

(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2012-503202
(P2012-503202A)

(43) 公表日 平成24年2月2日(2012.2.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 0 1 F	2 G O 4 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 P	
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 A	
	GO 1 N 33/543 5 7 5	
	GO 1 N 33/53 U	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2011-528006 (P2011-528006)
 (86) (22) 出願日 平成21年9月18日 (2009.9.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年5月11日 (2011.5.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/057532
 (87) 国際公開番号 W02010/033838
 (87) 国際公開日 平成22年3月25日 (2010.3.25)
 (31) 優先権主張番号 61/098,712
 (32) 優先日 平成20年9月19日 (2008.9.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

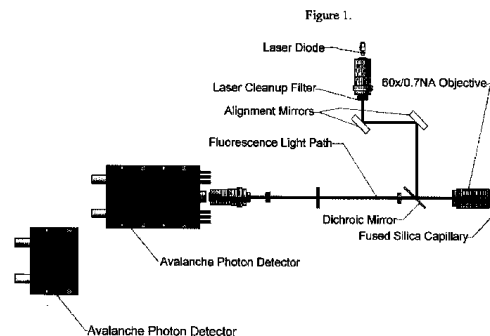
(71) 出願人 511071256
 シングレクス、インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 94502 カリフォル
 ニア、アラメダ、ハーバー ベイ パーク
 ウェイ 1650、スイート 200
 (74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所
 (74) 代理人 100066692
 弁理士 浅村 皓
 (74) 代理人 100072040
 弁理士 浅村 肇
 (74) 代理人 100088926
 弁理士 長沼 暉夫
 (74) 代理人 100102897
 弁理士 池田 幸弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 単一分子アッセイ

(57) 【要約】

分析の、診断の、又は予後のアッセイにおいて有用な種の単一分子分析を開示する。例示の実施形態において、アッセイは開示する方法によって調製された試料を利用し、アッセイに予想外の感度及び頑強さをもたらすものである。方法を、サイトカインアッセイを参照にすることによって非限定的に記載する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検出可能種が特異的に結合する分析物の単一分子に相関する、前記検出可能種の単一分子を検出するアッセイを行う方法であって、

(a) 第 1 の容器中における、

(i) 前記分析物と、前記分析物に特異的に結合する、磁性粒子に固定化された捕獲種との複合体を形成するステップと、

(i i) (i) の後、前記複合体を、前記分析物に特異的に結合する前記検出可能種と接触させることにより、前記検出可能種の固定化複合体を形成するステップと、

(b) 前記固定化複合体を、前記検出可能種を含まない第 2 の容器に移すステップと、

(c) 前記検出可能種を前記固定化複合体から溶出するステップと、

(d) 前記検出可能種の前記単一分子を検出するステップと

を含む上記方法。

【請求項 2】

前記捕獲種が、共有結合的相互作用及び非共有結合的相互作用から選択される 1 種である相互作用によって前記磁性粒子に固定化されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記捕獲種が、ビオチン - ストレプトアビジン相互作用によって前記磁性粒子に固定化されている、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

(a) (i) の前に、前記分析物の前記単一分子を、脂質上層、前記分析物の前記単一分子を含む中間層、及びフィブリン凝塊下層を含む 3 層の血漿試料の前記中間層から採取し、前記分析物の前記単一分子を、前記試料の前記中間層からアリコートで採取する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記捕獲種が、核酸、ポリペプチド、脂質、及び糖類から選択される 1 種である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記捕獲種が抗体である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記検出可能種が、核酸、ポリペプチド、脂質、及び糖類から選択される 1 種である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記検出可能種が抗体である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記分析物がサイトカイン及び増殖因子から選択される 1 種である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記サイトカインがインターロイキンである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記サイトカインが、IL - 1、IL - 1、IL - 2、IL - 4、IL - 8、IL - 12、IL - 21、G - CSF、GM - CSF、hTNF、mTNF、IFN、及びhVEGFから選択される 1 種である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

2 pg / mL 以下の量の前記サイトカインを検出することができるアッセイを提供する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

