

(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2008-514955

(P2008-514955A)

(43) 公表日 平成20年5月8日 (2008.5.8)

(51) Int.Cl.		F I			テーマコード (参考)
GO 1 N 21/64	(2006.01)	GO 1 N	21/64	F	2 G O 4 3
GO 1 N 21/78	(2006.01)	GO 1 N	21/78	C	2 G O 5 4
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53	D	
		GO 1 N	33/53	M	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 97 頁)

(21) 出願番号	特願2007-534561 (P2007-534561)	(71) 出願人	304023042
(86) (22) 出願日	平成17年1月28日 (2005.1.28)		シンギュレックス・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成19年5月28日 (2007.5.28)		アメリカ合衆国63108ミズーリ州セント・ルイス、フォレスト・パーク・アベニュー4041番
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/003524		
(87) 国際公開番号	W02006/036182	(74) 代理人	100101454
(87) 国際公開日	平成18年4月6日 (2006.4.6)		弁理士 山田 卓二
(31) 優先権主張番号	60/613, 881	(74) 代理人	100081422
(32) 優先日	平成16年9月28日 (2004.9.28)		弁理士 田中 光雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100100479
(31) 優先権主張番号	60/624, 785		弁理士 竹内 三喜夫
(32) 優先日	平成16年10月29日 (2004.10.29)	(72) 発明者	ロバート・ブスカス
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国63021ミズーリ州マンチェスター、シャーウィック・テラス752番
(31) 優先権主張番号	60/636, 158		
(32) 優先日	平成16年12月16日 (2004.12.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サンプル分析システムおよび方法

(57) 【要約】

本発明は、単一粒子分析器、分析器の使用法、単一粒子または複合粒子（マルチプレキシング）に関するサンプルを分析するための分析器システム、分析器またはシステムの分析器システムの使用に基づいたビジネスを行う方法、および本発明の分析器および分析器システムで有用なパラメータを保存するための電子媒体を含む分析器および分析器システムを包含する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) 複数のサンプルを自動的にサンプリングして、サンプル容器と第 1 取り調べ空間との間の流体通路を提供可能であるサンプリングシステムと、

(b) 単一粒子を検出可能である分析器とを備え、

該分析器は、(i) 電磁放射を発生する電磁放射源と、

(i i) 電磁放射源から発生した電磁放射を受けるように位置決めされた第 1 取り調べ空間と、

(i i i) 電磁放射源から発生した電磁放射を受けるように位置決めされた第 2 取り調べ空間であって、

第 2 取り調べ空間は、第 1 取り調べ空間との流体通路中にあり、

粒子が第 1 取り調べ空間と第 2 取り調べ空間との間で移動可能なように、推進力が第 1 取り調べ空間と第 2 取り調べ空間との間に存在するようにした、第 2 取り調べ空間と、

(i v) 第 1 取り調べ空間と動作可能に連結して、粒子の第 1 電磁放射特性を測定する第 1 電磁放射検出器と、

(v) 第 2 取り調べ空間と動作可能に連結して、粒子の第 1 電磁放射特性および粒子の第 2 電磁放射特性のうちの少なくとも 1 つを測定する第 2 電磁放射検出器とを備えるようにした、単一粒子分析器システム。

【請求項 2】

サンプルのほぼ全てを回収可能である、第 2 取り調べ空間との流体通路におけるサンプル回収システムをさらに備える請求項 1 記載の分析器システム。

【請求項 3】

サンプル調製システムをさらに備える請求項 2 記載の分析器システム。

【請求項 4】

サンプル調製システムは、遠心分離、フィルタリング、クロマトグラフィ、細胞溶解、pH の変更、バッファの追加、試薬の追加、加熱または冷却、光照射、ラベルの追加、ラベルの結合、結合していないラベルの分離、およびこれらの組合せからなるグループから選択されるサンプル調製を実施するようにした請求項 3 記載の分析器システム。

【請求項 5】

第 1 および第 2 電磁放射特性を分析して、分析結果を報告するデータ分析システムをさらに備える請求項 1 記載の分析器システム。

【請求項 6】

電磁放射源は、連続波電磁放射源である請求項 1 記載の分析器システム。

【請求項 7】

連続波電磁放射源は、発光ダイオードおよび連続波レーザからなるグループから選択される請求項 6 記載の分析器システム。

【請求項 8】

サンプリングシステムのサンプル残物は、約 0.02 % 未満である請求項 1 記載の分析器システム。

【請求項 9】

第 1 および第 2 取り調べ空間は、それぞれ約 0.02 pL と約 300 pL の間の容積を有する請求項 1 記載の分析器システム。

【請求項 10】

第 1 取り調べ空間および第 2 取り調べ空間の少なくとも 1 つは、約 0.05 pL と約 50 pL の間の容積を有する請求項 1 記載の分析器システム。

【請求項 11】

第 1 取り調べ空間および第 2 取り調べ空間の少なくとも 1 つは、約 0.1 pL と約 25 pL の間の容積を有する請求項 1 記載の分析器システム。

【請求項 12】

第 1 および第 2 取り調べ空間の少なくとも 1 つの容積は、調整可能である請求項 1 記載

10

20

30

40

50

の分析器システム。

【請求項 1 3】

第 1 取り調べ空間および第 2 取り調べ空間のうちの少なくとも 1 つに動作可能に連結され、粒子の第 1 電磁放射特性および粒子の第 2 電磁放射特性のうちの少なくとも 1 つを測定する第 3 電磁放射検出器をさらに備える請求項 1 記載の分析器システム。

【請求項 1 4】

推進力は、圧力を含む請求項 1 記載の分析器システム。

【請求項 1 5】

圧力は、ポンプ、真空源、遠心分離機、およびこれらの組合せからなるグループから選択される供給源によって提供されるようにした請求項 1 3 記載の分析器システム。

10

【請求項 1 6】

流体通路は、マイクロ流体素子内部の配管またはチャネルを含み、圧力は、ポンプまたは複数のポンプによって供給されるようにした請求項 1 4 記載の分析器システム。

【請求項 1 7】

分析は、粒子の存在、不在および必要に応じて濃度を決定することと、存在、不在及び / 又は濃度に基づいて、可能性ある診断、予後、治療状態または提案する治療を決定することを含む請求項 5 記載の分析器システム。

【請求項 1 8】

(a) サンプル容器と第 1 取り調べ空間との間の流体通路を提供するサンプリングシステムと、

20

(b) 前記第 1 取り調べ空間および第 2 取り調べ空間を含み、第 2 取り調べ空間は、第 1 取り調べ空間との流体通路中にあり、

粒子が第 1 取り調べ空間と第 2 取り調べ空間との間で移動可能なように、推進力が第 1 取り調べ空間と第 2 取り調べ空間との間に存在するようにした単一粒子分析器と、

(c) 第 1 及び / 又は第 2 取り調べ空間に動作可能に連結され、もし存在していれば、粒子の検出可能な特性を検出するための検出器と、

、

(d) サンプルが、サンプル容器から取り調べ部分へ移動して、分析器の他の構成要素と接触せずに、分析器内部の清浄なバッファとほぼ接触することなくサンプル容器に戻ることができるサンプル回収システムと、

30

(e) 検出器から入力を受けて、粒子の存在または不在を分析し、前記存在または不在に基づいて結果を報告するデータ分析器と、を備える分析器システム。

【請求項 1 9】

サンプル調製システムをさらに備える請求項 1 8 記載の分析器システム。

【請求項 2 0】

(a) 複数のサンプルを自動的にサンプリングして、サンプル容器と第 1 取り調べ空間との間の流体通路を提供するサンプリングシステムと、

(b) 単一分子を検出可能である分析器とを備え、

分析器は、(i) 電磁放射を発生するための電磁放射源と、

(i i) 電磁放射源から発生した電磁放射を受けるように位置決めされた前記第 1 取り調べ空間と、

40

(i i i) 第 1 取り調べ空間と動作可能に連結して、粒子の第 1 電磁放射特性を測定する第 1 電磁放射検出器とを備えるようにした、単一粒子分析器システム。

【請求項 2 1】

第 1 サンプルと第 2 サンプルが分析器に導入される場合、第 1 サンプルと第 2 サンプルとの間で検体濃度で 2 0 % 未満の差を検出可能である分析器を含む分析器システムであって、

分析器に導入される第 1 サンプルおよび第 2 サンプルの体積が 5 μ l 未満であり、

検体は、第 1 および第 2 サンプル中で 5 0 フェムトモル未満の濃度で存在している分析器システム。

50

【請求項 22】

電磁放射を発生するための、少なくとも 1 つの連続波電磁放射源と、

電磁放射源から発生した電磁放射を受けるように位置決めされ、約 0.02 pL と約 300 pL の間の容積を有する第 1 取り調べ空間と、

電磁放射源から発生した電磁放射を受けるように位置決めされ、約 0.02 pL と約 300 pL の間の容積を有し、第 1 取り調べ空間との流体通路中にある第 2 取り調べ空間と、を備え、

粒子が、少なくとも部分的に電気運動力を用いて第 1 取り調べ空間と第 2 取り調べ空間との間で移動可能なように、電位が第 1 取り調べ空間と第 2 取り調べ空間との間に存在しており、

第 1 取り調べ空間と動作可能に連結して、粒子の第 1 電磁放射特性を測定する第 1 電磁放射検出器と、

第 2 取り調べ空間と動作可能に連結して、粒子の第 1 電磁放射特性および粒子の第 2 電磁放射特性のうちの少なくとも 1 つを測定する第 2 電磁放射検出器と、を備える単一粒子分析器。

【請求項 23】

第 1 取り調べ空間および第 2 取り調べ空間のうちの少なくとも 1 つに動作可能に連結され、粒子の第 1 電磁放射特性および粒子の第 2 電磁放射特性のうちの少なくとも 1 つを測定する第 3 電磁放射検出器をさらに備える請求項 22 記載の分析器。

【請求項 24】

連続波電磁放射源は、発光ダイオードおよび連続波レーザからなるグループから選択されるようにした請求項 22 記載の分析器。

【請求項 25】

第 1 取り調べ空間および第 2 取り調べ空間の少なくとも 1 つは、約 0.1 pL と約 25 pL の間の容積を有する請求項 22 記載の分析器。

【請求項 26】

第 1 および第 2 取り調べ空間の少なくとも 1 つの容積は、調整可能である請求項 22 記載の分析器。

【請求項 27】

第 1 取り調べ空間および第 2 取り調べ空間の少なくとも 1 つは、電磁放射源から受けた電磁放射ビームの断面積、および第 1 電磁放射検出器および第 2 電磁放射検出器の少なくとも 1 つの検出範囲のうち少なくとも 1 つによって規定されるようにした請求項 22 記載の分析器。

【請求項 28】

検出範囲は、第 1 電磁放射検出器および第 2 電磁放射検出器の少なくとも 1 つに隣接して位置決めされた空間フィルタにおけるスリット幅により決定されるようにした請求項 27 記載の分析器。

【請求項 29】

第 1 および第 2 取り調べ空間の少なくとも 1 つは、ガラス、石英、溶融シリカ、プラスチック、またはこれらの組合せからなるグループから選択される固体材料を備えたハウジングによって少なくとも部分的に規定されるようにした請求項 22 記載の分析器。

【請求項 30】

第 1 取り調べ空間および第 2 取り調べ空間の少なくとも 1 つは、流体境界によって少なくとも部分的に規定されるようにした請求項 22 記載の分析器。

【請求項 31】

第 1 電磁放射検出器および第 2 電磁放射検出器の少なくとも 1 つは、CCD カメラ、ビデオ入力モジュールカメラ、ストリークカメラ、ポロメータ、フォトダイオード、フォトダイオードアレイ、アバランシェフォトダイオード検出器、光電子増倍管検出器、およびこれらの組合せからなるグループから選択される請求項 22 記載の分析器。

【請求項 32】

10

20

30

40

50

第 1 取り調べ空間と第 2 取り調べ空間の間で粒子の移動を促進するための、ポンプ、真空源および遠心分離機のうちの少なくとも 1 つをさらに備える請求項 2 2 記載の分析器。

【請求項 3 3】

単一粒子分析器システムを用いて、個体から得られるサンプルでの粒子の存在または不在を決定することを含む分析方法であって、

該単一粒子分析器システムは、(a) 複数のサンプルを自動的にサンプリングして、サンプル容器と第 1 取り調べ空間との間の流体通路を提供可能であるサンプリングシステムと、

(b) 単一粒子を検出可能である分析器と、を含み、

該分析器は、(i) 電磁放射を発生する電磁放射源と、

10

(i i) 電磁放射源から発生した電磁放射を受けるように位置決めされた第 1 取り調べ空間と、

(i i i) 電磁放射源から発生した電磁放射を受けるように位置決めされた第 2 取り調べ空間と、を含み、

第 2 取り調べ空間は、第 1 取り調べ空間との流体通路中にあり、

粒子が第 1 取り調べ空間と第 2 取り調べ空間との間で移動可能なように、推進力が第 1 取り調べ空間と第 2 取り調べ空間との間に存在しており、

(i v) 第 1 取り調べ空間と動作可能に連結して、粒子の第 1 電磁放射特性を測定する第 1 電磁放射検出器と、

(v) 第 2 取り調べ空間と動作可能に連結して、粒子の第 1 電磁放射特性および粒子の第 2 電磁放射特性のうちの少なくとも 1 つを測定する第 2 電磁放射検出器と、を含むようにした分析方法。

20

【請求項 3 4】

前記第 1 および第 2 電磁放射特性を分析して、前記分析結果を報告するデータ分析システムをさらに備える請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 3 5】

前記分析結果に基づいて、診断、予後、治療状態及び / 又は治療方法を決定することをさらに含む請求項 3 4 記載の方法。

【請求項 3 6】

前記サンプルのほぼ全てを回収可能である、第 2 取り調べ空間との流体通路におけるサンプル回収システムをさらに備える請求項 3 3 記載の方法。

30

【請求項 3 7】

サンプル調製システムをさらに備える請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 3 8】

電磁放射源は、連続波電磁放射源である請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 3 9】

第 1 および第 2 取り調べ空間は、それぞれ約 0 . 0 2 p L と約 3 0 0 p L の間の容積を有する請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 4 0】

第 1 および第 2 取り調べ空間は、それぞれ約 0 . 0 5 p L と約 5 0 p L の間の容積を有する請求項 3 3 記載の方法。

40

【請求項 4 1】

第 1 および第 2 取り調べ空間は、それぞれ約 0 . 1 p L と約 2 5 p L の間の容積を有する請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 4 2】

第 1 および第 2 取り調べ空間の少なくとも 1 つの容積は、調整可能である請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 4 3】

推進力は、圧力を備える請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 4 4】

50

圧力は、ポンプ、真空源、遠心分離機またはこれらの組合せからなるグループから選択される供給源によって提供される請求項 4 3 記載の方法。

【請求項 4 5】

個体は、動物または植物である請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 4 6】

個体は、動物である請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 4 7】

個体は、哺乳動物である請求項 4 6 記載の方法。

【請求項 4 8】

個体は、人間である請求項 4 7 記載の方法。

10

【請求項 4 9】

サンプル中の複数の粒子について分析を実施することを含む請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 5 0】

複数の粒子のそれぞれ検出された粒子は、ラベルを備え、

それぞれ検出された粒子は、ラベル識別、ラベル強度、移動度またはこれらの組合せからなるグループから選択された特性によって他と弁別されるようにした請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 5 1】

サンプルは、血液、血清、血漿、気管支肺胞洗浄液、尿、脳脊髄液、肋膜液、滑液、腹膜液、羊水、胃液、リンパ液、間質液、組織ホモジェネート、細胞抽出物、唾液、痰、大便、生理学分泌物、涙、粘液、汗、乳、精液、精漿、腔分泌物、潰瘍や他の表面の発疹、水疱、膿瘍からの液、良性、悪性および疑わしい組織の生体組織検査を含む組織抽出物、または、粒子を含むことがある他の何れかの身体要素なるグループから選択される、請求項 3 3 記載の方法。

20

【請求項 5 2】

サンプルは、血液、血漿、血清からなるグループから選択される請求項 5 1 記載の方法。

【請求項 5 3】

前記サンプル中の粒子をラベル付けすることをさらに含み、

前記サンプルを分析することは、前記ラベル付けした粒子の存在または不在を検出することを含むようにした、請求項 5 2 記載の方法。

30

【請求項 5 4】

前記サンプルから結合していないラベルを除去することをさらに含む、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 5】

前記個体から前記サンプルを入手することをさらに含む、請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 5 6】

粒子は、蛋白質、核酸、ナノ粒子、マイクロ粒子、デンドリマー、染色体、炭水化物、ウイルス、バクテリア、細胞、およびこれらの組合せからなるグループから選択される、請求項 5 3 記載の方法。

40

【請求項 5 7】

粒子は、蛋白質、核酸、ウイルス、菌類、バクテリアおよびこれらの組合せからなるグループから選択される、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 8】

粒子は、アミノ酸、ヌクレオチド、脂質、糖、微粒子毒素、ペプチド毒素、毒液、薬剤、およびこれらの組合せからなるグループから選択される、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 9】

サンプルは、対象となる粒子に限定的である、蛍光ラベル付けした抗体と接触した血清サンプルであって、

前記分析は、ラベル付けした粒子の存在、不在及び / 又は濃度を検出することを含むよ

50

うにした、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 6 0】

ラベル付けした粒子の存在、不在及び / 又は濃度に基づいて、診断、予後、治療状態及び / 又は治療方法を決定することをさらに含む請求項 5 9 記載の方法。

【請求項 6 1】

前記診断、予後、治療状態及び / 又は治療方法を個体に報告することをさらに含む請求項 6 0 記載の方法。。

【請求項 6 2】

バイオマーカーは、TREM - 1 である請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 6 3】

該方法は、1 時間未満で完了するようにした請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 6 4】

診断、予後、治療状態及び / 又は治療方法を決定することは、バイオマーカーパネルの存在、不在及び / 又は濃度に基づくようにした、請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 6 5】

該方法は、2 時間未満で実施されるようにした請求項 5 9 記載の方法。

【請求項 6 6】

個体から得られたサンプル中の粒子の存在、不在及び / 又は濃度に基づいて、診断、予後、治療状態及び / 又は治療方法を決定することを含む分析方法であって、

前記存在、不在及び / 又は濃度は、単一分子を決定可能な分析器を備えた分析器システムを用いて決定され、

前記分析器は、少なくとも 1 つの取り調べ空間を備えるようにした分析方法。

【請求項 6 7】

分析器は、少なくとも 2 つの取り調べ空間を備えるようにした請求項 6 6 記載の方法。

【請求項 6 8】

該分析器システムは、放射を発生するための少なくとも 1 つの連続波電磁放射源を備えた、単一分子を決定可能な分析器を備え、

少なくとも 1 つの取り調べ空間は、前記放射を受けるように位置決めされている請求項 6 6 記載の方法。

【請求項 6 9】

個体をスクリーニングして、ある状態の存在または不在を決定するための方法であって、

該状態についての 1 つ又はそれ以上のマーカーに関して個体からのサンプルを分析することを含み、

第 1 サンプルと第 2 サンプルが分析器に導入され、第 1 サンプルおよび第 2 サンプルの体積が約 5 μ l 未満であり、該 1 つ又はそれ以上のマーカーが第 1 および第 2 サンプル中で 5 0 フェムトモル未満の濃度で存在している場合、第 1 サンプルと第 2 サンプルの間で、該 1 つ又はそれ以上のマーカー濃度の約 2 0 % 未満の差を検出可能な分析器を用いて分析するようにした方法。

【請求項 7 0】

分析結果を、マーカーに関する既知の値と比較することをさらに含む請求項 6 9 記載の方法。

【請求項 7 1】

個体は喫煙者であり、癌は肺癌である請求項 6 9 記載の方法。

【請求項 7 2】

粒子を検出するための方法であって、

粒子を、電気運動力によって、約 0 . 0 2 p L と約 3 0 0 p L の間の容積を有する第 1 取り調べ空間および約 0 . 0 2 p L と約 3 0 0 p L の間の容積を有する第 2 取り調べ空間へ移動することと、

該サンプルを、少なくとも 1 つの連続波電磁放射源に曝すことと、

10

20

30

40

50

粒子が、第 1 取り調べ空間内で連続波電磁放射と相互作用する際、第 1 取り調べ空間内で粒子の第 1 電磁放射特性を測定することと、

粒子が、第 2 取り調べ空間内で連続波電磁放射と相互作用する際、第 2 取り調べ空間内で粒子の第 1 電磁放射特性および第 2 電磁放射特性の少なくとも 1 つを測定することを含む方法。

【請求項 7 3】

該粒子は、第 1 粒子であり、

該方法は、第 2 粒子を、第 1 取り調べ空間、第 2 取り調べ空間、第 3 取り調べ空間および第 4 取り調べ空間のうちの少なくとも 2 つに移動することと、

第 2 粒子が、第 1 取り調べ空間、第 2 取り調べ空間、第 3 取り調べ空間および第 4 取り調べ空間のうちの少なくとも 1 つの内部で連続波電磁放射と相互作用する際、第 2 粒子の第 1 電磁放射特性および第 2 粒子の第 2 電磁放射特性の少なくとも 1 つを測定することを含む請求項 7 2 記載の方法。

10

【請求項 7 4】

ディスプレイユニットを備えたユーザインタフェースを有する汎用コンピュータについての命令セットを収納するコンピュータ読み取り可能な保存媒体であって、

該命令セットは、

(a) 2 つの取り調べ空間を持つ単一粒子検出器を用いてサンプルの分析からの値を入力するためのロジックと、

(b) 前記ディスプレイユニットを用いて、入力値の結果を表示するための表示ルーチン、とを備えるようにした、コンピュータ読み取り可能な保存媒体。

20

【請求項 7 5】

該命令セットは、入力値とデータベースとを比較するための比較ルーチンをさらに備え、

表示ルーチンは、比較ルーチンの結果を表示するためのロジックをさらに備えるようにした、請求項 7 4 記載のコンピュータ読み取り可能な保存媒体。

【請求項 7 6】

ディスプレイユニットを備えたユーザインタフェースを有する汎用コンピュータのための命令セットを備えたコンピュータ間のインターネット経由で伝搬する電子信号または搬送波であって、

30

該命令セットは、ディスプレイユニットを備えたユーザインタフェースを有する汎用コンピュータについての命令セットを収納するコンピュータ読み取り可能な保存媒体を備え、

該命令セットは、

(a) 2 つの取り調べ空間を持つ単一粒子検出器を用いてサンプルの分析からの値を入力するためのロジックと、

(b) 前記ディスプレイユニットを用いて、入力値の結果を表示するための表示ルーチン、とを備えるようにした、信号または搬送波。

【請求項 7 7】

該命令セットは、入力値とデータベースとを比較するための比較ルーチンをさらに備え、

40

表示ルーチンは、比較ルーチンの結果を表示するためのロジックをさらに備えるようにした、請求項 7 6 記載の信号または搬送波。

【請求項 7 8】

サンプルの分析結果を得るために、2 つの取り調べ空間を有し、単一粒子を検出可能な検出器の団体による使用と、

前記結果を報告することと、

結果の報告に関する団体への支払いとを備える、ビジネスを行う方法。

【請求項 7 9】

50

団体は、C L I A (Clinical Laboratory Improvement Amendments) 研究所である、請求項 7 8 記載の方法。

【請求項 8 0】

団体は、C L I A 研究所ではない請求項 7 8 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(相互参照)

本願は、米国仮(Provisional)出願番号第 6 0 / 6 1 3 8 8 1 号(名称「連続波単一粒子検出器」、2 0 0 4 年 9 月 2 8 日出願)、米国仮出願番号第 6 0 / 6 2 4 7 8 5 号(名称「個別分子の検出用サンドイッチ分析検討」、2 0 0 4 年 1 0 月 2 7 日出願)および、米国仮出願番号第 6 0 / 6 3 6 1 5 8 号(名称「個別の分子、粒子またはセルの検出方法」、2 0 0 4 年 1 2 月 1 3 日出願)の利益を主張するものであり、これらの全ては参照により全体としてここに組み込まれる。

10

【背景技術】

【0 0 0 2】

生物医学的研究、医用診断、予後(prognosis)、監視および治療選択、バイオテロ(bioterrorism)検出、および少ない量および検体(analyte)濃度の複合サンプルの分析を必要とする他の分野での進歩は、次第に減少する濃度でサンプル中の粒子を高感度で検出可能なサンプル分析システムの発展をもたらした。米国特許第 4 7 9 3 7 0 5 号、第 5 2 0 9 8 3 4 号は、著しく高感度の検出を達成した従前のシステムを記載している。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 3】

本発明は、この分野での更なる発展を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 4】

(発明の要旨)

一態様において、本発明は、単一粒子分析器システムを提供する。幾つかの実施形態では、該システムは、複数のサンプルを自動的にサンプリングして、サンプル容器と第 1 取り調べ(interrogation)空間との間の流体通路を提供可能であるサンプリングシステムと、単一粒子を検出可能である分析器とを含み、

30

分析器は、電磁放射を発生する電磁放射源を含んでおり、

第 1 取り調べ空間は、電磁放射源から発生した電磁放射を受けるように位置決めされ、

第 2 取り調べ空間は、電磁放射源から発生した電磁放射を受けるように位置決めされ、

第 2 取り調べ空間は、第 1 取り調べ空間との流体通路中にあり、

粒子が第 1 取り調べ空間と第 2 取り調べ空間との間で移動可能なように、推進力(motiv e force)が第 1 取り調べ空間と第 2 取り調べ空間との間に存在しており、

第 1 取り調べ空間と動作可能に連結して、粒子の第 1 電磁放射特性を測定する第 1 電磁放射検出器と、

40

第 2 取り調べ空間と動作可能に連結して、粒子の第 1 電磁放射特性および粒子の第 2 電磁放射特性のうちの少なくとも 1 つを測定する第 2 電磁放射検出器と、を含む。

【0 0 0 5】

幾つかの実施形態では、電磁放射源は、発光ダイオードまたは連続波レーザなどの連続波(continuous wave)電磁放射源である。更なる実施形態では、分析器システムは、サンプリングシステムを含み、サンプリングシステムのサンプルキャリーオーバー(carryover)は、約 0 . 0 2 % 未満である。

【0 0 0 6】

幾つかの実施形態では、第 1 および第 2 取り調べ空間は、それぞれ約 0 . 0 2 p L と約 3 0 0 p L の間、または約 0 . 0 5 p L と約 5 0 p L の間、または約 0 . 1 p L と約 2 5

50

p Lの間の容積を有する。幾つかの実施形態では、第1および第2取り調べ空間の少なくとも1つの容積は調整可能である。

【0007】

幾つかの実施形態では、本発明の分析器システムは、第1取り調べ空間および第2取り調べ空間のうちの少なくとも1つに動作可能に連結され、粒子の第1電磁放射特性および粒子の第2電磁放射特性のうちの少なくとも1つを測定する第3電磁放射検出器をさらに含む。

【0008】

幾つかの実施形態では、分析器のための推進力は、例えば、ポンプ、真空源、遠心分離機(centrifuge)またはこれらの組合せによって提供される圧力である。

10

【0009】

本発明の分析器システムの幾つかにおいて、流体通路は、マイクロ流体(microfluidic)素子内部の配管またはチャネルを含み、圧力はポンプまたは複数のポンプによって供給される。

【0010】

幾つかの実施形態では、本発明の分析器システムは、サンプルのほぼ全てを回収可能である、第2取り調べ空間との流体通路におけるサンプル回収(recovery)システム、及び/又はサンプル調製(preparation)システム、及び/又は、粒子の第1および第2電磁放射特性を分析して、分析結果を報告するデータ分析システムをさらに含む。

【0011】

20

サンプル調製システムを含む実施形態では、該サンプル調製システムは、遠心分離、フィルタリング、クロマトグラフィを用いて、サンプル調製、例えば、細胞溶解(cell lysis)、pHの変更、バッファの追加、試薬の追加、加熱または冷却、光照射、ラベルの追加、ラベルの結合、結合していないラベルの分離、またはこれらの組合せを実施できる。

【0012】

データ分析システムを含む実施形態では、分析は、粒子の存在、不在および必要に応じて濃度を決定することと、存在、不在及び/又は濃度に基づいて、可能性ある診断、予後、治療状態または提案する治療を決定することを含む。

【0013】

30

一実施形態では、本発明は、サンプル容器と第1取り調べ空間との間の流体通路を提供するサンプリングシステムと、

第1取り調べ空間および第2取り調べ空間を含み、第2取り調べ空間は、第1取り調べ空間との流体通路中にあるようにした単一粒子分析器とを含み、

粒子が第1取り調べ空間と第2取り調べ空間との間で移動可能なように、推進力(motiv e force)が第1取り調べ空間と第2取り調べ空間との間に存在しており、

第1及び/又は第2取り調べ空間に動作可能に連結され、もし存在していれば、粒子の検出可能な特性を検出するための検出器と、

サンプルが、サンプル容器から取り調べ部分へ移動して、分析器の他の構成要素と接触せずに、分析器内部の清浄なバッファとほぼ接触することなくサンプル容器に戻ることができるサンプル回収システムと、

40

検出器から入力を受けて、粒子の存在または不在を分析し、前記存在または不在に基づいて結果を報告するデータ分析器と、を含む分析器システムを提供する。該システムは、サンプル調製システムをさらに含んでもよい。

【0014】

他の実施形態では、本発明は、複数のサンプルを自動的にサンプリングして、サンプル容器と第1取り調べ空間との間の流体通路を提供するサンプリングシステムと、

電磁放射を発生するための電磁放射源を含み、単一分子を検出可能である分析器と、

第1取り調べ空間は、電磁放射源から発生した電磁放射を受けるように位置決めされ、

第1取り調べ空間と動作可能に連結して、粒子の第1電磁放射特性を測定する第1電磁放射検出器とを含む単一粒子分析器システムを提供する。

50

【 0 0 1 5 】

他の実施形態では、本発明は、分析器に導入される第 1 サンプルと第 2 サンプルとの間で検体濃度で 2 0 % 未満の差を検出可能である分析器を含み、分析器に導入される第 1 サンプルおよび第 2 サンプルの体積が 5 μ l 未満であり、検体は、5 フェムトモル未満の濃度で存在している分析器システムを提供する。

【 0 0 1 6 】

幾つかの実施形態では、該システムは、複数のサンプルを自動的にサンプリングして、サンプル容器と分析器との間の流体通路を提供可能であるサンプリングシステムをさらに含む。

【 0 0 1 7 】

他の態様において、本発明は、単一粒子分析器を提供する。幾つかの実施形態では、本発明は、電磁放射を発生するための、少なくとも 1 つの連続波電磁放射源と、

電磁放射源から発生した電磁放射を受けるように位置決めされ、約 0 . 0 2 p L と約 3 0 0 p L の間の容積を有する第 1 取り調べ空間と、

電磁放射源から発生した電磁放射を受けるように位置決めされ、約 0 . 0 2 p L と約 3 0 0 p L の間の容積を有する第 2 取り調べ空間と、を含み、

第 2 取り調べ空間は、第 1 取り調べ空間との流体通路中にあり、

粒子が、少なくとも部分的に電気運動(electro-kinetic)力を用いて第 1 取り調べ空間と第 2 取り調べ空間との間で移動可能なように、電位(electric potential)が第 1 取り調べ空間と第 2 取り調べ空間との間に存在しており、

第 1 取り調べ空間と動作可能に連結して、粒子の第 1 電磁放射特性を測定する第 1 電磁放射検出器と、

第 2 取り調べ空間と動作可能に連結して、粒子の第 1 電磁放射特性および粒子の第 2 電磁放射特性のうちの少なくとも 1 つを測定する第 2 電磁放射検出器と、を含む単一粒子分析器を提供する。

【 0 0 1 8 】

幾つかの実施形態では、連続波電磁放射源は、発光ダイオードおよび連続波レーザからなるグループから選択される。

【 0 0 1 9 】

幾つかの実施形態では、第 1 取り調べ空間および第 2 取り調べ空間の少なくとも 1 つは、約 0 . 1 p L と約 2 5 p L の間の容積を有する。

【 0 0 2 0 】

幾つかの実施形態では、第 1 および第 2 取り調べ空間の少なくとも 1 つの容積は、調整可能である。

【 0 0 2 1 】

幾つかの実施形態では、第 1 取り調べ空間および第 2 取り調べ空間の少なくとも 1 つは、電磁放射源から受けた電磁放射ビームの断面積、および第 1 電磁放射検出器および第 2 電磁放射検出器の少なくとも 1 つの検出範囲のうち少なくとも 1 つによって規定される。

【 0 0 2 2 】

後者の実施形態の幾つかでは、検出範囲は、第 1 電磁放射検出器および第 2 電磁放射検出器の少なくとも 1 つに隣接して位置決めされた空間フィルタにおけるスリット幅により決定される。

【 0 0 2 3 】

幾つかの実施形態では、第 1 および第 2 取り調べ空間の少なくとも 1 つは、ガラス、石英(quartz)、溶融シリカ、プラスチック、またはこれらの組合せからなるグループから選択される固体(solid)材料を備えたハウジングによって少なくとも部分的に規定される。

【 0 0 2 4 】

幾つかの実施形態では、第 1 取り調べ空間および第 2 取り調べ空間の少なくとも 1 つは、流体境界によって少なくとも部分的に規定される。

【 0 0 2 5 】

幾つかの実施形態では、該分析器は、第 1 取り調べ空間および第 2 取り調べ空間のうちの少なくとも 1 つに動作可能に連結され、粒子の第 1 電磁放射特性および粒子の第 2 電磁放射特性のうちの少なくとも 1 つを測定する第 3 電磁放射検出器をさらに含む。

【0026】

本発明の分析器の幾つかの実施形態では、第 1 電磁放射検出器および第 2 電磁放射検出器の少なくとも 1 つは、CCD カメラ、ビデオ入力モジュールカメラ、ストリーク(streak)カメラ、ボロメータ(bolometer)、フォトダイオード、フォトダイオードアレイ、アバランシェフォトダイオード検出器、光電子増倍管検出器、およびこれらの組合せからなるグループから選択される。

【0027】

幾つかの実施形態では、該分析器は、第 1 取り調べ空間と第 2 取り調べ空間の間に粒子の移動を促進するための、ポンプ、真空源および遠心分離機のうちの少なくとも 1 つをさらに含む。

【0028】

他の態様において、本発明は、分析方法を提供する。一実施形態では、本発明は、単一粒子分析器システムを用いて、個体から得られるサンプルでの粒子の存在または不在を決定することを含み、

【0029】

該単一粒子分析器システムは、(a)複数のサンプルを自動的にサンプリングして、サンプル容器と第 1 取り調べ空間との間の流体通路を提供可能であるサンプリングシステムと、(b)単一粒子を検出可能である分析器と、を含み、

該分析器は、(i)電磁放射を発生する電磁放射源と、

(ii)電磁放射源から発生した電磁放射を受けるように位置決めされた第 1 取り調べ空間と、

(iii)電磁放射源から発生した電磁放射を受けるように位置決めされた第 2 取り調べ空間と、を含み、

第 2 取り調べ空間は、第 1 取り調べ空間との流体通路中にあり、

粒子が第 1 取り調べ空間と第 2 取り調べ空間との間で移動可能なように、推進力(motiv e force)が第 1 取り調べ空間と第 2 取り調べ空間との間に存在しており、

(iv)第 1 取り調べ空間と動作可能に連結して、粒子の第 1 電磁放射特性を測定する第 1 電磁放射検出器と、

(v)第 2 取り調べ空間と動作可能に連結して、粒子の第 1 電磁放射特性および粒子の第 2 電磁放射特性のうちの少なくとも 1 つを測定する第 2 電磁放射検出器と、を含むようにした分析方法を提供する。

【0030】

本発明の方法の幾つかの実施形態では、該分析器は、前記第 1 および第 2 電磁放射特性を分析して、前記分析結果を報告するデータ分析システムをさらに含む。これらの実施形態の幾つかでは、該分析器は、前記分析結果に基づいて、診断、予後、治療状態及び/又は治療方法を決定することを含む。

【0031】

本発明の方法の幾つかの実施形態では、該分析器は、前記サンプルのほぼ全てを回収可能である、第 2 取り調べ空間との流体通路におけるサンプル回収システム、及び/又はサンプル調製システムをさらに備える。

【0032】

本発明の方法の幾つかの実施形態では、電磁放射源は、連続波電磁放射源である。

【0033】

本発明の方法の幾つかの実施形態では、第 1 および第 2 取り調べ空間は、それぞれ約 0 . 0 2 p L と約 3 0 0 p L の間、または約 0 . 0 5 p L と約 5 0 p L の間、または約 0 . 1 p L と約 2 5 p L の間の容積を有する。

【0034】

本発明の方法の幾つかの実施形態では、第 1 および第 2 取り調べ空間の少なくとも 1 つの容積は調整可能である。

【 0 0 3 5 】

本発明の方法の幾つかの実施形態では、推進力は圧力を備える。これらの実施形態の幾つかは、圧力は、ポンプ、真空源、遠心分離機またはこれらの組合せからなるグループから選択される供給源によって提供される。

【 0 0 3 6 】

本発明の方法の幾つかの実施形態では、個体は、動物または植物、例えば、動物、哺乳動物、人間である。

【 0 0 3 7 】

幾つかの実施形態では、本発明の方法は、サンプル中の複数の粒子について分析を実施することを含む。これらの実施形態の幾つかでは、複数の粒子のそれぞれ検出された粒子は、ラベルを備え、それぞれ検出された粒子は、ラベル識別(identity)、ラベル強度、移動度(mobility)またはこれらの組合せからなるグループから選択された特性によって他と弁別される。

【 0 0 3 8 】

本発明の方法の幾つかの実施形態では、サンプルは、血液、血清(serum)、血漿(plasma)、気管支肺胞洗浄(bronchoalveolar lavage)液、尿(urine)、脳脊髄(cerebrospinal)液、肋膜(pleural)液、滑液(synovial fluid)、腹膜(peritoneal)液、羊水(amniotic fluid)、胃液(gastric fluid)、リンパ(lymph)液、間質(interstitial)液、組織ホモジェネート(homogenate)、細胞抽出物、唾液(saliva)、痰(sputum)、大便(stool)、生理学分泌物(secretions)、涙、粘液(mucus)、汗、乳、精液(semen)、精漿(seminal fluid)、膣(vaginal)分泌物、潰瘍(ulcers)や他の表面の発疹、水疱(blisters)、膿瘍(abscesses)からの液、良性、悪性および疑わしい組織の生体組織検査(biopsies)を含む組織抽出物、または、粒子を含むことがある他の何れかの身体要素なるグループから選択される。

