えば、薬剤がサイトカイン分泌プロフィールに及ぼす影響を調べるために、T細胞集団をプレーティングし、次いで細胞を薬剤に曝露し、分泌されたタンパク質をプレート上で捕捉する。その後、誘導された変化の頻度および特徴を記録する。例えばホルモン、他の細胞、毒素といった他の攪乱剤も、この方法で解析することができる。例えば、攪乱剤は、試験対象から採取したT細胞集団を動物試験の代用として用いて皮膚刺激特性について試験中である化粧品であってよい。

10

#### 【0103】

臨床研究では典型的に、サイトカイン分泌プロフィールはT細胞集団の代表的な試料について取得する。一般的に、T細胞集団の特徴的な像を確認するためには、個々のT細胞が50個、好ましくは100個、およびより好ましくは1,000個という試料サイズをプロフィールすべきである。「対象のT細胞集団の特徴づけ」という用語は、T細胞集団の代表的な試料のサイトカイン分泌プロフィールを取得することを指す。

20

#### 【0104】

上記のように、個々の薬剤および薬剤の組み合わせを含む種々の治療手順の影響を、対象のT細胞集団プロフィールに及ぼす影響について試験することができる。さらに、臨床効果の他の指標を用いることもできる、例えば、タンパク質の細胞内移行、表面提示タンパク質の分布および種類、ならびに一般的分泌プロフィールは、特定の疾患状態を特徴づけ得り、これらの疾患状態に及ぼす薬剤の影響は米国特許第6,673,554号に記載されているように試験することができる。

#### 【0105】

#### アッセイ様式5. 組織染色

多重染色の有用性は血液試料中の細胞型の規定に限定されず、より広範に任意の組織学的状況に適用できる。自動化病理学を単純化するために細胞型を区別するには、例えば、細胞表面抗原ばかりでなく任意の抗原を使用することができる。例えば、抗体と結合した微粒子標識で組織切片を染色し、これを顕微鏡で観察し得る。核膜抗原、ゴルジ体、および微小管を含む種々の細胞内抗原が区別され得る。ちょうど腫瘍細胞が正常抗原を異常な配置で提示し得るように、中間段階の幹細胞もそのように提示し得る（実際に、いくつかの腫瘍はこの種類の幹細胞の制御障害の結果であると考えられている）。多変量染色手順により正常細胞を同定することで、そのような異常な細胞がより容易に発見される。

30

#### 【0106】

組織染色はまた、血管新生または再生などの組織レベルの進行における細胞型の相互作用の解明に有用である。これらの進行は、それぞれ周囲の細胞に影響を及ぼす因子を分泌している複数の細胞型を伴う。

40

#### 【0107】

組織染色を行うには、mRNAをタンパク質抗原の代わりにマーカーとして、微粒子標識上の相補的プローブと共に使用することができる。単一のmRNA分子は、蛍光複合体がその位置で自己集合し、微粒子標識内の蛍光濃度に類似した蛍光濃度の高度の局在化を生じることにより、細胞内で画像化される。この技法を用いて、異なる遺伝子に由来するmRNAが細胞内で異なる空間的局在性を有することが実証された（米国特許第5,641,675号）。多重標識および組織染色への拡張は、この特許において開示されていない。

#### 【0108】

微粒子標識はまた、逆行性輸送標識として使用することもできる。この技法では、微粒

50

子標識はエンドサイトーシスにより神経細胞に取り込まれ、軸索を逆行して細胞体に輸送される。神経回路をマッピングするための従来の逆行性標識では、実験当たり数個の細胞のみが標識されるように、エンドサイトーシスによる取り込みの効率が意図的に低く保たれていた。多種多様な色で得られる微粒子標識を用いると、神経終末の領域は微粒子標識の着色された拡散にさらされ、単一の動物において全回路が解析され得り、これは別個の動物から得られたデータを照合するよりもより正確である。同様に、微粒子標識を細胞体に注入することもできる。微小管に沿った輸送を促進するタンパク質で微粒子標識をコーティングすれば、さらに回路を順行性様式でマッピングすることができる。顕微鏡を用いて単一細胞を観察することで、観察者は複数の細胞成分の位置に注目することができるようになる。

10

#### 【0109】

同様に、初期胚の各細胞に様々な微粒子標識種を添加し、形態形成の過程を追跡することができる。同定され得る子孫細胞の数は微粒子標識の分割により限定されるが、色を正確に同定するには所与の細胞においてほんのわずかな微粒子標識のみが必要であるため、数世代を観察することが可能である。または、すでに、胚発生を解明するのに細胞を標識するため、エンハンサートラップ構築物が用いられている。この技法では、ルシフェラーゼまたは $\beta$ -ガラクトシダーゼなどのレポーター遺伝子を、生殖系列の染色体部位にランダムにクローニングする。レポーターが特定の系譜に特異的な転写プロモーターの制御下にきた場合、その系譜の細胞が標識されることになる。微粒子標識によって提供される多重化を付加すれば、レポーターとして数百の識別可能な抗原を使用することができる。同様に、一連のエピトープタグ（識別可能な短いペプチド）の担体として分泌タンパク質を使用して、レポーターを操作することもできる。組織培養細胞に適用すれば、多重遺伝子レポーターアッセイ法に対するこのアプローチにより、経路の相互作用を研究するために多くの経路を同時に調べることが可能になる。トリ脾臓ペプチドのようなミニタンパク質のスクリーニングに関して上記したように、抗体のFc部分はエピトープタグの適切な担体を提供する。

20

#### 【0110】

さらに別の例として、ショウジョウバエ (*Drosophila*) の初期胚は、基礎的な分節計画を作成するために約30個の遺伝子を使用する。その過程を可視化するために、1度に3つの遺伝子産物が免疫組織学的染色により研究されている。この様式でマップを整列させるには、相当な労力が必要である。それぞれ異なる微粒子標識に結合している同じ30個の抗体を使用すると、1つの胚で完全なマップを構築することができ、変異の影響へのより深い洞察が提供される。