0.5 pg / mL 以下の量の前記サイトカインを検出することができるアッセイを提供する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記サイトカインが、IL - 1、IL - 1、IL - 8、IL - 12、IL - 21、G - C S F、GM - C S F、h T N F、m T N F、I F N、及びh V E G Fから選択される1種であり、前記方法が0.4 pg/mL以下の量の前記サイトカインを検出することができるアッセイを提供する、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記サイトカインが、IL - 1、IL - 1、IL - 8、IL - 12、IL - 21、G - C S F、GM - C S F、h T N F、I F N、及びh V E G Fから選択される1種であり、前記方法が0.3 pg/mL以下の量の前記サイトカインを検出することができるアッセイを提供する、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記サイトカインが、IL - 1、IL - 21、G - C S F、h T N F、及びh V E G Fから選択される1種であり、前記方法が0.2 pg/mL以下の量の前記サイトカインを検出することができるアッセイを提供する、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記サイトカインが、G - C S F、h T N F、及びh V E G Fから選択される1種であり、前記方法が0.1 pg/mL以下の量の前記サイトカインを検出することができるアッセイを提供する、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記アッセイが2 logを超えるダイナミックレンジを有する、請求項1に記載の方法。

【請求項19】

前記アッセイが少なくとも3 logのダイナミックレンジを有する、請求項15に記載の方法。

【請求項20】

前記アッセイが少なくとも4 logのダイナミックレンジを有する、請求項16に記載の方法。

【請求項21】

前記複合体が、25 μLから約1000 μLまでの体積のバッファー溶液中に形成される、請求項1に記載の方法。

【請求項22】

前記複合体が、少なくとも25 μLの体積のバッファー溶液中に形成される、請求項1に記載の方法。

【請求項23】

前記磁性粒子が、前記第1の容器中に0.1 μgから40 μgまでの量で存在する複数種の磁性粒子の1種である、請求項1に記載の方法。

【請求項24】

前記磁性粒子が、前記第1の容器中に少なくとも0.1 μgの量で存在する複数種の磁性粒子の1種である、請求項1に記載の方法。

【請求項25】

前記検出可能種が、それに共有結合しているフルオロフォアを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項26】

前記複合体が、
25 μLから約1000 μLまでのバッファー溶液に対して0.1 μgから40 μgまでの複数種の磁性粒子を含む混合物中の前記磁性粒子に形成される、請求項1に記載の方法。

【請求項27】

前記複合体が、0.5 μgから25 μgまでの前記複数の前記磁性粒子を、100 μLから1000 μLまでの血漿試料と接触させることによって形成される、請求項25に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 28】

(e) 前記単一の検出可能種分子の集団の濃度を決定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

(f) 前記単一の検出可能種の前記濃度を、前記分析物の前記単一分子の集団の濃度と関連させるステップをさらに含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

(g) 前記単一の検出可能種分子の集団の個々のメンバーを計数することにより、前記単一の検出可能種分子の数を決定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 31】

(h) 前記単一の検出可能種分子の前記数を前記分析物の前記単一分子の数と関連させるステップをさらに含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 32】

前記検出ステップが、

(a)

i . 電磁放射線を放射するための電磁放射線源、

i i . 電磁放射線源から放射される電磁放射線を受けるように配置された第 1 のインタロゲーション空間、

20

i i i . 前記検出可能種の前記単一分子の第 1 の電磁波の特徴を測定するために、第 1 のインタロゲーション空間に作動可能に接続されている第 1 の電磁放射線検出器を含む、前記検出可能種の前記単一分子を検出することができる分析器システムを含む単一分子分析器を用いることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 33】

前記分析器システムが、

(b) 少なくとも 1 つの試料を自動的にサンプリングし、試料コンテナと前記第 1 のインタロゲーション空間の間に液体の連絡を提供することができるサンプリングシステムをさらに含んでいる、請求項 32 に記載の方法。

30

【請求項 34】

分析器システムが、実質的に全試料の回収が可能である第 1 のインタロゲーション空間との液体の連絡中に試料回収システムをさらに含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 35】

分析器システムが試料調製システムをさらに含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 36】

電磁放射線源が連続波電磁放射線源である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 37】

第 1 のインタロゲーション空間が 0 . 02 p L と 300 p L の間の体積を有する、請求項 32 に記載の方法。

40

【請求項 38】

第 1 のインタロゲーション空間が 0 . 05 p L と 50 p L の間の体積を有する、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

第 1 のインタロゲーション空間が 0 . 1 p L と 25 p L の間の体積を有する、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記第 1 のインタロゲーション空間の体積が調節可能である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 41】