【 0 0 3 9 】

幾つかの実施形態では、サンプルは、血液、血漿、血清からなるグループから選択される。

【 0 0 4 0 】

これらの実施形態の幾つかは、該方法は、前記サンプル中の粒子をラベリングすることをさらに備え、前記サンプルを分析することは、前記ラベリングした粒子の存在または不在を検出することを備え、必要に応じて、前記サンプルから結合していないラベルを除去することを含み、及び / 又は前記個体から前記サンプルを入手すること、及び / 又は、蛋白質、核酸、ナノ粒子(nanosphere)、マイクロ粒子(microsphere)、デンドリマー(dendrimer)、染色体(chromosome)、炭水化物(carbohydrate)、ウイルス、バクテリア、細胞、およびこれらの組合せからなるグループから選択された粒子を分析すること、例えば、蛋白質、核酸、ウイルス、バクテリアおよびこれらの組合せからなるグループから選択することを含む。

【 0 0 4 1 】

幾つかの実施形態では、粒子は、アミノ酸、ヌクレオチド(nucleotide)、脂質(lipid)、糖、微粒子毒素、ペプチド毒素、毒液(venom)、薬剤(drug)、およびこれらの組合せからなるグループから選択される。

【 0 0 4 2 】

本発明の方法の幾つかの実施形態では、サンプルは、対象となる粒子に限定的である、蛍光ラベル付けした抗体(antibody)と接触した血清サンプルであって、前記分析は、ラベル付けした粒子の存在、不在及び / 又は濃度を検出することを備える。これらの実施形態の幾つかは、該方法は、ラベル付けした粒子の存在、不在及び / 又は濃度に基づいて、診断、予後、治療状態及び / 又は治療方法を決定することをさらに含む。

【 0 0 4 3 】

該方法は、前記診断、予後、治療状態及び / 又は治療方法を個体に報告することをさら

10

20

30

40

50

に含む。幾つかの実施形態では、バイオマーカー(biomarker)は、T R E M - 1である。幾つかの実施形態では、該方法は1時間未満で完了する。幾つかの実施形態では、診断、予後、治療状態及び/又は治療方法を決定することは、バイオマーカーパネルの存在、不在及び/又は濃度に基づいている。幾つかの実施形態では、該方法は2時間未満で実施される。

【0044】

一実施形態では、本発明は、個体から得られたサンプル中の粒子の存在、不在及び/又は濃度に基づいて、診断、予後、治療状態及び/又は治療方法を決定することを含み、前記存在、不在及び/又は濃度は、単一分子を決定可能な分析器を備えた分析器システムを用いて決定され、前記分析器は、少なくとも1つの取り調べ空間を備える。

10

【0045】

これらの実施形態の幾つかは、該分析器は、少なくとも2つの取り調べ空間を備える。幾つかの実施形態では、該分析器システムは、放射を発生するための少なくとも1つの連続波電磁放射源を備えた、単一分子を決定可能な分析器を備え、少なくとも1つの取り調べ空間は、前記放射を受けるように位置決めされる。

【0046】

他の実施形態では、本発明は、個体をスクリーニングして、癌(cancer)の存在または不在を決定するための方法を提供するものであり、該方法は、1つ又はそれ以上の癌マーカーに関して個体からのサンプルを分析することを含み、各マーカーが1ピコモル未満の濃度で存在し、サンプルのサイズが約5 μ lである場合、1つのサンプルから他のサンプルまで、1つ又はそれ以上のマーカー濃度の約20%未満の変化を検出可能な分析器を用いる。

20

【0047】

幾つかの実施形態では、該方法は、前記分析結果を、マーカーに関する既知の値と比較することをさらに含む。幾つかの実施形態では、個体は、喫煙者であり、癌は肺癌である。

【0048】

他の実施形態では、本発明は、粒子を検出するための方法を提供するものであり、該方法は、粒子を、電気運動力によって、約0.02 pLと約300 pLの間の容積を有する第1取り調べ空間および約0.02 pLと約300 pLの間の容積を有する第2取り調べ空間へ移動することと、

30

該サンプルを、少なくとも1つの連続波電磁放射源に曝すことと、

粒子が、第1取り調べ空間内で連続波電磁放射と相互作用する際、第1取り調べ空間内で粒子の第1電磁放射特性を測定することと、

粒子が、第2取り調べ空間内で連続波電磁放射と相互作用する際、第2取り調べ空間内で粒子の第1電磁放射特性および第2電磁放射特性の少なくとも1つを測定することとを含む。

【0049】

幾つかの実施形態では、該粒子は、第1粒子であり、該方法は、第2粒子を、第1取り調べ空間、第2取り調べ空間、第3取り調べ空間および第4取り調べ空間のうちの少なくとも2つに移動することと、

40

第2粒子が、第1取り調べ空間、第2取り調べ空間、第3取り調べ空間および第4取り調べ空間のうちの少なくとも1つの内部で連続波電磁放射と相互作用する際、第2粒子の第1電磁放射特性および第2粒子の第2電磁放射特性の少なくとも1つを測定することとを含む。

【0050】

更なる態様において、本発明は、ディスプレイユニットを備えたユーザインタフェースを有する汎用コンピュータについての命令セットを収納するコンピュータ読み取り可能な保存媒体を提供するものであり、該命令セットは、

(a) 2つの取り調べ空間を持つ単一粒子検出器を用いてサンプルの分析からの値を入

50

力するためのロジック(logic)と、

(b) 前記ディスプレイユニットを用いて、入力値の結果を表示するための表示ルーチン、とを備える。

【0051】

幾つかの実施形態では、該命令セットは、入力値とデータベースとを比較するための比較ルーチンをさらに備え、表示ルーチンは、比較ルーチンの結果を表示するためのロジックをさらに備える。

【0052】

さらに他の態様において、本発明は、ディスプレイユニットを備えたユーザインタフェースを有する汎用コンピュータのための命令セットを備えたコンピュータ間のインターネット経由で伝搬する電子信号または搬送波を提供するものであり、

該命令セットは、ディスプレイユニットを備えたユーザインタフェースを有する汎用コンピュータについての命令セットを収納するコンピュータ読み取り可能な保存媒体を備え、該命令セットは、

(a) 2つの取り調べ空間を持つ単一粒子検出器を用いてサンプルの分析からの値を入力するためのロジックと、

(b) 前記ディスプレイユニットを用いて、入力値の結果を表示するための表示ルーチン、とを備える。

【0053】

幾つかの実施形態では、該命令セットは、入力値とデータベースとを比較するための比較ルーチンをさらに備え、表示ルーチンは、比較ルーチンの結果を表示するためのロジックをさらに備える。

【0054】

さらに他の態様において、本発明は、ビジネスを行う方法を提供するものであり、該方法は、サンプルの分析結果を得るために、2つの取り調べ空間を有し、単一粒子を検出可能な検出器の団体(entity)による使用と、前記結果を報告することと、結果の報告に関する団体への支払いとを備える。

【0055】

幾つかの実施形態では、該団体は、C L I A (Clinical Laboratory Improvement Amendments) 研究所である。幾つかの実施形態では、該団体は、C L I A 研究所ではない。

【0056】

さらに他の態様において、本発明は、連続波照射源と、2つ又はそれ以上の別個のp Lサイズの取り調べ空間と、単一粒子を含む、検出すべき粒子の電気運動輸送とを組み合わせた装置を提供する。

【0057】

一態様において、本発明は、単一粒子分析器を提供するものであり、該分析器は、電磁放射を発生するための少なくとも1つの連続波電磁放射源と、

約0.02 p Lと約300 p Lの間の容積を有し、電磁放射源から発生した電磁放射を受けるように位置決めされた第1取り調べ空間と、

約0.02 p Lと約300 p Lの間の容積を有し、電磁放射源から発生した電磁放射を受けるように位置決めされた第2取り調べ空間とを備え、

第2取り調べ空間は、第1取り調べ空間との流体通路中にあり、

粒子が、少なくとも部分的に電気運動力を用いて第1取り調べ空間と第2取り調べ空間との間で移動可能なように、電位が第1取り調べ空間と第2取り調べ空間との間に存在しており、

第1取り調べ空間と動作可能に連結して、粒子の第1電磁放射特性を測定する第1電磁放射検出器と、

第2取り調べ空間と動作可能に連結して、粒子の第1電磁放射特性および粒子の第2電磁放射特性のうちの少なくとも1つを測定する第2電磁放射検出器と、を備える。

【0058】

本発明の他の態様によれば、該分析器は、第1取り調べ空間および第2取り調べ空間のうちの少なくとも1つに動作可能に連結され、粒子の第1電磁放射特性および粒子の第2電磁放射特性のうちの少なくとも1つを測定する第3電磁放射検出器をさらに備える。一態様において、連続波電磁放射源は、発光ダイオードおよび連続波レーザからなるグループから選択される。

【0059】

本発明のさらに他の態様によれば、第1電磁放射特性および第2電磁放射特性のうちの少なくとも1つは、放射波長、放射強度、パースト(burst)サイズ、パースト期間、蛍光の偏光、およびこれらの組合せからなるグループから選択される。

【0060】

本発明の他の態様において、第1取り調べ空間および第2取り調べ空間のうちの少なくとも1つは、約0.05 pLと約50 pLの間、好ましくは、約0.10 pLと約25 pLの間の容積を有する。一態様において、第1および第2取り調べ空間の少なくとも1つの容積は調整可能である。1つの代替において、第1取り調べ空間および第2取り調べ空間のうちの少なくとも1つは、電磁放射源から受けた電磁放射ビームの断面積、および第1電磁放射検出器および第2電磁放射検出器の少なくとも1つの検出範囲のうち少なくとも1つによって規定される。一態様において、検出範囲は、第1電磁放射検出器および第2電磁放射検出器の少なくとも1つに隣接して位置決めされた空間フィルタにおけるスリット幅により決定される。

【0061】

他の代替において、第1および第2取り調べ空間の少なくとも1つは、ガラス、石英(quartz)、溶融シリカ、プラスチック、またはこれらの組合せからなるグループから選択される材料を備えた固体(solid)ハウジングによって少なくとも部分的に規定される。

【0062】

さらに他の代替において、第1取り調べ空間および第2取り調べ空間の少なくとも1つは、流体境界によって少なくとも部分的に規定される。

【0063】

本発明の他の態様において、第1電磁放射検出器および第2電磁放射検出器の少なくとも1つは、電荷結合素子(CCD)カメラ、ビデオ入力モジュールカメラ、ストリーク(streak)カメラ、ボロメータ(bolometer)、フォトダイオード、フォトダイオードアレイ、アバランシェフォトダイオード検出器、光電子増倍管検出器、およびこれらの組合せからなるグループから選択される。

【0064】

さらに他の態様において、該分析器は、第1取り調べ空間と第2取り調べ空間の間で粒子の移動を促進するための、ポンプ、真空源および遠心分離機のうちの少なくとも1つをさらに備える。

【0065】

さらに他の態様において、本発明は、粒子を検出する方法を提供するものであり、該方法は、電気運動力によって、粒子を、約0.02 pLと約300 pLの間の容積を有する第1取り調べ空間および、約0.02 pLと約300 pLの間の容積を有する第2取り調べ空間の中へ移動することと、

該サンプルを、少なくとも1つの連続波電磁放射源に曝すことと、

粒子が、第1取り調べ空間内で連続波電磁放射と相互作用する際、第1取り調べ空間内で粒子の第1電磁放射特性を測定することと、

粒子が、第2取り調べ空間内で連続波電磁放射と相互作用する際、第2取り調べ空間内で粒子の第1電磁放射特性および粒子の第2電磁放射特性の少なくとも1つを測定することを含む。

【0066】

本発明の更なる態様によれば、第2取り調べ空間は、複数の取り調べ空間を備える。

【0067】

10

20

30

40

50

本発明のさらに他の態様によれば、該粒子は、第 1 粒子であり、該方法は、第 2 粒子を、第 1 取り調べ空間、第 2 取り調べ空間、第 3 取り調べ空間および第 4 取り調べ空間のうちの少なくとも 2 つに移動することと、

第 2 粒子が、第 1 取り調べ空間、第 2 取り調べ空間、第 3 取り調べ空間および第 4 取り調べ空間のうちの少なくとも 1 つの内部で連続波電磁放射と相互作用する際、第 2 粒子の第 1 電磁放射特性および第 2 粒子の第 2 電磁放射特性の少なくとも 1 つを測定することとをさらに含む。

【 0 0 6 8 】

本発明のさらに他の態様によれば、該方法は、第 1 取り調べ空間を第 2 取り調べ空間に連結することと、粒子移動に先だって流体を導入することとをさらに備える。

10

【 0 0 6 9 】

本発明の他の態様において、該方法は、粒子を、蛋白質、核酸、ナノ粒子(nanosphere)、マイクロ粒子(microsphere)、デンドリマー(dendrimer)、染色体(chromosome)、炭水化物(carbohydrate)、ウイルス、バクテリア、細胞、およびこれらの組合せからなるグループから選択することをさらに備える。

【 0 0 7 0 】

一態様において、粒子の組合せは、蛋白質、核酸、ウイルス、およびバクテリアからなるグループから選択される。

【 0 0 7 1 】

代替として、該方法は、粒子を、アミノ酸、ヌクレオチド(nucleotide)、脂質(lipid)、糖、微粒子毒素、ペプチド毒素、毒液(venom)、薬剤(drug)、およびこれらの組合せからなるグループから選択することをさらに備える。

20

【 0 0 7 2 】

本発明のさらに他の態様において、第 1 電磁放射特性および第 2 電磁放射特性のうちの少なくとも 1 つは、粒子の内的(intrinsic)パラメータおよび粒子の外的パラメータの 1 つによって作成される。

【 0 0 7 3 】

一態様において、該方法は、外的パラメータを付与するために、少なくとも 1 つのラベルを用いて粒子にマーキングすることをさらに備える。

【 0 0 7 4 】

更なる態様において、ラベルは、電磁放射を発生し、染料(dye)タグ、光散乱タグ、およびこれらの組合せからなるグループから選択される。

30

【 0 0 7 5 】

本発明の更なる態様において、粒子は、第 1 粒子であり、ラベルは、第 1 ラベルであり、第 1 粒子および第 1 ラベルは、複数の粒子および複数のラベルの混合物の中に含有されており、該方法は、

(a) 複数の粒子の第 1 粒子から、複数のラベルの少なくとも 1 つの結合していないラベルを分離すること、または複数のラベルの少なくとも 1 つの結合していないラベルを検出不能にすることと、

(b) 薬剤と、複数の粒子の第 1 粒子とを相互作用させて、第 1 粒子に結合された第 1 ラベルを遊離させることと、

40

(c) 第 1 ラベルが第 1 粒子から遊離した後、第 1 ラベルを検出し、これにより第 1 粒子を間接的に検出することと、さらに備える。

【 0 0 7 6 】

本発明の一態様において、第 1 粒子から遊離した第 1 ラベルは、粒子である。他の態様において、粒子は、少なくとも 2 つの弁別可能なラベルでマーキングされる。1 つの代替において、粒子は、共有(covalent)結合、イオン結合、疎水性結合、親和性(affinity)結合、水素結合、ファン・デル・ワールス力、配位複合体形成(coordination complex formation)、およびこれらの組合せからなるグループから選択される特定および不特定の相互作用の少なくとも 1 つを用いて、直接にラベル付けされる。

50

【0077】

他の代替において、粒子は、特定の複合体を形成するため、少なくとも1つの結合パートナーとの培養(incubation)を用いて、間接的にラベル付けされ、結合パートナーは少なくとも1つのラベルを備えるものである。

【0078】

一態様において、少なくとも1つの結合パートナーとの培養を用いて、粒子を間接的にラベル付けするステップは、共有(covalent)結合、イオン結合、疎水性結合、親和性(affinity)結合、水素結合、ファン・デル・ワールス力、配位複合体形成(coordination complex formation)、およびこれらの組合せからなるグループから選択される特定および不特定の相互作用の少なくとも1つを備える。

10

【0079】

1つの代替において、粒子は、第1取り調べ空間および第2取り調べ空間のうちの少なくとも1つの内部で結合パートナーと培養される。他の代替において、粒子は、粒子移動に先立って結合パートナーと培養される。

【0080】

さらに他の態様において、結合パートナーは、ポリヌクレオチド/ポリヌクレオチド相互作用、ポリヌクレオチド/ポリペプチド相互作用、ポリペプチド/ポリペプチド相互作用、およびこれらの組合せからなるグループから選択される。

【0081】

一態様において、少なくとも1つの結合パートナーとの前記培養は、粒子を第1結合パートナーと培養することと、粒子を第2結合パートナーと培養することとを備え、第1結合パートナーおよび第2結合パートナーのうちの少なくとも1つは、少なくとも1つのラベルを備える。

20

【0082】

本発明のさらに他の態様において、粒子を、第1取り調べ空間および第2取り調べ空間の中に移動することは、粒子を、毛細管ゲル電気泳動、ミセル電気運動クロマトグラフィー、等速回転電気泳動、磁界、およびこれらの組合せからなるグループから選択される分離機構に曝すことを備える。

【0083】

1つの代替において、該方法は、第2粒子を、第1粒子の方向とはほぼ反対方向に移動することをさらに備える。

30

【0084】

一態様において、粒子を、第1取り調べ空間および第2取り調べ空間の中に移動することは、電気運動力と、圧力勾配、重力、表面張力、遠心力、およびこれらの組合せからなるグループから選択される少なくとも1つの追加した力との組合せによって、粒子を移動することを備える。

【0085】

本発明の他の態様において、粒子の移動度(mobility)は、電気運動力と、内的および外的パラメータの少なくとも1つを含む粒子の物理パラメータとの相互作用によって決定される。

40

【0086】

一態様において、該方法は、外的パラメータを提供するため、少なくとも1つのラベルを用いて粒子をマーキングすることをさらに備える。

【0087】

一態様において、ラベルは、粒子の移動度に影響を与えることが可能であり、電荷(charge)タグ、質量タグ、電荷/質量タグ、磁気タグ、およびこれらの組合せからなるグループから選択される。

【0088】

更なる態様において、粒子は、少なくとも2つの弁別可能なラベルを用いてマーキングされる。

50

【0089】

1つの代替において、粒子は、共有(covalent)結合、イオン結合、疎水性結合、親和性(affinity)結合、水素結合、ファン・デル・ワールス力、配位複合体形成(coordination complex formation)、およびこれらの組合せからなるグループから選択される特定および不特定の相互作用の少なくとも1つを用いて、直接にラベル付けされる。

【0090】

他の代替において、粒子は、特定の複合体を形成するため、少なくとも1つの結合パートナーとの培養(incubation)を用いて、間接的にラベル付けされ、結合パートナーは少なくとも1つのラベルを備えるものである。

【0091】

一態様において、少なくとも1つの結合パートナーとの培養を用いて、粒子を間接的にラベル付けすることは、共有(covalent)結合、イオン結合、疎水性結合、親和性(affinity)結合、水素結合、ファン・デル・ワールス力、配位複合体形成(coordination complex formation)、およびこれらの組合せからなるグループから選択される特定および不特定の相互作用の少なくとも1つを備える。

10

【0092】

1つの代替において、粒子は、第1取り調べ空間および第2取り調べ空間のうちの少なくとも1つの内部で結合パートナーと培養される。他の代替において、粒子は、粒子移動に先立って結合パートナーと培養される。

【0093】

さらに他の態様において、結合パートナーは、ポリヌクレオチド/ポリヌクレオチド相互作用、ポリヌクレオチド/ポリペプチド相互作用、ポリペプチド/ポリペプチド相互作用、およびこれらの組合せからなるグループから選択される。

20

【0094】

一態様において、少なくとも1つの結合パートナーとの前記培養は、粒子を第1結合パートナーと培養することと、粒子を第2結合パートナーと培養することとを備え、第1結合パートナーおよび第2結合パートナーのうちの少なくとも1つは、少なくとも1つのラベルを備える。

【0095】

本発明の更なる態様において、別々の結合パートナーの混合物は、粒子と培養される。

30

【0096】

さらに他の態様において、粒子は、複数の粒子および複数のラベルの混合物中の第1粒子であり、第1粒子は、複数のラベルの第1ラベルを用いてラベル付けされ、第1ラベルを用いてラベル付けされた第1粒子は、複数の粒子のラベル付けされていない粒子および複数のラベルの結合していないラベルから弁別される。

【0097】

さらに他の態様において、第1粒子は、複数のラベルの第2ラベルを用いてラベル付けされ、第1粒子は、第1ラベルの電磁特性および第2ラベルの電磁特性との比率を測定することによって、複数の粒子のラベル付けされていない粒子および複数のラベルの結合していないラベルから弁別される。

40

【0098】

本発明の他態様において、少なくとも第1および第2粒子が検出され、該方法は、少なくとも第1および第2粒子を計数することをさらに備える。

【0099】

1つの代替において、少なくとも第1および第2粒子を計数することは、サンプルの濃度と既知の濃度を有する外部粒子標準とを比較することによって、サンプル内の粒子の濃度を決定することを備える。

【0100】

他の代替において、少なくとも第1および第2粒子を計数することは、サンプルの濃度と既知の濃度を有する内部粒子標準とを比較することによって、サンプル内の粒子の濃度

50

を決定することを備える。

【0101】

さらに他の代替において、少なくとも第1および第2粒子を計数することは、外部粒子標準を使用せず、内部粒子標準を使用しないで、粒子の濃度を決定することを備える。

【0102】

本発明の他の態様において、第1および第2粒子は、複数の粒子および複数のラベルの混合物中にある第1および第2粒子であり、第1粒子は、これに付着した複数のラベルの第1ラベルを有し、第2粒子は、これに付着した複数のラベルの第2ラベルを有し、第1および第2ラベルは、それぞれ異なる所定の範囲を有し、さらに、第1粒子は、結合していないラベルによって生成される特性信号によって、複数のラベルの結合していないラベルから弁別され、第1粒子は、第1および第2ラベルの異なる範囲によって、第2粒子から弁別される。

10

【0103】

本発明の他の態様において、第1および第2粒子は、複数の粒子および複数のラベルの混合物中にある第1および第2粒子であり、第1粒子は、第1ラベルおよび、第1ラベルと弁別可能な第2ラベルを用いてラベル付けされ、第2粒子は、第1ラベルにほぼ類似した第3ラベルを用いてラベル付けされ、第1粒子は、第2粒子から、第2ラベルにほぼ類似した複数のラベルのあるラベルのみを用いてラベル付けされた複数の粒子の中の粒子から、複数の粒子のラベル付けされていない粒子から、そして、複数のラベルの結合していないラベルから、弁別される。

20

【0104】

1つの代替において、第1および第3ラベルは、電磁放射を発生し、第2および第4ラベルは移動度に影響を与え、第1粒子は、第2粒子から、移動度に影響を与えるラベルを用いてのみラベル付けされた複数の粒子の中の粒子から、複数の粒子のラベル付けされていない粒子から、そして、複数のラベルの中の結合していないラベルから、弁別される。

【0105】

他の代替として、第2粒子は、第2ラベルにほぼ類似した第4ラベルを用いてラベル付けされ、第1ラベルの電磁特性および第2ラベルの電磁特性との比率は、第3ラベルの電磁特性および第4ラベルの電磁特性との比率と異なり、第1粒子は、第1粒子および第2粒子のラベル比率間の差を測定することによって、第2粒子から弁別される。

30

【0106】

他の態様において、第1ラベル、第2ラベル、第3ラベルおよび第4ラベルの電磁特性は、波長である。

【0107】

さらに他の代替において、第2粒子は、第2ラベルにほぼ類似した第4ラベルを用いてラベル付けされ、第1ラベルおよび第2ラベルによって発生する電磁強度の合計は、第3ラベルおよび第4ラベルによって発生する電磁強度の合計と異なり、第1粒子は、第1および第2ラベルの強度の合計と第3および第4ラベルの強度の合計との間の差を測定することによって、第2粒子から弁別される。

【0108】

さらに他の態様において、第1粒子は、第1ラベルを用いてラベル付けされ、第2粒子は、第2ラベルを用いてラベル付けされ、第1粒子および第2粒子は、第1粒子の電磁特性と第2粒子の電磁特性との間の差を測定することによって、弁別される。

40

【0109】

一態様において、第1粒子および第2粒子の電磁特性は、波長である。

【0110】

1つの代替において、粒子は、固有に検出可能な特性を有する第1粒子であり、ラベルは、移動度に影響を与える第1ラベルであり、固有に検出可能な特性を有する第2粒子は、移動度に影響を与える第2ラベルを用いてラベル付けされ、第1および第2粒子は、第1および第2粒子の間の移動度の差を測定することによって、弁別される。

50

【0111】

他の代替において、粒子は、固有に検出可能な特性を有する第1粒子であり、ラベルは、移動度に影響を与える第1ラベルであり、固有に検出可能な特性を有する第2粒子はラベル付けされず、第1および第2粒子は、第1および第2粒子の間の移動度の差を測定することによって、弁別される。

【0112】

本発明の他の態様において、該方法は、第1取り調べ空間内で測定された粒子の電磁特性と、第2取り調べ空間内で測定された粒子の電磁特性とを比較することをさらに備える。

【0113】

一態様において、比較するステップは、測定した粒子の電磁特性の少なくとも1つと背景電磁放射との間の統計的分析によって弁別することを備える。

【0114】

更なる態様において、比較するステップは、測定した粒子の電磁特性の相互相関をとって、粒子の速度を決定することを備える。

【0115】

(参照による組み込み)

本明細書で言及した全ての刊行物および特許出願は、個々の刊行物または特許出願が参照により組み込まれるように具体的かつ個別に指示されたのと同程度に、参照によりここに組み込まれる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0116】

本発明は、極めて低い濃度で、粒子の超高感度の検出、定量化および弁別のための分析器および分析器システム、ならびに該分析器および分析器システムを用いる方法を提供する。

【0117】

本発明の分析器システムの一実施形態を、図1に示す。図示したシステムは、複数のサンプルを自動的にサンプリング可能であり、サンプル容器と第1取り調べ空間との間の流体通路を提供するサンプリングシステムと、任意であるサンプル調製システムと、単一粒子を検出可能な分析器とを含み、分析器は、電磁(E M)放射源からの電磁放射を受けるように位置決めされ、電磁放射検出器を分離するように動作的に連結され、サンプルが通過する第1取り調べ空間および第2取り調べ空間を収容するものであり、そして、データ分析及び報告システムを含む。

【0118】

分析器は、小型で、耐久性があり、単一粒子、個々の粒子との相互作用、および単一粒子または粒子複合体を要するイベントの検出に関して正確である。

【0119】

分析器、分析器システムおよび関連した方法は、データ相互相関等を用いて、単一粒子についての特性速度、例えば、電気泳動速度を発生し決定するように使用することができ、単一粒子の速度を決定し、分析ノイズを最小化し、これらの速度、例えば、電気泳動速度、及び/又は電磁放射に基づいて粒子間を弁別する。

【0120】

分析器、分析器システムおよび関連した方法は、多数の粒子を含むサンプル中での少なくとも1つの粒子を弁別する能力を提供する。

【0121】

さらに、分析器、分析器システムおよび関連した方法は、多重ターゲット粒子または、単一サンプル中での1つ又はそれ以上のターゲット粒子の多重の識別可能な特性についての改善した検出を提供する。

【0122】

下記の実施形態は、例として、粒子検出の一手段として電磁放射を使用している。単一

10

20

30

40

50

粒子検出の分野では、光学ベースの検出システム（即ち、レーザ誘起蛍光）は、一般に利用可能であり、当業者に周知である。しかしながら、粒子検出の他の方法、例えば、化学ルミネセンスまたは放射能タグなどの使用は、電磁放射をサンプルに供給する必要がなく、検出のみであるが、本発明の範囲内であると理解される。

【0123】

（装置／システム）

一態様において、本発明は、サンプル中の個々の粒子を検出可能である分析器を提供するものであり、粒子は、推進力(motive force)によって分析器の中を移動する。

【0124】

幾つかの実施形態では、分析器は、EM放射源として連続波(CW)レーザを使用する単一粒子検出機器を備え、2つの流体連結された取り調べ空間を含み、圧力が、サンプルを取り調べ空間の中で移動させるために用いられる。

10

【0125】

幾つかの実施形態では、分析器は、EM放射源として連続波(CW)レーザを使用する単一粒子検出機器を備え、2つの流体連結された取り調べ空間を含み、電気運動(electro-kinetic)力が、サンプルを取り調べ空間の中で移動させるために用いられる。

【0126】

他の態様において、本発明は、分析器システムを提供する。幾つかの実施形態では、該システムは、単一粒子（例えば、単一分子）を検出可能な分析器を含み、該検出機器は、サンプルを分析器に導入するためのサンプリングシステムと流体連結された1つの取り調べ空間を含み、電磁放射を発生するための電磁放射源を含み、取り調べ空間は、電磁放射源から発生するEM放射を受けるように位置決めされており、第1取り調べ空間と動作可能に連結して、粒子（例えば、分子）の第1電磁放射特性を測定する第1電磁放射検出器を含む。

20

【0127】

幾つかの実施形態では、該システムは、単一粒子（例えば、単一分子）を検出可能な分析器を含み、該検出機器は、流体連結された2つの取り調べ空間と、サンプルを分析器に導入するためのサンプリングシステムとを含み、電磁放射を発生するための電磁放射源を含む。

【0128】

好ましい実施形態では、サンプリングシステムは、人間のオペレータからの介入なしで、複数のサンプルをサンプリング可能な自動サンプリングシステムである。

30

【0129】

幾つかの実施形態では、該システムは、サンプル回収機構を含み、分析後に、サンプルの一部またはほぼ全てが回収することができる。

【0130】

幾つかの実施形態では、該システムは、サンプル調製機構を提供し、サンプルは、単一粒子分析器による分析用に部分的または全て調製される。

【0131】

幾つかの実施形態では、該システムは、分析を制御し、及び／又は生データを分析するためのコンピュータを提供し、更なる実施形態では、この分析結果を報告するための報告装置を提供する。

40

【0132】

（サンプルおよび粒子）

本発明は、幅広いサンプルおよびサンプル内に含まれる粒子について、高い感度で、丈夫で、再現性のある分析のための分析器および分析器システムを提供する。本発明は、粒子の存在、不在及び／又は濃度の検出方法を提供する。

【0133】

（サンプル）

処理して又は処理しないで、システムの取り調べ空間を移動可能であり、システムの検

50

出器により検出可能な粒子を含みまたは含み得る何れのサンプルは、本発明の単一粒子分析器または分析器システムによって、分析することができる。

【0134】

これらは、以下に限定されないが、工業的応用からのサンプル、環境サンプル、農業サンプル、バイオテロサンプル、医療のスクリーニング、診断、予後、治療のためのサンプル、臨床または前臨床トライアルなど、生物医学または他の研究からのサンプルなどである。

【0135】

サンプルは、体外または体内のソースからでもよく、これらの組合せでもよい。システムは、生物医学研究、診断または治療のための臨床サンプルの分析にとって、特に有用である。

10

【0136】

分析評価は、例えば、下記実施形態で記載したように、生物学的サンプル、例えば、生物学的流体において、本発明の方法を用いて実行することができる。

【0137】

こうした流体は、以下に限定されないが、気管支肺胞洗浄(bronchoalveolar lavage)液(BAL)、血液、血清(serum)、血漿(plasma)、尿(urine)、脳脊髄(cerebrospinal)液、肋膜(pleural)液、滑液(synovial fluid)、腹膜(peritoneal)液、羊水(amniotic fluid)、胃液(gastric fluid)、リンパ(lymph)液、間質(interstitial)液、組織ホモジェネート(homogenate)、細胞抽出物、唾液(saliva)、痰(sputum)、大便(stool)、生理学分泌物(secretions)、涙、粘液(mucus)、汗、乳、精液(semen)、精漿(seminal fluid)、膣(vaginal)分泌物、潰瘍(ulcers)や他の表面の発疹、水疱(blisters)、膿瘍(abscesses)からの液、良性、悪性および疑わしい組織の生体組織検査(biopsies)を含む組織抽出物、または、対象となるターゲット粒子を含むことがある他の何れかの身体要素などである。他の同様な標本、例えば、細胞、組織培養、または培養液も対象である。

20

【0138】

幾つかの実施形態では、サンプルは、血液サンプルである。幾つかの実施形態では、サンプルは、血清または血漿サンプルである。幾つかの実施形態では、サンプルは、気管支肺胞洗浄液(BAL)サンプルである。幾つかの実施形態では、サンプル、例えば、血液、血清または血漿サンプルは、追加の処理なしで本発明の方法で使用される。他の実施形態では、ここで説明するように、サンプルは、例えば、対象となる1つ又はそれ以上の粒子にラベル付けするために処理される。処理は、本発明の分析器システムへのサンプル導入前に行ってもよく、サンプルをシステムに導入した後に行ってもよい。

30

【0139】

(分析用の粒子)

本発明の分析器および分析器システムを用いた、少なくとも1つの単一粒子を検出するための方法も提供される。この単一粒子分析器の特定の特徴は、幅広い範囲の粒子を検出する能力である。分析器によって検出可能な粒子は、以下に限定されないが、分子、超分子(supramolecular)複合体、オルガネラ(organelles)、ビーズ、分子の会合(associations)、超分子複合体の会合、有機体(organism)である。

40

【0140】

本発明の分析器および関連した方法を用いて検出可能な分子の粒子の例は、蛋白質などのバイオポリマー、核酸、炭水化物(carbohydrate)、有機および無機の小粒子化学物体などである。

【0141】

後者の例は、以下に限定されないが、抗自己免疫欠損症候群物質、抗体、抗癌物質、抗生物質、抗ウイルス物質、酵素、酵素抑制剤、神経毒、筋弛緩物質および抗パーキンソン物質、抗痙攣および筋収縮物質、縮瞳および抗コリン作用物質、免疫抑制物質(例えば、シクロスポリン(cyclosporine))、抗緑内障溶質、抗寄生生物及び/又は抗原生動物溶質、抗高血圧物質、鎮痛薬、解熱剤、抗炎症剤(例えば、非ステロイド消炎性薬剤)、局部

50

麻酔薬、眼科、プロスタグランジン類、抗うつ剤、抗精神病物質、鎮吐剤、造影剤、特定ターゲット剤、神経伝達物質、蛋白質、細胞応答調整剤、などである。

【0142】

同様に、検出可能な化学物質は、アミノ酸、ヌクレオチド、脂質、糖、薬剤、毒素、毒液、基質、ファルマコフォア、およびこれらの組合せなどの微粒子を含む、

【0143】

蛋白質は、幅広い治療学および診断学で対象となり、例えば、細胞群、血液型、病原体、病原体への免疫応答、免疫複合体、糖類、レクチン、自然発生レセプタなどの検出などである。

【0144】

検出可能な粒子の他の例は、ナノ粒子(nanosphere)、マイクロ粒子(microsphere)、デンドリマー(dendrimer)、染色体(chromosome)、オルガネラ、ミセル、キャリア粒子などである。オルガネラの例は、細胞核、ミトコンドリア、リボソーム、エンドソームなどの亜細胞粒子などである。

【0145】

有機体の例は、ウイルス、バクテリア、真菌細胞、動物細胞、植物細胞、真核生物細胞、原核生物細胞、古代バクテリア(archeobacter)細胞、およびこれらの組合せ、などである。

【0146】

粒子の複合体からなる粒子には、ラベルが結合した有機体、2つ又はそれ以上の核酸の複合体、1つ又はそれ以上の抗体または抗体フラグメントと結合したターゲット粒子の複合体、などである。

【0147】

2つ又はそれ以上のタイプの単一粒子が検出される複合体は、蛋白質、レセプタ、DNA、RNA、PNA、LNA、炭水化物、オルガネラ、ウイルス、細胞、バクテリア、真菌、これらのフラグメント、およびこれらの組合せから選択される粒子などである。

【0148】

これらおよび他の粒子を検出するために、ここで提供される多数の実施例の観点から、当業者は、本発明の分析器および関連した方法をどのように適合させるかについて認識するであろう。

【0149】

一実施形態では、分析器および関連した方法によって検出可能な化学物質は、合成または天然のホルモン、天然薬剤、合成薬剤、汚染物質、アレルゲン、影響粒子、成長因子、ケモカイン、サイトカイン、リンフォカイン、アミノ酸、オリゴペプチド、化学中間物質、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチドなどである。

【0150】

特に対象となるものは、ウイルス、原核生物および真核細胞、例えば、真菌、動物、哺乳類などの単細胞および多細胞有機体細胞、これらのフラグメントを含む微生物および細胞である。

【0151】

本発明の方法は、病原体(pathogen)を検出するためにも使用できる。対象となる病原体は、以下に限定されないが、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、ピコルナウイルス、オルトミクソウイルス、パラミクソウイルス、ラブドウイルス、コロナウイルス、アレナウイルス、レトロウイルスなどのウイルスである。

【0152】

これらはまた、以下に限定されないが、大腸菌、緑膿菌、エンテロバクタ・クローエカ(Enterobacter cloacae)、黄色ブドウ球菌、大便連鎖球菌、肺炎桿菌、ネズミチフス菌、表皮ブドウ球菌、セラチア・マルセスセンス、ウシ結核菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、尋常変形菌などのバクテリアを含む。

【0153】

10

20

30

40

50

こうした病原体の例は、上述のものに限定されないが、当業者は、どの特定種の微生物および寄生生物が、本発明の所定の設定または応用に特に重要であるかを知ることになる。

【0154】

更なる例は、ここに提供される。さらに、これらの有機体および関連した病気の網羅的でないリストが、例えば、ウォリア(Warinner)に付与された米国特許第5795158号において見つけることができ、これは参照によりここに全体として組み込まれる。

【0155】

临床上対象となる他の粒子は、炎症用(例えば、文献Lucey et al. (1996) Clin Microbiol. Rev. 9:532-62)、癌用(例えば、Sidransky (2002) Nat. Rev. Cancer 2: 210-219; Etzioni et al. (2003) Nat. Rev. Cancer 3:243- 52)またはアルツハイマー病用(例えば、Golde (2003) J. Clin. Invest. 111 :11-18)のバイオマーカーである。 10

【0156】

一実施形態では、幾つかの粒子のタイプが、同じサンプル中で検出し、弁別可能である。本発明の応用に特に対象となる粒子の組合せの例は、感染物質/その抗体、感染物質/核酸/毒素、癌細胞/異常(dysregulated)蛋白質、mRNA/対応する蛋白質転写産物、遺伝子(DNA)/メッセージ(RNA)、遺伝子(DNA)/蛋白質、ウイルス/毒素、バクテリア/毒素、酵素/基質、酵素/生成物、などである。

【0157】

幾つかの実施形態では、粒子パネル(panel)は、その存在、不在及び/又は濃度は、ある条件または一群の条件に関連しているものであり、本発明のシステムによって分析可能である。 20

【0158】

ここで説明した方法は、複合粒子を含むサンプル中で、少なくとも1つの粒子を単独で弁別可能とするものである。粒子の増幅は必要でない。複合粒子は、微粒子、核酸(例えば、単鎖の、二重鎖のDNA、RNA、およびこれらのハイブリッド)、蛋白質(例えば、ペプチド、ポリペプチド、蛋白質類)、有機および無機の分子(例えば、代謝産物、サイトカイン、ホルモン、神経伝達物質など)、有機体(例えば、ウイルス、細胞)などである。