30

#### 【0111】

##### アッセイ様式6. 増殖因子の発見

5,000を超える遺伝子が分泌タンパク質をコードしていると考えられている。そのほんの一部が十分に特徴づけられているにすぎない。自己分泌およびパラ分泌細胞シグナル伝達におけるそれらの役割は、上記の「組織染色」において考察した方法により研究することができるが、しかしそれはどの因子がどの組織に関連しているかをいくらか予備的に同定した上で初めて可能となる。試験すべき1つの性質は、栄養または増殖促進効果である。推定栄養因子が多く異なる細胞型に及ぼす影響を試験するための効率的なアプローチは、胚様体をその因子に曝露することである。米国特許第5,914,268号に記載されているように、8細胞期の哺乳動物胚を、適切なタンパク質因子を含む培地中に解離すると、未分化幹細胞として分裂増殖が起こる。必要な因子を退棄すると、細胞は凝集塊、典型的には約500個の細胞の中実または中空の球を形成し、分化へと進行する。多くの細胞型が形成されるが、それは組織化されていない様式による。単一の96ウェルマイクロプレートウェルは、これらの胚様体を数百個維持し得る。増殖因子を発見する目的で、マウス（またはヒト）を単一マイクロプレートウェルに効率的に圧縮する。この縮小化を利用するためには、数十から数百の細胞型を定量する高感度な手段が必要である。微粒子標識を標識として使用すれば、特異的抗体が利用できる細胞型をすべて試験することができる。抗原は

40

50

細胞表面であっても細胞内であってもよい。同様に、細胞表面抗原により、さらなる解析のための細胞を回収することが容易になる。

#### 【0112】

上記の抗体単離技術を用いることにより、胚様体における二次スクリーニングで数百からさらには数千もの抗原を同時にスクリーニングすることができ、この目的および一般的な自動化病理学に適した組織染色を見出す手段が提供される。さらに、三次スクリーニングとして、微粒子標識と結合してある抗体を、組織アレイ（マウスまたはヒトに由来する全組織の試料）に対して多重様式で探索することができる。このようなスクリーニングは、中間段階の幹細胞を明らかにすると考えられる。胚様体状況において活性のある増殖因子を、次に、想定される中間段階の幹細胞の増殖に及ぼす影響について試験し得る。そのような増殖因子は、再生または創傷治癒の誘導に役立つ可能性がある。逆に、癌を含む増殖性疾患の処置として、中和抗体（または受容体ドメイン）を用いて活性を減少させることができる。

10

#### 【0113】

したがって、胚様体を、それぞれ胚様体に含まれる個々の細胞型のマーカーの特異的結合パートナーを有する様々な識別可能な微粒子標識で標識する。この「対照」胚様体を、候補化合物で処理し、その後「対照」の胚様体と同様の方法で標識した試験胚様体と比較する。次に、「対照」と試験胚様体中の標識された各細胞の数および種類に関して比較を行う。「対照」と比較して試験抗体において少なくとも1つの細胞型の拡大または増殖をもたらした候補化合物を、その細胞型の増殖因子と同定する。このような方法で、様々な異なる細胞型を単一の候補化合物に対する応答に関して同時に試験することができる。

20

#### 【0114】

##### アッセイ様式7. 分画した生体物質の多重検出

分画方法は、大きさ、電荷、ならびに移動相（移動する気体または液体）および固定相（多孔質固体もしくはゲルまたは固体支持体上にコーティングされた液体を含む吸着剤）に対する物質の相対的親和性を含む固有の分子特性の相違に基づいて物質の混合物を分離するために使用する多様な技法を伴う。後者の場合、それぞれの物質が移動相に沿って運ばれる速度は、その溶解度（液体移動相における）または蒸気圧（気体移動相における）および吸着剤に対するその親和性に依存する。電荷または大きさなどの他の物理的特性に基づく関連技法には、これらに限定されるわけではないが、1Dゲル、2Dゲル、アガロース

30

#### 【0115】

おそらく最も簡単な分画方法は、細胞を破壊した後の可溶性タンパク質と不溶性タンパク質との分離である。レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法によって得られた細胞に適用すると（US 2204/0053326 A1号）、この方法により、ごく微量の材料で複数のシグナル伝達経路タンパク質を解析することができる。捕獲表面上で直接または膜を介した拡散後に細胞をインサイチューで破壊すれば、多重ELISA形式のアッセイを単一細胞レベルで行うことができる。

#### 【0116】

電気泳動は、タンパク質の複雑な混合物（例えば、細胞、細胞成分画分、カラム画分、または免疫沈降物に由来する）を分離して、サブユニット組成を調べるため、およびタンパク質試料の均一性を確認するために用いられる。ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、分析物は、電場に応答してゲル基質内の孔を通して移動する；孔の大きさはアクリルアミド濃度が高いほど小さくなる。ゲルの孔の大きさとタンパク質の電荷、大きさ、および形状の組み合わせで、タンパク質の移動速度が決まる。当技術分野において周知である変法には、超薄ゲル、複数の単一濃度ゲル、勾配ゲル、ならびに複数の勾配ゲルおよびミニゲルが含まれる；ゲルはまた、例えば等電点に基づいた1次分離、およびその後の例えば大きさに基づいた2次元目を伴う2次元で泳動することもできる。ゲルで分離された分析物は、次いで、オートラジオグラフィーもしくはリン光画像化または色素による染色によってインサイチューで解析し得る。

40

50

## 【0117】

解析におけるより優れた柔軟性は、ブロッティング（拡散、ウィッキング、または電場の影響下での移動による、ゲル化膜への転写）により提供される。DNAの場合、これはサザンブロッティングと称され；mRNAの場合にはノーザンブロッティングと称され、タンパク質の場合にはウェスタンブロッティングと称される。適切な膜には、ニトロセルロース、PVDF、またはナイロンが含まれる。転写された分析物は膜の表面に結合し、検出試薬との反応が利用できるようになる。残りの結合部位はすべて、膜をタンパク質または界面活性剤ブロッキング剤を含む溶液中に浸漬することによりブロッキングする。分析物が膜上に固定化されたならば、微粒子標識と結合している生物学的特異的結合剤で分析物をプロービングすることができる。