50

検出可能な抗体が特異的に結合する分析物の単一分子に相関する、前記検出可能な抗体の単一分子を検出するアッセイを行う方法であって、

(a) 第 1 の容器中における、

(i) 前記分析物と、前記分析物に特異的に結合する捕獲抗体とのハプテン - 抗体複合体を形成するステップであって、前記捕獲抗体がビオチンを含み、ストレプトアビジンを含む磁性粒子に前記ビオチンと前記ストレプトアビジンの間の相互作用によって固定化されている、ステップと、

(i i) (i) の後、前記複合体を、前記分析物に特異的に結合する前記検出可能な抗体と接触させることにより、前記検出可能な抗体の固定化複合体を形成するステップと、

(b) 前記固定化複合体を、前記検出可能な抗体を含まない第 2 の容器に移すステップと、

(c) 前記検出可能な抗体を前記固定化複合体から溶出するステップと、

(d) 前記検出可能な抗体の前記単一分子を検出するステップと

を含む上記方法。

【請求項 4 2】

(a) (i) の前に、前記分析物の前記単一分子を、脂質上層、前記分析物の前記単一分子を含む中間層、及びフィブリン凝塊下層を含む 3 層の血漿試料の前記中間層から採取し、前記分析物の前記単一分子を、前記試料の前記中間層からアリコートで採取する、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記ビオチンが、前記捕獲抗体の、アミン部分及びヒンジのサッカリル (s a c c h a r y l) 部分から選択される 1 種である部位に結合している、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

検出可能種が特異的に結合するサイトカイン及び増殖因子から選択される 1 種である分析物の単一分子に相関する、前記検出可能種の単一分子を検出する試料のアッセイを行う方法であって、前記アッセイは 5 p g / m L 以下の量の前記検出可能種を検出することができ、前記アッセイは少なくとも 1 o g 2 のダイナミックレンジを有し、

(a) 第 1 の容器中における、

(i) 前記分析物と、前記分析物に特異的に結合する捕獲種との複合体を形成するステップであって、前記捕獲種がビオチンを含み、ストレプトアビジンを含む磁性粒子に、前記ビオチンと前記ストレプトアビジンの間の相互作用によって固定化されている、ステップと、

(i i) (i) の後、前記複合体を、前記分析物に特異的に結合する前記検出可能種と接触させることにより、前記検出可能種の固定化複合体を形成するステップと、

(b) 前記検出可能種の前記単一分子を検出するステップと

を含む上記方法。

【請求項 4 5】

(b) の前に、

(c) 前記固定化複合体を、前記検出可能種を含まない第 2 の容器に移すステップをさらに含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

ステップ (b) の前に、

(d) 前記検出可能種を前記固定化複合体から溶出するステップをさらに含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記アッセイが、対象の臨床上健康な非疾患状態に相関する範囲の前記分析物の検出を可能にするように設計されている、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 8】

単一分子アッセイの結果に基づいて診断、予後、治療の状態、及び治療の方法から選択

10

20

30

40

50

される 1 種を決定する方法であって、

(a) 第 1 の容器中における、

(i) 捕獲種が磁性粒子に固定化されており、前記分析物と、前記分析物に特異的に結合する前記捕獲種との間に複合体を形成するステップと、

(i i) (i) の後、前記複合体を、前記分析物に特異的に結合する前記検出可能種と接触させることにより、前記検出可能種の固定化複合体を形成するステップと、

(b) 前記固定化複合体を、前記検出可能種を含まない第 2 の容器に移すステップと、

(c) 前記検出可能種を、前記固定化複合体から溶出するステップと、

(d) 前記検出可能種の前記単一分子を検出するステップと、

(e) 複数の前記単一分子を定量することにより、前記単一分子の濃度を決定するステップと、

(f) 前記単一分子の前記濃度を、前記診断、予後、治療の状態、及び治療の方法から選択される 1 種と関連させるステップと

を含む上記方法。

【請求項 49】

アッセイから得られるデータセットであって、前記データセットが、分析物の単一分子に対するアッセイから収集した前記分析物からのシグナルに対応する少なくとも 1 つのデータ点を含み、前記アッセイが 0 . 5 p g / m L 未満の検出限界及び少なくとも 2 . 5 l o g のダイナミックレンジを有する、上記データセット。