【0159】

これに関して、複合粒子を含むサンプルは、複数の微粒子、複数の核酸粒子、複数の蛋白質粒子、複数の有機及び/又は無機分子の粒子、複数の細胞及び/又はウイルス、またはこれらの種々の組合せなどである。 30

【0160】

こうして、サンプル中の、(i)核酸、微粒子、有機および無機の分子、または蛋白質、(ii)核酸と微粒子、(iii)核酸と蛋白質、(iv)蛋白質と微粒子、(v)核酸と有機および無機の分子、(vi)核酸、微粒子、蛋白質および上記の組合せを含む任意の粒子が、細胞/ウイルスと弁別可能である。

【0161】

さらに上記粒子に加えて、複合体を含む粒子は、例えば、ラベルとハイブリッド化(hybridized)した核酸、抗体-抗原複合体、リガンド-レセプタ複合体、酵素-基質複合体、蛋白質-核酸複合体であり、これらの方法を用いて弁別可能である。 40

【0162】

(単一粒子分析器)

図3に示すように、本発明の一実施形態の分析器は、全体を参照符号10で示している。分析器10は、2つの連続波電磁放射源12と、ミラー14と、レンズ16と、毛细管(capillary)フローセル18と、2つの顕微鏡対物レンズ20と、2つのアパーチャ22と、2つの検出器レンズ24と、2つの検出器フィルタ26と、2つのシングルフォトン検出器28と、検出器と動作可能に接続されたプロセッサ30とを含む。

【0163】

動作の際、電磁放射源 1 2 は、これらのビーム 3 2 , 3 4 がミラー 1 4 の前側表面 3 6 で反射するように整列している。レンズ 1 6 は、ビーム 3 2 , 3 4 を、毛細管フローセル 1 8 における 2 つの別個の取り調べ(interrogation)空間(例えば、図 4 に示すような取り調べ空間 3 8 , 4 0)の中に集束させる。顕微鏡対物レンズ 2 0 は、サンプル粒子からの光を集めて、ビーム 3 2 , 3 4 の像をアパーチャ 2 2 上に形成する。

【0164】

アパーチャ 2 2 は、毛細管フローセル 1 8 の壁からの散乱を阻止する。検出器レンズ 2 4 は、アパーチャ 2 2 を通過した光を集めて、検出器フィルタ 2 6 を通過した後、光を検出器 2 8 の有効エリア上に結像する。検出器フィルタ 2 6 は、ノイズ信号(例えば、散乱光、周囲光)を最小化し、粒子からの光信号を最大化するのを促進する。プロセッサ 3 0 は、ここで説明する方法に従って、粒子からの光信号を処理する。一実施形態では、顕微鏡対物レンズ 2 0 は、高い開口数の顕微鏡対物レンズである。

【0165】

本発明の分析器の毛細管フローセル 1 8 の一実施形態は、図 4 に示す。図 4 に示すように、連続波電磁放射源 1 2 (図 3)からの 2 つのビーム 3 2 , 3 4 は、予め定めた距離(例えば、約 100 μm)だけ離れたターゲット上に光学的に集光される。ビーム 3 2 , 3 4 は、サンプルが充填された毛細管フローセル 1 8 の長さに対して垂直である。ビーム 3 2 , 3 4 は、特定の検出ラベルを励起するように選択された予め定めた波長で動作する。

【0166】

分析器 10 (図 3)の複数の取り調べ空間 3 8 , 4 0 は、個々のビーム 3 2 , 3 4 の直径、及び/又は選択した個々のビーム 3 2 , 3 4 の切片(segment)によってそれぞれ決定される。取り調べ空間 3 8 , 4 0 は、適切なサンプル濃度で、それぞれの観測期間中に 1 つの粒子だけが各取り調べ空間内に存在するように、それぞれ設定される。ビーム 3 2 , 3 4 は、本発明の範囲から逸脱しないように、別の直径を有してもよいが、一実施形態では、各ビームは約 5 μm の直径を有する。

【0167】

サンプルには、推進力が印加される。一実施形態では、推進力は圧力である。幾つかの実施形態では、推進力は、粒子を電気泳動的に移動するためにサンプルに印加される電界である。幾つかの実施形態では、推進力、例えば、圧力および電界の組合せが用いられる。電気泳動条件下で、同程度の電荷および質量の粒子は、ほぼ同じ速度でセル 1 8 の中を移動する。

【0168】

粒子がビーム 3 2 , 3 4 を通過する際、各蛍光粒子が 1 つの光子励起によって励起される。1 秒より短い時間で、励起された粒子は緩和し、検出可能な光を発生する。励起-発光サイクルは、取り調べ空間 3 8 または 4 0 を通過する際、分析器 10 (図 3)が各粒子につき数万個の光子を検出できるように、ビームを通過するのに要する長さで、各粒子ごとに何回も繰り返される。

【0169】

蛍光粒子によって発生した光子は、粒子(または分子複合体)が 1 つの検出器の取り調べ空間から第 2 検出器の取り調べ空間へ通過する時間を示す時間遅延を伴って、両方の検出器 2 6 (図 3)に記録される。

【0170】

光子強度は、検出器 2 6 によって記録される。検出器 2 6 で検出された信号は、自由に選択可能な時間チャンネル幅を持つ、均等かつ任意の時間セグメントに分割される。各セグメントに含まれる信号の数が確定する。統計的分析の 1 つまたは幾つかの組合せが、粒子の存在について評価される。こうして、粒子が、確率論的な背景ノイズから弁別される。

【0171】

本発明の分析器 5 0 の共焦点配置は、図 5 に示している。2 つの連続波電磁放射源 1 2 からのビーム 3 2 , 3 4 は、単一の顕微鏡対物レンズ 5 2 によって結合され、毛細管フロ

10

20

30

40

50

ーセル 18 の内部に、2 つの取り調べ空間（例えば、図 4 に示す取り調べ空間 38, 40）を形成する。

【0172】

レーザ光を反射して、蛍光を通過させるダイクロイックミラー 54 が、蛍光をレーザ光から分離するために用いられる。検出器 26 の前方にある追加のフィルタ 56 は、検出器での非蛍光を除去している。

【0173】

（推進力）

粒子は、推進力によって取り調べ空間の中を移動する。幾つかの実施形態では、粒子を移動させるための推進力は、圧力である。幾つかの実施形態では、圧力は、ポンプ、エア圧力源、真空源、遠心分離機、またはこれらの組合せによって供給される。幾つかの実施形態では、圧力は、ポンプによって供給される。幾つかの実施形態では、推進力は、電気運動力である。磁気力（例えば、磁気粒子の運動を制御するため）または光学力を使用してもよい。力の組合せを用いてもよい。

【0174】

（圧力）

例えば、ポンピングを用いて粒子を移動する場合、2 つの取り調べ空間での粒子観測の間の時間遅延は、均等で予測可能なものであり、即ち、時間オフセットは予め決定でき、粒子をノイズから弁別するのに役立つ。他の推進力、例えば、電気泳動を用いた場合、オフセットを予測するのはより困難である。サンプル中の複数の種は、多様な速度で移動するようになるためであり、これらは電気泳動移動度によって決定される。幾つかの実施形態では、圧力は、ポンプを用いてサンプルを移動するために供給される。

【0175】

適切なポンプは、先行技術で知られており、例えば、HPLC 等の応用に、サイベックス社(Sciex, Inc.)によって製作されたものである。より少量をポンピングするために（例えば、サンプル濃度が制限されない場合）、米国特許第 5094594 号、第 5730187 号、第 6033628 号、第 6533553 号などに記載されたマイクロ流体ポンプが使用でき、これらは、ナノリットルまたはピコリットルの範囲の流体容積をポンプでできる装置を開示している。好ましくは、サンプルと接触するポンプ内部の材料全部が、高い不活性材料、例えば、ポリエーテルエーテルケトン（PEEK）、溶融シリカ、サファイアなどで作成される。

【0176】

標準ポンプには種々のサイズがあり、適当なサイズのものが、予想されるサンプルサイズおよびフロー要件に適合するように選択できる。幾つかの実施形態では、サンプル分析用およびシステムの流水洗浄用に、別個のポンプが用いられる。分析ポンプは、例えば、約 0.000001 mL ~ 約 10 mL、または、約 0.001 mL ~ 約 1 mL、または、約 0.01 mL ~ 約 0.2 mL、または、0.005、0.01、0.05、0.1 もしくは 0.5 mL の容量を有してもよい。洗浄ポンプは、分析ポンプより大きな容量のものでもよく、例えば、約 0.01 mL ~ 約 20 mL、または、約 0.1 mL ~ 約 10 mL、または、約 0.1 mL ~ 約 2 mL、または、0.05、0.1、0.5、1、5 もしくは 10 mL の容量のものである。

【0177】

これらのポンプサイズは、例示に過ぎず、当業者は、応用、サンプルサイズ、ポンプすべき流体の粘度、配管の寸法、フローレート、温度、およびこの分野で周知の他の要因に従ってポンプサイズが選択できることは理解するであろう。幾つかの実施形態では、システムのポンプは、ステップモータで駆動され、これは、マイクロプロセッサを用いて極めて正確に制御するのが容易である。

【0178】

好ましい実施形態では、洗浄および分析ポンプは、フロー方向を制御するための特別な逆止弁とともに、直列で使用される。配管は、分析ポンプが最大サンプルを引き上げる場

10

20

30

40

50

合、サンプルがポンプ自体に届かないように、設計される。これは、分析ポンプと分析毛细管との間の配管のIDおよび長さを選択することによって、達成され、配管容積が分析ポンプのストローク容量より大きくなるようにしている。

【0179】

幾つかの実施形態では、粒子およびサンプルを移動するために、エア圧力が用いられる。エア圧力源およびこれらの制御はこの分野で知られている。

【0180】

(電気運動力など)

粒子の電気運動的な移動のために電界を発生するには、高電圧電源(不図示)が、電極、例えば、プラチナ電極を用いてサンプルに接続され、例えば、1つの電極がサンプル毛细管の各端部に配置できる。約10~約1000V/cmの範囲の電圧が適切であろう。

10

【0181】

電気運動力は、他の推進力とともに組合せてもよい。例えば、追加の力は、サンプル内の全ての粒子の速度を同じ程度に変更するために使用できる。幾つかの実施形態では、追加の力は、異なるタイプの粒子間、または粒子と結合したラベルと結合していないラベルの間を区別する方法を提供する。追加の力をサンプルに印加する方法の一例は、上述のような、ポンプを用いた圧力(および真空)である。

【0182】

一実施形態では、シリンジポンプが用いられる。しかしながら、本発明の範囲を逸脱せずに、重力供給、容積移送式ポンプ、ローラ型ポンプなど何れかの制御可能な流体配給システムを用いて、圧力をサンプルに印加できる。

20

【0183】

流体フロー用の遠心力は、回転ディスク(不図示)など、取り調べ空間38, 40と動作可能に連結された構成部品(不図示)を必要とする。

【0184】

これらの構成部品は、ディスクと一体に、または装着されるモジュールとして、ディスクと接触または内蔵するように搭載して組み立て可能である。

【0185】

一実施形態では、磁界中で磁性材料を選択的に保持することによって、磁気分離が用いられる。この技術は、磁気粒子を用いてラベル付けされた非磁性ターゲットにも適用できる。この技術の1つの応用では、ターゲット材料を磁気粒子に付着することによって、粒子がラベル付けされる。付着は、一般に、共役のための官能基を提供する粒子上のコーティングと共役である特定の結合パートナーとの粒子の会合による。

30

【0186】

当業者は、下記実施例で説明するように、こうした磁気粒子共役がこの分野で周知であると認識するであろう。キットでは、ニューイングランド・バイオラボ(New England Biolabs)(バーバリー、マサチューセッツ州)、チアゲン(Qiagen)(バレンシア、カリフォルニア州)から入手可能である。

【0187】

対象となる材料、あるいはターゲットは、磁気タグと連結して、流体中に浮遊しており、そして、取り調べ空間38, 40へ導入するためにチャンバ(不図示)に供給される。チャンバを横断して供給される磁気傾斜の存在下で、磁氣的にラベル付与されたターゲットは、チャンバ内で保持され、チャンバがマトリクスを含む場合は、マトリクスと会合する。

40

【0188】

磁気ラベルを有していない材料は、チャンバを通過する。そして、保持された材料は、磁界の強さを変えたり除去することによって、溶出される。磁界は、永久磁石または電磁石によって供給可能である。所望のターゲットサンプル材料に関する選択性は、磁気粒子と共役である特定の結合パートナーによって提供される。磁界が印加されるチャンバには、適切な磁化率の材料からなるマトリクスがしばしば設けられ、高い磁界傾斜を、チャン

50

バ内のマトリクス表面に近接した部分に局所的に誘導する。

【0189】

他の実施形態では、サンプルは、電気泳動サンプルチャンネルにサンプルを配置するなどによって、電気泳動にかけられる。サンプル流体内部での粒子の移動度は、粒子の特性とともに変化する。電気運動力によって生成される移動速度は、単一粒子の相対電荷および質量によって決定される。粒子の移動は、電荷 / 質量タグなど、粒子に付着したラベルのタイプによって変化する。

【0190】

他の実施形態では、2つ又はそれ以上の粒子が存在する場合、少なくとも1つの粒子が少なくとも2つの取り調べ空間38, 40の中を、他の粒子と反対の方向に移動することがある。従って、それぞれ検出可能にラベル付けされた粒子の電気泳動移動度が決定される。それぞれ検出可能にラベル付けされた粒子の電気泳動速度の決定に基づいて、複数の粒子を含むサンプル中の単一粒子が弁別可能になる。免疫学的検定または核酸ハイブリッド形成ラベリング技術との組合せでほぼ大部分の電気泳動分離技術が、本発明の場面で使用に適合し得る。

10

【0191】

粒子間の弁別するために、電気運動力は、他の推進力、例えば、圧力、真空、表面張力、重力および遠心力などと組合せ可能である。一実施形態では、2つ又はそれ以上の粒子が存在する場合、これらの力は、これらの異なる作用がサンプル中の別々の粒子に加わるように選択でき、その結果、少なくとも1つの粒子が、他の粒子と異なる速度で、少なくとも2つの取り調べ空間38, 40の中を移動するようになる。

20

【0192】

粒子の速度は、流体フローと調和することができ、あるいは、少なくとも1つの粒子が流体フローとは逆平行に移動することができる。他の実施形態では、少なくとも1つの粒子が、流体フロー速度を超える逆平行速度を持つ。他の実施形態では、少なくとも1つの粒子が、流体フローに対して垂直な動きとなる。他の実施形態では、少なくとも1つの粒子が、流体フローに対して逆平行と垂直の組合せによる動きになる。

【0193】

(EM放射源)

外的ラベルまたは粒子の内的特性が、光相互作用するラベルまたは特性、例えば、蛍光ラベルまたは光散乱ラベルなど、である本発明の実施形態では、ラベル及び / 又は粒子を照射するために、EM放射源が使用される。例えば、化学ルミネセンスラベルが用いられる他の実施形態では、必ずしも粒子の検出用のEM源を利用する必要はない。蛍光励起用のEM放射源が好ましい。

30

【0194】

図3と図5では、2つの連続波電磁放射源12を示したが、本発明の範囲から逸脱せずに、1つだけの連続波電磁放射源を使用してもよいと理解すべきである。さらに、1つだけの連続波電磁放射源12を使用した場合、供給源は、電磁放射を、任意の数の別々の取り調べ空間に向けてるように、任意の数のビームに分けてもよい。

【0195】

図3に示した実施形態では、各取り調べ空間38, 40は、別々の連続波電磁放射源12を有する。図3と図5では、2つの供給源12を示したが、本発明の範囲から逸脱せずに、任意の数の供給源を使用してもよい。幾つかの場合は、全ての連続波電磁放射源が同じ波長の電磁放射を発生する。他の実施形態では、別々の供給源は、異なる波長の電磁放射を発生する。別々の供給源の構成および取り調べ空間が設計可能である。例えば、一実施形態では、異なる発光波長を持つ2つ又はそれ以上の連続波電磁放射源は、同じ取り調べ空間を照射するために使用できる。この構成は、複数の取り調べ空間に拡張可能である。他の実施形態では、各取り調べ空間は、異なる波長の電磁放射を用いて照射される。当業者は、照射波長および取り調べ空間の多くの異なる組合せが、本発明の分析器とともに使用できると理解すべきである。

40

50

【0196】

本発明の範囲から逸脱せずに、他の供給源が使用でき、一実施形態では、供給源12は、約200と約1000nmの間の波長を発生する連続波レーザである。こうした供給源12は、小型で耐久性があり、比較的安価であるという利点がある。さらに、これらは、他の抗原より大きな蛍光信号を発生する能力を有する。

【0197】

適切な連続波電磁放射源の具体例は、以下に限定されないが、アルゴン、クリプトン、ヘリウム-ネオン、ヘリウム-カドミウム型のレーザ、そして、波長可変ダイオードレーザ（赤から赤外領域）であり、いずれも周波数の2倍波の可能性を持つ。

【0198】

レーザは、これらの照射を中断するための電子的または機械的な装置、例えば、シャッタなどの付属品なしで、連続照射を提供する。

【0199】

LEDは、他の低価格で高い信頼性の照射源である。高輝度LEDおよび高い吸収断面および量子収量を持つ染料での近年の進歩は、LEDの単一粒子検出への応用可能性を支援する。

【0200】

こうしたレーザは、単独でまたは他の光源、例えば、水銀アークランプ、元素アークランプ、ハロゲンランプ、アーク放電、プラズマ放電、発光ダイオード、またはこれらの組合せ、との組合せで利用できる。

【0201】

最適なレーザ強度は、単一染料の光ブリーチング(bleaching)特性および取り調べ空間を横切るのに必要な時間長さ（粒子の速度、取り調べ空間の間の距離、取り調べ空間の間のサイズなど）に依存する。最大信号を得るには、染料の高い割合で光ブリーチングを生じさせない最も高い強度で、サンプルを照射するのが望ましい。好ましい強度は、粒子が最後の取り調べ空間を横切る時間までに、染料のわずか5%しかブリーチングされないようにしたものである。

【0202】

一実施形態では、取り調べ空間38, 40は、対応するビーム32, 34の断面積および検出器の視野内のビーム切片によって決定される。本発明の一実施形態では、取り調べ空間38, 40は、0.02pLと300pLの間である。本発明の一実施形態では、取り調べ空間38, 40は、0.02pLと50pLの間である。他の実施形態では、取り調べ空間38, 40は、約0.1~約25pLの範囲にある。好ましくは、取り調べ空間は、約1pLである。当業者は、取り調べ空間38, 40は、分析器の最大性能のための選択できると理解すべきである。

【0203】

背景ノイズを最小化するために、極めて小さい取り調べ空間を示したが、大きな取り調べ空間は、低濃度サンプルが妥当な時間で分析できるという利点を有する。

【0204】

本発明の一実施形態では、取り調べ空間は、約1000fM~約1ゼプトモル(zM)の範囲の濃度で粒子の検出を可能するのに十分な大きさである。本発明の一実施形態では、取り調べ空間は、約1000fM~約1アトモル(aM)の範囲の濃度で粒子の検出を可能するのに十分な大きさである。本発明の一実施形態では、取り調べ空間は、約10fM~約1アトモル(aM)の範囲の濃度で粒子の検出を可能するのに十分な大きさである。

【0205】

多くの場合、大きな取り調べ空間は、追加の予備濃縮の装置または技術を使用せずに、約1fM未満の濃度で粒子の検出を可能する。当業者は、多くの適切な取り調べ空間サイズは、検出すべき粒子の輝度、背景ノイズのレベル、および分析すべきサンプルの濃度に依存することを認識するであろう。

10

20

30

40

50

【0206】

取り調べ空間38, 40のサイズは、分析器の光学系を調整することによって、制限できる。一実施形態では、ビーム32, 34の直径は、取り調べ空間38, 40の容積を変えるように調整可能である。他の実施形態では、検出器26の視野が可変である。こうして供給源12および検出器26は、単一粒子が取り調べ空間38, 40内部で照射され、検出されるように調整可能である。

【0207】

他の実施形態では、検出器26の視野を決定するスリット22(図3)の幅が可変である。この構成は、取り調べ空間をほぼリアルタイムで変更することを可能とし、多かれ少かれ濃度調整したサンプルを補償して、2つまたはそれ以上の粒子が同時に取り調べ空間内にあるという低い確率を確保している。

10

【0208】

取り調べ空間への物理的制限は、固体壁によってもたらされる。一実施形態では、サンプル流体が毛細管内に含まれる場合、壁は、1つ又はそれ以上のセル18壁である。一実施形態では、セル18は、ガラス製であり、それ以外に、約200~約1000nm以上の範囲の光に対して透明な他の物質、例えば、石英(quartz)、溶融シリカ、および有機材料、例えば、テフロン(登録商標)、ナイロン、プラスチック、例えば、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリエチレン、またはこれらの組合せが、本発明の範囲を逸脱せずに使用できる。

20

【0209】

他の断面形状(例えば、矩形、円柱)が、本発明の範囲を逸脱せずに使用できるが、一実施形態では、毛細管フローセル18は、四角断面を有する。他の実施形態では、取り調べ空間は、チップ(不図示)の中にエッチングされたチャネル(不図示)によって少なくとも部分的に規定してもよい。

【0210】

取り調べ空間38, 40は、流体によって連結される。一実施形態では、流体は、水性(aqueous)である。他の実施形態では、流体は、非水性または、水性流体と非水性流体の組合せである。さらに、流体は、pH、イオン組成を調整するための薬剤、または篩分け(sieving)剤、例えば、可溶性のマクロ粒子またはポリマーまたはゲルなど、を含んでもよい。

30

【0211】

流体連結を一時的に遮断するために、弁または他の装置が取り調べ空間の間に存在してもよいことは想定される。一時的に遮断された取り調べ空間は、流体によって連結されると考えられる。本発明の他の実施形態では、取り調べ空間38, 40は、希釈液体積内でサンプル材料の層状フロー、いわゆるシース(sheath)フローのサイズによって制約される。

【0212】

取り調べ空間38, 40は、シースフロー単独で、または照射源の寸法または検出器の視野との組合せによって規定できる。シースフローは、下記に列挙したような数多く方法で構成できる。

40

【0213】

1. サンプル材料は、同心状の層流(laminar flow)において内側材料であり、希釈液体積は外側にある。

【0214】

2. 希釈液体積は、サンプル体積の一方の側にある。

【0215】

3. 希釈液体積は、サンプル材料の2つの側にある。

【0216】

4. 希釈液体積は、サンプル材料の複数の側にあるが、サンプル材料を完全には包囲していない。

50

【0217】

5. 希釈液体積は、サンプル材料を完全に包囲する。

【0218】

6. 希釈液体積は、サンプル材料を同心状に完全に包囲する。

【0219】

7. サンプル材料は、不連続な液滴中での内側材料であり、希釈液体積は、サンプル材料の各液滴を完全に包囲する。

【0220】

当業者は、ある場合には、分析器が、3つ、4つ、5つ、6つまたはそれ以上の別々の取り調べ空間を含むであろうことは認識するであろう。

10

【0221】

(検出器)

一実施形態では、光(例えば、紫外、可視または赤外の範囲の光)は、検出される電磁放射である。検出器26は、例えば、蛍光粒子からのフォトンバーストの振幅および持続期間を捕捉し、これらを電子信号に変換することが可能である。CCDカメラ、ビデオ入力モジュールカメラ、ストリーク(Streak)カメラなどの検出装置が、切れ目ない信号を伴う像を生成するために使用できる。

【0222】

他の実施形態では、連続信号を生成する、例えば、ボロメータ、フォトダイオード、フォトダイオードアレイ、アバランシェフォトダイオード、光電子増倍管などの装置が使用できる。上述した検出器の他の組合せも使用できる。一実施形態では、アバランシェフォトダイオードが、フォトン検出用に用いられる。

20

【0223】

取り調べ空間38, 40と対応する検出器26の間に特定の光学系を用いて、発生電磁放射についての幾つかの別々の特性、発光波長、発光強度、バーストサイズ、バースト期間、および蛍光偏光などが検出できる。

【0224】

当業者は、各取り調べ空間38, 40では、1つ又はそれ以上の検出器26が構成可能であり、そして、単一の検出器26は、上記した発生電磁放射の特性の何れかを検出するように構成可能であると理解すべきである。

30

【0225】

いったん、粒子がラベル付けされて検出可能になり(または、粒子が、固有の特性を検出可能なように処理する場合)、本発明の範囲を逸脱せずに、この分野で知られた何れか適切な検出機構が使用でき、例えば、連続信号を生成する、CCDカメラ、ビデオ入力モジュールカメラ、ストリーク(Streak)カメラ、ボロメータ、フォトダイオード、フォトダイオードアレイ、アバランシェフォトダイオード、光電子増倍管、およびこれらの組合せが使用できる。

【0226】

一実施形態では、アバランシェフォトダイオードが、フォトン検出用に用いられる。電磁放射の異なる特性、例えば、発光波長、発光強度、バーストサイズ、バースト期間、蛍光偏光、およびこれらの組合せなど、が検出できる。

40

【0227】

(計数および弁別)

ここで説明する方法は、粒子が取り調べ空間を1つずつ通過する際、粒子の数え上げを可能にする。サンプルの濃度は、設定した時間長さで、計数した粒子の数および取り調べ空間を通過するサンプルの体積から決定できる。

【0228】

取り調べ空間がサンプル流の断面全体を包含している場合、設定した時間長さで、計数した粒子の数および取り調べ空間を通過するサンプルの体積だけが、サンプルの濃度を計算するために必要である。

50

【0229】

取り調べ空間がサンプル流より小さい場合、粒子の濃度は、標準濃度の制御サンプルを用いて生成した標準曲線からの補間により決定できる。

【0230】

他の実施形態では、粒子の濃度は、測定した粒子を内部粒子標準と比較することによって、決定できる。サンプル希釈を知れば、開始サンプルでの粒子の濃度を計算できる。

【0231】

検出した粒子からのデータ分析は、相互相関を含む。一実施形態では、フォトン信号は、直接に相互相関がとられる。この場合、少なくとも2つの取り調べ空間からサンプルにより発光した蛍光信号（フォトン）は、少なくとも2つの検出器によって検出される。

10

【0232】

検出器で個々に検出された信号は、それぞれ予め選択した時間長さ（ビン幅(bin width)）を有する任意の時間セグメント（ビン(bin)）に分割される。本発明の範囲から逸脱せずに、他のビン幅を用いてもよいが、一実施形態では、ビン幅は、約10 μ s ~ 約5 msの範囲に選択される。好ましいビン幅は、1 msである。

【0233】

各セグメントに含まれる信号の数は、確定する。第1検出ユニットから各時間セグメントに関して、第2検出ユニットの選択した範囲のセグメントでの相互相関分析が行われる。相互相関分析の結果についての少なくとも1つの統計的分析が行われ、及び/又は、該分析は閾値分析にかけられる。前記統計的分析または幾つかの統計的分析の少なくとも1つの組合せが、粒子の存在について評価される。こうして、少なくとも2つの検出器チャネルでの相関信号の存在に基づいて、粒子が、確率論的および背景のノイズから弁別される。

20

【0234】

一実施形態では、検出した信号は、最初、ノイズレベルを決定するために分析され、データの相互相関に先だって、信号は、閾値を超えて選択される。一実施形態では、ノイズレベルは、多数のビンに渡って信号を平均化することによって、決定される。他の実施形態では、背景レベルは、平均ノイズレベル、または二乗平均平方根(root-mean-square)ノイズから決定される。他の場合、典型的ノイズ値または統計的値が選ばれる。多くの場合、ノイズは、ポアソン分布に従うと予想される。

30

【0235】

閾値は、真の信号（ピーク、こぶ(bump)、粒子）をノイズから弁別するために決定される。閾値を選択する際、ランダムノイズから誤りの正の信号の数が最小化され、拒否される真の信号の数が最小化されるように、注意しなければならない。閾値を選択する方法は、ノイズレベルを超える固定した値を決定することと、ノイズ信号の分布に基づいて閾値を計算することを含む。

【0236】

一実施形態では、閾値は、背景レベルを超えた固定した数の標準偏差で設定される。ノイズのポアソン分布を仮定すると、この方法を用いて、実験の時間経過に渡って誤りの正の信号の数を推定できる。

40

【0237】

そして、2つの検出器から識別される信号について相互相関分析が行われる。相互相関をとった信号の時間オフセットは、対応する検出器の間の推移を提供し、従って、検出器間の距離に基づいて、粒子の速度、例えば、電気泳動速度が決定される。

【0238】

幾つかの場合、該時間オフセットが既知の時間オフセットに対応することによって、粒子は検出される。他の場合、個数(population)分布により決定される未知のオフセットによって、粒子は検出される。

【0239】

他の実施形態では、取り調べ空間の相対配置または検出される波長で区別される2つ以

50

上の検出器、例えば、3個、4個、5個、6個または6個以上の検出器からのデータについて相互相関分析が実施可能である。この場合、別個である検出器の組合せからのデータについて、相互相関分析が実施可能である。例えば、別々の波長発光(R, G, B)をそれぞれ検出する3個の検出器が、それぞれ2つの取り調べ空間にある場合、R1はR2と相互相関がとられ、G1はG2と相互相関がとられ、B1はB2と相互相関がとられ、単一検出器によって検出される波長発光を持つ粒子に関して時間オフセットが得られる。

【0240】

相互相関分析の他の組合せも、例えば、R1はG1と相互相関がとられ、R1はB1と相互相関がとられ、G1はB1と相互相関がとられるという、オーバーラップ設定が実施可能である。これらの相互相関分析の結果、二重ラベル付けした粒子の周波数を示すであろう。相互相関分析の異なる組合せは、速度およびラベリング(色)に基づいて粒子を弁別するために、相互に使用できる。さらに、複数ペアの相互相関分析を用いると、混合物内の単一粒子の特性についてより正確な決定が得られる。

10

【0241】

他の実施形態では、検出器からのデータについて、別個である場所及び/又は波長の何れの組合せについて、相互相関分析が行われるように、分析方法が採用される。

【0242】

こうして当業者は、粒子(染料タグなど)からの電磁放射、または粒子(電荷/質量または磁気タグなど)の移動度を変更できるラベルの組合せを採用することによって、複数の粒子が混合物内で識別可能であることを認識するであろう。

20

【0243】

ここで説明した方法は、複数の粒子を含むサンプル中で、少なくとも1つの粒子を単独で弁別可能にする。複数の粒子は、微粒子、核酸(例えば、単鎖の、二重鎖のDNA、RNA、およびこれらのハイブリッド)、蛋白質(例えば、ペプチド、ポリペプチド、蛋白質類)、有機および無機の分子(例えば、代謝産物、サイトカイン、ホルモン、神経伝達物質、化学または生物の反応の生成物など)、有機体(例えば、ウイルス、細胞)などである。

【0244】

これに関して、複合粒子を含むサンプルは、複数の微粒子、複数の核酸粒子、複数の蛋白質粒子、複数の有機及び/又は無機分子の粒子、複数の細胞及び/又はウイルス、またはこれらの種々の組合せなどである。

30

【0245】

こうして、サンプル中の、(i)核酸、微粒子、有機/無機の分子、または蛋白質、(ii)核酸と微粒子、(iii)核酸と蛋白質、(iv)蛋白質と微粒子、(v)蛋白質と有機/無機の分子、(vi)核酸と有機/無機の分子、(vii)核酸、微粒子、蛋白質および上記の組合せを含む任意の粒子が、細胞/ウイルスと弁別可能である。

【0246】

該方法は、サンプル中のターゲット粒子を増幅する必要性を排除する。

【0247】

上述した粒子に加えて、複合体を含む粒子は、例えば、ラベルとハイブリッド化(hybridized)した核酸、抗体-抗原複合体、リガンド-レセプタ複合体、酵素-基質複合体、蛋白質-核酸複合体であり、これらの方法を用いて弁別可能である。

40

【0248】

幾つかの実施形態では、本発明の分析器または分析器システムは、検体(analyte)、例えば、1ナノモル、1ピコモル、1フェムトモル、1アトモルまたは1ゼプトモル未満のレベルのバイオマーカー、を検出できる。

【0249】

幾つかの実施形態では、分析器または分析器システムは、検体または複数の検体、例えば、バイオマーカー、の濃度変化を検出でき、例えば、バイオマーカーが、サンプル中に1ナノモル、1ピコモル、1フェムトモル、1アトモルまたは1ゼプトモル未満の濃度で

50

存在して、各サンプルのサイズが、約 100、50、40、30、20、10、5、2、1、0.1、0.01、0.001、0.0001 μ l 未満である場合、一方のサンプルから他方のサンプルへ、約、0.1、1、2、5、10、20、30、40、50、60 または 80 % 未満の濃度変化を検出できる。

【0250】

幾つかの実施形態では、分析器または分析器システムは、検体が約 1 ピコモル未満の濃度で存在し、各サンプルのサイズが約 50 μ l 未満である場合、第 1 サンプルから第 2 サンプルへ、約 20 % 未満の濃度変化を検出できる。

【0251】

幾つかの実施形態では、分析器または分析器システムは、検体が約 100 フェムトモル未満の濃度で存在し、各サンプルのサイズが約 50 μ l 未満である場合、第 1 サンプルから第 2 サンプルへ、約 20 % 未満の濃度変化を検出できる。

10

【0252】

幾つかの実施形態では、分析器または分析器システムは、検体が約 50 フェムトモル未満の濃度で存在し、各サンプルのサイズが約 50 μ l 未満である場合、第 1 サンプルから第 2 サンプルへ、約 20 % 未満の濃度変化を検出できる。

【0253】

幾つかの実施形態では、分析器または分析器システムは、検体が約 5 フェムトモル未満の濃度で存在し、各サンプルのサイズが約 50 μ l 未満である場合、第 1 サンプルから第 2 サンプルへ、約 20 % 未満の濃度変化を検出できる。

20

【0254】

幾つかの実施形態では、分析器または分析器システムは、検体が約 5 フェムトモル未満の濃度で存在し、各サンプルのサイズが約 5 μ l 未満である場合、第 1 サンプルから第 2 サンプルへ、約 20 % 未満の濃度変化を検出できる。

【0255】

幾つかの実施形態では、分析器または分析器システムは、検体が約 1 フェムトモル未満の濃度で存在し、各サンプルのサイズが約 5 μ l 未満である場合、第 1 サンプルから第 2 サンプルへ、約 20 % 未満の濃度変化を検出できる。

【0256】

(分析器システム)

30

ここで説明する単一粒子分析器に加えて、本発明は、単一粒子分析器に加えて、サンプリングシステムと、サンプル回収システムと、サンプル調製システムと、フローレートなどの分析パラメータを制御するためのコンピュータと、及び/又は、コンピュータ及び/又は生データの分析およびこの分析結果を報告するための報告装置を含むデータ分析および報告システムとを含み得る分析器システムも提供する。

【0257】

幾つかの実施形態では、分析器システムは、複数のサンプルを自動的にサンプリングして、サンプル容器と第 1 取り調べ空間との間の流体通路を提供可能であるサンプリングシステムと、単一分子を検出可能である分析器とを含み、該分析器は、(i) 電磁放射を発生する電磁放射源と、(ii) 電磁放射源から発生した電磁放射を受けるように位置決めされた前記第 1 取り調べ空間と、(iv) 第 1 取り調べ空間と動作可能に連結して、粒子の第 1 電磁放射特性を測定する第 1 電磁放射検出器とを含む。

40

【0258】

幾つかの実施形態では、該分析器は、上述したような単一粒子を検出能力を持つ第 2 取り調べウインドウをさらに含む。

【0259】

(サンプリングシステム)

幾つかの実施形態では、本発明の分析器システムは、サンプルの部分標本(aliquot)を、分析用の単一粒子分析器の中に導入するためのサンプリングシステムを含む。サンプルを導入できる任意の機構が使用できる。サンプルは、液体をチューブに押し込むように、

50

ポンプからの真空またはサンプルへ印加される圧力を用いて、あるいはサンプルをサンプルチューブに導入するように機能する他の任意の機構を用いて、引き上げ可能である。

【0260】

一般に、必ずしも必要でないが、サンプリングシステムは、既知のサンプル量のサンプルを、単一粒子分析器の中に導入する。粒子の存在または不在あるいは粒子が検出される幾つかの実施形態では、サンプルサイズの正確な知識は重大でない。

【0261】

好ましい実施形態では、サンプリングシステムは、単一のサンプルまたは複数のサンプルについての自動化したサンプリングを提供する。

【0262】

既知の量のサンプルがシステムに導入される実施形態では、サンプリングシステムは、約0.0001、0.001、0.01、0.1、1、2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、500、1000、1500または2000 μ lより多い分析用サンプルを提供する。

【0263】

幾つかの実施形態では、サンプリングシステムは、約2000、1000、500、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、5、2、1、0.1、0.01、0.001 μ lより少ない分析用サンプルを提供する。

【0264】

幾つかの実施形態では、サンプリングシステムは、約0.01~1500 μ l、約0.1~1000 μ l、約1~500 μ l、約1~100 μ l、約1~50 μ l、または約1~20 μ lの分析用サンプルを提供する。

【0265】

幾つかの実施形態では、サンプリングシステムは、約5 μ l~200 μ l、約5 μ l~100 μ l、または約5 μ l~50 μ lの分析用サンプルを提供する。

【0266】

幾つかの実施形態では、サンプリングシステムは、約10 μ l~200 μ l、約10 μ l~100 μ l、または約10 μ l~50 μ lの分析用サンプルを提供する。

【0267】

幾つかの実施形態では、サンプリングシステムは、約0.5 μ l~約50 μ lの分析用サンプルを提供する。

【0268】

幾つかの実施形態では、サンプリングシステムは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、150、200、500、1000または2000 μ lの分析用サンプルを提供する。

【0269】

幾つかの実施形態では、サンプリングシステムは、約50 μ lの分析用サンプルを提供する。幾つかの実施形態では、サンプリングシステムは、約25 μ lの分析用サンプルを提供する。幾つかの実施形態では、サンプリングシステムは、約10 μ lの分析用サンプルを提供する。

【0270】

サンプリングシステムは、実際に分析されるより大きいサンプルサイズを提供してもよい。例えば、サンプリングシステムは、約25 μ l、約20 μ l、約15 μ l、または約10 μ lを引き上げて、そのうち約1~約5 μ lだけが分析される。

【0271】

幾つかの実施形態では、サンプリングシステムは、サンプルごとに変化し得るサンプルサイズを提供する。これらの実施形態では、サンプルサイズは、ここで説明したサンプルサイズのいずれか1つであってもよく、必要ならば、サンプルあるいはサンプルセットごとに変えてもよい。