10

## 【0118】

多重染色は、単一試料において様々な特性を関連づけるのに有用である。隣接したレーンでそれぞれ異なる特性に関して染色した複製試料を泳動する代わりに、隣接したレーンを用いて、供給源細胞が、薬剤または他の攪乱剤によって処理する前と後に単離された試料を比較すること、または正常組織と罹患組織を比較することなどができる。典型的にその特性に対する抗体を使用して同じ試料において試験する関心対象となる特性には、これらに限定されないが以下のものが含まれる：ホスホチロシンおよびホスホセリン；ジnkフィンガーまたはロイシンジッパーモチーフを含む配列「モチーフ」；SH2ドメインおよび他のタンパク質相互作用ドメイン；c-myc、Hisタグ、FLAGエピトープなどの操作されたタグ；ならびに特定の糖質部分（例えば抗体の代わりにレクチンを使用）。プロット上で分析物を検出する方法は広範囲に及ぶ。いずれの場合も、多重微粒子標識を使用することにより、同じ試料からより多くの情報を得ること、および装置の大きさを縮小することが可能になる。特に、マイクロ加工の進歩が、数十センチメートルから数十ミリメートルというゲル電気泳動の大きさの大幅な減少につながっている。

20

## 【0119】

多重染色については記載済みであるが、個々の微粒子標識を列挙することによりゲル分画してブロッティングした試料における分析物の同定については記載していなかった。1つの適用は、商業的供給源から得られる多くのタンパク質サイズラダーの1つを利用する。分析物の分子量を正確に決定することは重要である。例えばInvitrogenのキットは、見かけの分子量約10～190 kDaのサイズラダーにつき10個のタンパク質からなる。標準的技法では、別のレーンでサイズラダーを泳動し、非特異的にタンパク質を染色する。微粒子標識を使用すると、10個のタンパク質すべてを修飾して、必要に応じて分離の前または後に特定の微粒子標識と結合させることができる。したがって、サイズラダーを1つ1つのレーンに含めることができ、分析物のさらにより正確な位置合わせが提供される。同じ利点はDNAサイズラダーにも成立する。

30

## 【0120】

キャピラリー電気泳動（CE）は、特にDNA配列決定（Carrilho, F., Electrophoresis (2000) 21:55-65）および断片サイズの解析（Butler, J.M., Methods Mol. Biol. (1998) 98:279-289）に広く使用されている別の分画法である。例えば、チェーンターミネーション法による配列決定は、一本鎖鋳型および特異的プライマーを使用したDNAポリメラーゼによるDNA鎖の合成を含む。合成反応は、伸長を終結するヌクレオチド類似体（ddNTP）の取り込みに際して終了する。dNTPおよび4つのddNTPのうちの1つの適切な混合物を使用すると、重合はそれぞれ可能な部位でランダムに終結する。現行の市販のシーケンサー（例えば、Applied BiosystemsのABI 373）では、チェーンターミネーターはまた4つの識別可能な有機色素蛍光の1つで標識されている。蛍光として量子ドットを使用することにより、感度が上昇する。

40

## 【0121】

8つの識別可能な量子ドットを使用することにより、2つのDNA鎖を単一のキャピラリーで配列決定することができる。分離後標識様式では、より高度な多重化も可能である。キャピラリーの末端から移動ドラムに滴下させるか、またはゲル電気泳動分離後にサザンブ

50

ロットィングするという古い技法により、分離されたDNAを膜上に堆積させるが、その効率は非常に薄いゲルを使用することにより改善される；薄いゲルは容量が低い、検出が高感度であるため許容範囲である。DNA試料番号1を固有の配列を含むプライマー（ヒトゲノムでは18塩基で十分である）から開始する場合、その相補的配列を微粒子標識番号1に結合させ得る。数百の識別可能な微粒子標識を用いて、数百のDNA断片を単一レーンにおいて識別することができ、処理量の徹底的な増加が示される。微粒子標識は十分に明るく、分析物の検出は単一分子レベルに近づくため、この技法は、微量でしか得られないDNAに、または配列決定の前のPCRによる厄介なDNAの増幅またはクローニングを回避するために特に有用である。また、分離後標識アプローチとして、微粒子標識をタグとして使用することにより、DNAの移動速度を変化させる蛍光ダイターミネーターに付随する人為的結果が回避される。 10

#### 【0122】

マイクロ加工された装置におけるキャピラリー電気泳動の実施は、分解能を有意に喪失することなく電気泳動時間が短縮されることが示されている（最近の総説に関しては、Medintz, I.L., et al., Electrophoresis (2001) 22:3845-3856、およびJin, L.J. et al., Biotechniques (2001) 31:1332-1340, 1342を参照のこと）。読み取り長が約500 bpのDNA配列決定は、30分未満で行われ得る（Medintz, I.L., et al., Electrophoresis (2001) 22:3845-3856に概説されている）。微粒子標識によって提供される感度の高さは、縮小化によりDNAの添加容量が減少するために、これに関連して特に価値がある。

#### 【0123】

さらに、組み合わせ技法により多種多様な特異性を有するペプチドおよび他のオリゴマーを構築し、大きく異なる結合特異性を有する一連のパラログを得ることができる（米国特許第5,340,474号）。一般に、顕微鏡規模まで縮小された多重ELISA形式のアッセイ法は、血液、尿など、バイオマーカーの測定に有用である。増殖因子発見様式により、血中レベルの上昇が癌の早期警戒信号である多くのタンパク質が得られるはずである。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0124】