【請求項 50】

検出可能種が特異的に結合する分析物の単一分子に相関する、前記検出可能種の単一分子を検出するアッセイを行う方法であって、

(a) 前記分析物と、前記分析物に特異的に結合する、磁性粒子に固定化された捕獲種との複合体を形成するステップと、

(b) (a) の後、前記複合体を、前記分析物に特異的に結合する前記検出可能種と接触させることにより、前記検出可能種の固定化複合体を形成するステップと、

(c) 前記検出可能種の前記固定化複合体を、前記検出可能種の前記固定化複合体に結合していない本質的に全ての検出可能種から分離するステップと、

(d) 前記検出可能種を前記固定化複合体から溶出するステップと、

(e) 前記検出可能種の前記単一分子を検出するステップと

を含む上記方法。

【請求項 51】

前記検出可能種が特異的に結合する分析物の単一分子に相関する、検出可能種を検出するアッセイを行う方法であって、

(a) 分析物と、前記分析物に特異的に結合する、磁性粒子に固定化された捕獲種との複合体を形成するステップと、

(b) (a) の後、前記複合体を、前記分析物に特異的に結合する前記検出可能種と接触させることにより、前記検出可能種の固定化複合体を形成するステップと、

(c) 前記検出可能種の前記固定化複合体を、前記検出可能種の前記固定化複合体に結合していない本質的に全ての検出可能種から分離するステップと、

(d) 前記検出可能種を前記固定化複合体から溶出するステップと、

(e) 前記検出可能種の単一分子に対応する光子、前記検出可能種の複数コピーに対応する事象光子、前記検出可能種の複数コピーに対応する全光子、及びこれらの組合せから選択される 1 種を検出するステップと

を含む上記方法。

【請求項 52】

前記分析物が試料体積の範囲内にあり、前記検出可能種が、前記試料体積より小さい溶出体積中に溶出される、請求項 1、50、又は 51 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

本出願は、その全文が全ての目的で参照によって援用される、2008年9月19日出願の米国仮特許出願第61/098712号の利益を主張する。

【0002】

本発明は、1つ又は複数の別個の、分析物の単一分子を検出するアッセイを目的とする。

【背景技術】

【0003】

生物医学的研究、医学的診断、予後、モニタリング及び治療の選択、バイオテロリズムの検出、並びに低体積及び低濃度の分析物の複数の試料の分析に関する他の分野における進歩により、低下し続ける濃度の試料中の粒子を高感度に検出することを可能にする試料分析システムの開発がもたらされている。米国特許第4,793,705号及び同第5,209,834号は、極めて高感度の検出が実現されている以前のシステムを記載している。本発明は、当技術分野における、とりわけサイトカインの検出、定量、及びキャラクタリゼーションの分野におけるさらなる発展を提供する。

10

【0004】

従来のサイトカインアッセイは血清又は血漿中のサイトカインの測定を伴うが、他の生体液中に様々なサイトカインが検出されている。例えば、Kimball, J. Immunol., 133巻、256~260頁(1984年)は、ヒト尿中のIL-1生物活性を報告した。Tamatanira, Immunology, 65巻、337~342頁(1988年)は、クロマトグラフィー法及びバイオアッセイ法を用いて、ヒト羊水中のIL-1及びIL-1の存在を公開している。同グループは酵素免疫測定法を用いて、ヒト羊水中のIL-1及びIL-1を測定した(Tsunodaら、Lymphokine Res., 7巻、333頁、1988年)。Wilmottら、Lymphokine Res., 7巻、334頁(1988年)は、他の疾患に比較した、嚢胞性線維症におけるヒト気管支肺胞洗浄液中のIL-1及びIL-1の生物活性を測定した。Khanら、Mol. Cell Endocrinol., 58巻、221~230頁(1988年)は、高レベルのIL-1様の生物活性が、ヒト卵巣卵胞液中に実証され得ることを報告した。類天疱瘡患者の水疱液中にリンホトキシンが報告されている(Jeffesら、J. Clin. Immunol., 4巻、31~35頁、1984年)。IL-1はヒトの汗中にも報告されている。(Didierjeanら、Cytokine, 2巻、438~446頁、1990年)。IL-1が、ネコ(Coceaniら、Brain Res., 446巻、245~250頁、1988年)、及びヒト(例えば、Peterら、Neurology, 41巻、121~123頁、1991年を参照されたい)の脳脊髄液(CSF)中に見出されることが報告されている。臨床上健康なヒトの歯肉滲出液中に、IL-1様生物活性を有する因子が検出され(Oppenheimら、Transplant. Proc., 14巻、553~555頁、1982年)、非炎症の歯肉の領域よりも炎症の領域において活性が高かった。