10

20

30

40

50

【0272】

サンプリングシステムのサンプル量の精度およびサンプル間の量の精度は、分析に必要な、手元にある。幾つかの実施形態では、サンプリング量の精度は、使用するポンプによって決定され、典型的には、サンプル量の約50、40、30、20、10、5、4、3、2、1、0.5、0.1、0.05、または0.01%未満のCV値によって表される。

【0273】

幾つかの実施形態では、サンプリングシステムのサンプル間の精度は、約50、40、30、20、10、5、4、3、2、1、0.5、0.1、0.05、または0.01%未満のCV値によって表される。

10

【0274】

幾つかの実施形態では、サンプリングシステムの内部分析(intra-assay)精度は、約10、5、1、0.5、または0.1%未満のCV値によって表される。

【0275】

幾つかの実施形態では、サンプリングシステムの内部分析精度は、約5%未満のCV値を示す。

【0276】

幾つかの実施形態では、サンプリングシステムの分析物間(interassay)精度は、約10、5、または1%未満のCV値によって表される。

【0277】

幾つかの実施形態では、サンプリングシステムの分析物間(interassay)精度は、約5%未満のCV値を示す。

20

【0278】

幾つかの実施形態では、サンプリングシステムは、低いサンプル残物(carryover)を提供し、サンプル間で追加の洗浄ステップを要しない点で好都合である。幾つかの実施形態では、サンプル残物は、約1、0.5、0.1、0.05、0.04、0.03、0.02、0.01、0.005、または0.001%未満である。幾つかの実施形態では、サンプル残物は、約0.02%未満である。幾つかの実施形態では、サンプル残物は、約0.01%未満である。

【0279】

幾つかの実施形態では、サンプラーは、サンプルループを提供する。これらの実施形態では、複数の粒子が配管に連続的に引き込まれ、それぞれバッファの「プラグ(plug)」によって他から分離される。サンプルは、典型的には、他の後に一回読まれ、その間では洗浄しない。洗浄は、ループの最後に1回行われる。マイクロタイター(microtiter)プレートの別々のウェルにある各プラグを回収することができる。

30

【0280】

サンプリングシステムは、標準の分析設備、例えば、96個のウェルのマイクロタイタープレートまたは、好ましくは384個のウェルプレートとともに使用するように適合可能である。

【0281】

幾つかの実施形態では、システムは、96個のウェルプレート位置決め具(positioner)と、サンプルチューブをウェル中に出し入れする機構、例えば、X、Y、Z軸に沿った運動を提供する機構とを含む。

40

【0282】

幾つかの実施形態では、サンプリングシステムは、複数のサンプリングチューブ、例えば、マイクロタイタープレート上に1列8個から「少しずつ吸う(sip)」複数のチューブを提供する。

【0283】

幾つかの実施形態では、複数のチューブからの全てのサンプルが1つの検出器で分析され、他の実施形態では、複数の単一分子検出器をサンプルチューブに連結してもよい。

50

【 0 2 8 4 】

サンプルは、サンプリングシステムによるサンプリングに先だって、プレートのウエル中のサンプルについて実施される操作を含むステップにより、調製してもよく、あるいはサンプルは分析器システム内で調製してもよく、あるいは両方の組合せでもよい。

【 0 2 8 5 】

(サンプル回収)

本発明の分析器および分析システムの実施形態の特に有用な 1 つの特徴は、サンプルを消費することなく分析できることである。これは、サンプル材料が制限されている場合、特に重要である。サンプル回収は、別の分析を行ったり、再分析するのを可能にする。サンプルサイズが制限されたり、及び / 又はサンプルを再分析する能力が望ましい応用、例えば、法医学、ドラッグ検査、臨床診断の応用へのこの特徴の利点は、当業者に明らかとなる。

10

【 0 2 8 6 】

こうして、幾つかの実施形態では、本発明の分析器システムは、さらに、分析後のサンプル回収のためのサンプル回収システムを提供する。これらの実施形態では、該システムは、機構および方法を含み、これによりサンプルは分析器に引き入れられ、分析されて、そして、例えば、同じ経路で、サンプルホルダ、例えば、サンプルチューブに戻される。

【 0 2 8 7 】

サンプルは破壊されず、他の弁や他の配管に進入しないため、汚染されないままである。さらに、サンプル経路での材料全てが高い不活性で、例えば、P E E K、溶融シリカまたはサファイアであるため、サンプル経路からの汚染がほとんどない。ステップモータ制御のポンプ (特に、分析ポンプ) の使用は、引き上げて、押し戻される体積の正確な制御を可能にする。

20

【 0 2 8 8 】

これは、洗浄パッファによる希釈もほとんどない、サンプルの完全またはほぼ完全な回収を可能にする。幾つかの実施形態では、分析後、約 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 5 %、または 9 9 . 9 % より大きいサンプルが回収される。

【 0 2 8 9 】

幾つかの実施形態では、回収したサンプルは希釈されない。幾つかの実施形態では、回収したサンプルは、約 1 . 5 倍、1 . 4 倍、1 . 3 倍、1 . 2 倍、1 . 1 倍、1 . 0 5 倍、1 . 0 1 倍、1 . 0 0 5 倍、または 1 . 0 0 1 倍未満で希釈される。

30

【 0 2 9 0 】

サンプリング及び / 又はサンプル回収のため、サンプル容器から分析器へ液体サンプルを輸送するための任意の機構が使用できる。幾つかの実施形態では、分析毛細管の入口端は、サンプル容器、例えば、テストチューブやサンプルウエルの中に浸漬したり、廃棄容器の上方で保持される、短い長さの配管、例えば、P E E K 配管を装着した。洗浄の際、前回のサンプルを装置から清掃するために、この配管は、洗浄廃棄物を捕捉する廃棄容器の上に位置決めされる。

【 0 2 9 1 】

サンプルを引き込む場合、チューブは、サンプルウエルまたはテストチューブの中に置かれる。典型的には、サンプルは、素早く引き込まれ、そして、ゆっくり押し出しながら、サンプル内の粒子を観測する。

40

【 0 2 9 2 】

代替として、幾つかの実施形態では、引き込みサイクルの少なくとも一部でサンプルはゆっくり引き込まれ、サンプルをゆっくり引き込みながら、分析してもよい。これに、サンプルの迅速な戻りと迅速な洗浄が続く。幾つかの実施形態では、サンプルは、内向き (引き込み) サイクルおよび外向き (押し出し) サイクルの両方で分析してもよく、これは、例えば、小さい希釈サンプルの計数統計を改善したり、結果などを確認できる。

【 0 2 9 3 】

50

サンプルを節約するのが望ましい場合、そこから来た同じサンプルウエルまたは他のウエルに押し戻すことができる。サンプルを節約するのが望ましくない場合、配管は廃棄容器上に位置決めされる。

【0294】

(サンプル調整システム)

サンプル調整は、分析用生サンプルを調整するために必要なステップを含む。これらのステップは、例として、遠心分離、ろ過、蒸留、クロマトグラフィー等の分離ステップ、濃縮、細胞融解、pH変更、バッファの追加、希釈液の追加、試薬の追加、加熱または冷却、ラベルの追加、ラベルの結合、照射を用いた架橋結合、結合していないラベルの分離、不活性化、及び/又は介入化合物の除去、およびサンプルを単一粒子分析器による分析用に調整するのに必要な他の何れかのステップ、の1つ又はそれ以上を含むことができる。幾つかの実施形態では、血液は、血漿または血清を分離するために処理される。追加のラベリング、結合していないラベルの除去、及び/又は希釈ステップ、血漿または血清サンプルについて行ってもよい。

10

【0295】

この分野で知られているように、例えば、ラベルが1つ又はそれ以上の粒子に追加されるサンプル調整は、同種または異種フォーマット(format)で行ってもよい。同種フォーマットでは、結合していないラベルはサンプルから除去されない。幾つかの実施形態では、対象となる粒子は、対象となる粒子と結合する、ラベル付けした抗体の追加によってラベル付けされる。

20

【0296】

異種フォーマットでは、結合していないラベル除去のため、1つ又はそれ以上のステップが追加される。幾つかの実施形態では、例えば、対象となる粒子を固定化するための捕捉抗体を用いる分離ステップも用いられる。

【0297】

こうして、幾つかの実施形態では、同種調整は、下記ステップを含む。1) 対象となる粒子を含むのが疑わしいサンプルを追加すること、2) 検出(例えば、ラベル付け)抗体を追加すること。

【0298】

幾つかの実施形態では、異種調整は、下記ステップを含む。1) 捕捉抗体を追加すること、2) 洗浄、3) 阻止、4) 対象となる粒子を含むのが疑わしいサンプルを追加すること、5) 洗浄、6) 検出(例えば、ラベル付け)抗体を追加すること、7) 洗浄、8) 結合した分子を遊離させること(方法に依存するが、中和を要することがある)。

30

【0299】

幾つかの実施形態では、分析器システムは、単一粒子分析器による分析用のサンプルを提供するのに必要な幾つかまたは全てのプロセスを実施するサンプル調整システムを含む。このシステムは、サンプル調整のための上記ステップの何れかまたは全てを行ってもよい。

【0300】

幾つかの実施形態では、サンプルは、分析器システムのサンプル調整システムによって、部分的に処理される。こうして幾つかの実施形態では、サンプルは、分析器システムの外部、例えば、遠心分離により、部分的に処理され、そして、サンプル調整システムによって、例えば、バッファ等との混合によるサンプルのラベリングのために、分析器システムの内部で部分的に処理される。

40

【0301】

幾つかの実施形態では、血液サンプルが分析器システムの外部で処理され、血清または血漿サンプルを供給し、これは分析器システムに導入され、さらにサンプル調整システムによって処理され、対象となる粒子をラベル付けし、必要に応じて、結合していないラベルを除去する。

【0302】

50

幾つかの実施形態では、分析器システムは、分析すべきサンプルの完全な調整、例えば、血液サンプル、唾液サンプル、尿サンプル、脳脊髄液サンプル、リンパ液サンプル、BALサンプル、生体組織検査サンプル、法医学的サンプル、バイオテロサンプルなどの完全な調整、をシステムに提供するサンプル調整システムを提供する。幾つかの実施形態では、分析器システムは、該サンプル調整の幾つかまたは全てを提供するサンプル調整システムを提供する。

【0303】

幾つかの実施形態では、初期サンプルは、分析器システムによってさらに処理される血液サンプルである。

【0304】

幾つかの実施形態では、分析器システムによってさらに処理される血清または血漿サンプルである。血清または血漿サンプルは、例えば、対象となる粒子に結合されるラベルと接触させることによって、さらに処理され、そして、該サンプルは、結合していないラベルの除去とともに、または除去しないで使用してもよい。

【0305】

幾つかの実施形態では、サンプル調整が、分析器システムの外部、または分析器システムのサンプル調整コンポーネントで、1つ又はそれ以上のマイクロタイタープレート、例えば、96個ウエルプレートなど、で行われる。

【0306】

試薬、バッファなどの貯蔵は、配管またはこの分野で周知である他の適切な構造によって、プレートのウエルとの断続的な流体通路の中とすることができる。

【0307】

サンプルは、96個ウエルプレートまたはチューブの中に別個に用意してもよい。

【0308】

サンプル分離、ラベル結合、必要ならば、ラベル分離のステップは、1つのプレート上で実施してもよい。

【0309】

幾つかの実施形態では、調整した粒子はプレートから遊離して、サンプルは、サンプル分析システムの中にサンプリングするためのチューブ内に移動する。

【0310】

幾つかの実施形態では、サンプル調整の全てのステップが、1つのプレート上で行われ、分析システムは、サンプルをプレートから直接に取得する。

【0311】

本実施形態は、96個ウエルプレートについて説明するが、1つ又はそれ以上のサンプルを収容し、サンプル調整に適した任意の容器が使用できると理解されよう。例えば、384個または1536個のウエルの標準マイクロタイタープレートを使用できる。より一般には、

【0312】

幾つかの実施形態では、サンプル調整システムは、約5個、10個、20個、30個、40個、50個、60個、70個、80個、90個、100個、200個、300個、500個、1000個、5000個、または10000個より多いサンプルを保持し調整することができる。

【0313】

幾つかの実施形態では、複数のサンプルを、複数の分析器システムでの分析用にサンプリングしてもよい。こうして幾つかの実施形態では、2個のサンプル、または2個、3個、4個、5個、7個、10個、15個、20個、50個、または100個より多いサンプルがサンプル調整システムからサンプリングされ、複数の分析器システムにおいて平行して走行する。

【0314】

マイクロ流体システムを、分析器システムの一部であるサンプル調整システムとして、

10

20

30

40

50

サンプル調整用に使用してもよく、特に、検出がより少ないサンプルを必要とする高い粒子濃度を含むと疑わしいサンプルについてである。

【0315】

マイクロ流体操作の原理および技術は、この分野で知られている。例えば、米国特許第4979824号、第5770029号、第5755942号、第5746901号、第5681751号、第5658413号、第5653939号、第5653859号、第5645702号、第5605662号、第5571410号、第5543838号、第5480614号、第5716825号、第5603351号、第5858195号、第5863801号、第5955028号、第5989402号、第6041515号、第6071478号、第6355420号、第6495104号、第6386219号、第6606609号、第6802342号、第6749734号、第6623613号、第6554744号、第6361671号、第6143152号、第6132580号、第5274240号、第6689323号、第6783992号、第6537437号、第6599436号、第6811668号、国際公開第WO9955461(A1)号を参照。

10

【0316】

サンプルは、単一または複数の分析器システムでの使用のために、直列的または並列的に調整してもよい。

【0317】

好ましくは、サンプルはバッファを含む。バッファは、分析器システムの外部でサンプルと混合してもよく、またはサンプル調整機構によって供給してもよい。

20

【0318】

何れか適当なバッファが使用できるが、好ましいバッファは、低い蛍光バックグラウンドを有し、検出可能なラベル付け粒子に対して不活性で、作業pHを維持できるものであり、推進力が電気運動力である実施形態では、電気泳動のために適切なイオン強度を有する。バッファ濃度は、何れの適当な濃度、例えば、約1～約200mMの範囲にできる。

【0319】

対象となる分子の溶解性、機能性(function)、検出可能性を提供する限り、何れのバッファ系も使用できる。好ましくは、ポンピングを用いる応用では、バッファは、リン酸塩、グリシン、アセテート、クエン酸塩、酸味料(acidulate)、炭酸塩/重炭酸塩、イミダゾール、トリエタノールアミン、グリシンアミド、ホウ酸塩、MES、Bis-トリス(Tris)、ADA、aces、PIPES、MOPSO、Bis-Trisプロパン、BES、MOPS、TES、HEPES、DISPO、MOBS、TAPSO、Trizma、HEPPSO、POPSO、TEA、EPPS、Tricine、Gly-Gly、Bicine、HEPBS、TAPS、AMPD、TABS、AMPSO、CHES、CAPSO、AMP、CAPS、およびCABSからなるグループから選択される。

30

【0320】

特に好ましいバッファは、0.1%のTween20を持つ、pH7.4のリン酸塩バッファの生理食塩水であるが、イミダゾールバッファの生理食塩水、ホウ酸塩バッファの生理食塩水、トリスバッファの生理食塩水も使用可能である。

40

【0321】

好ましくは、バッファは、Gly-Gly、ピシン(bicine)、トリシン(tricine)、2-モルホリン脂肪酸(MES)、4-モルホリンプロパンスルホン酸(MOPS)、および2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール塩酸塩(AMP)からなるグループから選択される。

【0322】

特に好ましいバッファは、pH8.1の2nMのトリス/ホウ酸塩であるが、トリス/グリシン(glycine)およびトリス/HClも使用可能である。

【0323】

好ましくは、電気泳動を用いた応用では、バッファは、Gly-Gly、ピシン(bicin

50

e)、トリシン(tricine)、2 - モルホリン脂肪酸 (M E S)、4 - モルホリンプロパンスルホン酸 (M O P S)、および 2 - アミノ - 2 - メチル - 1 - プロパノール塩酸塩 (A M P) からなるグループから選択される。

【 0 3 2 4 】

特に好ましいバッファは、p H 8 . 1 の 2 n M のトリス / ホウ酸塩であるが、トリス / グリシン(glycine)およびトリス / H C l も使用可能である。

【 0 3 2 5 】

双性イオン(zwitterions)は、電気泳動サンプル中に 2 M までの濃度で含んでもよい。これは、電気泳動システムの電流を増加させずに、毛細管表面との相互作用を最小化するように機能する。

10

【 0 3 2 6 】

幾つかの応用では、バッファは、望ましくは、該方法の実施形態での使用のために、ふるい(sieving)マトリクスをさらに備える。

【 0 3 2 7 】

何れが適当なふるいマトリクスが使用できるが、望ましくは、ふるいマトリクスは、低い蛍光バックグラウンドを有し、特に、検出可能なラベル付き粒子のサイズ依存のリタデーション(retardation)を提供できる。

【 0 3 2 8 】

ふるいマトリクスは、任意の適当な濃度 (例えば、約 0 . 1 % ~ 約 1 0 %) で存在できる。任意の適当な分子量が使用できる (約 1 0 0 0 0 0 ~ 約 1 0 0 0 万) 。

20

【 0 3 2 9 】

ふるいマトリクスの例は、ポリ (エチレンオキサイド) (P E O)、ポリ (ビニルピロリドン) (P V P)、直鎖ポリアクリルアミドおよび誘導体 (L P A)、ヒドロキシメチルプロピルセルロース (H P M C)、およびヒドロキシエチルセルロース (H E C) などであり、これら全ては水に溶解し、希釈液濃度 (0 . 3 % w t / v o l) で並外れて低い粘性を有する。

【 0 3 3 0 】

さらに、これらのポリマー溶液は、これらのからみ合い(entanglement)閾値より上にあり、調整、フィルタリング、毛細管への充填が容易である。

【 0 3 3 1 】

30

トリス / ホウ酸塩バッファへの 0 . 2 % L P A (5 0 0 0 0 0 0 ~ 6 0 0 0 0 0 0 m w) の添加は、1 分間の電気泳動分離で、I g G と 1 . 1 k b の核酸断片の弁別を可能にした (下記の実施例 7 a を参照) 。

【 0 3 3 2 】

幾つかの場合、測定可能な電磁特性が、ターゲット粒子の固有の性質によって生成される。他の場合は、対象となる粒子は、分析器を用いた検出に先立って、検出可能なラベルを用いてラベル付けしてもよい。

【 0 3 3 3 】

検出可能なラベルは、例えば、発光性(luminescent)ラベルまたは光散乱性ラベルとすることができる。一実施形態では、検出可能なラベルは、発光性ラベルである。

40

【 0 3 3 4 】

他の発光性ラベルが、本発明の範囲から逸脱せずに使用でき、有用な発光性ラベルは、蛍光ラベル、化学発光ラベル、生物発光ラベルなどである。さらに、蛍光クエンチング(q uenching)も監視可能である。

【 0 3 3 5 】

さらに、他の光散乱性ラベルが本発明の範囲から逸脱せずに使用できる。有用な光散乱性ラベルは、例えば、金、銀、プラチナ、セレンなどの金属、およびチタン酸化物などである。

【 0 3 3 6 】

検出するためには、粒子は、電磁放射を発生可能にする必要がある。電磁放射は、粒子

50

の内的性質または粒子の外的性質のいずれかである。

【0337】

内的性質の例は、蛍光、光散乱などあるが、粒子が、検出可能にする1つ以上の内的性質を有していてもよい。

【0338】

外的性質は、粒子に付着した場合、ラベルによって提供されるものである。

【0339】

ラベルは、粒子を取り調べ空間38, 40の中に位置決めする前、その後または同時に付着する。

【0340】

好ましくは、検出手段は、蛍光ラベルである。蛍光ラベルの例は、文献「HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH PRODUCTS (R. Haugland, 9th Ed., Molecular Probes Pub. (2004))」で見つかる。

【0341】

検出可能なラベルは、粒子の内的性質および外的性質の何れかの組合せで生成してもよい。

【0342】

粒子をラベル付けする方法は、この分野の当業者に周知である。ラベルを粒子に付着することは、直接付着または結合パートナーの使用などの任意の知られた方法を採用することができる。

【0343】

幾つかの場合、ラベリングの方法は、不特定である。例えば、特定のヌクレオチドシーケンスに関係なく、全ての核酸をラベル付けする方法が知られている。他の場合、ラベリングは、ラベル付けされたオリゴヌクレオチドがターゲット核酸シーケンスと限定的に結合するように、特定のものである。

【0344】

本発明のラベルは、染料(dye)タグ、電荷タグ、質量タグ、量子ドットまたはビーズ、磁気タグ、光散乱性タグ、ポリマータグ、およびポリマと付着した染料などである。

【0345】

染料は、材料に色を付けたり、発光性または蛍光の発生を可能にする極めて大きいカテゴリーの化合物を含む。染料は、特定の波長で、光を吸収したり、光を発生してもよい。染料は、インターカレーションのもので、または粒子に対して非共有もしくは共有で結合するものでもよい。染料自体が、副溝(minor groove)構造、十字形、ループ形または粒子の他の配座元素を検出するプローブのような、プローブを構成してもよい。

【0346】

染料は、BODIPYおよびALEXA染料、Cy[n]染料、SYBR染料、臭化エチジウムおよび関連する染料、アクリジンオレンジ、二量体のシアニン染料、例えば、TOTO、YOYO、BOBO、TOPRO、POPOおよびこれらの誘導体、ビス-ベンジミド(benzimide)、オリグリーン(OliGreen)、ピコグリーン(PicoGreen)、および関連する染料、シアニン染料、フルオレセイン(fluorescein)、LDS 751、DAPI、AMCA、カスケードブルー(Cascade Blue)、CL-NERF、ダンシル(Dansyl)、ジアルキルアミノクマリン、4', 5'-ジクロロ-2', 7'-ジメチトキシフルオレセイン、2', 7'-ジクロロフルオレセイン、DM-NERF、エロシン(Eosin)、エリトロシン(Erythrosin)、フルオロセイン(Fluorescein)、ヒドロキシコルマリン(Hydroxycoumarin)、イソスルファンブルー(Isosulfan blue)、リサミネローダミンB(Lissamine rhodamine B)、マラカイトグリーン(Malachite green)、メトキシコルマリン(Methoxycoumarin)、ナフトフルオレセイン(Naphtho fluorescein)、NBD、オレゴングリーン(Oregon Green)、PyMPO、ピレン(Pyrene)、ローダミン(Rhodamine)、ロードルグリーン(Rhodol Green)、2', 4', 5', 7'-テトラブロモスルホンフルオロセイン、テトラメチルローダミン、テキサスレッド(Texas Red)、X-ローダミン、ジオミック(Dyomic)

10

20

30

40

50

染料シリーズ、アット・テク(Atto-tec)染料シリーズ、コルマリン(Coumarins)、フィコビリプロテイン(phycobilliproteins)(フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン)、グリーン、イエロー、レッドおよび他の蛍光蛋白質、アップコンバート燐光体、および量子ドットなどである。

【0347】

当業者は、本発明の範囲内で使用できる他の染料を認識するであろう。

【0348】

これは、徹底的な列挙ではなく、使用可能な染料は、本発明のラベル付けした粒子の検出を可能にするために使用される、現在知られ又は将来知られる全ての染料を含む。

【0349】

蛍光粒子、蛍光共役抗体などの蛍光マーカーを有することによって、サンプルは、蛍光粒子によって吸収される光を用いて照射可能になり、発生した光は、光測定装置によって測定される。

【0350】

本発明で使用可能な光散乱性タグは、金、銀、セレンなどの金属、およびチタン酸化物などである。当業者は、他のマイクロ粒子またはビーズも光散乱性タグとして使用できることを認識するであろう。

【0351】

本発明のさらに他の実施形態では、ラベルが、電気泳動速度、及び/又は、電気泳動では分離できない同一または異なるサイズのターゲット粒子の分離に影響を及ぼす。

【0352】

こうしたラベルは、電荷/質量タグと称される。電荷/質量タグの付着は、ある意味で、これらの電気泳動移動度および分離に影響を与えるのに十分な程度に、ターゲット粒子の電荷と並進摩擦抗力との比率を変化させる。他の実施形態では、該ラベルは、電荷または質量、あるいは電荷と質量の組合せを変化させる。

【0353】

粒子と結合した電荷/質量タグは、電界中でのこれらの挙動の空間的な相違のため、または電界中でのこれらの挙動の速度の相違のため、結合していない粒子または結合していないタグと弁別可能である。

【0354】

多糖類(Polysaccharide)でコートした常磁性体のマイクロ粒子またはナノ粒子が、粒子をラベル付けするために使用できる。モルデイ(Molday)に付与された米国特許第4452773号は、参照によりここに全体が組み込まれ、これは磁性の鉄-デキストランビーズの調整を記載しており、生物学的材料への付着に適した粒子を調整する様々な方法を説明した概要を提供している。

【0355】

高い傾斜磁気分離方法で用いられる磁気粒子用のポリマーコーティングの説明は、ドイツ特許第3720844号および、ミルテンニ(Miltenyi)に付与された米国特許第5385707号で見つかり、両方とも参照により全体が組み込まれる。常磁性ビーズを調整するための方法は、米国特許第4770183号に記載されている。

【0356】

ビーズを粒子に付着するための正確な方法は、本発明の粒子にとって重要ではなく、この分野で多くの代替方法がある。付着は、一般に、粒子と、ビーズ上のコーティングと共役であり、相互作用のための官能基を提供する特定の結合パートナーとの相互作用による。

【0357】

抗体は、結合パートナーの例である。抗体は、高い親和性結合システムの1つのメンバー、例えば、ビオチン(biotin)と結合可能であり、粒子は、他のメンバー、例えば、アビジン(avidin)に付着する。

【0358】

10

20

30

40

50

一次抗体の種限定のエピトープ(epitopes)を認識する二次抗体、例えば、抗マウスIg、抗ラットIgが、本発明でも使用可能である。

【0359】

間接結合方法は、様々な粒子とともに、単一磁気結合物体、例えば、抗体、アビジンなどの使用を可能にする。

【0360】

この技術の1つの応用では、コーエン(Cohen)によって記載されているように(Cohen et al. (1988) PNAS 85:9660-3)、ターゲット粒子は、磁気タグと結合でき、チャンバ(不図示)内の流体中に浮遊できる。

【0361】

チャンバを横切って供給される磁界の存在下で、磁氣的にラベル付けされたターゲットは、チャンバ中に保持される。磁気ラベルを持たない材料は、チャンバを通過する。そして、保持された材料は、磁界を変化させたり、除去することによって、溶出できる。

【0362】

磁界が印加されるチャンバには、マトリクス表面に近い部分で、チャンバ内に局所的に高い磁界を誘導するために、適当な磁化率の材料からなるマトリクスがしばしば設けられる。これは、かなり弱く磁化した粒子の保持を可能にし、この手法は、高傾斜磁気分離と称される。

【0363】

本発明の他の実施形態では、粒子を検出可能にする外的性質が、少なくとも2つのラベルにより提供される。例えば、ターゲット粒子は、2つ又はそれ以上のラベルを用いてラベル付けされ、各ラベルは、他のラベルの発光と区別される1つ又はそれ以上の波長で検出した発光に起因して、区別される。この例では、粒子は、2つ又はそれ以上の波長で検出した発光の比率によって、自由なラベルと弁別される。

【0364】

他の例では、粒子は、2つ又はそれ以上のラベルを用いてラベル付けされ、少なくとも2つのラベルが同じ波長で発光する。この例では、粒子は、各粒子に付着した2つ、3つ又はそれ以上のラベルからの発光によって生成される検出した蛍光の強度に基づいて、弁別される。

【0365】

他の実施形態では、染料は、同じまたは重なった励起スペクトルを有するが、弁別可能な発光スペクトルを有する。

【0366】

好ましくは、染料は、実質的に異なる発光スペクトルを持つように、好ましくは、約10nmより大きく分離した発光最大値を持つように、より好ましくは、約25nmより大きく分離した発光最大値を持つように、さらにより好ましくは、約50nmより大きく分離した発光最大値を持つようにして選択される。

【0367】

機器の方法を用いて、2つの染料を差別化することが望ましい場合、種々のフィルタおよび回折格子が、個々の発光スペクトルを独立に検出可能にする。機器の差別化はまた、広いバンド幅より狭いバンド幅を持つ染料を選択することによって、増強できる。しかしながら、こうした染料は、高い増幅発光を有したり、積分した信号強度の損失が信号検出に有害である十分な濃度で存在する必要がある。

【0368】

一例では、第2ラベルは、第1ラベルの蛍光を消す(quench)かもしれず、その結果、二重ラベル付け粒子についての蛍光信号の損失をもたらす。適当な蛍光/クエンチ対の例は、5'6-FAMTM/3'Dabcyl、5'Oregon Green(登録商標)488-X NHS Ester/3'Dabcyl、5'Texas Red(登録商標)-X NHS Ester/3'Black Hole QuencherTM-1(インテグレートDNAテクノロジー社(Integrated DNA Technologies, Coralville,

10

20

30

40

50

IA)) 等である。

【 0 3 6 9 】

他の例は、蛍光共鳴エネルギー転送（FRET）のために、2つのラベルを使用してもよい。これは、2つの染料粒子の励起状態間の距離依存の相互作用である。

【 0 3 7 0 】

この場合、励起は、ドナーからのフォトン放出無しでドナーからアクセプタへ移送される。ドナーおよびアクセプタ粒子は、近くに接近している必要がある（例えば、約100以内）。

【 0 3 7 1 】

適当なドナーとアクセプタ対は、フルオレセイン(fluorescein) / テトラメチルローダミン、I A E D A N S / フルオレセイン、E D A N S / ダブシル(dabcyl)、フルオレセイン / Q S Y 7（文献R. Haugland, "Molecular Probes," Ninth edition, 2004）、および当業者に知られた多くの他の他のもの等である。

10

【 0 3 7 2 】

粒子は、検出及び / 又は弁別を容易にするために、1種以上のラベル、例えば、染料タグおよび質量タグなどを用いてラベル付けしてもよい。例えば、蛋白質は、2つの抗体を用いてラベル付けしてもよく、一方は、ラベル無しで質量タグまたは質量 / 電荷タグとして機能し、他方は、染料タグを有する。

【 0 3 7 3 】

そして、この蛋白質は、染料タグを持つ抗体のみに結合した同様なサイズの他方の蛋白質と、例えば、推進力（追加の結合抗体の増加した質量または質量 / 電荷によって生ずる）として電気泳動を用いた場合、その遅い速度で弁別される。

20

【 0 3 7 4 】

ラベル付けした粒子を正確に検出するために、ラベル付けした粒子は、結合していないラベルと弁別する必要がある。これを達成する多くの方法は、当業者に知られている。

【 0 3 7 5 】

例えば、同質分析物では、結合していないラベルは、分析に先立ってラベル付けした粒子から分離される。一実施形態では、分析物は同質分析物であり、結合していないラベルを含むサンプルは、電気泳動と単一粒子蛍光検出の組合せによって分析される。この場合、電気泳動条件は、ラベル付けした粒子と結合していないラベルとで別個の速度を提供するように選ばれる。

30

【 0 3 7 6 】

核酸の非限定ラベリングは、一般に、特定のヌクレオチドシーケンスに関係無く、全ての核酸にラベル付けする。当業者は、核酸の一般的なラベリングのための種々の技術に精通している。

【 0 3 7 7 】

こうした方法は、挿入色素、例えば、TOTO、臭化エチジウム、ヨウ化プロピジウム、配位複合体の形成用のULYSISキット、ラベルが容易に付着する化学反応性ヌクレオチド類似体の組み込み用、およびストレプトアビジン結合ラベルの付着のためのヌクレオチド類似体を含むビオチンの組み込み用のARESキット等である。ラベル付けしたヌクレオチド類似体の酵素的な組み込みは、当業者に周知の他の手法である。

40

【 0 3 7 8 】

蛋白質を非限定的にラベル付けする技術も、当業者に周知である。蛋白質表面で幾つかの化学反応性アミノ酸、例えば、リシンなどの1級アミンが使用できる。

【 0 3 7 9 】

さらに、ラベルは、蛋白質の炭水化物部分に添加できる。イソタイプの特定試薬が、抗体をラベリングするために開発されている（例えば、ゼノン(Zenon)ラベリング(Haugland, 2004)）。

【 0 3 8 0 】

一実施形態では、混合物内の特定の粒子だけがラベル付けされる。特定のラベリングは

50

、ターゲット粒子をラベル付けした結合パートナーと組合せることによって、達成できる。結合パートナーは、相補性結合表面を通じて、ターゲット粒子と限定的に相互作用を行う。

【0381】

パートナー間の結合力は、共有相互作用または非共有相互作用、例えば、疎水性、親水性、イオン、水素結合、ファンデルワールス力、または配位複合体形成などである。

【0382】

結合パートナーの例は、細胞角膜炎レセプタについての作用薬および拮抗薬、毒素(toxin)および毒液(venom)、抗体およびウイルスエピトープ、ホルモン(例えば、オピオイドペプチド、スロイドなど)およびホルモンレセプタ、酵素および酵素基質、補助因子およびターゲットシーケンス、薬剤および薬剤ターゲット、オリゴヌクレオチドおよび核酸、蛋白質およびモノクローナル抗体、抗原および特定の抗体、ポリヌクレオチドおよびポリヌクレオチド結合蛋白質、ビオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジン、酵素および酵素補助因子、レクチンおよび特定の炭水化物、等である。

10

【0383】

結合パートナーとして機能できる例示のレセプタは、天然由来のレセプタ、例えば、チロキシン結合グロブリン、レクチン、細胞表面で見つかる種々の蛋白質(分化クラスタまたはCD粒子)などである。CD分子は、真核生物細胞の表面にある既知および未知の蛋白質を指す。例えば、CD4は、ヘルパーTリンパ球を主に定義する分子である。

20

【0384】

一実施形態では、サンプルは、ターゲット粒子と反応する結合パートナーを用いてコートされた、ビーズまたはマイクロ粒子と反応する。

【0385】

ビーズは、サンプルの何れかの非結合コンポーネントから分離される。結合した粒子を含むビーズは、本発明の分析器によって検出される。

【0386】

蛍光染めされたビーズは、これらの方法のために特に好適である。例えば、オリゴマーシーケンスでコートされた蛍光ビーズは、ターゲット相補性シーケンスと限定的に結合するようになり、適切な分離ステップの後、ターゲットシーケンスの検出を可能にする。

30

【0387】

一実施形態では、粒子を検出する方法は、結合パートナーとして、モノクローナル抗体を持つサンドイッチ分析物を使用する。一次抗体は、捕捉抗体として機能する表面に連結している。

【0388】

そして、サンプルが添加されると、抗体によって認識されるエピトープを有する粒子は、表面上の抗体と結合するであろう。結合していない粒子は、洗い流され、ほぼ限定的に結合した粒子だけを残す。

【0389】

そして、結合した粒子/抗体は、検出可能なラベルを含む検出抗体と反応できる。検出抗体と粒子の反応を可能にする培養の後、非限定的に結合した検出抗体は洗い流される。粒子および検出抗体は、表面から遊離可能になり、本発明の分析器で検出される。

40

【0390】

代替として、検出抗体だけを遊離して検出することができ、これにより粒子を間接的に検出できる。代替として、検出抗体と結合したラベルだけを遊離して検出することができ、これにより粒子を間接的に検出できる。

【0391】

一変形は、細胞レセプタによって認識されるリガンド(ligand)を採用するものである。この実施形態では、リガンドは、特定のレセプタを表す細胞を捕捉するために、表面に結合している。ラベル付けしたリガンドは、細胞をラベル付けするために用いられる。

【0392】

50

レセプタは、表面免疫グロブリンとすることができる。こうして限定的に結合した細胞の存在を決定できる。従って、レセプタに相補的な対象となるリガンドを表面に結合させると、こうしたリガンドについて特定の免疫グロブリンを有する細胞が検出できる。

【0393】

他の実施形態では、リガンドに対する抗体を表面に結合させて、リガンドを表面に非共有で付着させることができる。

【0394】

(データの収集、分析、報告)

【0395】

粒子から検出された信号を含むデータは、例えば、標準またはカスタムのソフトウェアを持つパーソナルコンピュータ(図1では示していない)を用いて、相互相関がとられ、例えば、サンプル中に存在する蛍光種ごとにピークを示す速度のヒストグラムを生成する。

10

【0396】

サンプルに電界が印加される一実施形態では、検出器間の各粒子の通過時間は、粒子の特徴的な電荷、サイズおよび形状に依存している。

【0397】

コンピュータは、分析器を動作させるため、例えば、フローレートを制御し、サンプリング、サンプル回収、サンプル調製などを行うために、使用してもよい。

【0398】

システムは、データ及び/又は分析結果を報告するためのデータ報告器を含んでもよい。当業者に知られた何れの方法も、この目的のために使用できる。

20

【0399】

生データ(例えば、粒子の数、相互相関データ、蛍光の波長、蛍光の強度など)はさらに、報告する前に、適切なソフトウェアによって分析してもよく、サンプル中の粒子の確からしい識別、濃度、検出した粒子の組合せ、正常、以上または特定の条件に関連した特定レベルと比較した検出粒子のレベル、1つ又はそれ以上の粒子の存在、不在及び/又は濃度に基づいた可能性ある診断、検出した粒子の可能性ある供給源、および報告前にデータ上で実行できる他の分析を示す。

【0400】

適切な報告を提供する何れの機構も、データ報告器として使用できる。データ報告器の非限定的な例は、ビデオモニタ上のディスプレイ、印刷、リモートディスプレイまたは印刷のためのデータ伝送、例えば、インターネット、音声報告などなどである。

30

【0401】

(方法)

本発明の他の態様は、単一粒子を検出可能な少なくとも2つの取り調べ空間を持つ検出システムを用いて、個体から得られるサンプルについて分析を実施することを含む分析方法を提供するものであり、該分析は、サンプル中の粒子の存在または不在を決定することを含む。

【0402】

幾つかの実施形態では、個体は、植物や動物であり、幾つかの実施形態では、個体は人間である。

40

【0403】

検出システムは、ここで説明する何れのものでもよい。幾つかの実施形態では、検出システムは、電磁放射源としてCWレーザを利用できる。

【0404】

幾つかの実施形態では、検出システムは、例えば、それぞれ約0.02 pLと約300 pLの間、または約0.02 pLと約50 pLの間、または約0.1 pLと約25 pLの間の容積を有する2つの取り調べ空間を有する。幾つかの実施形態では、2つ以上の取り調べ空間を使用する。幾つかの実施形態では、3つ、4つ、5つ、6つ又はそれ以上の取

50

り調べ空間を使用する。

【0405】

2つの取り調べ空間を持つ検出器の他の実施形態は、ここで説明するように、本発明の実施形態で使用してもよい。

【0406】

幾つかの実施形態では、サンプルは、複数の異なる粒子について分析される（マルチプレキシング）。幾つかの実施形態では、複数の個体からの複数の粒子が分析される。他の実施形態では、複数の個体からのサンプルが分析される。