【図1】図1A～図1Cは、異なる大きさの直列粒子の会合によって提供される多重化拡大の図式による表示である。

【図2】そのような直列粒子の顕微鏡写真である。

【図3】微粒子標識を生体分子と結合する生物結合法の略図である。

【図4】有機色素ローダミン6GとCdSe微粒子標識との(a)励起プロファイルおよび(b)発光プロファイルの比較を示す。どちらを測定するのにも同様のフィルターセットが使用できる。

【図5】図5Aおよび5Bは、本発明の多重標識を使用する多重アッセイ法の略図を示す。図5Aに示す段階1では、単一のT細胞から分泌された複数のサイトカインを、特異的な捕獲抗体の混合物により下層の表面上で捕獲する；図5Bに示す段階2では、細胞を除去した後、捕獲されたサイトカインを、それぞれ識別可能な微粒子標識と結合している特異的検出抗体の混合物を用いて検出する。

【図6】単一細胞から分泌され、本発明の微粒子標識で標識されたIL-2の、広視野顕微鏡画像を用いて得られた顕微鏡写真である。IL-2と結合した個々の粒子はそれぞれその標識により検出できる。 40

【図7】様々な色の純粋な微粒子標識に関する、2つの色チャンネルそれぞれの強度を示す。このような多重度は有用であり、場合によっては本発明の方法において必須である。

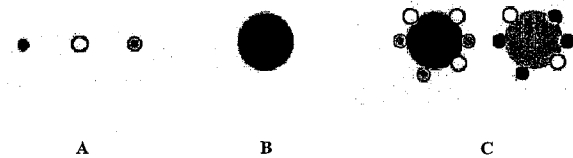
【図8】代表的な6つの細胞それぞれの5-サイトカインプロファイルを示す棒グラフである。微粒子標識の解読は、図7に示した2つの色チャンネルにおける参照標識強度に基づく。

【図9】2つのマウス株の様々な単一細胞の分泌サイトカインプロファイルを示す。各点は、5次元空間の3つの最も重要な成分に投影された、単一細胞の5-サイトカインプロファイルを表す。どちらの株も種の範囲を示すが、分泌は、一方の株が灰色のドットで示されもう一方が黒色のドットで示される2つの株の間の偏差である。 50

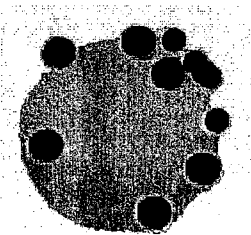
【図 1 0】分泌されたIgGが下層の表面上で捕獲されている、膜上に位置する個々のハイブリドーマ細胞から得られた、結合した微粒子標識のパターンを示す。この「フットプリント」は、2つの識別可能な微粒子標識でプロービングした。一方の微粒子標識（黒色）は抗Ig試薬と結合しており、細胞からの分泌レベルを定量するために用いられる。第2の微粒子標識（灰色）は抗原と結合しており、抗原特異性を規定する。さらなる標識を、複数の抗原特異性を同時に探索することができる。

【図 1 1】試料表面から膜を持ち上げる改良法の1つの態様を示す。示したように、試料表面の真上の開口部が、吸引によって除去する膜の上面で乱れが生じるのを妨げる。

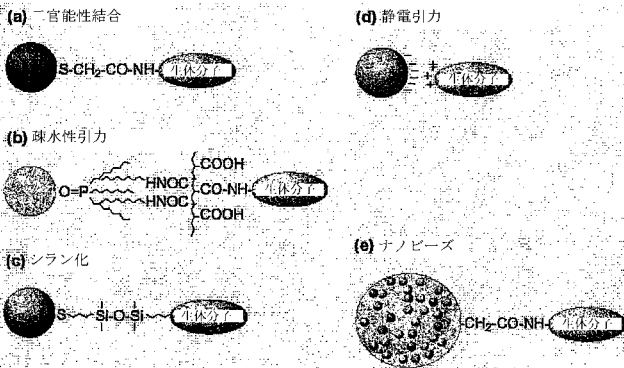
【図 1】



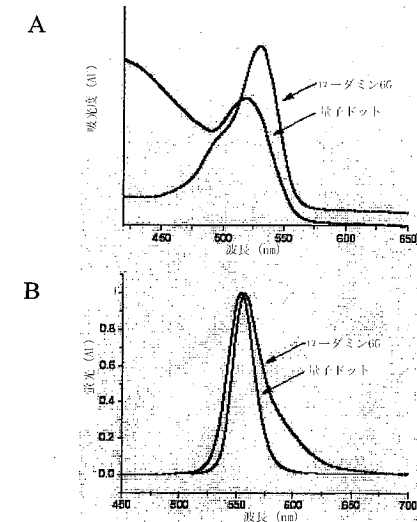
【図 2】



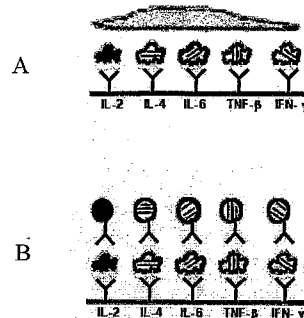
【図 3】



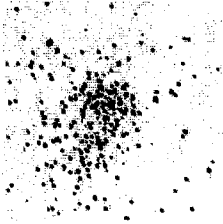
【図 4】



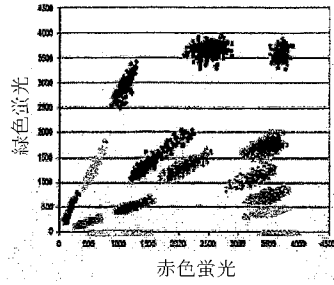
【図 5】



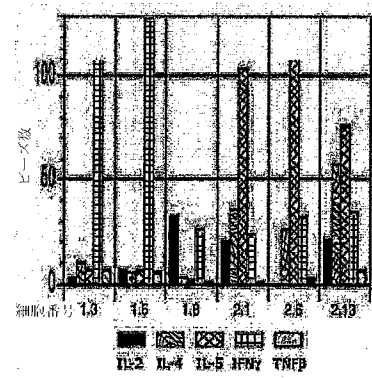
【図 6】



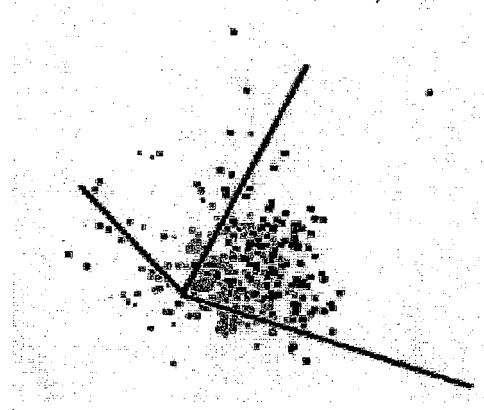
【図 7】



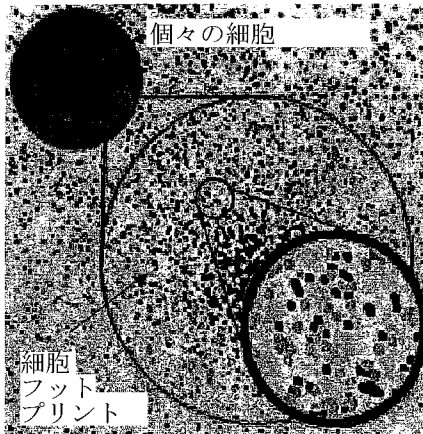
【図 8】



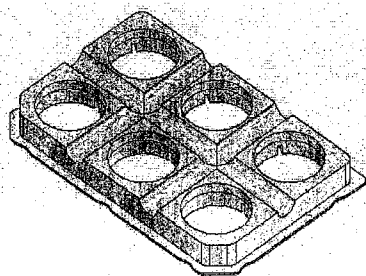
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【手続補正書】

【提出日】平成18年7月11日(2006.7.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の段階を含む、単一細胞に結合する様々な細胞成分の有無を決定する方法：

該単一細胞またはその成分を、異なる色を有する様々な微粒子標識と接触させる段階であって、異なる色の粒子それぞれが、細胞成分に特異的な結合パートナーと結合しており、かつ、該単一細胞または成分が、該成分を保持するが未結合の微粒子標識を保持しない試料表面上に堆積している、段階；

未結合の微粒子標識を除去する段階；ならびに

顕微鏡観察手段により、試料表面上の該細胞または成分と結合している微粒子標識の数および性質を観察する段階。

【請求項2】

試料表面を顕微鏡で調べて、該試料表面上に存在する成分を決定する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

表面上の成分が微粒子標識で標識され、該標識それぞれが、成分に特異的な結合パートナーを含みかつ特徴的な色を有する、請求項2記載の方法。

【請求項4】

各成分の存在および量を決定して、該成分に関する該細胞のプロフィールを取得する、請求項3記載の方法。

【請求項5】

細胞がT細胞であり、成分が少なくとも3つの異なるサイトカインを含む；または疾患状態を評価すべき対象のT細胞集団を代表する少なくとも50個のT細胞に対して行われる；または

細胞が溶解した細菌である；または

細胞が初代B細胞、不死化B細胞、もしくはハイブリドーマであり、決定すべき成分が特定の抗原もしくはエピトープに特異的な抗体である、

請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】

標識の前に、細胞を薬剤または他の外部刺激に曝露する段階をさらに含む方法であって

該細胞を該薬剤または刺激に曝露していない条件下で観察される微粒子標識の数および性質を、細胞を該薬剤または外部刺激に曝露した場合に観察される微粒子標識の数および性質と比較し、それにより該薬剤および外部刺激が該細胞に及ぼす影響を決定する、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項7】

試料表面上に重層した透過性の膜支持体上で細胞が支持され、かつ

細胞成分が、膜を透過して試料表面上に堆積させられ、

を含む、個々の細胞に結合する成分サブセットの特徴づけに使用し得る試料を取得する方法であって、

それによって膜上の該細胞の位置と試料表面の位置が相関づけられ得り、それによって該個々の細胞に結合する成分の試料が得られる、請求項1～6のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】

膜支持体が、膜上に堆積した細胞の位置を維持するのに十分半固体である基質でコーテ



ィングされる、請求項7記載の方法。

【請求項9】

単一細胞の成分のプロフィールがもたらされる、請求項1～8のいずれか一項記載の方法

。

【請求項10】

プロフィールがn次元空間における位置により表され、nは特異的結合パートナー含有微粒子標識が提供されている成分の数である、請求項9記載の方法。

【請求項11】

細胞がT細胞であり、成分が少なくとも3つの異なるサイトカインを含む；または  
方法が、疾患状態を評価すべき対象のT細胞集団を代表する少なくとも50個のT細胞に対して行われる；または

細胞がB細胞であり、決定すべき成分が特定の抗原もしくはエピトープに特異的な抗体である、

請求項9または10記載の方法。

【請求項12】

以下の段階を含む、所望の免疫グロブリンを分泌させるために不死化され得る細胞を同定するために使用される、請求項1～11のいずれか一項記載の方法：

抗原またはエピトープに非依存的な免疫グロブリンに対する第1特異的結合パートナーを含む少なくとも1つの第1微粒子標識で、および該抗原またはエピトープに特異的な免疫グロブリンに対する第2特異的結合パートナーを含む少なくとも1つの第2微粒子標識で、個々のB細胞それぞれを処理することにより、脾臓、リンパ節、粘膜関連リンパ組織、または末梢血に由来する該B細胞を、抗原またはエピトープに対する抗体の分泌に関して試験する段階；ならびに

該細胞に結合している該第1および第2微粒子標識の数を顕微鏡により決定し、それによって、該第1および第2標識がほぼ同数結合している細胞を、該免疫グロブリンを分泌させるために不死化され得る細胞として同定する段階。