【0407】

本発明は、診断、予後(prognosis)、治療状態（例えば、治療の進展及び／又は効果を監視すること）を決定することを含む分析方法、及び／又は、個体から取られたサンプル中の粒子の存在、不在及び／又は濃度に基づいた治療方法も提供するものであり、粒子の存在、不在及び／又は濃度は、2つの取り調べ空間を持つ単一粒子検出器を用いて決定される。

10

【0408】

ここで用いる「診断」は、病気または病理(pathology)への体質、または病気または病理の存在及び／又は重大性を決定するために、個体をスクリーンするテスト結果の使用を含み、さらに病気または病理の体質や存在の欠損についての決定を含む。

【0409】

幾つかの実施形態では、分析は、サンプル中の複数タイプの粒子の存在、不在及び／又は濃度を決定することを含む。

20

【0410】

これらの方法は、さらに、診断、予後、治療状態、治療の監視及び／又は決定を、サンプルが得られた個体及び／又はこれらの代理人（ヘルスケア提供者など）へ報告することを含む。

【0411】

単一粒子検出器は、分析器および分析器システムなど、ここで説明する何れのものでもよい。検出システムは、電磁放射源としてCWレーザを利用できる。

【0412】

幾つかの実施形態では、2つの取り調べ空間は、それぞれ約0.02 pLと約300 pLの間、または約0.02 pLと約50 pLの間、または約0.1 pLと約25 pLの間の容積を有する。

30

【0413】

幾つかの実施形態では、2つ以上の取り調べ空間を使用する。幾つかの実施形態では、3つ、4つ、5つ、6つ又はそれ以上の取り調べ空間を使用する。

【0414】

図2は、本発明の方法の一実施形態を図示する。

【0415】

個体（例えば、人間）からのサンプルは、単一分子を検出可能な2つの取り調べ空間を持つ検出システムを用いて（幾つかの実施形態では、電磁放射源としてCWレーザを利用）分析され、分析結果が得られる。

40

【0416】

幾つかの実施形態では、その結果は、対象となる粒子の存在、不在及び／又は濃度の観点のものである。幾つかの実施形態では、その結果は、さらに、診断、予後、治療効果の決定、治療タイプの決定など提供するために、分析される。幾つかの実施形態では、報告は、個体または代理人へ連絡される。

【0417】

本発明はまた、コンピュータ分析によりデータ分析方法を提供する。

【0418】

データベースは、データベースの取り調べ空間を持つ少なくとも2つの単一粒子検出器

50

を用いて実施したサンプルの分析結果を収納する。該分析は、サンプル中の粒子の存在、不在及び／又は濃度を決定することを含む。

【0419】

幾つかの実施形態では、分析は、サンプル中の複数のタイプの粒子の存在、不在及び／又は濃度を決定することを含む。

【0420】

サンプルは、ここで説明した供給源の何れかから得られる。幾つかの実施形態では、サンプルは、生物医学的研究、臨床試験や前臨床試験の研究、基礎研究などで得られる。

【0421】

単一粒子検出器は、ここで説明した実施形態のいずれでもよい。

10

【0422】

検出システムは、電磁放射源としてCWレーザを利用できる。

【0423】

幾つかの実施形態では、2つの取り調べ空間は、それぞれ約0.02 pLと約300 pLの間、または約0.02 pLと約50 pLの間、または約0.1 pLと約25 pLの間の容積を有する。

【0424】

幾つかの実施形態では、2つ以上の取り調べ空間を使用する。幾つかの実施形態では、3つ、4つ、5つ、6つ又はそれ以上の取り調べ空間を使用する。

【0425】

20

ある態様において、本発明は、ディスプレイユニット、例えば、ビデオディスプレイまたは印刷ユニットを備えたユーザインタフェースを有する汎用コンピュータについての命令セットを収納するコンピュータ読み取り可能な保存媒体、例えば、CDを提供するものであり、該命令セットは、2つの取り調べ空間を持つ単一粒子検出器を用いてサンプルの分析からの値を入力するためのロジック(logic)と、必要ならば、入力した値をデータベースと比較する比較ルーチンと、前記ディスプレイユニットを用いて、入力値及び／又は比較ルーチンの結果を表示するための表示ルーチン、とを備える。

【0426】

この態様の他の実施形態では、本発明は、ディスプレイユニット、例えば、ビデオディスプレイまたは印刷ユニットを備えたユーザインタフェースを有する汎用コンピュータのための命令セットを備えたコンピュータ間のインターネット経由で伝搬する電子信号または搬送波を提供するものであり、該命令セットは、2つの取り調べ空間を備え、単一分子を検出可能な検出システムを用いてサンプルの分析からの値を入力するためのロジック(logic)と、入力した値をデータベースと比較する比較ルーチンと、前記ディスプレイユニットを用いて、比較ルーチンの結果を表示するための表示ルーチン、とを備える。

30

【0427】

検出システムの感度およびロバスト性(robustness)のため、数多くのサンプルが、高い正確さおよび精度で、対象となる1つ又はそれ以上の粒子の存在、不在及び／又は濃度に関して、短時間で分析できる。

【0428】

40

本発明の方法は、例えば、研究の結果、例えば、以下に限定されないが、前臨床および臨床試験などの生物医学的研究の結果を、迅速、頑丈かつ高感度で決定するのに有用である。

【0429】

本発明の方法はまた、例えば、臨床診断、予後、監視および治療方法の決定においても有用である。

【0430】

これらの実施形態では、該方法は、さらに分析結果、または分析結果から決定された診断、予後、監視または治療を、サンプルが取られた個体またはこれらの代理人へ報告することを含んでもよい。

50

【 0 4 3 1 】

「個体」は、サンプルの何れかの供給源でもよく、典型的には生物学的サンプルである。

【 0 4 3 2 】

実施形態では、個体は、有機体、好ましくは、動物、より好ましくは哺乳類、最も好ましくは人間である。動物は、家畜、スポーツ動物、ペット動物、研究動物、および人間などである。

【 0 4 3 3 】

幾つかの実施形態では、個体は人間であり、人間は、幾つかの実施形態では、病理学的状態、例えば、伝染性または非伝染性の病気を有する疑いがあり、または1つ又はそれ以上の状態についてスクリーニングにかけられる患者である。

10

【 0 4 3 4 】

幾つかの実施形態では、個体は、遺伝的変異や異常に関連した蛋白質または他のマーカーの状態及び/又は発現に対する遺伝的体質についてのスクリーニングされる

【 0 4 3 5 】

幾つかの実施形態では、個体は、ウイルスまたは細菌の感染を持つ疑いがある人間である。幾つかの実施形態では、個体は、植物または他の有機体である。幾つかの実施形態では、個体は、非生物物質である。

【 0 4 3 6 】

幾つかの実施形態では、本発明の方法は、個体から採取されたサンプルを分析することを含む。幾つかの実施形態では、サンプルを個体から採取するステップは、この方法に含まれる。

20

【 0 4 3 7 】

幾つかの場合、例えば、研究応用では、個体全体、例えば、有機体全体または有機体グループ（例えば、バクテリアコロニー）がサンプルを構成してもよい。

【 0 4 3 8 】

他の場合、より典型的には、サンプルは個体から採取した個体の一部である。サンプルは、ここで前述したいずれでもよい。

【 0 4 3 9 】

こうして、例えば、サンプルは、生物学的流体、例えば、血液、血清(serum)、血漿(plasma)、気管支肺胞洗浄(bronchoalveolar lavage)液、尿(urine)、脳脊髄(cerebrospinal)液、肋膜(pleural)液、滑液(synovial fluid)、腹膜(peritoneal)液、羊水(amniotic fluid)、胃液(gastric fluid)、リンパ(lymph)液、間質(interstitial)液、組織ホモジェネート(homogenate)、細胞抽出物、唾液(saliva)、痰(sputum)、大便(stool)、生理学分泌物(secretions)、涙、粘液(mucus)、汗、乳、精液(semen)、精漿(seminal fluid)、膣(vaginal)分泌物、潰瘍(ulcers)や他の表面の発疹、水疱(blisters)、膿瘍(abscesses)からの液、良性、悪性および疑わしい組織の生体組織検査(biopsies)を含む組織抽出物、または、対象となる粒子を含むことがある他の何れかの身体要素である。

30

【 0 4 4 0 】

幾つかの実施形態では、サンプルは、血液サンプルである。幾つかの実施形態では、血漿サンプルである。幾つかの実施形態では、血清サンプルである。

40

【 0 4 4 1 】

存在、不在及び/又は濃度が決定されるサンプル中の粒子は、ここで説明するようなものである。ここで説明した何れのタイプの粒子も、本発明の方法によって検出でき、前述した目的およびより詳しく後述する目的のために使用できる。

【 0 4 4 2 】

幾つかの実施形態では、粒子は、分子、超分子(supramolecular)複合体、オルガネラ(organelles)、有機体、細胞、およびこれらの組合せである。

【 0 4 4 3 】

幾つかの実施形態では、1つ又はそれ以上の粒子は、有機体、例えば、ウイルス、バク

50

テリア、真菌細胞、動物細胞、植物細胞、真核生物細胞、原核生物細胞、古代バクテリア (archeobacter) 細胞、およびこれらの組合せ、などである。

【 0 4 4 4 】

幾つかの実施形態では、有機体は、例えば、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、ピコルナウイルス、オルトミクソウイルス、パラミクソウイルス、ラブドウイルス、コロナウイルス、アレナウイルス、レトロウイルスなどのウイルスである。

【 0 4 4 5 】

幾つかの実施形態では、粒子は、大腸菌、緑膿菌、エンテロバクタ・クローエカ (Enterobacter cloacae)、黄色ブドウ球菌、大便連鎖球菌、肺炎桿菌、ネズミチフス菌、表皮ブドウ球菌、セラチア・マルセスセンス、ウシ結核菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、尋常変形菌などのバクテリアである。

【 0 4 4 6 】

幾つかの実施形態では、1つ又はそれ以上の粒子は、アミノ酸、ペプチド、蛋白質、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸、DNA、RNA、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、炭水化物、脂質、ホルモン、サイトカイン、リンフォカイン、毒液、毒素、天然由来薬剤、合成薬剤、汚染物、アレルゲン、影響粒子、成長因子、代謝中間物、基質、ファルマコフォア、無機分子、有機分子、およびこれらの組合せからなるグループから選択される。

【 0 4 4 7 】

幾つかの実施形態では、サンプルは、検出システムへの導入前に処理される。幾つかの実施形態では、サンプルは、処理無しで検出システムへ導入される。これらの実施形態では、サンプルは、追加の処理無しで検出可能である。あるいは、サンプルは、システムでの分析に先立って検出システム内で処理してもよい。

【 0 4 4 8 】

処理は、導入の前または後で、ここで説明したようなものでよい。幾つかの実施形態では、サンプル処理は、該粒子に限定した蛍光ラベル付き抗体を用いて粒子をラベリングすることを含む。

【 0 4 4 9 】

幾つかの実施形態では、単一サンプル中の複数の粒子は、複数の蛍光ラベル付き抗体を用いてラベル付けされ、それぞれが対象となる特定タイプの粒子に限定的である。幾つかの実施形態では、ラベル付けされた粒子はバイオマーカーである。

【 0 4 5 0 】

バイオマーカーは、以下に限定されないが、炎症、細菌感染、病理学的状態用マーカー、発現マーカー、発生マーカーなどである。幾つかの実施形態では、存在、不在及び/又は濃度が検出される粒子は、細菌感染用マーカーである。

【 0 4 5 1 】

細菌感染用マーカーの例は、脊髄細胞で発現するトリガリングレセプタ (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells) (TREM-1) とすることができ、これは体液中で見つかり、バクテリアまたは菌類による感染を示すマーカーである。サンプルは、蛍光ラベル付き抗TREMの抗体を用いて、導入前または導入後に処理される。

【 0 4 5 2 】

本発明の分析器および分析器システムは、マルチプレキシング (multiplexing)、即ち、サンプル中の1つ以上のタイプの検出に、特に好適である。

【 0 4 5 3 】

サンプルは、1) サンプルを複数のサンプルに分割し、それぞれを1つ又はそれ以上のタイプの粒子に関して分析すること、2) 異なる粒子について異なるラベルを使用すること、例えば、異なる粒子について、異なるラベル色、数、強度など、3) 例えば、電気泳動において、異なる粒子の異なる移動度を利用すること、を含む方法によって、多重処理 (multiplexed) される。

10

20

30

40

50

【0454】

幾つかの実施形態では、複数タイプの粒子は、単一サンプル中で分析される。

【0455】

単一サンプル中での粒子のタイプの数、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10つ、11つ、12つ、13つ、14つ、15つ、16つ、17つ、18つ、19つ、20つ、25つ、30つ、40つ、75つ、または100つより多くてもよい。

【0456】

粒子のタイプ数は、200つ、100つ、50つ、40つ、30つ、20つ、19つ、18つ、17つ、16つ、15つ、14つ、13つ、12つ、11つ、10つ、9つ、8つ、7つ、6つ、5つ、4つ、または3つより少なくてもよい。

10

【0457】

幾つかの実施形態では、粒子のタイプ数は、約2～約20、または約2～約5、または約2～約10、または約10～約20である。粒子のタイプを相互に弁別する方法はここで説明している。

【0458】

特に、方法は、組合せラベル信号強度（例えば、異なる粒子での異なる数のラベル）、ラベル識別（例えば、異なる粒子での異なるレベル）、ラベル移動度（例えば、推進力が電気運動力である場合、異なる粒子の異なる移動度）、またはこれらの組合せを用いてもよい。

20

【0459】

本発明の方法は、共通の会合(association)を有し、またはサンプル中で所望の情報、即ち「パネル」を提供する、複数タイプの粒子の存在、不在及び/又は濃度の検出を含む。

【0460】

ここで用いる「パネル」は、その存在が本発明の分析物によって検出できる粒子グループを含む。

【0461】

粒子は、本発明のシステムによってこれらの検出を可能にしたり、検出するためにラベリングを必要とする固有の特性を有してもよい。

30

【0462】

こうして、本発明の方法は、粒子パネルの1以上のメンバーの存在、不在及び/又は濃度の検出のため、サンプルを適切な複数のラベルと接触させることを含むことができる。

【0463】

こうした粒子パネルは、例えば、バイオテロ分析サンプル、医療検診、診断、予後、監視、及び/又は治療選択、生物医学研究、法医学、農業分析、工業的応用において、有用である。

【0464】

例えば、パネルは、特定のタイプの診断、例えば、感染有機体パネル、心臓疾患、癌や特定タイプの癌、糖尿病、関節炎、アルツハイマー病などの病気のためのマーカーパネルと関連付けてもよい。あるいは、種々のシステムの機能を評価するには、例えば、内分泌物パネルである。パネルは、バイオテロと関連付けてもよく、例えば、可能性あるバイオテロ有機体や毒素のパネルである。パネルは、医療スクリーニングにおいて有用であり、例えば、特定の病気または病理学的状態に関連し、または正常または過常な状態に関連した、特定の遺伝的多型または遺伝的変種に関連した蛋白質のパネルである。パネルは、予後と関連付けてもよく、例えば、特定タイプの癌と関連付けたマーカーパネルは、癌の一部または全てを根絶する治療の後、癌の再発及び/又は進行を決定するために使用できる。

40

【0465】

パネルは、血液サンプルのスクリーニングにおいても有用であり、スクリーニングを行

50

うべき血液について、多くの感染性物質及び / 又は抗体を含んでもよい。

【 0 4 6 6 】

同様に、多くの濫用物質、環境物質、獣医学的に重大な物質を検出するために、単一サンプルを本発明の方法で分析してもよい。

【 0 4 6 7 】

本発明の利点は、ある症候群を有する疑いがある個体について、この症候群の原因物質を同時に検出するために使用可能なテストパネルの組み立てを可能にする。パネルが有用である他の分野は、研究である。

【 0 4 6 8 】

種々のタイプの使用のために、パネル中に用いられる例示のマーカークループを図 2 8 に示し、後述している。

【 0 4 6 9 】

バイオテロのサンプル分析用パネルは、当業者に知られているように、種々の薬品(agency)脅威リストにある 1 つ又はそれ以上の 3 0 個の病原体および毒素を含むことができる。公衆衛生人員は、疑わしいサンプル中にある病原体の大部分をめったに見ないため、これらを迅速に識別することは困難である。

【 0 4 7 0 】

さらに、多くの病原体感染は、感染した患者で直ちに症状を示さず、数日という長さで遅れた症状の発症があり、病気を制御し、患者を治療するという選択肢に制約がある。

【 0 4 7 1 】

現在の脅威リストにある複数の病原体または毒素を、迅速に検出し識別可能な実用的な監視ネットワークの欠落は、バイオテロを封じる能力において多大な欠点になる。

【 0 4 7 2 】

「保護 / 警告のための検出(Detect to Protect/Warn)」プログラムで動作するバイオ脅威薬品センサは、好ましくは、1) 1 ~ 2 時間の時間ウィンドウ内でバイオ脅威薬品を検出可能であり、出来事に応答する十分な時間を可能にし、2) 維持コストが極めて低く、必要ならば、連続的な監視を可能にし、3) 偽陽性をほとんど排除する十分な選択性を有することである。

【 0 4 7 3 】

米国バイオ - ウオッチプログラムは、エネルギー省、環境保護局(EPA)、米国保健社会福祉省の疾病管理センターが関与している。結局、このプログラムは、120 以上の米国都市で、生物攻撃を検出し、24 時間内で攻撃を報告する能力を有することになる。

【 0 4 7 4 】

バイオ - ウオッチプログラムは、自律ペンタゴン検出システム(APDS: Autonomous Pathogen Detection System)を利用しており、ファイルキャビネットの大きさの機械が、空気を採取し、テストを行い、その結果を報告する。APDS は、フローサイトメータ(cytometer)およびリアルタイムPCR増幅検出器に、サンプル回収、サンプル調製、流体力学を組み込んで、複数の病原体及び / 又は毒素を同時に検出可能である、コンパクトで、自律的に動作する機器を提供する。

【 0 4 7 5 】

該システムは、固定した場所用に設計され、そこでは、空気サンプルを連続的に監視し、特定の生物薬品の存在を自動的に報告する。APDS は、地下鉄システム、輸送ターミナル、大型オフィス複合施設、コンベンションセンターを狙いとし、単一サンプル中で100 に達する異なる薬品および対照(controls)を測定する能力を提供する。

【 0 4 7 6 】

バイオ検出器の最新の進化であるAPDS - II は、ビーズ捕捉免疫学的検定と、複数の生物学的偽物の同時識別のためのコンパクトなフローサイトメータを使用している。

【 0 4 7 7 】

本発明は、APDS システムと同じ要件に限定されず、より迅速に安価で正確に同じ検出を提供することができる。

10

20

30

40

50

【 0 4 7 8 】

さらに、本発明は、医薬、医療検査、診断、予後、監視、及び / 又は治療選択、生物医学研究において、他に多くの応用を有する。

【 0 4 7 9 】

幾つかの実施形態では、本発明は、規制された薬剤および物質の検出、治療服用量の監視、健康状態、移植目的のためのドナー適性、妊娠（例えば、絨毛性ゴナドトロピンまたは α - フェトプロテイン）、病気の検出、例えば、エンドトキシン、癌抗原、病原体などに、使用可能である。

【 0 4 8 0 】

幾つかの実施形態では、本発明は、化学および生物学的化合物および治療薬剤を検出するように、当業者によって適応可能であり、以下に限定されないが、抗自己免疫欠損症候群物質、抗癌物質、抗生物質、抗ウイルス物質、酵素、酵素基質、酵素抑制剤、神経毒、オピオイド、催眠剤、抗ヒスタミン剤、トランキライザ、抗痙攣剤、筋弛緩物質および抗パーキンソン物質、抗痙攣および筋収縮物質、縮瞳および抗コリン作用物質、免疫抑制物質（例えば、シクロスポリン(cyclosporine)）、抗緑内障溶質、抗寄生生物及び / 又は抗原生動物溶質、抗高血圧物質、解熱および消炎剤（例えば、非ステロイド消炎性薬剤）、局部麻酔薬、眼科、プロスタグランジン類、抗うつ剤、抗精神病物質、鎮吐剤、造影剤、特定ターゲット剤、神経伝達物質、蛋白質、細胞応答調整剤、などを検出する。

【 0 4 8 1 】

蛋白質は、幅広い治療学および診断学で対象となり、例えば、細胞群、血液型、病原体、病原体への免疫応答、免疫複合体、糖類、レクチン、天然由来レセプタなどの検出などである。

【 0 4 8 2 】

幾つかの実施形態では、例えば、感染症または炎症の臨床診断用のマーカーのパネルが用いられる。

【 0 4 8 3 】

サンプルは、ラベル付けされ、単一サンプル中で多くの感染物質、例えば、以下に限定されないが、バクテリア、ウイルス、真菌、マイコプラズマ、リケッチア、クラミジア、プリオンおよび原虫、に関連した抗原や抗体を検出し、そして、自己免疫疾病に関連した自己抗体についての分析、性感染症の物質についての分析、肺疾患、胃腸障害、心臓血管疾患、神経疾患、筋骨格疾患、皮膚疾患などに関連した検体についての分析、を行う。

【 0 4 8 4 】

臨床診断用のパネルは、特定疾患または病理学状態、例えば、炎症用マーカーに関連した状態の存在についての他のマーカーを含んでもよい。

【 0 4 8 5 】

例えば、敗血症の診断用に、下記診断マーカーの種々の組合せが使用でき、例えば、炎症バイオマーカー T R E M - 1、炎症バイオマーカー I L - 6 と I L - 8、真菌感染バイオマーカー、大腸菌、例えば、複数の特定の菌株についての 1 つ以上の病原体マーカー、黄色ブドウ球菌、例えば、複数の特定の菌株についての 1 つ以上の病原体マーカー、口そうカンジダ、例えば、複数の特定の菌株についての 1 つ以上の病原体マーカー、エンテロバクター、例えば、複数の特定の菌株についての 1 つ以上の病原体マーカー、そして、他の臨床マーカー、必要ならば、負の対照(control)などである。

【 0 4 8 6 】

幾つかの実施形態では、臨床診断は、敗血症の存在または不在の決定、例えば、T R E M - 1、肺サンプル用には、肺炎（例えば、人工呼吸器の患者）の存在または不在の決定のための 1 つだけのマーカーに基づくものでもよい。

【 0 4 8 7 】

診断は、血漿、血清または B A L サンプルを用いて行ってもよい。診断は、分析したサンプルから得られる値と、正常および異常（例えば、罹患した）人々についての値との比較に基づくものでもよい。

10

20

30

40

50

【0488】

幾つかの実施形態では、市中肺炎の診断のためのマーカーパネルを使用してもよく、これらは、下記の何れかまたは全ての組合せである。例えば、炎症バイオマーカー T R E M - 1、炎症バイオマーカー I L - 6 と I L - 8、炎症バイオマーカー I L - 10 と I L - 12、必要に応じて I L - 18、ウイルス感染バイオマーカー S A A、肺炎連鎖球菌、例えば、複数の特定の菌株についての1つ以上の病原体マーカー、R S (Respiratory Syncytial) ウイルス、例えば、複数の特定の菌株についての1つ以上の病原体マーカー、ヘモフィルス、例えば、複数の特定の菌株についての1つ以上の病原体マーカー、マイコプラズマ、例えば、複数の特定の菌株についての1つ以上の病原体マーカー、そして、他の臨床マーカー、必要ならば、負の対照(control)などである。

10

【0489】

例えば、バクテリア病原体用のパネルが、当業者に明らかとなろう。文献 (Dunbar et al. 2003. J Microbiol Methods 53:245-52) を参照。

【0490】

感染疾病の検出および診断は、しばしば複数の抗体についてのテストを必要とする。従って、特定の抗体は、下記の組合せの検出用のパネルを用いて、評価してもよく、例えば、アデノウイルス、百日咳菌、カンピロバクター感染菌、クラミジア肺炎菌、トラコーマ病原体、コレラトキシン、コレラトキシンb、クロストリジウム・フィリフォルム(Clostridium piliforme) (チザー病)、サイトメガロウイルス、ジフテリアトキシン、エクトロメリアウイルス、E D I M (Epidemic diarrhea of infant mice)、エンセファリトゾーン症虫道、エプスタイン・バー E A、エプスタイン・バー N A、エプスタイン・バー V C A、H B V コア、H B V エンベロープ、H B V 表面 (A d)、H B V 表面 (A y)、H C V コア、H C V N S 3、H C V N S 4、H C V N S 5、ヘリコバクター・ピロリ、A 型肝炎、D 型肝炎、H E V o r f 2 3 K D、H E V o r f 2 6 K D、H E V o r f 3 3 K D、H I V - 1 g p 1 2 0、H I V - 1 g p 4 1、H I V - 1 p 2 4、H P V、H S V - 1 g D、H S V - 1 / 2、H S V - 2 g G、H T L V - 1 / 2、インフルエンザ A 型、インフルエンザ A 型 H 3 N 2、インフルエンザ B 型、ドノバン・リーシュマニア、ライム病、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、M 肺炎、M 肺結核、微小ウイルス、流行性耳下腺炎、肺マイコプラズマ、パラインフルエンザウイルス 1、パラインフルエンザウイルス 2、パラインフルエンザウイルス 3、パルボウイルス、マウス肺炎ウイルス、ポリオウイルス、ポリオーマウイルス、レオウイルス - 3、R S V、風疹、麻疹、センダイウイルス、T クルージ(cruzi)、T 淡そう球 1 5 k d、T 淡そう球 p 4 7、テタヌストキシン、タイラー・マウス脳脊髄炎ウイルス、トキソプラズマ、水痘帯状ヘルペスなどである。

20

30

【0491】

イソタイプのパネルが、検出、特徴付け、抗体免疫不全疾患の類似、例えば、多重の骨髄腫、H I V 感染、実質性器官の腫瘍、または慢性肝炎などに、有用である。

【0492】

こうしたパネルは、特に、特定の病気、例えば、応答者 / 不応答者の状態、増加または異常なアレルギー、自己免疫疾患、G I 疾患、悪性腫瘍、胸部症候、または再発バクテリア感染、に関連した種々の I g G 欠損など、において全てのレベルの一定のイソタイプのものを測定するのを求める研究者にとって有用である。

40

【0493】

パネルは、例えば、I g A、I g E、I g G 1、I g G 2 アルファ、I g G 2 ベータ、I g G 3、I g M、および軽鎖 (カッパまたはガンマ)、の組合せを含んでもよい。

【0494】

臨床医および研究者に有用な、複数の異なるプロテインキナーゼのホスホ - トランスフェラーゼ活性を検出するために、基質蛋白パネルは、A T P と混合してもよく、例えば、異なる色コードの抗体、例えば、ビオチン化レポーター抗体、および共役ストレプトアビジン - フィコエリトリン、と接触してもよい。そして、各反応は、ただ1つのラベルによ

50

って検出できる。

【0495】

パネルは、例えば、Akt、Akt/PKB（トータル）、Akt/PKBpS473、ATF2（Thr71）、Erk-2、Erk1（Thr202/Tyr204）、Erk1/Erk2（Thr202/Tyr204）、Erk2（Thr202/Tyr204）、GSK-3ベータ、IkappaB-アルファ pS32、IkappaB-アルファ トータル、JNK（pTpY183/185）、JNKトータル、JNKp（Thr183/Y182）、MARKAP K2、p38（トータル）、p38 MAPK pT180/pY182、p53（トータル）、p53 pS15、PKB-アルファ、PKC、SAPK1a/JNK2、SAPK4、STAT1pY701、STAT1トータル、STAT3（Tyr705）、ZAP-70などの組合せを含むものでもよい。

10

【0496】

システムは、変性タンパク、例えば、特定の抗体を用いた修飾によるリン酸化蛋白質、を検出してもよい。システムは、1つ又はそれ以上のタイプの個別分子の1つ又はそれ以上の修飾を検出できる。

【0497】

正常および、癌などの組織改造を含む疾病状態を検出するために、マトリクス・メタロプロテイナーゼ（MMP）の酵素ファミリーのパネルが有用であり、MMP-1、MMP-12、MMP-13、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9を含んでもよい。

20

【0498】

他のパネルは、癌バイオマーカー、例えば、アルファ-フェトプロテイン、PSA、癌抗原125、癌胚抗原の組合せや、心臓病マーカー、例えば、クレアチンキナーゼ-MB、エンドセリン1、PAP、TIMP-1や、アルツハイマー病用のマーカーのパネルを含む。

【0499】

アレルゲンのパネル、例えば、マルチ-検体アレルギーテストの応用では、例えば、アレルゲン限定の抗体用のターゲットとして機能する異なるアレルゲンを使用してもよく、第2ラベル分子が、抗ヒトIgEを用いて、反応を終了させる。

30

【0500】

こうしたパネル用の例示のアレルゲンは、アルテルナリア属（モールド）、バミューダグラス、猫のふけ、卵の白身、ミルク、ダニのプテルノイシヌス（Pternoyssidinus）、山スギ（Cedar）、ブタクサ、オオアワガエリおよび小麦（食品）などを含む。

【0501】

同様な手順が用いられ、例えば、自己免疫抗体を検出するために、ASCA、ベータ2ミクログロブリン、動原体（Centromere）B、クロマチン、ENAプロファイル4（SSA、SSB、Sm、RNP）、ENAプロファイル5（SSA、SSB、Sm、RNP、Scl-70）、ENAプロファイル6（SSA、SSB、Sm、RNP、Scl-70、Jo-1）、ヒストン、ヒストンH1、ヒストンH2A、ヒストンH3、ヒストンH4、HSP-27 pS82、HSP-27トータル、HSP-32、HSP-65、HSP-71、HSP-90a、HSP-90b、Jo-1、PCNA、PR3、PR3（cANCA）、リボソームP、RNP、RNP-A、RNP-C、SCF、Scl-70、血清アミロイドP、SLEプロファイル8（SSA、SSB、Sm、RNP、Scl-70、Jo-1、リボソームP、クロマチン）、Sm、スミス（Smith）、SSA、SSB、ストレプトリジンO、TPOなどの抗原を用いる。

40

【0502】

血管形成（例えば、人間の血管形成）の分析のために、さらに他のパネルを用いてもよく、例として、IL-8、bFGF、VEGF、アンジオゲニン、およびTNFの組合せを含んでもよい。

【0503】

50

細胞活性化（例えば、人間の細胞活性化）の分析のために、他のパネルを用いてもよく、例として、IL - 8、β FGF、VEGF、アンジオゲニン、およびTNFの組合せであり、B細胞の活性化（例えば、人間のB細胞活性化）のためのパネルは、例として、CD79b（Igβ3）、BLNK、Btk、Syk、およびPLCγの組合せを含んでもよく、T細胞の活性化（例えば、人間のT細胞活性化）のためのパネルは、例として、TCRζ、SLP - 76、ZAP - 70、Pyk2、Itk、およびPLCγの組合せを含んでもよい。

【0504】

炎症マーカー（例えば、人間の炎症）のためのパネルは、例えば、IL - 8、IL - 1β、IL6、IL10、TNF、IL - 12p70、そして、他のサイトカインや当業者に明らかとなるバイオマーカーの組合せを含んでもよい。

10

【0505】

ケモカイン（例えば、人間のケモカイン）のためのパネルは、例えば、IL - 8、RANTES、KC（マウス）、モノカイン誘導インターフェロン - γ、単球 - 化学誘引物質プロテイン - 1、マクロファージ炎症性プロテイン - 1α、マクロファージ炎症性プロテイン - 1β、インターフェロン - γ誘導プロテイン10の組合せを含んでもよい。

【0506】

アポトーシス（例えば、人間のアポトーシス）のためのパネルは、例えば、開裂PARP、Bcl - 2、活性カスパーゼ - 3プロテインの組合せを含んでもよい。

20

【0507】

人間の過敏症毒素(anaphylotoxins)のためのパネルは、例えば、過敏症毒素C4a、3a、5aの組合せを含んでもよい。

【0508】

アレルギーメディエータ（例えば、人間のアレルギーメディエータ）のためのパネルは、例えば、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 7、IL - 9（マウス）、IL - 10、IL - 13（マウス）、エオタキシン（CCL11）顆粒球刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子の組合せを含んでもよい。

【0509】

研究および診断の両方のために、サイトカインは、多くの状態、病気、病理学などのマーカーとして有用であり、幾つかの異なるパネルに含まれてもよい。

30

【0510】

現在、100以上のサイトカイン/ケモカインが存在しており、その調和または非調和規則は、臨床的な対象となる。特定の疾患プロセスをサイトカインレベルの変化と関連させるために、理想的な手法は、複数のサイトカイン用の各サンプルを分析する必要がある。

【0511】

マーカーパネルに現在使用され、本発明の方法および組成物で用いられるパネルで利用できる例示的なサイトカインは、以下に限定されないが、BDNF、CREB pS133、CREBトータル、DR - 5、EGF、ENA - 78、イオタキシン(Eotaxin)、脂肪酸結合プロテイン、EGF - ベーシック、G - CSF、GCP - 2、GM - CSF、GRO - KC、HGF、ICAM - 1、IFN - アルファ、IFN - ガンマ、IL - 10、IL - 11、IL - 12、IL - 12 p40、IL - 12 p40 / p70、IL - 12 p70、IL - 13、IL - 15、IL - 16、IL - 17、IL - 18、IL - 1アルファ、IL - 1ベータ、IL - 1ra、IL - 1ra / IL - 1F3、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 9、IP - 10、JE / MCP - 1、KC、KC / GROα、LIF、リンフォトキシン、M - CSF、MCP - 1、MCP - 1 (MCAF)、MCP - 3、MCP - 5、MDC、MIG、MIP - 1アルファ、MIP - 1ベータ、MIP - 1ガンマ、MIP - 2、MIP - 3ベータ、OSM、PDGF - BB、RANTES、Rb (pT821)、Rb (トータル)、Rd pSpT249 / 252、Tau (pS214)、Tau (pS396)、Tau (ト

40

50

ータル)、組織因子、TNF - アルファ、TNF - ベータ、TNF - RI、TNF - RII、VCAM - 1、VEGFなどを含む。

【0512】

パネルはまた、内分泌マーカー、例えば、糖尿病または甲状腺マーカーのために設計してもよく、臨床的研究所において、またはライフサイエンス研究者にとって有用である。

【0513】

例示の内分泌マーカーは、アジポネクチン(Adiponectin)、アミリン、C - ペプチド、カルシトニン、CRF、FGF - 9、GLP - 1、グルカゴン、成長ホルモン、インスリン、レプチン、リポプロテイン、レシスチン(Resistin)、T3、T4、TBG、チログロブリン、TSHなどを含む。

【0514】

代謝マーカーも、研究または臨床応用にとって有用であり、アポリポプロテインA - 1、アポリポプロテインA - I、アポリポプロテインA - I I、アポリポプロテインB、アポリポプロテインC - I I、アポリポプロテインC - I I I、アポリポプロテインE、ベータ2グリコプロテイン、コラーゲン型1、コラーゲン型2、コラーゲン型4、コラーゲン型6、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ、臍島細胞、tTG(セリアック病)などを含む。

【0515】

臨床的研究所および研究者は、例えば、対象となる複対立遺伝子を検出することによる組織型別(tissue typing)のため、しばしば複数の核酸シーケンスの同時取り調べを必要とする。適切なパネルは、HLAクラスIとII、HLAクラスI単一抗原抗体、グループ1、HLAクラスI単一抗原抗体、グループ2、PRAクラスI、PRAクラスIとII、PRAクラスII、SSOクラスI HLA - A、SSOクラスI HLA - B、SSOクラスI HLA - C、SSOクラスII DP、SSOクラスII DQB1、SSOクラスII DRB1、SSOクラスII DRB3, 4, 5の組合せを含んでもよい。

【0516】

妊娠パネルは、妊娠個体における、例えば、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、B型肝炎表面抗原、風疹ウイルス、アルファフェトプロテイン、3'エストラジオール、および対象となる他の物質のためのテストを備えてもよい。

【0517】

本発明の分析器の感度は、いままでにないマーカーおよびマーカーパネルの設計および実施を可能にするものであり、腫瘍や遺伝的異常などの異常なレベルのマーカーの存在に関する単に簡単な肯定/否定の答えだけではなく、例えば、状態の発症などの早期の決定など、より洗練された分析、およびマーカーの正常な範囲と個体で見つかるレベルとのより正確な比較をも決定できると理解されよう。

【0518】

現在の分析方法は、対応した潜在的な病理学的状態が、治療が有効でないか、または僅かに有効なだけである段階に到達した場合、しばしばマーカーの検出のみを可能にする。例えば、多くの癌に関する現在の検出レベルは、癌がかなり進行したレベルでのみしか検出が可能でない。

【0519】

本発明の方法は、早期の検出だけでなく、正常個体で存在するものの、異常に高くまたは低いレベルで病理学的存在を示すマーカーについて、正常個体に関するベースラインレベルの確立を可能にする。

【0520】

従って、本発明は、1つ又はそれ以上のバイオマーカーの検出及び/又は定量化に基づいて、病気または病理学的の早期検出の方法を含む。

【0521】

典型的には、個体、例えば、人間からの血液、血漿または血清サンプルなどのサンプル

10

20

30

40

50

中のバイオマーカーの濃度は、正常または異常である値と比較される。分析器および分析器システムは、検出および診断で現在用いられているものよりかなり低い程度、例えば、現在、定量化可能なレベルの0.1、0.01、0.001または0.0001倍程度で、正常および病気の人々の両方についてのバイオマーカーのレベルを決定するために、用いてもよい。

【0522】

こうして、データベースは、所定の状態について正常または異常なレベルについて作成することができ、個体はスクリーニングされて、該状態は、以前では可能であったものよりかなり早期に検出されるようになる。

【0523】

代替として、データベースは、正常または異常な値に関して既存のものでもよいが、現在の方法は、マーカーについての個体の値が正常な範囲にあるか否かを決定するためのルーチンベースで、十分な感度での個体スクリーニングについては実用的でない

【0524】

例えば、サンプル中のIL-6濃度決定のための多くの現在の方法は、約5 pg/mlの濃度までのIL-6のみを検出できる。IL-6の正常範囲は、約1～約10 pg/mlである。よって、現在の方法は、正常範囲の上側部分にあるIL-6を検出できるに過ぎない。

【0525】

これに対して、本発明の分析器および分析器システムは、約0.1 pg/ml未満、あるいは正常範囲の値の1/10より低い濃度までのIL-6の検出を可能にする。

【0526】

こうして、本発明の分析器および分析器システムにより、より広範でより繊細なデータベースが、バイオマーカー、例えば、IL-6について作成可能になり、正常範囲の内側および外側にあるバイオマーカーについてスクリーニングが可能になり、早期検出が可能になる。

【0527】

こうした本発明の早期検出方法は、1つ又はそれ以上のバイオマーカーが存在または発見でき、あるいは状態の発症または進行と相関してデータベースの値が得られる、何れの病気または状態の検出についても使用できる。