【請求項13】

所望の免疫グロブリンを分泌すると同定されたB細胞を不死化する段階をさらに含む、請求項12記載の方法。

【請求項14】

以下の段階を含む、所望の特異性および親和性を有する免疫グロブリンを分泌する細胞を同定する方法：

膜上に細胞を提供する段階であって、該膜が、分泌された免疫グロブリンに対して透過性を有し、かつ免疫グロブリン用捕獲試薬を任意に含む試料表面を覆っている、段階；

細胞を含む膜を除去する段階；

試料表面を、それぞれ識別可能な微粒子標識で標識された様々なエピトープおよび抗原でプロービングする段階；

所望のエピトープおよび抗原と結合するが望ましくないエピトープおよび抗原とは結合しない表面の位置を選択する段階；ならびに

同定された表面の位置と膜上の細胞の位置とを相関づける段階。

【請求項15】

第1粒子よりも小さな直径を有する様々な第2粒子とその表面においてさらに結合している、特徴的な色を有する第1粒子を含む微粒子標識であって、該第2粒子が該第1粒子とおよび相互に異なる色を有する、微粒子標識。

【請求項16】

第1の粒子が直径200～500 nmを有し、第2の粒子が直径10～100 nmを有する；および/または

第2の粒子が共有結合により第1の粒子の表面と結合している；および/または

色がそれぞれ少なくとも2つのシグナル生成部分により生成される；および/またはシグナル生成部分がフルオロフォアである、

請求項15記載の標識。

【請求項17】

色の異なる様々な第1の粒子を含む、請求項15または16記載の微粒子標識の収集物。

【請求項18】

以下の段階を含む、可溶化生物試料中の様々な成分の有無を検出する方法：

可溶化生物試料の成分を、電気泳動またはクロマトグラフィーによる単一の移動経路で分離する段階であって、各成分がその微粒子標識によって結合する特徴的な色を有するように、該成分が微粒子標識で標識されている、段階；および

顕微鏡観察手段により、該移動経路におけるそれぞれの位置で、分離された成分の特徴的な色を検出し、それによって各成分の有無を検出する段階。

【請求項19】

成分がddNTPと結合しており、分離段階が配列決定の一部として行われる、請求項18記載の方法。

【請求項20】

以下の段階を含む、組織試料を特徴づける方法：

該試料を様々な微粒子標識と接触させる段階であって、標識がそれぞれ、該組織の成分に特異的な結合パートナーを含み、かつ特徴的な色を含む、段階；ならびに

該組織試料を顕微鏡で観察して、各微粒子標識の数および位置を決定する段階。

【請求項21】

を含む、胚発生に重要な増殖因子を同定する方法であって、

少なくとも1つの第1および第2の胚様体を様々な微粒子標識で標識する段階であって、各標識が、該胚様体の細胞型に特異的な結合パートナーを含み、かつ特徴的な色を有し、該第1の胚様体が、候補増殖因子で処置された、段階；ならびに

該第1および第2の胚様体中の少なくとも2つの細胞型の数を比較し、それによって、該第2の胚様体と比較して該第1の胚様体中の細胞型の数が増加したことが、該細胞型の増殖因子として該候補化合物を同定する段階。

【請求項22】

膜の表面における乱れを最小限に抑えながら試料表面から膜を除去する方法であって、吸引を最小限に抑えるために開口部が提供された試料表面から膜を持ち上げる段階を含む方法。

【手続補正書】

【提出日】平成18年8月22日(2006.8.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の段階を含む、単一細胞に結合する様々な細胞成分の有無を決定する方法：

該単一細胞またはその成分を、異なる色を有する様々な微粒子標識と接触させる段階であって、異なる色の粒子それぞれが、細胞成分に異なる特異的な結合パートナーと結合しており、かつ、該単一細胞または成分が、該成分を保持するが未結合の微粒子標識を保持しない試料表面上に堆積している、段階；

未結合の微粒子標識を除去する段階；ならびに

顕微鏡観察手段により、試料表面上の該細胞または成分と結合している微粒子標識の数および性質を観察する段階。

【請求項2】

各成分の存在および量を決定して、該成分に関する該細胞のプロフィールを取得する、請求項1記載の方法。

## 【請求項 3】

細胞がT細胞であり、成分が少なくとも3つの異なるサイトカインを含む；または疾患状態を評価すべき対象のT細胞集団を代表する少なくとも50個のT細胞に対して行われる；または

細胞が溶解した細菌である；または

細胞が初代B細胞、不死化B細胞、もしくはハイブリドーマであり、決定すべき成分が特定の抗原もしくはエピトープに特異的な抗体である、

請求項1または2に記載の方法。

## 【請求項 4】

接触の前に、細胞を薬剤または他の外部刺激に曝露する段階、ならびに、該細胞を該薬剤または刺激に曝露していない条件下で観察される微粒子標識の数および性質を、細胞を該薬剤または外部刺激に曝露した場合に観察される微粒子標識の数および性質と比較し、それにより該薬剤または外部刺激が該細胞に及ぼす影響を決定する段階をさらに含む、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 5】

試料表面上に重層した透過性の膜支持体上で細胞が支持され、かつ

細胞成分が、膜を透過して試料表面上に堆積させられ、

それによって膜上の該細胞の位置と試料表面の位置が相関づけられ得り、それによって該個々の細胞に結合する成分の試料が得られる、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 6】

単一細胞の成分のプロフィールがもたらされる方法であり、

ここで該プロフィールがn次元空間における位置により表され、nは特異的結合パートナー含有微粒子標識が提供されている成分の数である、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 7】

以下の段階を含む、所望の免疫グロブリンを分泌させるために不死化され得る細胞を同定するために使用される、請求項1～6のいずれか一項記載の方法：

抗原またはエピトープに非依存的な免疫グロブリンに対する第1特異的結合パートナーを含む少なくとも1つの第1微粒子標識で、および該抗原またはエピトープに特異的な免疫グロブリンに対する第2特異的結合パートナーを含む少なくとも1つの第2微粒子標識で、個々のB細胞それぞれを処理することにより、脾臓、リンパ節、粘膜関連リンパ組織、または末梢血に由来する該B細胞を、抗原またはエピトープに対する抗体の分泌に関して試験する段階；ならびに

該細胞に結合している該第1および第2微粒子標識の数を顕微鏡により決定し、それによって、該第1および第2標識がほぼ同数結合している細胞を、該免疫グロブリンを分泌させるために不死化され得る細胞として同定する段階。

## 【請求項 8】

所望の免疫グロブリンを分泌すると同定されたB細胞を不死化する段階をさらに含む、請求項7記載の方法。

## 【請求項 9】

以下の段階を含む、所望の特異性および親和性を有する免疫グロブリンを分泌する細胞を同定する方法：

膜上に細胞を提供する段階であって、該膜が、分泌された免疫グロブリンに対して透過性を有し、かつ免疫グロブリン用捕獲試薬を任意に含む試料表面を覆っている、段階；

細胞を含む膜を除去する段階；

試料表面を、それぞれ識別可能な微粒子標識で標識された様々なエピトープおよび抗原でプロービングする段階；

所望のエピトープおよび抗原と結合するが望ましくないエピトープおよび抗原とは結合しない表面の位置を選択する段階；ならびに

同定された表面の位置と膜上の細胞の位置とを相関づける段階。

## 【請求項 10】

第1粒子よりも小さな直径を有する様々な第2粒子とその表面においてさらに結合している、特徴的な色を有する第1粒子を含む微粒子標識であって、該第2粒子が該第1粒子とおよび相互に異なる色を有する、微粒子標識。

## 【請求項 11】

第1の粒子が直径200～500 nmを有し、第2の粒子が直径10～100 nmを有する；および/または

第2の粒子が共有結合により第1の粒子の表面と結合している；および/または色がそれぞれ少なくとも2つのシグナル生成部分により生成される；および/またはシグナル生成部分がフルオロフォアである、

請求項10記載の標識。

## 【請求項 12】

以下の段階を含む、可溶化生物試料中の様々な成分の有無を検出する方法：

可溶化生物試料の成分を、電気泳動またはクロマトグラフィーによる単一の移動経路で分離する段階であって、各成分がその微粒子標識によって関連する特徴的な色を有するように、該成分が微粒子標識で標識されている、段階；および

顕微鏡観察手段により、該移動経路におけるそれぞれの位置で、分離された成分の特徴的な色を検出し、それによって各成分の有無を検出する段階。

## 【請求項 13】

以下の段階を含む、組織試料を特徴づける方法：

該試料を様々な微粒子標識と接触させる段階であって、標識がそれぞれ、該組織の成分に特異的な結合パートナーを含み、かつ特徴的な色を含む、段階；ならびに

該組織試料を顕微鏡で観察して、各微粒子標識の数および位置を決定する段階。

## 【請求項 14】

以下の段階を含む、胚発生に重要な増殖因子を同定する方法であって、

少なくとも1つの第1および第2の胚様体を様々な微粒子標識で標識する段階であって、各標識が、該胚様体の細胞型に特異的な結合パートナーを含み、かつ特徴的な色を有し、該第1の胚様体が、候補増殖因子で処置された、段階；ならびに

該第1および第2の胚様体中の少なくとも2つの細胞型の数を比較し、

それによって、該第2の胚様体と比較して該第1の胚様体中の細胞型の数が増加したことが、胚発生における増殖因子として該候補化合物を同定する段階。

## 【請求項 15】

膜の表面における乱れを最小限に抑えながら試料表面から膜を除去する方法であって、吸引を最小限に抑えるために開口部が提供された試料表面から該膜を持ち上げる段階を含む方法。