【0528】

一例として、癌の診断は、腫瘍の成長、例えば、腫瘍自体の可視化のおおまかな測定の使用にしばしば依存する。これは、不正確であり、あるいは、例えば、現在の方法による実用的な臨床設定において、これらが検出可能になる前の高いレベルに到達する必要がある。

【0529】

検出の段階では、腫瘍は、転移前に診療行為(intervention)が生じないような十分なサイズにまでしばしば成長する。例えば、X線による肺癌の検出は、直径1 cmより大きい腫瘍を要し、CTスキャンでは2～3 mmより大きいものを要する。

【0530】

代替として、腫瘍成長のバイオマーカーが使用できる。腫瘍は、バイオマーカーが現在の臨床技術にアクセス可能なレベルで検出可能になる時間までに、しばしば早く進行する。

【0531】

さらに、診療行為(例えば、腫瘍を収縮させたり除去するための手術、化学療法または放射線)の後、残存した病気が、更なる診療行為が成功しそうな段階まで進行するまで、癌が再発したかを決定するのに十分な感度で、腫瘍マーカーを測定することがしばしば不可能になる。

【0532】

本発明の分析器、システムおよび方法を用いれば、例えば、転移の低い可能性により、

10

20

30

40

50

診療行為が成功するであろう段階で、腫瘍成長の発症および腫瘍成長の再発の両方を検出することができる。

【0533】

よって、本発明は、1) 以前から存在していたバイオマーカーに関して、病気の診断または監視に有用な極めて低いレベルでスクリーニングを行う方法、2) 上記1) で発見されたり、現に知られているバイオマーカーの検出に基づいて、現在可能なものよりかなり低いレベルで、病気の発症についてのスクリーニングを行う方法、3) 病気の再発などの影響を検出するための、現在可能なものより、かなり高い能力でもって、治療の方針または実験的治療の有用性を監視する方法、を提供する。

【0534】

これらは、状態の存在、不在、進展の見込み、または進行の程度について、個体をテストするための方法を含む。状態は、病理学的なものでも、非病理学的なもの(例えば、加齢、妊娠)でもよい。

【0535】

例示の病理学的状態は、一般的な病理学的状態、例えば、糖尿病、心臓病、関節炎、癌など多くの特定の病理学的状態と関連した炎症などを含む。

【0536】

病理学的状態はまた、以下に限定されないが、癌、炎症状態、及び/又は自己免疫疾患、心臓血管疾患、胃腸障害、皮膚疾患、神経疾患、遺伝的障害、感染症、加齢、アレルギーなどを含む、より多くの特定の状態も含む。

【0537】

癌は、以下に限定されないが、肺、胃、脾臓、食道、卵巣、乳房、前立腺、膀胱、結腸、直腸の癌を含む。

【0538】

該方法は、本発明の分析器または分析器システムを用いて、1つ又はそれ以上マーカーについて個体からのサンプルを分析することを含み、分析器または分析器システムは、1ナノモル、1ピコモル、1フェムトモル、1アトモルまたは1zeptomol未満のレベルのマーカーを検出できる。

【0539】

幾つかの実施形態では、分析器または分析器システムは、バイオマーカーが、1ナノモル、1ピコモル、1フェムトモル、1アトモルまたは1zeptomol未満の濃度で存在して、サンプルのサイズが、約100、50、40、30、20、10、5、2、1、0.1、0.01、0.001、0.0001 μ l 未満である場合、一方のサンプルから他方のサンプルへ、約0.1、1、2、5、10、20、30、40、50、60または80%未満のマーカー濃度変化を検出できる。

【0540】

幾つかの実施形態では、分析器または分析器システムは、検体が約1ピコモル未満の濃度で存在し、各サンプルのサイズが約50 μ l 未満である場合、第1サンプルから第2サンプルへ、約20%未満の濃度変化を検出できる。

【0541】

幾つかの実施形態では、分析器または分析器システムは、検体が約100フェムトモル未満の濃度で存在し、各サンプルのサイズが約50 μ l 未満である場合、第1サンプルから第2サンプルへ、約20%未満の濃度変化を検出できる。

【0542】

幾つかの実施形態では、分析器または分析器システムは、検体が約50フェムトモル未満の濃度で存在し、各サンプルのサイズが約50 μ l 未満である場合、第1サンプルから第2サンプルへ、約20%未満の濃度変化を検出できる。

【0543】

幾つかの実施形態では、分析器または分析器システムは、検体が約5フェムトモル未満の濃度で存在し、各サンプルのサイズが約50 μ l 未満である場合、第1サンプルから第

10

20

30

40

50

2 サンプルへ、約 20 % 未満の濃度変化を検出できる。

【0544】

幾つかの実施形態では、分析器または分析器システムは、検体が約 5 フェムトモル未満の濃度で存在し、各サンプルのサイズが約 5 μ l 未満である場合、第 1 サンプルから第 2 サンプルへ、約 20 % 未満の濃度変化を検出できる。

【0545】

幾つかの実施形態では、分析器または分析器システムは、検体が約 1 フェムトモル未満の濃度で存在し、各サンプルのサイズが約 5 μ l 未満である場合、第 1 サンプルから第 2 サンプルへ、約 20 % 未満の濃度変化を検出できる。

【0546】

該方法はさらに、状態の存在、不在または進行の程度を決定するために、検体から得られた値を、バイオマーカーに関する既知の値と比較することを含む。該方法はさらに、比較の結果を個体に知らせたり、あるいは、前記比較に基づいて、治療の方針、予後または診断を決定することを含むことができる。

【0547】

幾つかの実施形態では、該方法は、個体からの複数のサンプルを分析することを含み、これらはしばしば連続した時間に渡って採取されるものであり、そして、テストされる特定の状態についてマーカー濃度の変化の程度及び/又は変化レートを決定することと、その程度及び/又は変化レートを、正常値及び/又は異常値と比較することを含む。

【0548】

状態の存在、不在または進行を決定する際に高機能なレベルを増加させる場合、絶対的な値および変化レートなども用いてもよいと理解されるであろう。

【0549】

一例において、本発明は、個体の肺癌の存在、不在または進行をスクリーニングする方法を提供する。

【0550】

幾つかの実施形態では、個体は、肺癌について高いリスクにある人間であってもよく、こうした個体は、例えば、喫煙や職業上の被爆、例えば、アスベスト被爆などによる肺の発癌性物質に曝された個体、そして、約 50 年、55 年、60 年、65 年、70 年または 80 年の年齢の個体、または、既存の肺癌または他の癌についての治療を受けている個体などを含む。

【0551】

本発明は、1 ナノモル、1 ピコモル、1 フェムトモル、1 アトモルまたは 1 ゼプトモルのレベルでマーカーを検出できる分析器を用いて、肺癌及び/又は 1 つ又はそれ以上の特定タイプの肺癌、例えば、小細胞癌など、の 1 つ又はそれ以上のマーカーに関して、個体からの痰(sputum)、BAL、血液、血清または血漿サンプルを分析することを含む。

【0552】

幾つかの実施形態では、検出レベルは、1 ピコモル未満である。

【0553】

幾つかの実施形態では、分析器または分析器システムは、バイオマーカーが、1 ナノモル、1 ピコモル、1 フェムトモル、1 アトモルまたは 1 ゼプトモル未満の濃度で存在して、サンプルのサイズが、約 100、50、40、30、20、10、5、2、1、0.1、0.01、0.001、0.0001 μ l 未満である場合、一方のサンプルから他方のサンプルへ、約 0.1、1、2、5、10、20、30、40、50、60 または 80 % 未満のマーカー濃度変化を検出できる。

【0554】

幾つかの実施形態では、分析器または分析器システムは、バイオマーカーが約 1 ピコモル未満の濃度で存在している場合、約 5 μ l 未満のサンプルセットにおいて約 20 % 未満の濃度変化を検出できる。

【0555】

10

20

30

40

50

該方法はさらに、個体での肺癌の存在、不在または進行の程度を決定するために、分析で得られた値を、バイオマーカーに関する既知の値と比較することを含む。該方法はさらに、比較の結果を個体に知らせたり、あるいは、前記比較に基づいて、治療の方針、予後または診断を決定することを含むことができる。

【0556】

幾つかの実施形態では、ある時間に渡って同じ個体から得られたバイオマーカーのレベルについての値を相互に比較することと、上述のように、肺癌についての診断、予後、見込みの程度、進行の程度を決定することを含む。

【0557】

さらに、本発明の方法は、例えば、治療の結果及び/又は治療のテストの成果を決定するために、パネルの発見および使用の感度を増加させることができる。

10

【0558】

例えば、癌組織を削減または除去する方法を必要とする癌の治療において、癌がどれぐらの速さでいつ再発するかを知るのに有用である。

【0559】

本方法の感度は、こうした情報を、再発のかなり早期の段階で、かなり高い精度で入手可能になり、病状の再発でより早期の段階でアクションをとることができる。

【0560】

これは、当然ながら、以前は正常な個体での病気の発症のスクリーニングについても同様である。

20

【0561】

さらに、本発明の分析器および方法についての感度およびマルチプレキシングにより、種々のタイプの臨床、研究、農業および工業の応用について、本発明の方法の使用が可能になる。

【0562】

こうして、バイオマーカーのパネルは、スクリーニングおよび他の研究応用で使用されるように、反復性のある分析物のために設計することができる。分析の感度が、今まで生物医学的研究で用いられていたものより大幅に高いためであり、今まで可能であったものよりはるかに低いレベルでマーカーの変化を検出することができ、そして新しいバイオマーカーを発見し使用することが可能になる。

30

【0563】

幾つかの実施形態では、以前は使用されていない新しいバイオマーカーがバイオマーカーのパネルにおいて使用でき、あるいは、低い感度のレベルで以前使用していたバイオマーカーが、本発明のパネルにおいて使用できる。

【0564】

従って、幾つかの実施形態では、本発明の方法は、個体からのサンプルを、2つの取り調べ空間を持つ単一粒子検出器で分析することを含み、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50100、または100以上のタイプの粒子が検出可能であり、もし存在すれば、単一サンプル中で、1 nM、1 pM、100 fM、10 fM、5 fM、4 fM、3 fM、2 fM、1 fM、0.5 fM、0.1 fM、0.01 fM、0.001 fM、0.0001 fM、0.00001 fM、または0.000001 fM未満の感度で検出可能である。

40

【0565】

粒子の個々のタイプは、異なる検出レベルを有ししてもよい。

【0566】

本発明の方法は、増加した感度およびサンプルを多重処理する能力を提供することから、この方法で必要なサンプルのサイズは、相応に減少させることができる。

【0567】

本発明の幾つかの実施形態では、サンプルは生物学的流体であり、例えば、体液（例えば、血清）であり、サンプルサイズは、1000、500、200、100、75、50

50

、40、30、20、10、5、4、3、2、1、0.1、0.01、0.001、または0.0001 μ l未満にできる。

【0568】

こうしたサンプルで分析できる粒子の異なるタイプの数、1つ、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、100、または100以上でもよい。

【0569】

幾つかの実施形態では、サンプルサイズは、約1 μ l ~ 約500 μ l、約10 μ l ~ 約200 μ l、約10 μ l ~ 約100 μ l、約10 μ l ~ 約50 μ l、または約50 μ lであり、分析される粒子タイプ数は、約1 ~ 約50、約1 ~ 約20、または約1 ~ 約10

10

【0570】

幾つかの実施形態では、サンプルの分析は、一定時間間隔で生ずる。

【0571】

幾つかの場合、分析は、約1日内、または約12、8、4、2、1、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.01、または0.01未満の時間内で行われる。

【0572】

ある実施形態では、本発明は、2つの取り調べ空間を持つ単一粒子検出器を用いて、複数のサンプルを分析する方法を提供するものであり、各サンプルは、平均で1時間未満、0.5時間未満、0.2時間未満、または0.1時間未満、または5、4、3、2、1、0.5、または0.1分未満で分析される。

20

【0573】

一実施形態では、本発明は、2つの取り調べ空間を持つ単一粒子検出器を用いて、臨床サンプルを分析する方法を提供するものであり、各サンプルは、平均で1時間未満、0.5時間未満、または0.1時間未満で分析される。

【0574】

一実施形態では、本発明は、個体が病気を患っているか否かを決定する方法を提供するものであり、2つの取り調べ空間を持つ単一粒子検出器を用いて、バイオマーカーの存在、不在または濃度について、個体からのサンプルを分析することを含み、サンプルの分析は、2時間未満、1時間未満、0.5時間未満、0.25時間未満、0.1時間未満、または0.01時間未満で行われる。

30

【0575】

該方法はまた、個体からのサンプルを取得すること、及び/又は分析の結果を個体に報告することを含む。

【0576】

一実施形態では、本発明は、分析の結果を、サンプルが採取された個体またはその代理人に報告することを含む方法を提供するものであり、2つの取り調べ空間を持つ単一粒子検出器を用いて、TREM-1の存在、不在または濃度について個体からのサンプルを分析することを含み、サンプルの分析は、1時間未満で行われる。

40

【0577】

粒子の存在、不在または濃度の検出は、サンプルが採取された個体、またはサンプルが採取された個体のためのヘルス職業介護者に報告される。

【0578】

幾つかの実施形態では、診断、予後、監視、及び/又は提案された治療方針が、粒子の存在、不在または濃度に基づいて行われる。

【0579】

幾つかの実施形態では、診断、予後、監視、及び/又は提案された治療方針は、サンプルが採取された個体、または代理人、サンプルが採取された個体のためのヘルス職業介護者に報告される。

50

【 0 5 8 0 】

本発明の方法は、研究者またはヘルス職業者など個人に、研究または臨床または前臨床のトライアルを評価するための情報を提供する能力をも提供することは理解されよう。

【 0 5 8 1 】

例えば、遺伝情報および病気と決定遺伝子の突然変異との関連の入手可能性は、研究および臨床の分析の豊富な分野を生成している。

【 0 5 8 2 】

遺伝情報（即ち、遺伝変異性を決定するための核酸の分析）およびプロテオミクス(proteomic)情報（即ち、遺伝変異性の発現を決定するための実際の蛋白質の分析）の両方は、研究および臨床の設定において有用である。

10

【 0 5 8 3 】

一般に、決定遺伝子の突然変異についての情報に基づく研究または診断の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）およびその変形の使用を必要としていた。

【 0 5 8 4 】

本発明の感度は、核酸の増幅の必要性なしで、核酸または蛋白質またはその両方から突然変異の事象の検出を可能にする。

【 0 5 8 5 】

さらに、多くの蛋白質の存在、不在及び／又は濃度での変化は、その発現は特定の遺伝的構成に関連しており、及び／又は病理学的状態は、本発明の方法によって容易に検出できるものであり、例えば、病理学的状態での影響に関してテストされる薬品の影響について、迅速で敏感なスクリーニングを可能にする。

20

【 0 5 8 6 】

多くの異なるマーカー、例えば、蛋白質は、同時に検出してもよく、及び／又は、単一サンプル中で定量化してもよい。

【 0 5 8 7 】

本発明の追加の工業的および環境的な応用は、プロセス制御、環境モニタリングおよび食品安全を行うことを含む。

【 0 5 8 8 】

例えば、土壌、水、空気などの環境源や、廃棄流、水資源、供給ライン、生産ロットなどの工業源からのサンプルは、汚染について分析できる。確からしい汚染の例は、殺虫剤、石油製品、工業副産物、有機体などである。

30

【 0 5 8 9 】

同じ汚染物質の多くは、食品供給に懸念され、特に、穀類中の菌、肉類、猟鳥獣類(game)、製品または日用製品の中のバクテリアなどの有機体である。

【 0 5 9 0 】

工業的応用は、生物学的反応などの発酵媒体の品質制御、または醸造などの食品発酵プロセスを含む。

【 0 5 9 1 】

更なる態様において、本発明は、ビジネスを行う方法を提供する。一実施形態では、本発明は、サンプルの分析結果を得るために、2つの取り調べ空間を持つ、単一粒子（例えば、単一の分子）を検出可能な検出器の団体(entity)による使用と、前記結果を報告することと、結果の報告について団体への支払いとを備えるビジネスを行う方法を提供する。

40

【 0 5 9 2 】

幾つかの実施形態では、検出器は、ここで説明した実施形態の何れでもよい。

【 0 5 9 3 】

幾つかの実施形態では、該団体は、CLIA(Clinical Laboratory Improvement Amendments)研究所である。幾つかの実施形態では、該団体は、CLIA研究所ではない。サンプルは、単一粒子検出器によって分析可能なサンプルの何れのタイプでもよい。

【 0 5 9 4 】

幾つかの実施形態では、サンプルは、個体からのものである。この個体は、ここで説明

50

したような何れのタイプの個体でもよい。

【0595】

幾つかの実施形態では、個体は、スクリーニング、診断、予後、監視及び/又は治療方法の決定が望まれている患者(例えば、動物や人間)である。

【0596】

幾つかの実施形態では、個体は、臨床試験または前臨床試験の研究に参加している個体(例えば、動物や人間)である。

【0597】

幾つかの実施形態では、サンプルは、例えば、生物医学的研究、農業的研究、工業的研究、教育的研究、バイオテクノロジー研究などの研究プロジェクトの一部である個体からのものである。

10

【0598】

幾つかの実施形態では、支払いは、結果の報告を受け取る個人、例えば、ヘルスケア職業者、及び/又は、サンプルが採取された個人によって、分析を実施する団体、例えば、C L I A 研究所に対して行ってもよく、あるいは、支払いは、サンプルが採取された個人によって、分析を実施する団体からの報告を受け取る個人、または団体自体、またはその両方もしくはこれらの組合せに対して行ってもよい。

【0599】

他の実施形態では、本発明は、ビジネスを行う方法を提供するものであり、個体からのサンプルの分析結果を得るために、2つの取り調べ空間を持つ、単一粒子を検出可能な検出器のヘルスケア提供者による使用と、前記結果を個体またはこれらの代理人に報告すること、前記結果報告について個体による支払いとを備える。

20

【0600】

(実施例)

下記実施例は、例として提供されものであり、残る開示を限定するものではない。

【0601】

DNA断片、粒子、蛋白質、ウイルス、核酸と結合したオルガネラをポンプ供給して、電気泳動にかけた。

【0602】

データは、次のように分析した。フォトンを収容する隣接ビン(bin)を、分析ソフトウェアを用いて粒子から導出されるフォトンバーストにグループ分けした。

30

【0603】

電気泳動を利用する実験について、粒子導出のフォトンバーストは相互相関をとって、これらの電気泳動速度(2つの検出器での検出時間オフセット)を決定した。

【0604】

(実施例1: DNA断片の検出 - 電気泳動速度および希釈曲線)

A 6 4 7を用いてラベル付けした7.2 kbのDNA断片を使用して、核酸の電気泳動を示した。M 1 3 m p 1 8 R F I DNA (ニューイングランドバイオラボ社(New England Biolabs, Beverly, MA)を、S m a Iによって単一の制限酵素認識部位(single restriction)において消化した(digest)した。

40

【0605】

得られた7.2 kbの断片は、U L Y S I S (登録商標)核酸ラベリングキット(モレキュラープローブ社(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR))を用いて、製造者の指示に従って、アレクサフルオル647 (AlexaFluor647)でラベル付けした。

【0606】

アレクサフルオルでラベル付けしたDNAの濃度は、260 nmでの吸収度から決定した。アレクサフルオルの濃度は、650 nmでの吸収度から決定した。

【0607】

ラベリングの程度は、DNA粒子当たり190個の染料(dye)であった。原液から階段希釈(serial dilution)を行って、0.03と100 f Mの間の濃度範囲に作成した。

50

【 0 6 0 8 】

各サンプルは、本発明で説明した分析器に投入して、4分間、電気泳動にかけた。

【 0 6 0 9 】

0 および 0.1 f M の DNA を持つサンプルの粒子相互相関のヒストグラムプロットの例を、図 6 に示す。

【 0 6 1 0 】

0.1 f M では、9 個の粒子のピークが 142 m s で検出され、一方、バックグラウンドサンプルは、-78 m s で 1 個の粒子を有していた。

【 0 6 1 1 】

検出した粒子の数と、100 f M までのサンプル濃度との間は、線形関係を示した。

10

【 0 6 1 2 】

(実施例 2 : バイオマーカー用のサンドイッチ分析試料)

最近の報告は、TREM-1 を、バクテリアまたは菌の感染のバイオマーカーとして確立した (文献 (Bouchon et al. (2000) J. Immunol. 164:4991-5; Colonna (2003) Nat. Rev. Immunol. 3:445-53; Gibot et al. (2004) N. Engl. J. Med. 350:451-8; Gibot et al. (2004) Ann. Intern. Med. 141:9-15.) を参照) 。

【 0 6 1 3 】

TREM-1 用の分析試料は、サンドイッチ分析試料フォーマットを用いて開発した (個々の分子検出用のサンドイッチ分析試料、米国仮特許出願第 60 / 624785 号) 。 TREM-1 用の分析試料試薬は、R & D システム社 (R & D Systems, Minneapolis, MN) から商業的に入手可能である。

20

【 0 6 1 4 】

分析評価は、96 個のウエルプレート中で行った。モノクローナル抗体は、捕捉試薬として使用した。他のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体は、検出のために使用した。検出抗体は、アレクサフルオル 647 (AlexaFluor647) (登録商標) でラベル付けた。

【 0 6 1 5 】

分析手順は、下記のとおりであった。

1. プレートは捕捉抗体でコートして、5 回洗浄。

2. 1 % BSA、PBS の 5 % 蔗糖でブロック。

3. 希釈ターゲットを血清に添加し、培養して、5 回洗浄。

4. 検出抗体を添加し、培養して、5 回洗浄。

5. 0.1 M のグリシン pH 2.8 を添加し、プレートから、結合した試料成分を遊離。

30

6. 処理プレートから検出プレートへサンプルを移し、サンプルの pH を中性とし、単一粒子分析器システムで走らせる。

【 0 6 1 6 】

図 7 は、分析試料を用いて生成した TREM-1 の標準曲線を示す。分析試料は、100 ~ 1500 フェムトモルの測定範囲で線形であった。R & D システム社からの ELISA 試料は、最近、導入された。これらの ELISA 試料について報告された標準曲線は、60 ~ 4000 pg / ml の間である。

40

【 0 6 1 7 】

この実施例は、我々が、標準曲線において 100 f M (4.7 pg / ml) をルーチンで測定可能であることを示唆しており、約 10 倍以上の感度を可能にしている。

【 0 6 1 8 】

IL-6 の検出用に構成されたサンドイッチ分析試料も、商業的に入手可能な試薬 (R & D システム社) を用いて開発した。

【 0 6 1 9 】

手順は、ターゲット希釈および捕捉抗体ペアが R & D システム社によって説明したものである点以外は、TREM-1 に関して上述したものとほぼ同じである。検出抗体は、ア

50

レクサフルオル 6 4 7 を用いてラベル付けした R & D システム社の抗体であった。

【 0 6 2 0 】

分析試料は、I L - 6 の検出を 0 . 5 p g / m l 未満で可能にした (図 8 A と 図 8 B) 。検出の限界は、0 . 0 6 p g / m l と計算された。この感度レベルは、0 . 5 と 1 0 p g / m l の間の範囲にある I L - 6 の通常レベルの検出に優れている。

【 0 6 2 1 】

I L - 6 を含む商業的に入手可能な多重処理した分析試料と比較して、このシステムは、検出レベルで著しい改善を提供する。

【 0 6 2 2 】

R & D システム社の分析と比較して、検出限界はほぼ同じ (図 8 C) であるが、このシステムは、マルチプレキシングの利点を提供し、増幅ステップに依存しない。これらの 2 つは、R & D システム社の分析では必要である。

【 0 6 2 3 】

単一粒子分析器システムは、分子の全体 (ensemble) 測定を行うもののと比べて、低い濃度溶液で個々の分子を計数することによって定量化が行われる点で、E L I S A データと相違する。フォーマットは、後者よりもより正確である。

【 0 6 2 4 】

(実施例 3 : ビーズベースの分析評価)

上述した 2 つの分析試料は、同じマイクロタイタープレートのフォーマットを使用しており、プラスチック表面がターゲット分子を固定化するために用いられる。

【 0 6 2 5 】

結合していない部分から結合の分離を達成するために、単一粒子分析器システムは、マイクロ粒子またはビーズを用いて溶液中で行われる試料評価と互換性がある。

【 0 6 2 6 】

図 9 は、甲状腺刺激ホルモン (T S H) を検出する、ビーズベースの分析評価の結果を示す。このデータは、サンドイッチ分析試料が、ビーズベースのフォーマットに直接に移送可能で、該システムで使用可能であることを示す。

【 0 6 2 7 】

超常磁性のストレプトアビジンのマイクロビーズ (ミルテンニバイオテック社 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA)) を、ビオチン化抗 T S H 捕捉抗体を用いてコートした。

【 0 6 2 8 】

0 ~ 2 0 0 f M の T S H の希釈は、リン酸緩衝生理食塩水の中で過剰なマイクロビーズを用いて、4 での培養によって捕捉した。

【 0 6 2 9 】

捕捉した T S H を持つマイクロビーズは、高い傾斜磁気分離コラムで回収し洗浄した (ミルテンニバイオテック社) 。

【 0 6 3 0 】

ビーズは、コラムから除去して、アレクサフルオル 6 4 7 (モレキュラープローブ社 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)) を用いてラベル付けした抗 T S H 検出抗体を用いて、2 時間、3 7 で培養した。

【 0 6 3 1 】

捕捉 T S H と結合した検出抗体を持つビーズは、回収して、リン酸緩衝生理食塩水を用いて洗浄し、コラムから除去した。

【 0 6 3 2 】

ビーズは、5 0 ~ 2 0 0 フェムトモル T S H の測定範囲で線形な応答を生成する粒子分析システムで走らせた (図 9) 。

【 0 6 3 3 】

(実施例 4 : 人間血清中のターゲット蛋白質の検出)

血清中のターゲットを検出するために、上述したものと同様なサンドイッチ分析試料を開発した。

10

20

30

40

50

【0634】

この分析試料では、既知の量のTSHを、10%の人間血清を含有するサンプルに添加した。TSHに限定的なラベル付けした抗体を添加し、結合していないラベルを除去し、サンプルを単一粒子分析器システムで走らせた。

【0635】

その結果は、図10に示すように、添加したTSH全てが分析において回収された。

【0636】

(実施例5: サブ f M 濃度の核酸ポリマーの検出)

3DNA(登録商標)デンドリマー(dendrimer)は、多く分岐し、相互連結した核酸粒子からなる粒子である。ジェニスフェア社(Genisphere Inc., Hatfield, PA)から入手した、A647でラベル付けした4層のデンドリマーを、粒子の電気泳動を示すために用いた。

10

【0637】

製造者は、デンドリマーは、20 ng / μ l の濃度で、デンドリマー当り約375染料を用いてラベル付けした、約37000のデオキシヌクレオチドを含むと明記する。これらの製造者仕様を、サンプルのモル濃度を計算するために用いた。

【0638】

原液から階段希釈を行って、0.03と33 f Mの間の濃度範囲に作成した。各サンプルは、本発明で説明した分析器に投入して、4分間、電気泳動にかけた。

【0639】

20

0および0.03 f Mのデンドリマーを持つサンプルについて、粒子相互相関のヒストグラムプロットの例を、図11に示す。

【0640】

0.03 f Mでは、全部で17.6個の粒子が163 ms および227 ms のピークで検出され、一方、バックグラウンドサンプルは、119 ms で1個の粒子を有していた。

【0641】

検出した粒子の数と、33 f Mまでのサンプル濃度との間は、線形関係を示した。

【0642】

0および0.03 f Mのサンプルについて、隣接フォトンバーストの相互相関の結果の例を図12に示す。後者は、フォトンのピークが206 ms で検出され、一方、バックグラウンドサンプルは0個の検出フォトンを持つことを示した。

30

【0643】

(実施例6: BSAの検出 - SDS 電気泳動および希釈曲線)

蛋白質の電気泳動を示すために、A647でラベル付けしたウシ血清アルブミン(BSA)を用いた。BSAは、製造者の指示に従って、A647カルボン酸(のスクシンイミジルエステルを用いて共有結合でラベル付けした(モレキュラープローブ社Molecular Probes, Inc., Eugene, OR))。

【0644】

共役でないアレクサフルオルは、マイクロコン(Microcon)YM-30膜(ミリポール社Millipore Corporation, Bedford, MA)の限外ろ過によって、蛋白質から分離した

40

【0645】

A647ラベル付けBSAの濃度は、280 nmでのアレクサフルオルの関与について補正して、280 nmでの吸収度から決定した。アレクサフルオルの濃度は、650 nmでの吸収度から決定した。ラベリングの程度は、蛋白質粒子当り1.9個のアレクサフルオルであった。

【0646】

原液から階段希釈を行って、0.03と30 f Mの間の濃度範囲に作成した。

【0647】

各サンプルは、本発明で説明した分析器に投入して、4分間、電気泳動にかけた。

【0648】

50

0 および 1 0 f M の蛋白質を持つサンプルの粒子相互相関のヒストグラムプロットの例を、図 1 3 に示す。

【 0 6 4 9 】

1 0 f M では、3 0 個の粒子のピークが 4 2 7 m s で検出され、一方、バックグラウンドサンプルは、2 5 0 m s と 6 0 0 m s で 4 個の粒子を有していた。

【 0 6 5 0 】

検出した粒子の数と、3 0 f M までのサンプル濃度との間は、線形関係を示した。

【 0 6 5 1 】

(実施例 7 : ウイルスの検出 - 電気泳動移動度)

ウイルスの検出を示すために、M 1 3 K 0 7 を A 6 4 7 ゼノン (Zenon) ラベル付け抗 G P 8 抗体と結合した。

【 0 6 5 2 】

抗 G P 8 抗体は、ゼノン (登録商標) I g G ラベリングキット (モレキュラープローブ社 Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)) を用いて、室温で 5 分間でラベル付けした。

【 0 6 5 3 】

3 . 7 p M の M 1 3 K 0 7 ニューイングランド・バイオラボ (New England Biolabs, Beverly, MA) を、1 1 0 p M のラベル付けした抗 G P 8 抗体とともに、1 x P B S 中で、4 で夜通し培養した。

【 0 6 5 4 】

ラベル付けしたファージは、反応物を S - 4 0 0 H R スピンコラムに 2 回かけることによって、自由な抗体から精製した。

【 0 6 5 5 】

S - 4 0 0 コラムからの溶出液は希釈し、本発明で説明した分析器に投入して、4 分間、電気泳動にかけた。

【 0 6 5 6 】

粒子相互相関のヒストグラムプロットの例を、図 1 4 に示す。ウイルス粒子の移動度は、電流の関数で増加した。また、ウイルスの濃度は、各条件で同じであったが、4 分間で検出した粒子の数は、最も遅いサンプル (1 μ A) で最小であり、予想より高い速度で増加した。

【 0 6 5 7 】

(実施例 8 : バクテリアおよびウイルスの検出)

免疫学的検定を用いて、バクテリアやウイルスなどの有機体全体を測定するために、分析試料を開発した。

【 0 6 5 8 】

図 1 5 は、微生物を検出するために使用した分析結果を示す。大腸菌 K 1 2 J M 1 0 9 を検出するために、ビーズベース分析試料を用いた。細胞は、アレクサフルオル 6 4 7 (登録商標) と共役した抗体 (ウサギポリクローナル) とともに、1 時間、室温で培養した。

【 0 6 5 9 】

バクテリア懸濁液を 0 . 2 ミクロンフィルタを通して遠心分離し、細胞に結合した抗体から、結合していない抗体を分離した。

【 0 6 6 0 】

細胞を 8 回洗浄し、遊離バッファ (0 . 1 M グリシン p H 2 . 8) 中に再懸濁させ、1 0 分間培養した。遊離溶液は、フィルタを通して遠心分離し、中和し、粒子分析システムで走らせた。

【 0 6 6 1 】

ウイルスの検出に関して、希釈した原液からの M 1 3 ファージ粒子 (ニューイングランド・バイオラボ (New England Biolabs, Beverly, MA)) は、室温での培養により、マイクロタイタープレートのウェルと受動的に結合したような分析試料を用いた。ウェルは、吸引し、3 0 分間、ブロックした。

10

20

30

40

50

【0662】

抗M13抗体は、ゼノン（登録商標）（モレキュラプローブ社）を用いてラベル付けし、1000 ng/mlでウエルに添加した。プレートは、1時間培養し、洗浄し、結合した材料は0.1M グリシン pH 2.8を用いて遊離し、中和し、単一粒子分析器システムで走らせた。

【0663】

図15のデータを生成するために用いた分析評価は、バックグラウンドを低減し、検出を最大化し、または分析時間を最小化するように最適化した。最適化は、より低い検出限界を可能とし、2時間で結果が得られた。

【0664】

大腸菌をモデルとして選択することの理論的根拠は、抗体の入手可能性と検出の分析評価である。

【0665】

大腸菌は、よく研究され、その鎖が主に抗原型に基づいて区別される多様な有機体である。このことは、特徴付けを通じて、現在では700を超える数である多くの抗原型を区別するために開発された多数の抗体に反映されている(www.textbookofbacteriology.net)。

【0666】

これは、分析評価開発にとって利点と欠点の両方である。利点は、選択すべき多くの候補の抗体が存在することであり、高い品質のものを見つける可能性が高い。欠点は、特殊性の問題を極めて注意深く処理する必要があることである。

【0667】

理想的には、対象となる抗原型だけを検出し、他のものは検出しない抗体ペアを選択できる。現実には、捕捉及び/又は検出抗体は、対象となる鎖と限定的に反応し、他の鎖とほとんど相互花脳しない抗体プールで構成する必要がある。

【0668】

特別に懸念されるものは、臨床サンプルのどこにでも存在し、ありふれた汚染物質である非病原性の鎖である。最善の抗体をうまく選択することは、冗長でルーチンの選別プロセスが必要になる。

【0669】

本発明の分析器および分析器システムの高いスピードは、この選別プロセスの完了を劇的に容易にする。

【0670】

抗体プールを用いた場合、各抗体の濃度をバランスさせて、それぞれ関連した鎖の均一な検出を提供するようにする。

【0671】

非病原性の大腸菌鎖との相互反応性をテストするのに加えて、相互反応性を、他の病原体、例えば、ブドウ球菌、エンテロバクター、カンジダ、シュードモナス鎖などについて調査する。これらの他の病原体を限定的に検出する分析試料が開発されている。

【0672】

臨床試験が行われるときおよび一定の前に、各分析試料が、そのターゲット病原体を限定的に検出し弁別することを確保するために、広範な相互反応性テストが行われる。

【0673】

血液サンプル中のバクテリア濃度は、活性敗血症を持つ患者からのサンプル中であっても低いことは予想される。各バクテリアは、その限定的抗体について多くの結合部分を含むため、分析試料が「ビルトイン」増幅を有する場合であっても、追加の増幅ステップが必要になるかもしれない。

【0674】

追加の信号増幅ステップは、これらの免疫学的検定で可能であり、本発明の分析器による検出と互換性があることは説明した。増幅は、検出抗体と共役したアルカリ性ホスファ

10

20

30

40

50

ターゼの酵素活性によって達成される。例えば、ストレプトアビジンと共役したアルカリ性ホスファターゼ(Roche, Basel, Switzerland)は、固定化したビオチンと結合する。

【0675】

結合していない酵素を除去するために洗浄した後、非蛍光性アルカリ性ホスファターゼ基質が添加され、サンプルともに数分間培養する。共役の抗体酵素によって生成した蛍光物質の個々の分子は、分析機器で計数する。

【0676】

このタイプのモデル実験では、アルカリ性ホスファターゼは、0 ~ 150 分子 / 200 μ l の既知の濃度に希釈し、そして、基質 (9 H - (1, 3 - ジクロロ - 9, 9 - ジメチルアクリジン - 2 - ONE - 7 - yl) リン酸、ジアンモニウム塩 [DDAO - リン酸塩、モレキュラープロブ社]) と反応させ、蛍光物質に開裂させた。

10

【0677】

この反応は、37、60 分間、培養した。この反応はを停止し、ここで説明した 2 - 取り調べ空間分析器で走らせた。

【0678】

図 29 は、各酵素濃度での計数した蛍光物質分子の数を示す。200 μ l サンプルからは、10 個より少ない酵素分子が検出された。

【0679】

この基本的な方法論は、直接的なバクテリアまたはウイルス検出が、関連する臨床測定にとって敏感でない場合、または分析の感度を、以前では特徴付けしていない領域まで拡張したい場合に、採用される。

20

【0680】

信号のこの酵素増幅は、上述したように、個々のバクテリアを検出するためにも使用でき、あるいは、酵素 - リガンド共役が結合可能であり、結合していない酵素 - リガンドは除去されたり不活性になるような任意の検体を検出するためにも使用できる。

【0681】

血液中の大腸菌を検出するために、血液サンプル中の大腸菌が、培養成長したバクテリアと同じように行動するように、試薬および条件が定義され、正確な濃度測定は標準曲線から決定できる。

【0682】

30

分析評価は、生育可能および生育不能な有機体の両方を検出ようになるため、分析評価は、培養によって示されるものより多数のターゲットの有機体の存在を明らかにできる。

【0683】

患者サンプル中での治療用抗生物質の存在は、該システムを用いたバクテリア検出に影響を及ぼすとは予想していない。血液は、バクテリアターゲットへの分析抗体の結合を干渉し得る多くの分子を含む。所望の結合反応を最大化し、他の全てを最小化する条件を定義することは重要である。

【0684】

(実施例 9 : 質量タグを用いたラベリングが、蛋白質複合体の電気泳動速度をシフトさせる)

40

ストレプトアビジンラベル付け PBXL - 3 (PBXL - 3 / SA) (マルテック・バイオサイエンス社(Martek Biosciences Corp., Columbia, MD)) は、ビオチンラベル付けした 1 kb の PCR 断片 (b - NA) と組み合わせて、結合相互作用の検出を示した。

【0685】

等モル濃度の PBXL - 3 / SA および b - NA (800 pM) を、室温で少なくとも 1 時間、10 nM トリス中で培養し、0.1 % カゼイン加水分解物を持つ 0.5 mM の EDTA pH 8.1 をキャリアとした。

【0686】

PBXL - 3 / SA 単独、およびビオチン無し (NA) で同じ 1 kb の断片をもつ PBX

50

L - 3 / S A の対照培養も行った。

【0687】

培養に続いて、サンプルは10000倍に希釈し、最終濃度を2 mM トリスで8 f M、0.1 mM の E D T A p H 8.1 とした。サンプルは、本発明で説明した分析器に投入して、4 分間、電気泳動にかけた。

【0688】

粒子相互相関のヒストグラムプロットの例を、図16に示す。核酸の不在では、オルガネラ (P B X L - 3 / S A) 368 でのピークとして移動した (パネル A) 。