## 【国際調査報告】

| <b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | International application No.<br>PCT/US04/37077                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                       |     |                                                                             |      |   |                                                                                     |      |   |                                                                                     |      |     |                                                                                     |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------|------|---|-------------------------------------------------------------------------------------|------|---|-------------------------------------------------------------------------------------|------|-----|-------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(7) : G01N 33/53, 33/543<br>US CL : 435/4, 7.1, 7.2, 7.92, 7.93, 177, 178, 179, 287.7, 436/34, 501, 518, 543, 546, 547, 548; 530/387.1<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                       |     |                                                                             |      |   |                                                                                     |      |   |                                                                                     |      |     |                                                                                     |      |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>U.S. : 435/7.1, 7.92, 7.93; 436/501, 518, 543, 546, 547, 548; 530/387.1<br><br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br><br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH, BIOSIS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                       |     |                                                                             |      |   |                                                                                     |      |   |                                                                                     |      |     |                                                                                     |      |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y,P</td> <td>US 6,673,554 B1 (KAUVAR) 06 January 2004 (06.01.2004), see entire document.</td> <td>1-59</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 6,642,062 B2 (KAUVAR et al.) 04 November 2003 (04.11.2003), see entire document.</td> <td>1-59</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 6,492,125 B2 (KAUVAR et al.) 10 December 2002 (10.12.2002), see entire document.</td> <td>1-59</td> </tr> <tr> <td>Y,P</td> <td>US 6,790,652 B1 (TERRY et al.) 14 September 2004 (14.09.2004), see entire document.</td> <td>1-59</td> </tr> </tbody> </table>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                        | Category *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Relevant to claim No. | Y,P | US 6,673,554 B1 (KAUVAR) 06 January 2004 (06.01.2004), see entire document. | 1-59 | A | US 6,642,062 B2 (KAUVAR et al.) 04 November 2003 (04.11.2003), see entire document. | 1-59 | A | US 6,492,125 B2 (KAUVAR et al.) 10 December 2002 (10.12.2002), see entire document. | 1-59 | Y,P | US 6,790,652 B1 (TERRY et al.) 14 September 2004 (14.09.2004), see entire document. | 1-59 |
| Category *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Relevant to claim No.                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                       |     |                                                                             |      |   |                                                                                     |      |   |                                                                                     |      |     |                                                                                     |      |
| Y,P                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | US 6,673,554 B1 (KAUVAR) 06 January 2004 (06.01.2004), see entire document.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 1-59                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                       |     |                                                                             |      |   |                                                                                     |      |   |                                                                                     |      |     |                                                                                     |      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | US 6,642,062 B2 (KAUVAR et al.) 04 November 2003 (04.11.2003), see entire document.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1-59                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                       |     |                                                                             |      |   |                                                                                     |      |   |                                                                                     |      |     |                                                                                     |      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | US 6,492,125 B2 (KAUVAR et al.) 10 December 2002 (10.12.2002), see entire document.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1-59                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                       |     |                                                                             |      |   |                                                                                     |      |   |                                                                                     |      |     |                                                                                     |      |
| Y,P                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | US 6,790,652 B1 (TERRY et al.) 14 September 2004 (14.09.2004), see entire document.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1-59                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                       |     |                                                                             |      |   |                                                                                     |      |   |                                                                                     |      |     |                                                                                     |      |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <input type="checkbox"/> See patent family annex.                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                       |     |                                                                             |      |   |                                                                                     |      |   |                                                                                     |      |     |                                                                                     |      |
| * Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="vertical-align: top;">           "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br/>           "E" earlier application or patent published on or after the international filing date<br/>           "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br/>           "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br/>           "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </td> <td style="vertical-align: top;">           "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br/>           "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br/>           "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br/>           "&amp;" document member of the same patent family         </td> </tr> </table> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                        | "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                       |     |                                                                             |      |   |                                                                                     |      |   |                                                                                     |      |     |                                                                                     |      |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                       |     |                                                                             |      |   |                                                                                     |      |   |                                                                                     |      |     |                                                                                     |      |
| Date of the actual completion of the international search<br>11 July 2005 (11.07.2005)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Date of mailing of the international search report<br>27 JUL 2005      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                       |     |                                                                             |      |   |                                                                                     |      |   |                                                                                     |      |     |                                                                                     |      |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US<br>Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450<br>Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. (703) 305-3230                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Authorized officer<br>Gailene R. Gabel<br>Telephone No. (571) 272-1600 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                       |     |                                                                             |      |   |                                                                                     |      |   |                                                                                     |      |     |                                                                                     |      |

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ハリマン ウィリアム ディー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 アラメダ パーバーズ ポイント ロード 2861

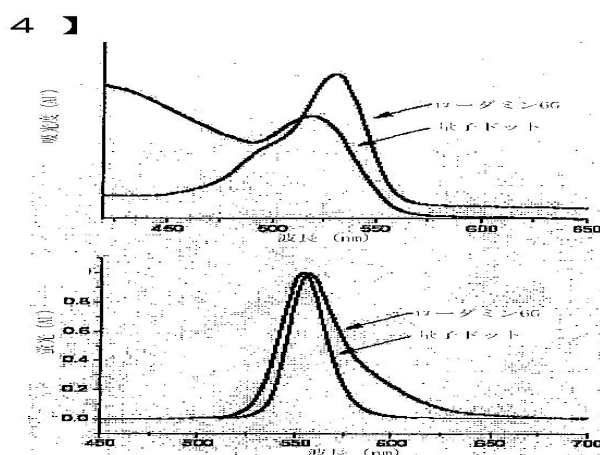
(72)発明者 コラリーニ エレン ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 オークランド メーソニック アベニュー 5120

|                |                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 在用于检测生物分析物的方法中使用微粒标记                                                                                                                                                                                                |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2007510929A</a>                                                                                                                                                                                       | 公开(公告)日 | 2007-04-26 |
| 申请号            | JP2006539689                                                                                                                                                                                                        | 申请日     | 2004-11-04 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 网格生物科学股份有限公司Retiddo                                                                                                                                                                                                 |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 网格生物科学股份有限公司Retiddo                                                                                                                                                                                                 |         |            |
| [标]发明人         | カウバルローレンスエム<br>ハリマンウィリアムディー<br>コラリーニエレンジェイ                                                                                                                                                                          |         |            |
| 发明人            | カウバル ローレンス エム.<br>ハリマン ウィリアム ディー.<br>コラリーニ エレン ジェイ.                                                                                                                                                                 |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/543 G01N33/53 G01N33/15 C12N5/08 G01N G01N15/06 G01N21/64 G01N27/447 G01N30/74 G01N30/88 G01N33/50 G01N33/567 G01N33/58                                                                                      |         |            |
| CPC分类号         | G01N15/0625 G01N21/6428 G01N21/6458 G01N27/44726 G01N30/74 G01N30/88 G01N33/505 G01N33/5052 G01N33/54313 G01N33/585 G01N2021/6441 G01N2030/8813 G01N2030/8827 Y10T436/112499 Y10T436/13 Y10T436/25125 Y10T436/25375 |         |            |
| FI分类号          | G01N33/543.541.Z G01N33/53.K G01N33/53.P G01N33/543.575 G01N33/15.Z                                                                                                                                                 |         |            |
| 代理人(译)         | 清水初衷                                                                                                                                                                                                                |         |            |
| 优先权            | 60/517651 2003-11-05 US<br>60/517713 2003-11-05 US                                                                                                                                                                  |         |            |
| 其他公开文献         | JP5189292B2                                                                                                                                                                                                         |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                                                                                                           |         |            |

#### 摘要(译)

我们描述了一种新的应用程序，用于使用可识别的微粒标签，可以用于各种颜色，并且是亚微米范围的尺寸。这些应用包括细胞组分的分析，分泌模式的获得，色谱或电泳中各种组分的鉴定，以及分泌所需免疫球蛋白的细胞的鉴定。



5