【0689】

核酸と結合すると、より早く移動し、294 m s のピークシフトが見られた (パネル B) 。

【0690】

409 m s でのピークとして移動するオルガネラ中で得られる反応物中のその存在 (ビオチンタグ無し) により、核酸がオルガネラと結合すると、シフトだけが発生した (パネル C) 。

【0691】

(実施例 10 : 移動度による2つの粒子の弁別 - ふるい無しの電気泳動)

ウイルスと核酸の弁別を示すために、M13K07をA647ゼノン (Zenon) ラベル付け抗GP8抗体と結合した。抗GP8抗体は、3倍過剰のゼノンA647を用いて、室温で5分間ラベル付けした。

【0692】

3.7 p M の M 1 3 K 0 7 (ニューイングランド・バイオラボによって報告されたブラーク形成ユニットに基づく) を、110 p M のラベル付け抗GP8抗体とともに、1 x P B S 中で室温で1時間培養した。反応物を4 で一晩保存した。

【0693】

ラベル付けしたファージは、反応物をS-400HRスピンコラムに2回かけることによって、自由な抗体から精製した。

【0694】

溶離したサンプルは、10000倍希釈し、本発明で説明した分析器に投入して、4分間、電気泳動にかけた。

【0695】

核酸サンプルは、M13K07から派生した1 k b の P C R 断片であり、A647でラベル付けされていた。全てのサンプルは、8 f M の全体濃度で走らせた。

【0696】

粒子相互相関のヒストグラムプロットの例を、図17に示す。P C R 核酸断片およびウイルス / 抗体の組合せの両方が存在している場合、2つのピークが245 m s と296 m s に分解される (パネル A) 。

【0697】

ラベル付けした核酸単独は、302 m s でのピークで移動した (パネル B) 。抗体と結合したウイルス単独は、222 m s でのピークで移動した (パネル C) 。

【0698】

(実施例 11 : 移動度による2つの粒子の弁別 - 直鎖ポリアクリルアミドを用いた S D S 電気泳動)

A647でラベル付けしたI g Gおよび1.1 k b の P C R 部分のサンプルを、18 m M トリス、18 m M グリシン、p H 8.6、0.2 % の直鎖ポリアクリルアミド (L P A 、5000000 ~ 6000000 M W) 、0.01 % のドデシル硫酸ナトリウム、および、それぞれ1 μ g / m l のウシ血清アルブミン (フィコル F i c o l l (登録商標)) 、およびポリビニルピロリドンで調製した。

【0699】

サンプルを、分析器毛細管にポンプ供給して、ポンプを停止し、電界を印加した (30

10

20

30

40

50

0 V / c m)。

【0700】

粒子の相互相関を時間オフセットの関数で決定した。1 分間データを回収し分析した。

【0701】

粒子相互相関のヒストグラムプロットの例を、図 18 に示す。

【0702】

パネル A は、A 6 4 7 でラベル付けした I g G だけを 2 6 f M の濃度で含むサンプルは、7 5 m s での相互相関事象のピークを示したことを表し、I g G が 2 つの取り調べ空間を移動するのに必要な時間である。

【0703】

パネル B は、A 6 4 7 でラベル付けした P C R 部分だけを 1 0 f M の濃度で含むサンプルは、2 2 0 m s での相互相関事象のピークを示したことを表し、P C R 部分が 2 つの取り調べ空間を移動するのに必要な時間である。

【0704】

パネル C は、A 6 4 7 でラベル付けした I g G および P C R 部分を、それぞれ 1 3 f M および 5 f M の濃度で含むサンプルは、一方が 7 5 m s、他方が 2 1 5 m s での相互相関事象の 2 つのピークを示したことを表し、分析評価は、説明した分析条件下で、分析器においてこれらの異なる移動時間に基づいて、これらの 2 つ分子を弁別することが可能であることを示した。

【0705】

(実施例 1 2 : 粒子の間接検出 - ターゲット分子から遊離したラベルの検出)

ビオチン化した抗甲状腺刺激ホルモン (T S H) 抗体を、ストレプトアビジンでコートした 9 6 個のウエルプレートに固定し、余分な結合していない抗体を洗い流した。

【0706】

T S H 抗原および A 6 4 7 ラベル付けした抗 T S H 抗体を、1 % のウシ血清アルブミン (B S A)、0 . 1 % の T w e e n (登録商標) 2 0 を有するリン酸緩衝生理食塩水のウエルに添加した。

【0707】

プレートを攪拌で培養した。液体を吸引によって除去し、ウエルを 3 回洗浄した。A 6 4 7 ラベル付け抗体は、0 . 1 M のグリシン - H C l、P H 2 . 8 との培養により、T S H サンドイッチから解離した。

【0708】

自由な A 6 4 7 ラベル付け抗体を回収して希釈し、S M D によって分析した。

【0709】

遊離したラベルと元のターゲット粒子濃度との線形関係を、図 1 9 A に示す。

【0710】

核酸のラベリングおよびラベルの遊離のために類似の方法が利用できることは、当業者によって理解されるであろう。マツレイ等 (Matray et al.) は、蛋白質および核酸の両方についてラベリングおよびラベル遊離の方法を教示している (Matray, 2004)。当業者は、ターゲットの蛋白質および核酸から遊離したラベルの混合物の分離および弁別が、元のターゲットについてのものと本質的に同じであることを認識するであろう。

【0711】

図 1 9 B と図 1 9 C は、分析器を用いて、2 つのラベルを弁別するための 2 つの可能な方法を示している。

【0712】

(実施例 1 3 : 強度による 2 つの粒子の弁別)

固有の蛍光性である蛋白質複合体 (complex) P B X L - 3 は、核酸、A l e x a F l u o r (登録商標) 6 4 7 を用いてラベル付けした線状化 p U C 1 9 と比べて、単位時間当たり多くの光子を発生する。

【0713】

10

20

30

40

50

pUC19 DNAを、Alexa Fluor (登録商標) 647を用いて、ULYSIS (登録商標) 核酸ラベリングキット (モレキュラープローブ社(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)) の手順に従ってラベル付けした。

【0714】

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (10 mMのリン酸ナトリウム、150 mMのNaCl、pH 7.2) に、0.01% カゼイン加水分解物 (シグマ-アルドリッチ社(Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri)) で補充して、蛋白質単独、核酸単独または両方の混合物からなる希釈系列 (2.5、5、7.5、10、20 fM) を作成するために用いた。サンプルは、1 μ L / 分で、4 分間ポンピングを行うことにより、分析器の中を移動させた。

10

【0715】

データは、平均バックグラウンドを超える 4 つの標準偏差より大きい検出信号の相互相関によって分析した。

【0716】

図 20A と図 20B は、蛋白質複合体および核酸についての相互相関をとった信号のプロットを示す。経過時間の範囲は、ピーク内事象自体のみを示し (図 20A と図 20B を参照)、異なる蛋白質複合体および核酸の特徴的な蛍光強度を強調するように限定した。

【0717】

500 個のフォトンの輝度レベルを、カットオフ点として選択し、蛋白質複合体については明るい強度のウィンドウと、核酸については低い強度のウィンドウを分離した。

20

【0718】

2 つの分子種を弁別するこの手法を用いて、検出した事象の数を、蛋白質複合体および核酸の両方について濃度系列で測定した。

【0719】

標準曲線を、蛋白質複合体および核酸について両方の輝度ウィンドウを用いてプロットし、そして曲線の傾斜を決定した。

【0720】

3 つの異なる混合物において、蛋白質複合体および核酸をこれらの蛍光強度に基づいて弁別した。PBXL-3 と pUC19 の混合物中で検出した分子の数を、標準曲線の傾斜に基づいて各成分の濃度を計算するために用いた。

30

【0721】

蛋白質および核酸についての測定した濃度と予測値との比較により、サンプル中で検出された分子の数を標準曲線と比較することによって、サンプル成分の濃度を決定できることを示す (図 20C)。

【0722】

さらに、分子の計数によって決定した濃度は、サンプルを調製するために用いた未希釈原液のマクロスケールの分光によって決定される濃度と極めて一致している。

【0723】

(実施例 14 : 単一粒子の性質を測定するための生物学的検定(bioassay))

生物学的粒子に関して広く用いられる分析試料は、抗体を捕捉して検出するために結合する 2 つのエピトープ(epitopes)の同時存在を検出可能なサンドイッチ ELISA 分析試料を含む。これらは、典型的には、2 つのエピトープに制限されており、感度が低く (典型的には pM またはそれ以上)、単一のエピトープだけを持つ粒子を検出することができない。

40

【0724】

蛍光共鳴エネルギー転送 (FRET) 方法は、競合分析評価においてしばしば用いられ、2 つのエピトープの同時存在を検出するが、感度が低い。

【0725】

質量分光は、しばしば、大きな粒子を、分析用に十分な揮発性を持つ断片に分裂する必要がある、サンプル数全体について修正を平均化している。

50

【 0 7 2 6 】

本発明の S M D 分析器は、生物学的分析評価で使用可能な重要な利点、即ち、高い感度と、バルク状態ではなく、粒子または分子複合体を単独で測定する能力と、電気泳動速度に基づく粒子の弁別と、単一試料内で複数の波長を監視する能力とを提供する。

【 0 7 2 7 】

これらの利点は、ターゲット粒子についての複数の電磁放射特性を検出し、そして、これらの電気泳動速度を決定するという分析器のユニークな機能的な能力によって達成される。

【 0 7 2 8 】

(1 4 A . サンドイッチ分析試料)

異種の分析フォーマットでは (図 2 1 A)、ターゲット粒子を含有するテスト溶液が、ターゲット粒子に限定的な抗体を用いてコートしたビーズと反応する。ターゲットは、ビーズ上で捕捉され、結合していない材料は洗い流される。

【 0 7 2 9 】

そして、ビーズ - ターゲット複合体は、ターゲットに限定的に結合する蛍光タグとともに培養され、ラベル付けサンドイッチを生成する。

【 0 7 3 0 】

本発明の分析器は、ラベル付けサンドイッチを検出し、その電気泳動速度を決定するために使用される。

【 0 7 3 1 】

同種の分析フォーマットでは (図 2 1 B)、ビーズ - ターゲット - ビーズ複合体を同じ方法で形成するが、結合していない材料を除去しない。

【 0 7 3 2 】

ターゲットサンドイッチおよびタグ単独の異なる電気泳動速度は、これらを弁別するために用いる。

【 0 7 3 3 】

(1 4 B . 2 色弁別)

第 2 の応用は、同種の分析フォーマットにおいて、単一ターゲット粒子上の 2 つのラベルの同時検出を利用する。この手法において、結合していないラベルは、ターゲットに結合したものから分離しない。

【 0 7 3 4 】

サンプルは、第 1 取り調べ空間での第 1 発光波長についての検出器と、第 2 取り調べ空間での第 2 発光波長についての検出器とを有する本発明の分析器において、電気泳動にかけることが可能である。

【 0 7 3 5 】

粒子は、両方の取り調べ空間で検出されるが、両方のラベルのスペクトル上の指紋を有する粒子だけが計数される。

【 0 7 3 6 】

異なる電気泳動速度は、結合していないラベルと結合したラベルを弁別するために用いる。2色分析評価の例を、図 2 2 A に示す。

【 0 7 3 7 】

同種のサンドイッチ試料は、単一蛋白質粒子の翻訳後 (post-translational) 変異 (modification) パターンを決定するために使用できる。

【 0 7 3 8 】

変異に関して複数の可能性ある場所を持つ蛋白質粒子は、各変異について特定のラベルと反応する。各特定ラベルは、唯一の蛍光スペクトルを有する。反応混合物は、例えば、各取り調べ空間での複数の検出器を通過する電気泳動によって移動して、蛋白質ラベル付け複合体のスペクトル上の指紋 (異なる波長のチャネルでのフォトンの比率) が記録される (図 2 6 B を参照)。さらに、種々のラベル付けした成分の電気泳動速度は、決定可能である。

10

20

30

40

50

【0739】

これは、単一チャネルにおいてターゲット粒子と結合していないラベルとの偶然の一致によるバックグラウンドを低減する。

【0740】

複数の検出器からのスペクトル上の指紋は、同じ粒子と結合した一对のラベルを識別し、従って、これは単一粒子に生ずる翻訳後変異に対応している。

【0741】

この手法は、単一粒子に関するデータを得るため、蛋白質集団の平均レベルの変異の測定より多くの情報を提供する。

【0742】

平均測定値は、単独で多様に変異した蛋白質同士を弁別できない。例えば、変異1を持つ1つの蛋白質と、変異2を持つ1つの蛋白質との混合物は、変異していない蛋白質と、平均的な変異レベルを得る方法による両方の変異を持つものとの組合せから区別できなくなる。本発明の分析器は、これらの粒子を明確に弁別可能である。

【0743】

こうして分析できる変異の例は、組み換え蛋白質および天然蛋白質のグリコシル化パターンの比較、単一蛋白質の複数部分でのリン酸化レベルの決定、蛋白質分解の熟成および蛋白質の分解(degradation)における前駆物質および生成物の同時検出、構造的成分の異なる組合せによって作成される異型蛋白質の比較、リン酸化状態との異型蛋白質の相関関係などの、変異の組合せ、などを含む。

【0744】

(14C. 作用試料/拮抗試料の結合)

第3の応用は、ラベルの結合に影響を与える物質の分析試料において、2つのラベル付けた粒子の検出を利用する。

【0745】

各粒子は、スペクトル上でユニークなラベルの組合せを用いてラベル付けする。

【0746】

結合に関して競合する作用物質および拮抗物質の存在下で、結合したラベルおよび結合していないラベルの割合が、各々または両方のラベルのスペクトル上の指紋を持つ粒子を計数することによって、決定される。この試料の例を図22Bに示す。

【0747】

この試料に関する応用は、触媒および調節酵素サブユニット、転写因子を伴う核酸、リガンドを伴うレセプタ、およびこれらの基質を伴う酵素、の結合への影響に関する薬剤成分のスクリーニングなどを含む。

【0748】

(14D. FRETを用いた競合分析評価)

1. cAMP試料 環状AMP(cAMP)依存キナーゼ

【0749】

cAMPの不在下で、触媒(C)および調製(R)サブユニットの不活性四量体(C₂R₂)として存在する。cAMPが結合した場合、四量体は解離して、活性触媒サブユニットを遊離する。

【0750】

cAMP用の試料において、触媒および調製サブユニットは、一对のFRET蛍光団を用いてラベル付け可能である。例えば、調製サブユニットは、ドナー蛍光団を用いてラベル付け可能であり、触媒サブユニットは、アクセプタ蛍光団を用いてラベル付け可能である。

【0751】

cAMPの不在下では、ドナーとアクセプタが近くに接近すると、エネルギーはドナーからアクセプタへ転送され、光子がアクセプタから発生する。

【0752】

10

20

30

40

50

c A M P のが存在している場合、ドナーとアクセプタは近くに接近せず、アクセプタから光子は発生しない。

【0753】

本発明の分析器は、バルク測定に通常用いられるこの技術に対して、単一粒子レベルの検出感度を提供する。2色分析評価の例を図22Cに示す。

【0754】

2. 競合リガンド結合分析評価

レセプタ(R)およびリガンド(L)は、ドナーおよびアクセプタ蛍光団を用いてラベル付けできる。リガンドがレセプタと結合した場合、ドナーおよびアクセプタが近くに接近すると、光子がアクセプタから発生する。

【0755】

ラベル付けしていないリガンド(例えば、分析すべきサンプルから)の存在下では、ラベル付けリガンドは、レセプタから変位することができ、ドナーおよびアクセプタは近くに接近せず、アクセプタから光子は発生しない。

【0756】

ラベル付けしていないリガンドの既知の量と、光子を発生するアクセプタの数とを関連付けた校正曲線が作成できる。

【0757】

サンプル中のリガンドレベルは、校正曲線と光子を発生するサンプルアクセプタ粒子の数から推定できる。簡単なFRET分析評価の例を図22Dに示す。

【0758】

3. 作用物質/拮抗物質結合の分析評価

競合リガンド結合分析評価のように、レセプタ(R)およびリガンド(L)は、ドナーおよびアクセプタ蛍光団を用いてラベル付けできる。リガンドがレセプタと結合した場合、ドナーおよびアクセプタが近くに接近すると、光子がアクセプタから発生する。

【0759】

作用物質または拮抗物質の可能性ある結合のサンプルは、レセプタ-リガンド混合物に添加できる。

【0760】

サンプル中の作用物質は、レセプタと結合したラベル付きリガンドの量を増やし、増加した数のアクセプタ粒子が光子を発生する。サンプル中の拮抗物質は、光子を発生するリガンドの数を減少させる。

【0761】

この方法は、薬剤の発見および開発において可能性ある治療効果についての化合物ライブラリーをスクリーニングするために使用できる。

【0762】

本発明のSMD手法は、低い濃度で高い親和性相互作用をスクリーニングするのに、特に、有用である。競合FRET分析評価の例を図22Eに示す。

【0763】

4. 酵素レート分析評価

加水分解酵素活性は、消光剤(quencher)および開裂部分の反対側にあるアクセプタ粒子を用いてラベル付けした基質を用いて分析可能である。

【0764】

無傷基質粒子(消光剤およびアクセプタが接近)の蛍光は、加水分解(消光剤およびアクセプタは接近しない)で変化する。例えば、ペプチド基質は、対象となるプロテアーゼについて開裂部分を含み、一端は蛍光消光剤を用いて、他端はアクセプタを用いてラベル付けできる。

【0765】

無傷基質ペプチドは、消光剤の接近に起因して、ほとんど光子を発生しない。

【0766】

10

20

30

40

50

開裂（生成物）したペプチドは、より多くのフォトンが発生する。蛋白質分解レートは、開裂ペプチド粒子の出現レートによって測定される。酵素 F R E T 分析評価の例を図 2 2 F に示す。

【0767】

本発明の S M D 手法の利点は、数百または数千の粒子の活性の平均の全体測定ではなく、単一粒子に関して酵素活性の速度論(kinetics)が測定可能であることである。

【0768】

本発明の分析器は、結合パートナーが異なる色の蛍光団を用いてラベル付けされる同様な分析評価にも使用できることは、当業者に明らかとなるう。

【0769】

（実施例 15：単一ターゲット粒子の検出のためのラベリング方針）

当業者は、粒子の混合物中でこれらの検出または弁別を可能にするために、ターゲット粒子をラベリングするために多くの方針を採用できる。

【0770】

ラベルは、ラベルとターゲットの非限定または限定の相互作用を利用する方法など、知られた何れの手段で付着することができる。

【0771】

ラベルは、検出可能な信号を提供したり、または電界中の粒子の移動度に影響を及ぼすことができる。

【0772】

さらに、ラベリングは、直接的に、または結合パートナーを通じて達成できる。

【0773】

本発明で使用可能なラベリング方針の例は、以下のとおりである。

【0774】

15 A . 単一粒子検出（図 2 3 を参照）

粒子は、1つの染料(dye)、1つの染料の複数の複製（図 2 3 A）または2つの染料もしくは2つの染料の複数の複製（図 2 3 B）を用いてラベル付けが可能であり、別個の発光強度及び/又は発光波長に基づいて検出することができ、結合していないラベルと弁別可能である。

【0775】

15 B . 1個より多い粒子の電磁特性による検出および弁別（図 2 4 を参照）

1つの染料の複数の複製を用いてラベル付けした粒子は、より少ない数の同じ染料の複製を用いてラベル付けした粒子と、これらの発光強度に基づいて弁別可能である（図 2 4 A）。

【0776】

2つの染料を用いてラベル付けした粒子は、1つの染料だけを用いてラベル付けした粒子と、1つではなく2つの波長で発光することによって弁別可能である（図 2 4 B）。

【0777】

2つの染料の1つ又は複数の複製を用いてラベル付けした粒子は、より少ない数の2つの染料の複製を用いてラベル付けした粒子と、2つの染料の別個の比率を測定することによって弁別可能である（図 2 4 C と図 2 4 D）。

【0778】

異なる蛍光強度を有する2つの染料の1つ又は複数の複製を用いてラベル付けした粒子は、これらの発光波長に基づいて各粒子からの蛍光の全体強度での差によって弁別可能である（図 2 4 E）。

【0779】

染料および電気泳動速度に影響を及ぼすラベルを用いてラベル付けした粒子は、移動度ラベルだけを用いてラベル付けした粒子と、これらの発光スペクトル及び/又は電気泳動速度に基づいて弁別可能である（図 2 4 F）。

【0780】

10

20

30

40

50

1つの染料の1つ又は複数の複製を用いてラベル付けした粒子は、異なる染料の1つ又は複数の複製を用いてラベル付けした粒子と、2つの染料の電磁特性での差に基づいて弁別可能である(図24Gと図24H)。

【0781】

15C. 1個より多い粒子の電気泳動速度による検出および弁別(図25を参照)

電気泳動速度に影響を及ぼすラベルを用いてラベル付けした粒子は、電気泳動速度に影響を及ぼす別個のラベルを用いてラベル付けした粒子と、これらの異なる電気泳動速度に基づいて弁別可能である(図25A)。

【0782】

染料を用いてラベル付けした粒子は、電気泳動移動度に影響を及ぼすラベルを用いてラベル付けした、固有に検出可能な粒子と、これらの発光スペクトル及び/又は電気泳動速度に基づいて弁別可能である(図25B)。

【0783】

(実施例16: 蛍光発光の特徴的強度による2つの粒子の弁別)

高い感度および粒子を単独で観察する能力は、単一粒子の変質レベルの分析に好都合となり得る。

【0784】

例えば、分解(degradation)が予定される蛋白質は、複数のユビキチンを用いてタグ付けできる。ユビキチンのための蛍光ラベルは、サンプルに添加可能であり、ターゲットと結合可能であり、電気運動力によって検出器を通過できる。

【0785】

電気泳動移動度は、自由ラベルを結合ラベルと弁別し、各粒子について検出されるフォトン数は、蛋白質上のユビキチンタグの数に比例する。

【0786】

従って、この分析評価は、平均的な数だけでなく、単一蛋白質粒子当たりのユビキチンタグの数の分布に関する情報を提供する。可能性ある実験の例を、図26Aと図26Bに示す。

【0787】

(実施例17: 蛍光偏光(FP)分析評価)

粒子は、蛍光団を用いてラベル付け可能である。ラベル付けした粒子を偏光した光で励起した場合、発光光も偏光し得る。発光光の偏光度は、ラベルの移動度および蛍光団の蛍光寿命の関数である。

【0788】

ラベル付け粒子がより大きなレセプタ粒子と結合し、その移動度が減少した場合、その偏光は増加する。

【0789】

ラベル-粒子-レセプタ対での変化は、競合リガンド結合、基質結合および酵素活性、例えば、蛋白質キナーゼなど、を含む種々の測定での検出システムとして使用できる。

【0790】

従来のFP測定は、全てのサンプル粒子の偏光を全体で検出するものであり、制限されたダイナミックレンジに悩まされる。

【0791】

分析評価における偏光値の実用的な範囲は、典型的には、約10と約300mPの間となる(Pは、励起面に対して平行(F1)および垂直(F2)である蛍光強度を測定することによって計算される偏光の単位である。 $P = (F1 - F2) / (F1 + F2)$)。この範囲の各端の部分での変化を検出することは困難である。

【0792】

本発明のSMD分析器は、平均的な偏光を提供するというより、高い偏光または低い偏光を有する粒子を1つずつ計数する。蛍光偏光による検出の例を、図27に示す。

【0793】

10

20

30

40

50

(他の態様)

本発明を実用化する際、上述した詳細な説明は当業者に提供される。しかしながら、ここで説明し、請求項に記載した本発明は、ここで開示した特定の実施形態及び／又は態様による範囲に限定されない。これらの実施形態および態様は、本発明の幾つかの実施形態および態様の例示として意図しているからである。

【0794】

何れの均等な実施形態及び／又は態様は、本発明の範囲内であると意図している。

【0795】

実際、ここで図示し説明したものに加えて、本発明の開示の精神または範囲から逸脱せずに、上述した説明から本発明の種々の変形が当業者にとって明らかであろう。こうした変形もまた、添付した請求項の範囲内にあることを意図している、

【0796】

本発明またはその好ましい態様の要素を導入する場合、冠詞"a"、"an"、"the"、"said"は、1つ又はそれ以上の要素があることを意味するものと意図している。

【0797】

用語"comprising"、"including"、"having"は、包含を意図しており、列挙した要素以外に追加の要素が存在し得ることを意味する。

【0798】

(引用文献)

各単一の刊行物、特許、特許出願および他の引用文献が、全ての目的のために個別的に単独に参照により全体としてここに組み込まれべきと示したものと同一程度で、本願における全ての刊行物、特許、特許出願および他の引用文献は、全ての目的のために参照により全体としてここに組み込まれる。

【0799】

ここでの文献引用は、本発明に対する先行技術の承認として解釈すべきでない。本発明の好ましい実施形態は、ここで図示し説明したが、こうした実施形態が例示だけとして提供されていることは当業者にとって自明であろう。

【0800】

多くの変形、変化および置換が、本発明から逸脱することなく、当業者に生ずるであろう。

【0801】

ここで説明した本発明の実施形態への種々の代替が、本発明を実用化する際に採用できると理解すべきである。

【0802】

下記の請求項は、本発明の範囲を定義し、これらの請求項およびこれらの均等の範囲内の方法および構造は、これらによって網羅されることを意図している。

【図面の簡単な説明】

【0803】

【図1】本発明のサンプル分析システムの一実施形態の概略図。

【図2】本発明の方法の一実施形態の概略図。

【図3】本発明の一実施形態の単一粒子分析器の概略図。

【図4】本発明の一実施形態の単一粒子分析器のための毛細管フローセルの概略図。

【図5】共焦点配置を有する本発明の一実施形態の単一粒子分析器の概略図。

【図6】7.2 kbのDNA断片の電気泳動および希釈曲線。A) バッファブランク中の粒子の相互相関分析。B) 0.1 fMサンプル中の粒子の相互相関分析。C) 相互相関によって検出された粒子とサンプル濃度との線形関係。

【図7】単一粒子分析器用に関連されたサンドイッチ分子免疫学的検定(immunoassay)で測定したTREM-1の標準曲線。分析物の線形範囲は、100~1500 fMである。

【図8】IL-6についての標準曲線。A) R&Dシステムキットに従って希釈したIL-6標準は、0.1と10 pg/mlの間で線形応答を示した。B) 1 pg/ml以下の

10

20

30

40

50

I L - 6 標準曲線。C) 2つの信号増幅ステップを用いる分析物について、R & Dシステムの製品文献によるI L - 6についての標準曲線。

【図9】ビーズベースの分子免疫学的検定におけるT S H検出の標準曲線。ターゲット分子はビーズに捕捉され、検出抗体と結合した。ビーズは、ターゲットを固定するために使用し、結合していない材料は除去された。ビーズ/ターゲット複合体全体は、単一粒子分析器システムによって検出された。

【図10】T S Hを、人間の血清(serum)を10%含有するサンプルに追加した。該サンプルは、T S H用のサンドイッチ捕捉分析物中で使用し、単一粒子分析器システムで走らせた。この分析物では、回収は108%で計算した。

【図11】デンドリマー(dendrimer)の電気泳動と希釈曲線。A) バッファブランク中の粒子の相互相関分析。B) 0.03 f Mサンプル中の粒子の相互相関分析。C) 相互相関によって検出された粒子とサンプル濃度との線形関係。

【図12】デンドリマー希釈曲線の電気泳動。A) バッファブランク中のフォトンの相互相関分析。B) 0.03 f Mサンプル中のフォトンの相互相関分析。

【図13】ドデシル硫酸ナトリウムの存在下でのウシ血清アルブミン(B S A)の電気泳動および希釈曲線。A) バッファブランク中の粒子の相互相関で検出された粒子の生データ。B) 10 f Mサンプル中の相互相関で検出された粒子。C) 相互相関によって検出された粒子とサンプル濃度との線形関係。

【図14】ウイルス粒子の移動度は、電流増加とともに増加する。

【図15】微生物(microorganism)の検出。A) 大腸菌(E. coli)セルをラベル付けした抗体とともに培養して、特定の結合を行った。結合していない抗体を除去した後、結合抗体をセルから遊離させて測定した。B) ウイルス粒子をプレートに結合させ、ラベル付けした抗体とともに培養、洗浄し、結合ラベルを遊離させて測定した。

【図16】質量タグ。オルガネラ(organelle)(P B X L - 3)の電気泳動移動度は、核酸と結合した場合、シフトする。A) P B X L - 3単独では、368 m sのピークで移動する。B) 核酸と結合したP B X L - 3は、294 m sのピークで移動する。C) 核酸中に存在するが、拡散と結合していないP B X L - 3は、409 m sで移動する。

【図17】ウイルスと核酸の弁別。両方とも、A l e x a F l u o r (登録商標) 647(「A 647」、インビトロゲン(Invitrogen)社(カールズバッド、カリフォルニア州)を用いてラベル付けした。A) ウイルスの混合物で分析した2つのピーク。抗体を用いてコートタンパク質にラベル付けものとラベル付けした核酸。B) ラベル付けした核酸単独。C) 抗体でラベル付けしたウイルス単独。

【図18】S D S電気泳動。蛋白質と核酸の弁別。両方とも、A 647を用いてラベル付けした。A) A bと結合した蛋白質単独。B) ラベル付けした核酸単独。C) ラベル付けA bと結合した蛋白質、ラベル付けした核酸の混合物での分析した2つのピーク。

【図19】蛋白質ターゲットと核酸ターゲットから遊離したラベルの弁別。A) 蛋白質ターゲットから遊離したラベルの検出。甲状腺刺激ホルモン(T S H)を96個のウエルプレート上で固定し、A 647でラベル付けした抗T S Hを用いてラベル付けした。結合していない試薬は、洗浄により除去した。A 647でラベル付けした抗体は、T S Hから解離し、S M Dで測定した。測定したA 647の正味の粒子と元のT S H濃度の間で、線形関係が測定された。B) 電気泳動移動度に基づいた、遊離したラベルの弁別の予想表現。C) これらの蛍光強度に基づいた、遊離したラベルの弁別の予想表現。

【図20A】蛍光強度に基づいた粒子の弁別。A), B) 両方の検出器での各粒子の検出についての輝度を、経過時間に対してプロットしている。プロットに示したドットは、単一分子でとった測定値を表す。X軸(経過時間)のスケールは、ピーク内の個々の分子を強調するように制限した。「暗い」分子ウィンドウから「明るい」分子ウィンドウを分割するために、500個のフォトンのカットオフ値を用いた。P B X L - 3分子は、p U C 19分子より高い平均強度で発光する。

【図20B】蛍光強度に基づいた粒子の弁別。A), B) 両方の検出器での各粒子の検出についての輝度を、経過時間に対してプロットしている。プロットに示したドットは、単

10

20

30

40

50

一分子でとった測定値を表す。X軸(経過時間)のスケールは、ピーク内の個々の分子を強調するように制限した。「暗い」分子ウインドウから「明るい」分子ウインドウを分割するために、500個のフォトンのカットオフ値を用いた。P B X L - 3分子は、p U C 19分子より高い平均強度で発光する。

【図20C】C)分子計数によって決定されるようなP B X L - 3およびp U C 19の濃度は、希釈していないサンプルの分光によって決定されるような予測値と比較している。

【図21】サンドイッチ分析物を用いた粒子の検出および弁別。A)ターゲット蛋白質(P)がビーズ(B)と結合し、これらを検出可能にするためラベルとも結合している。パネルAでの異種分析物の表現において、結合していないラベルはサンプルから除去され、ビーズ-ラベル-ターゲット複合体は、電気泳動にかけられる。B)パネルBでの同種分析物の表現において、分離していないサンプルは、電気泳動にかけられ、ビーズ-ラベル-ターゲットは、結合していないラベルから弁別される。

【図22a】二色(two-color)分析物を用いた粒子の検出および弁別の機構。ターゲット粒子(T)は、2つのラベル(L)と結合している。各ラベルは、別々に検出可能な波長で電磁放射を発生する。A)サンプルは、電気泳動にかけられ、ターゲット粒子は、1つの色付ラベルだけを用いてラベル付けされた粒子、結合していないターゲット、および結合していないラベルから弁別される。B)ターゲット粒子は、それぞれ2つの異なるラベルを用いてラベル付けされ、ターゲットへのラベル付けされた粒子の1つの結合のための作用物質(agonist)または拮抗物質(antagonist)が添加される。サンプルは、電気泳動にかけられ、2つのラベルを持つ粒子は、競合者と結合した1つのラベルを持つ粒子、および結合していないラベルから弁別される。

【図22b】C)FRETアクセプタ(A)を用いてラベル付けされた触媒(C)サブユニットの不活性四量体(tetramer)、および環式AMP依存のキナーゼAのFRETドナー(D)を用いてラベル付けされた調節性(regulatory)(R)サブユニットは、波長2(λ_2)で発光する。cAMPの存在下で、四量体は解離し、単一のサブユニットは、波長1(λ_1)で発光する。D)レセプタ(R)およびリガンド(L)は、FRETアクセプタ(A)およびドナー(D)を用いてそれぞれラベル付けされ、互いに結合した場合、 λ_2 で発光する。ラベル付けしたリガンドをラベル付けしていないリガンドで置換すると、結合していないラベル付けしたリガンドは、 λ_1 で発光する。E)レセプタ(R)およびリガンド(L)は、FRETアクセプタ(A)およびドナー(D)を用いてそれぞれラベル付けされ、互いに結合した場合、 λ_2 で発光する。ラベル付けしたリガンドを競合者で置換し、レセプタ/リガンド結合を妨害すると、結合していないラベル付けしたリガンドは、 λ_1 で発光する。F)無傷の基質粒子が、アクセプタ(A)および消光剤(quencher)(Q)を用いてラベル付けされると、発光は生じない。酵素を用いて基質を開裂し、ペアおよびアクセプタでラベル付けした断片を分離すると、発光するようになる。

【図23】単一粒子検出のためのラベリング表現。A)ターゲット粒子は、単一染料の少なくとも1つを用いてラベル付けされる。B)ターゲット粒子は、2つの異なる染料の少なくとも1つの粒子を用いてラベル付けされる。

【図24】少なくとも2つの粒子の検出および弁別のためのラベリング表現。A)単一染料の異なる複合(multiple)でラベル付けした粒子。B)2つの異なる染料または2つの染料のいずれか1つでラベル付けした粒子。C), D)2つの染料でラベル付けした粒子。少なくとも1つは複合コピーに存在する。E)異なる蛍光強度を有する2つの染料の少なくとも1つを用いてラベル付けした粒子。F)染料または電気泳動速度に影響を与えるラベルでラベル付けした粒子。G), H)それぞれ1つの染料でラベル付けした粒子。

【図25】電気泳動速度に基づいた検出および弁別のためのラベリング表現。A)固有に検出可能なターゲット粒子は、電気泳動速度に影響を与える別個のラベルを用いてラベル付けされる。B)ターゲット粒子は、検出可能な染料タグまたは電気泳動速度に影響を与えるラベルを用いてラベル付けされる。

【図26】蛍光発光の特性強度による2つの粒子の弁別の表現。A)ターゲット粒子は、1つの染料の1つまたは複合コピーでラベル付けされ、粒子当りの結合した染料粒子の数

10

20

30

40

50

に比例する蛍光発光の強度によって弁別される。B) ターゲット粒子は、2つの染料の1つまたは複合コピーでラベル付けされ、蛍光発光の合計強度または2つの異なる染料の強度の比率によって弁別される。

【図27】 蛍光偏光分析物の表現。染料でラベル付けしたターゲット粒子は、回転レートで決定される別個の蛍光偏光を有する。ラベル付けした粒子をレセプタに結合させると、回転レートを変化させ、そして、検出される粒子の蛍光偏光を変化させる。

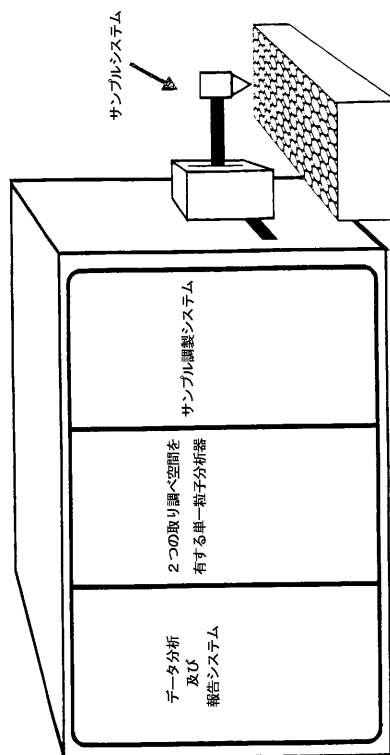
【図28A】 種々の条件での使用するマーカー、およびこれらの現在の検出限界。

【図28B】 種々の条件での使用するマーカー、およびこれらの現在の検出限界。

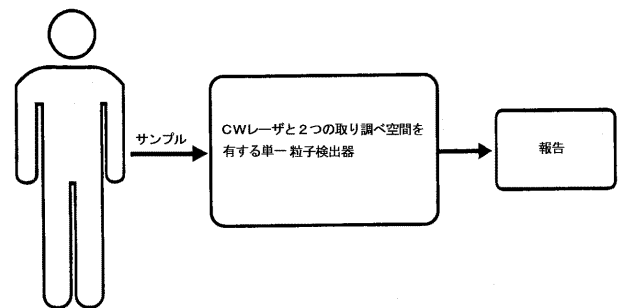
【図29】 2つの取り調べ空間分析器で走らせ、基質と反応したアルカリ性ホスファターゼ(phosphatase)の各濃度で計数した蛍光製品分子の数を示すグラフ表現。 本発明の新規な特徴は、添付の請求項で特別に述べている。本発明の特徴および利点のより良い理解は、例示の実施形態を説明している下記詳細な説明を参照することにより得られる。そこでは、本発明の原理および添付の図面が利用される。

10

【図1】

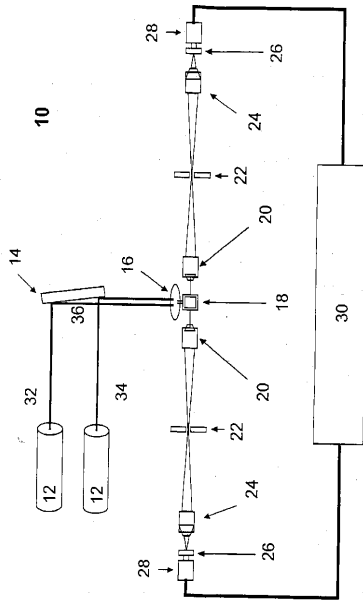


【図2】



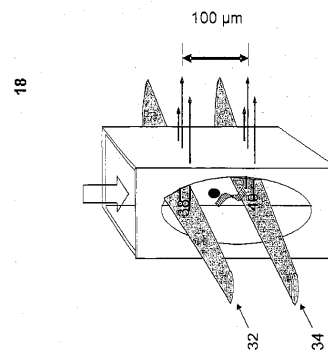
【図 3】

Figure 3



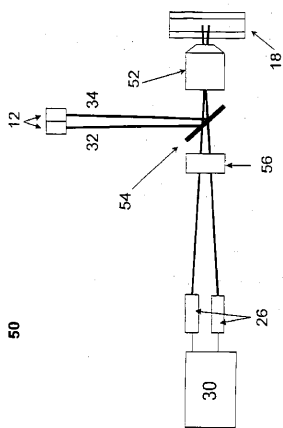
【図 4】

Figure 4

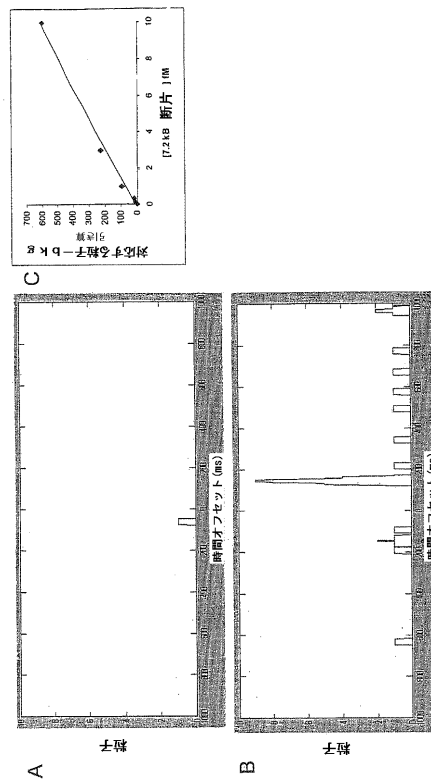


【図 5】

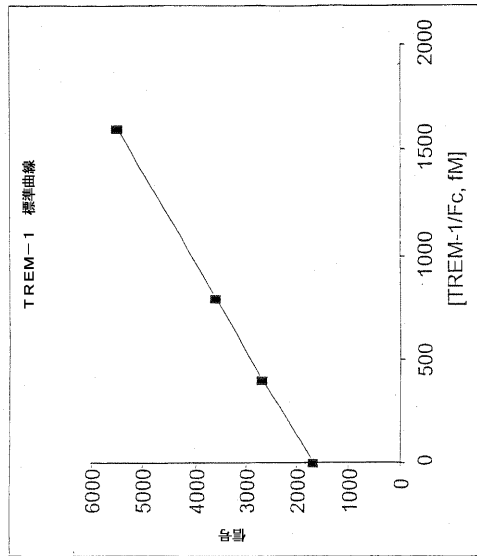
Figure 5



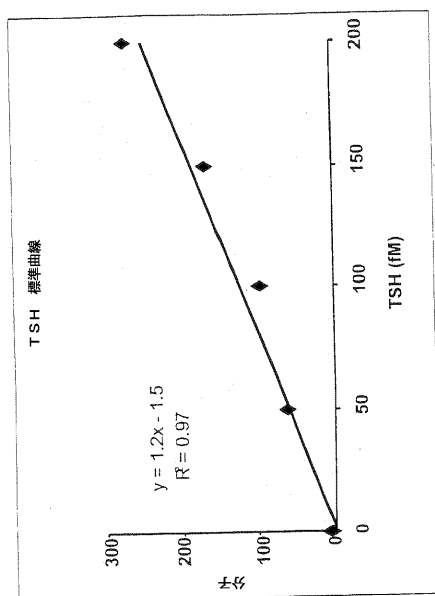
【図 6】



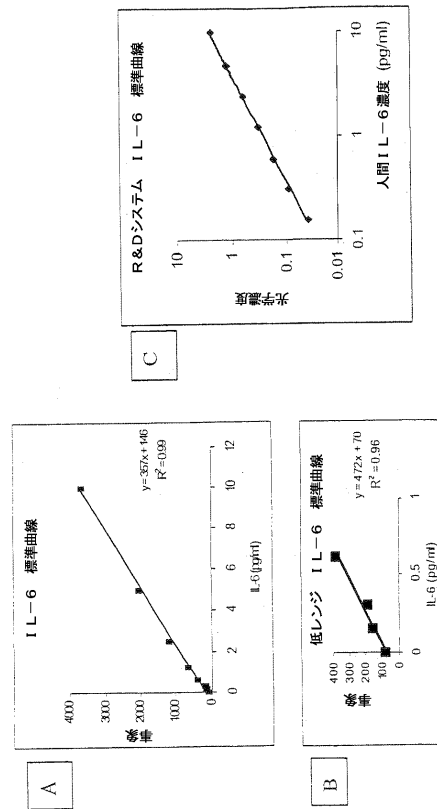
【図 7】



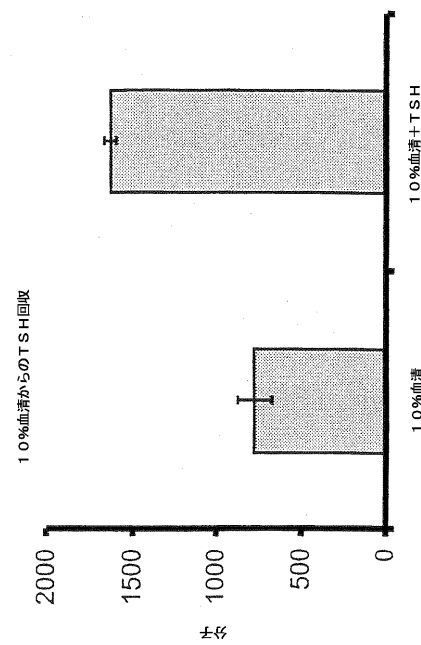
【図 9】



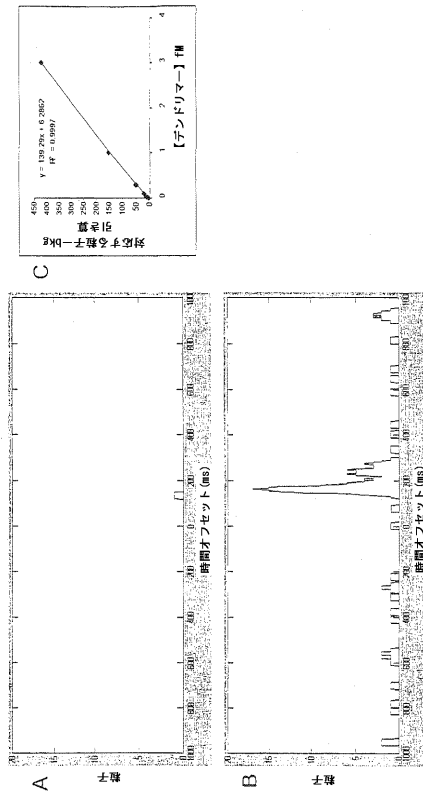
【図 8】



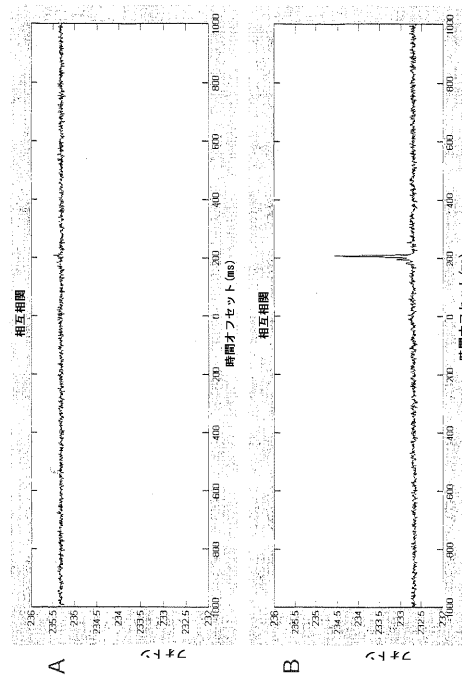
【図 10】



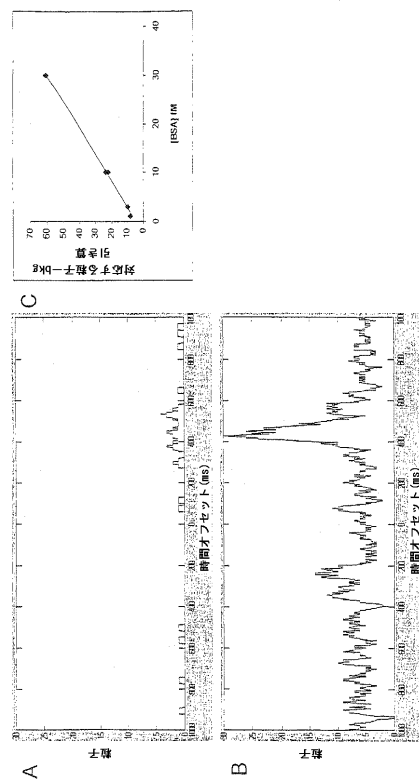
【図 1 1】



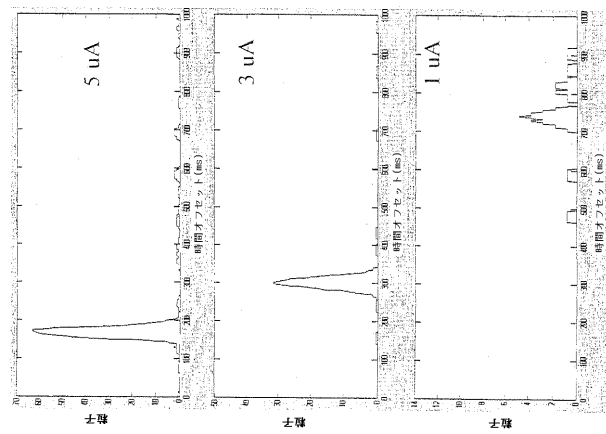
【図 1 2】



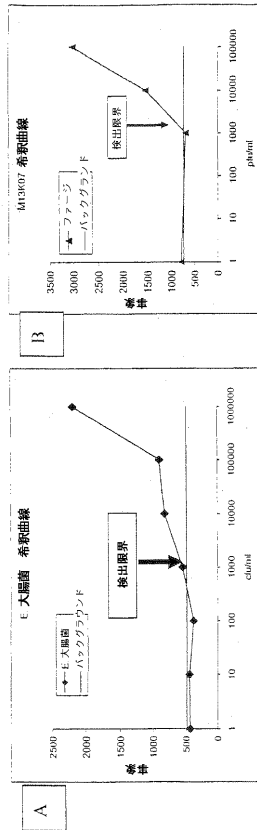
【図 1 3】



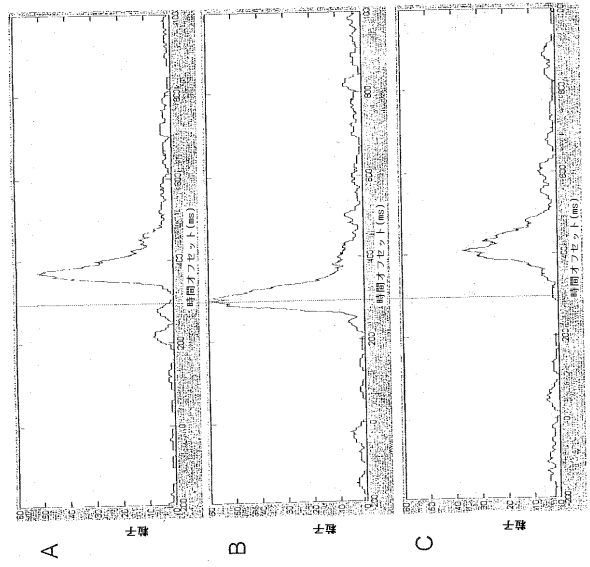
【図 1 4】



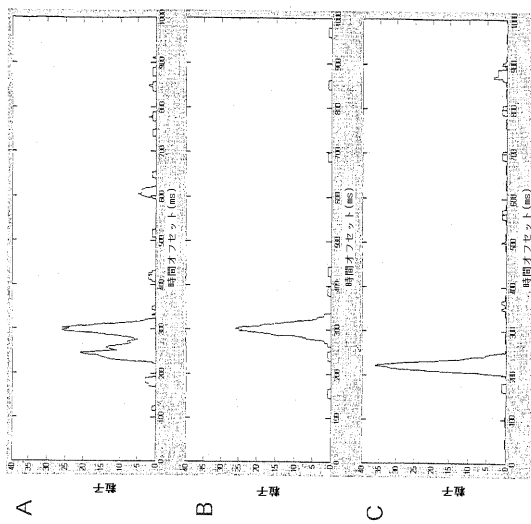
【図 15】



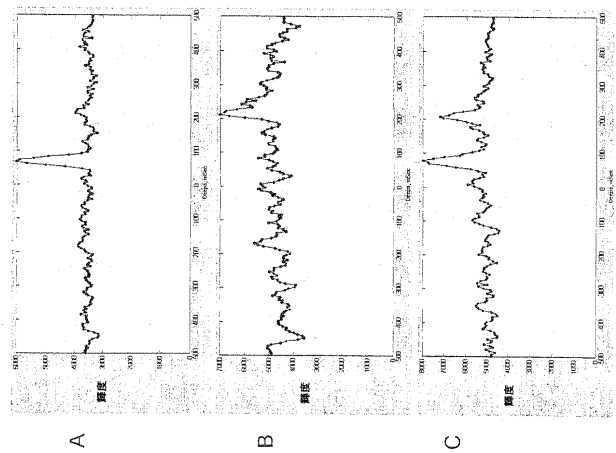
【図 16】



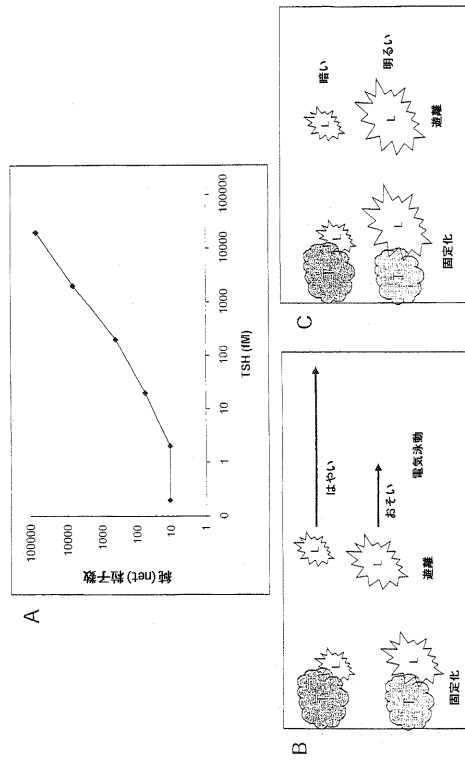
【図 17】



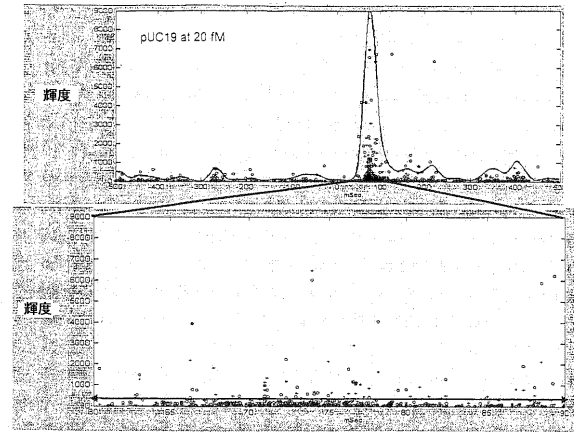
【図 18】



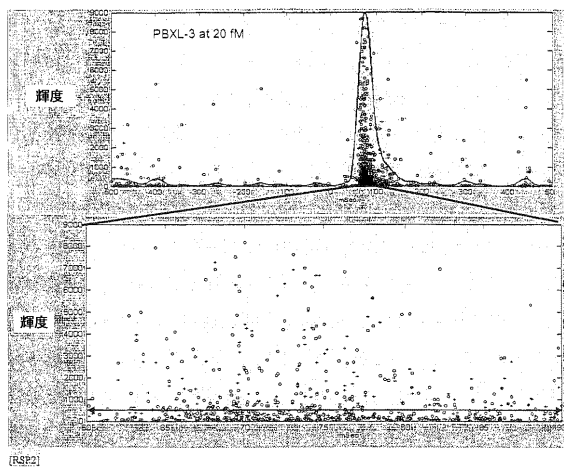
【図 19】



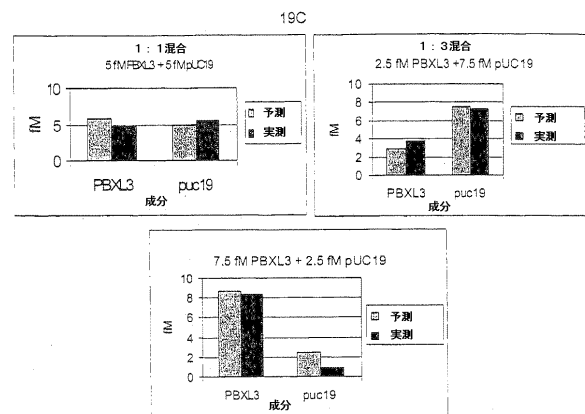
【図 20 A】



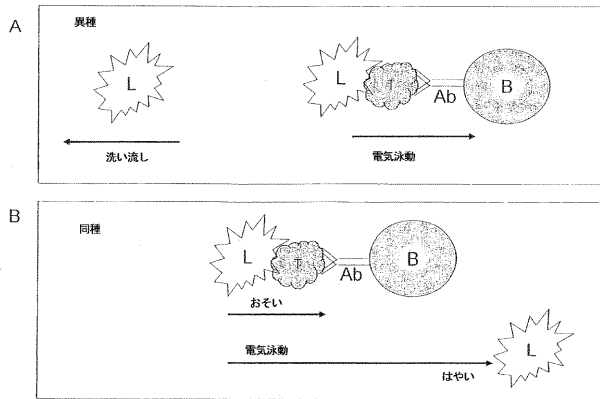
【図 20 B】



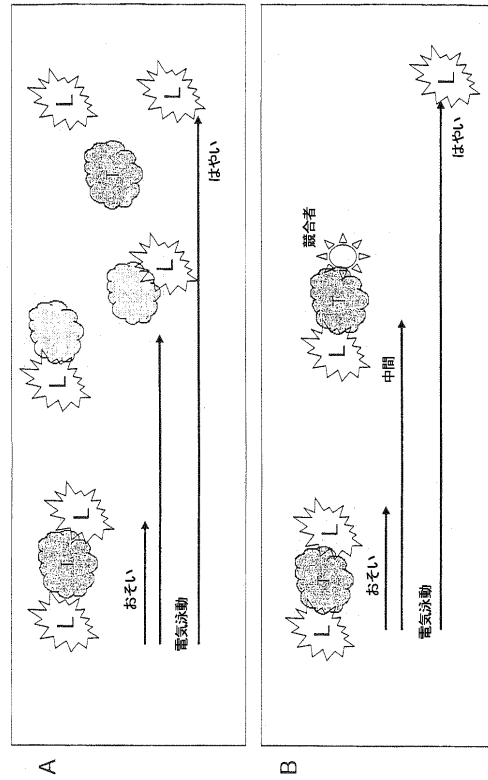
【図 20 C】



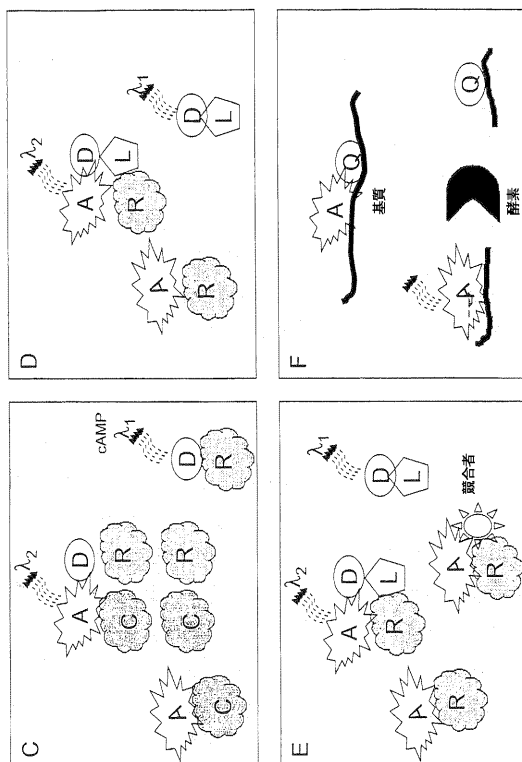
【図 2 1】



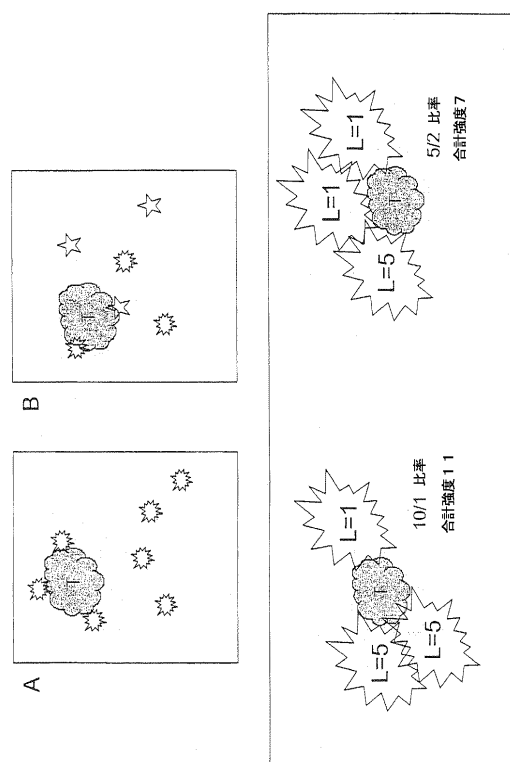
【図 2 2 a】



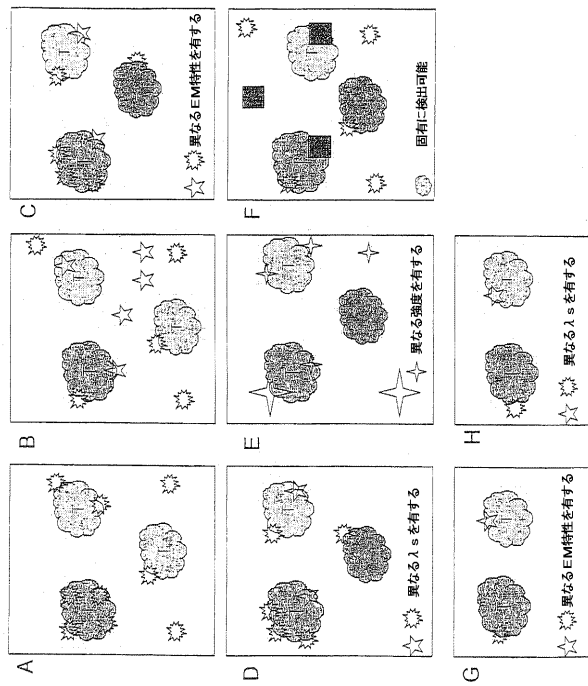
【図 2 2 b】



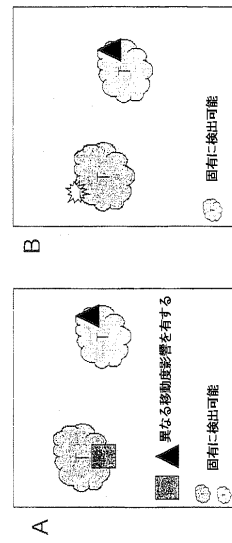
【図 2 3】



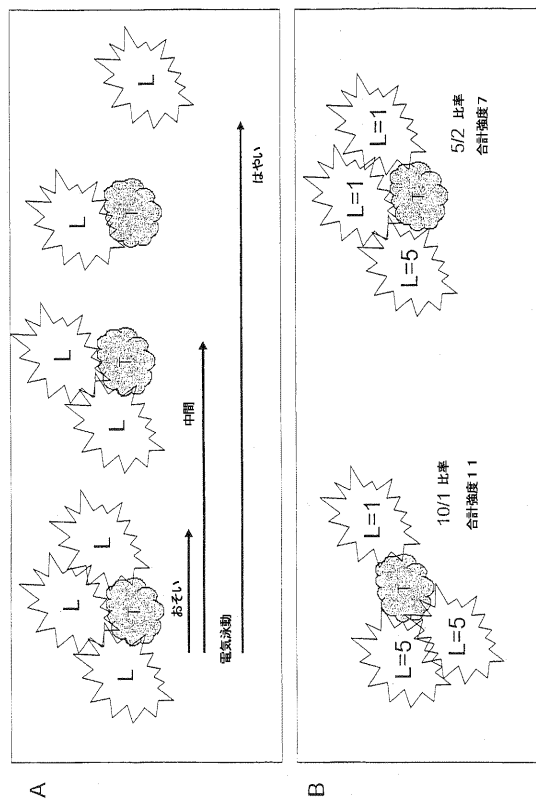
【図 24】



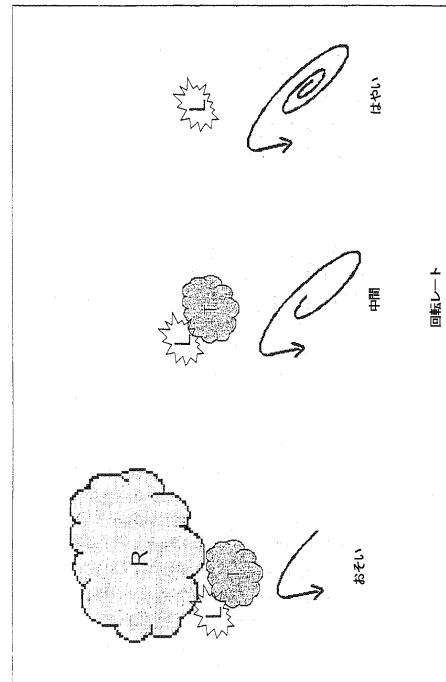
【図 25】



【図 26】



【図 27】



【図 28 A】

高感度分析試料

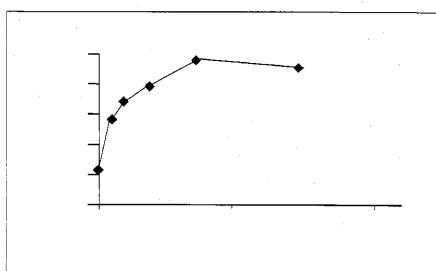
サイトカイン	モル濃度	分子
IL-12 p70	2.02E-14	6.09E+05
IL-10	5.36E-14	1.61E+06
IL-1 alpha	5.56E-14	1.67E+06
IL-3	5.85E-14	1.76E+06
IL-12 p40	6.07E-14	1.83E+06
IL-1ra	6.12E-14	1.84E+06
IL-12	8.09E-14	2.44E+06
IL-6	9.53E-14	2.87E+06
IL-4	1.15E-13	3.47E+06
IL-18	1.80E-13	5.43E+06
IP-10	1.88E-13	1.13E+07
IL-5	1.99E-13	5.98E+06
Eotaxin	2.06E-13	1.24E+07
IL-16	3.77E-13	1.14E+07
MIG	3.83E-13	1.15E+07
IL-8	4.56E-13	1.37E+07
IL-17	5.18E-13	1.56E+07
IL-7	5.97E-13	1.80E+07
IL-15	6.13E-13	1.84E+07
IL-13	8.46E-13	2.55E+07

サイトカイン	モル濃度	分子
IL-2R (soluble)	8.89E-13	2.68E+07
IL-2	8.94E-13	2.69E+07
LIF/IL11DA	9.09E-13	5.47E+07
IL-1 beta	1.17E-12	3.51E+07
Fas/CD95/Apo-1	1.53E-12	9.24E+07
MCP-1	2.30E-12	6.92E+07

腫瘍学	モル濃度	分子
EGF	4.75E-14	2.86E+06
TNF-alpha	6.64E-14	8.00E+06
PSA (3rd generation)	1.15E-13	6.92E+06
VEGF	2.31E-13	6.97E+06
TGF-beta1	2.42E-13	3.65E+07
FGFb	2.81E-13	1.69E+07
TRAIL	5.93E-13	3.57E+07
TNF-RI (p55)	2.17E-12	2.62E+08

【図 29】

Figure 29



【図 28 B】

高感度分析試料

炎症	モル濃度	分子
ICAM-1 (soluble)	8.67E-15	5.22E+04
RANTES	6.10E-14	3.71E+06
MIP-2	9.92E-14	2.99E+06
MIP-1 beta	1.98E-13	5.97E+06
MIP-1 alpha	2.01E-13	6.05E+06
MMP-3	1.75E-12	5.28E+07

内分泌学	モル濃度	分子
17 beta-Estradiol (E2)	4.69E-14	2.82E+06
DHEA	4.44E-13	2.67E+07
ACTH	1.32E-12	7.96E+07
Gastrin	2.19E-12	1.32E+08
Growth Hormone (hGH)	2.74E-12	1.65E+08

自己免疫	モル濃度	分子
GM-CSF	1.39E-13	8.15E+06
C-Reactive Protein (CRP)	3.98E-13	2.40E+07
G-CSF	1.76E-12	1.06E+08

甲状腺	モル濃度	分子
Cyclic AMP	9.02E-15	5.43E+05
Calcitonin	3.25E-14	1.95E+06
Parathyroid Hormone (PTH)	1.56E-13	9.37E+06

心臓	モル濃度	分子
B-Natriuretic Peptide	2.88E-13	1.72E+07
NT-proBNP	2.86E-12	8.60E+07

C-Reactive Protein, HS (B1G)	モル濃度	分子
Beta-2-microglobulin	5.59E-13	3.36E+07

糖尿病	モル濃度	分子
C-Peptide	2.41E-15	1.45E+05
Leptin	1.89E-13	1.14E+07

感染症	モル濃度	分子
IFN-gamma	2.08E-13	1.25E+07
IFN-alpha	4.55E-13	2.74E+07

代謝	モル濃度	分子
Bio-Intact PTH (1-84)	1.59E-12	1.44E+08
PTH	1.05E-13	9.51E+06

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/03524									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: G01N 21/00(2006.01), 21/03(2006.01), 21/75(2006.01), 21/76(2006.01) USPC: 436/164-166, 172 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 436/164-166, 172 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <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</td> <td>CASTRO et al. "Single-Molecule Electrophoresis", Anal. Chem., 1995, v. 67, pp. 3181-3186; especially Abstract, pages 3181-3182 and Figures 1 and 6</td> <td>1-16, 18-32, 69-75</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 4,927,265 (BROWNLEE et al.) 22 May 1990, Abstract and col. 5, lines 31-40</td> <td>1-16, 18-32, 69-75</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	CASTRO et al. "Single-Molecule Electrophoresis", Anal. Chem., 1995, v. 67, pp. 3181-3186; especially Abstract, pages 3181-3182 and Figures 1 and 6	1-16, 18-32, 69-75	Y	US 4,927,265 (BROWNLEE et al.) 22 May 1990, Abstract and col. 5, lines 31-40	1-16, 18-32, 69-75
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
Y	CASTRO et al. "Single-Molecule Electrophoresis", Anal. Chem., 1995, v. 67, pp. 3181-3186; especially Abstract, pages 3181-3182 and Figures 1 and 6	1-16, 18-32, 69-75									
Y	US 4,927,265 (BROWNLEE et al.) 22 May 1990, Abstract and col. 5, lines 31-40	1-16, 18-32, 69-75									
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.											
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 26 September 2006 (26.09.2006)		Date of mailing of the international search report 01 NOV 2006									
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Yelena G. Gakh, Ph.D. Telephone No. (571) 272-1700 Jacqueline A. Whitfield Special Project Asst. <i>JW</i>									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/03524

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 76 and 77
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
an electronic signal is a non-statutory subject matter;
2. ☒ Claims Nos.: 17,33-68 and 78-80
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such
an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Please See Continuation Sheet
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all
searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment
of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report
covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is
restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the
payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee
was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/03524

Continuation of Box II Reason 2:

determining diagnosis, prognosis, state of treatment by detecting one particle from a biological sample is not enabled by the specification and is not searchable, because it is not clear as to what to search;

a method of using an apparatus does not set forth any method steps; since it is improperly describes the process, it is not searchable;

a method of doing business by using a device is not enabled by the disclosure and is not searchable as it is not apparent as to which steps the method comprises.

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions, which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-20, 22-32, 33-68, 74-75, drawn to a single particle analyzer system and the method of its use.

Group II, claim(s) 21, drawn to an analyzer system.

Group III, claim(s) 69-71, drawn to a method for screening an individual.

Group IV, claims 72-73, drawn to a method for detecting a particle.

Group V, claims 76-77, drawn to an electronic signal, which is a non-statutory subject matter.

Group VI, claims 78-80, drawn to a method of doing business, which does not forward any method steps.

Groups I, IV and II, III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: groups I, IV and II, III are unrelated. While the first invention is related to the analyzer and method based on using electromagnetic radiation, the analyzer and method of second and third inventions can be any analyzer and method capable of analysis of small amounts of analytes, e.g. micro-chromatographic analysis.

The common technical feature for inventions I and IV and II and III is the apparatus with the sampling system and an analyzer for detecting a single particle, which is known or obvious over the prior art, see e.g. Castro et al. (Anal. Chem., 1995), and therefore is not a special technical feature.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.**
PCT/US05/03524

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
EAST, STN, Google:

electrophoresis, single particles, fluorescence, laser, optical analysis

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,LT,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,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 フィリップ・ゴワ

アメリカ合衆国 9 4 6 1 1 カリフォルニア州オークランド、フローレンス・テラス 5 6 1 2 番

(72)発明者 リチャード・エイ・リビングストン

アメリカ合衆国 6 3 1 1 9 ミズーリ州ウェブスター・グローブ、フローレンス・アベニュー 4 6 8 番

(72)発明者 ダグラス・ディ・ヘルド

アメリカ合衆国 6 3 0 2 1 ミズーリ州ボールウィン、ウェザートン・プレイス 1 2 1 9 番

(72)発明者 パーバラ・クライン

アメリカ合衆国 6 3 1 3 1 ミズーリ州セント・ルイス、トッピング・イースト 1 2 9 1 7 番

(72)発明者 ノエル・フクシマ

アメリカ合衆国 6 3 1 1 7 ミズーリ州セント・ルイス、エドワード・テラス 1 1 4 0 番

(72)発明者 ロバート・フリーズ

アメリカ合衆国 6 2 2 9 8 イリノイ州ウォータールー、モッキングバード・レイン 2 3 0 番

(72)発明者 ピーター・デイビッド

アメリカ合衆国 9 4 3 0 6 カリフォルニア州パロ・アルト、ラ・ドナ・アベニュー 3 8 9 5 ・ 1 / 2 番

(72)発明者 ミッキー・アーデア

アメリカ合衆国 9 4 5 0 7 カリフォルニア州アラモ、バンス・メドー・ドライブ 1 0 0 番

F ターム(参考) 2G043 AA01 AA03 BA16 CA03 DA01 DA02 EA01 EA13 EA19 FA06

FA07 KA02 KA03 KA05 KA09 LA01 LA02 LA03 NA11

2G054 AA06 AA07 AA08 AB02 BB03 CA22 CA23 CD01 CE02 EA03

EA04 EB01 GA02 GA03 GA04 GA05 JA06

专利名称(译)	样品分析系统和方法		
公开(公告)号	JP2008514955A	公开(公告)日	2008-05-08
申请号	JP2007534561	申请日	2005-01-28
[标]申请(专利权)人(译)	神谷来克斯公司		
申请(专利权)人(译)	单片雷克斯公司		
[标]发明人	ロバート・ブスカス フィリップ・ゴワ リチャード・エイ・リビングストン ダグラス・ディ・ヘルド バーバラ・クライン ノエル・フクシマ ロバート・フリーズ ピーター・デイビッド ミッキー・アーデア		
发明人	ロバート・ブスカス フィリップ・ゴワ リチャード・エイ・リビングストン ダグラス・ディ・ヘルド バーバラ・クライン ノエル・フクシマ ロバート・フリーズ ピーター・デイビッド ミッキー・アーデア		
IPC分类号	G01N21/64 G01N21/78 G01N33/53		
CPC分类号	G01N35/1095 G01N1/28 G01N15/1459 G01N21/6428 G01N27/447 G01N33/68 G01N33/6803 G01N33/6845 G01N2015/1438 G01N2035/1034		
FI分类号	G01N21/64.F G01N21/78.C G01N33/53.D G01N33/53.M		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/CA03 2G043/DA01 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/EA13 2G043/EA19 2G043/FA06 2G043/FA07 2G043/KA02 2G043/KA03 2G043/KA05 2G043/KA09 2G043/LA01 2G043/LA02 2G043/LA03 2G043/NA11 2G054/AA06 2G054/AA07 2G054/AA08 2G054/AB02 2G054/BB03 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/CD01 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/EA04 2G054/EB01 2G054/GA02 2G054/GA03 2G054/GA04 2G054/GA05 2G054/JA06		
代理人(译)	山田卓司 田中，三夫 竹内干雄		
优先权	60/613881 2004-09-28 US 60/624785 2004-10-29 US 60/636158 2004-12-16 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明基于单颗粒分析仪的使用，使用分析仪的方法，分析与单颗粒或复合颗粒有关的样品的分析系统（多路复用），分析仪的分析系统或系统一种做生意的方法，以及一种分析器和分析器系统，包括用于存储在本发明的分析器和分析器系统中有用的参数的电子介质。

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
GO 1 N 21/84 (2006.01)	GO 1 N 21/64	2 G 0 4 3
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78	C
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
	GO 1 N 33/53	M

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 97 頁)

(21) 出願番号	特願2007-534561 (P2007-534561)	(71) 出願人	304023042
(86) (22) 出願日	平成17年1月28日 (2005.1.28)		シンギュレックス・インコーポレイテッ
(85) 翻訳文提出日	平成19年5月28日 (2007.5.28)		アメリカ合衆国63108ミズーリ州セ:
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/003524		ト・ルイス、フォレスト・パーク・アベ:
(87) 国際公開番号	W02006/036182		ユー4041番
(87) 国際公開日	平成18年4月6日 (2006.4.6)	(74) 代理人	100101454
(31) 優先権主張番号	60/613, 881		弁理士 山田 卓二
(32) 優先日	平成16年9月28日 (2004.9.28)	(74) 代理人	100081422
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	60/624, 785	(74) 代理人	100100479
(32) 優先日	平成16年10月29日 (2004.10.29)		弁理士 竹内 三喜夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ロバート・ブスカス
(31) 優先権主張番号	60/636, 158		アメリカ合衆国63021ミズーリ州:
(32) 優先日	平成16年12月16日 (2004.12.16)		チェスター、シャーウィック・テラス7:
(33) 優先権主張国	米国 (US)		2番
最終頁に続く			