20

30

【0005】

サイトカインレベルを測定するための結合アッセイは、固相又は均一な様式を用いることができる。適切なアッセイ方法には、サンドイッチアッセイ又は競合的結合アッセイが含まれる。サンドイッチ免疫アッセイの例は、Grubbらへの米国特許第4,168,146号、及びTomらへの米国特許第4,366,241号に記載されている。競合的免疫アッセイの例には、Deutschらへの米国特許第4,235,601号、Liottaへの米国特許第4,442,204号、及びBuechlerらへの米国特許第5,208,535号に開示されているものが含まれる。

40

【0006】

結合試薬アレイの使用による多重化、標識のスペクトル弁別を用いた多重化、粒子で行われる結合アッセイのフローサイトメトリー分析による多重化(例えば、Luminexシステムを用いたもの)など、多重化アッセイ様式を用いて複数のサイトカインを測定す

50

ることができる。別の取組みは、個々に同定され、問われ得るビーズ上にコーティングされた結合試薬の使用を伴う。国際公開第9926067A1号(Watkinsら)は、複数の分析物をアッセイするためのサイズの異なる磁性粒子の使用を記載しており、様々な分析物をアッセイするのに様々な別々のサイズ範囲に属する粒子が用いられる。粒子はフローサイトメトリーによって区別され、個々に問われるようにデザインされている。Vignaliは、各々が均一で別々の割合の2種類の色素を有する、64の異なるビーズセットの微小粒子を用いる多重結合アッセイを記載している(Vignali, D. A. A., 「Multiplexed Particle-Based Flow Cytometric Assays」、J. Immunol. Meth., (2000年)243巻、243~255頁)。サイズ及び蛍光の異なる15の異なるビーズを1セット有する同様の取組みが、肺炎球菌の多数の血清型を同時に型別するのに有用であると開示されている(Park, M. K.ら、「A Latex Bead-Based Flow Cytometric Immunoassay Capable Of Simultaneous Typing Of Multiple Pneumococcal Serotypes (Multibead Assay)」、Clin Diagn Lab Immunol., (2000年)7巻、486~9頁)。Bishop, J. E.らは、6種のヒトサイトカインを同時定量するための多重サンドイッチアッセイを記載している(Bishop, J. E.ら、「Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology」、Clin Chem., (1999年)45巻、1693~1694頁)。

10

20

30

40

50

【0007】

サイトカインのmRNA又はサイトカインのポリペプチドを測定する方法を含む、特異的なサイトカインの発現を定量するための他の方法が用いられている。例えば、PCR(商標)、競合的PCR(商標)、PCR-ELISA、マイクロアレイ、遺伝子発現ビーズに基づくアッセイ、及びインサイチュハイブリダイゼーション法を用いてサイトカインのmRNAを測定することができ、免疫組織化学を用いてサイトカインタンパク質レベルを測定することができる。公開されている米国特許出願公開第20060205012号は、試料中の1つ又は複数のサイトカインのレベルを測定するためのアッセイ方法を開示している。

【0008】

サイトカインなど、低濃度の診断上又は予後上価値のある分析物を測定するためのより高感度の方法が現在必要とされている。さらに、分析物の単一分子を検出するためのより効果的且つ効率的な方法、化合物、及び系統が、様々な状況において診断及び予後における著しい進歩を表している。本発明はこれらの及びさらなる必要性を提供する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、分析物の単一分子を検出するアッセイを行う方法を提供する。この方法は、現在利用可能な方法よりも低い検出閾値で、分析、診断、及び予後診断の対象となる種の検出をもたらす。さらに、本発明の様々な実施形態は、現在利用可能な方法よりも広いダイナミックレンジを有する単一分子アッセイを提供する。本発明の方法の重要性は、高感度及び頑強なダイナミックレンジの検出を必要とする、迅速で安価な単一のバイオマーカー及び多重のバイオマーカーの診断アッセイに対する強力な臨床上の必要性によって、さらに増大される。

【0010】

本発明の方法はマイクロプレートベースのアッセイとは異なる。マイクロプレートベースのアッセイは、実質的に全ての非結合の検出種を、検出種と分析物で形成した複合体から除去する可能性を容易に許容しない。様々な実施形態において、本発明は、捕獲抗体-

分析物 - 検出抗体のサンドイッチ複合体を、検出抗体を含まない容器に移し、その後検出抗体をサンドイッチ複合体から溶出することによって、複合体から非結合の検出可能種を分離することを含む方法を提供する。非特異的に結合している検出抗体が存在し、サンドイッチ複合体の特異的に結合している検出抗体と共に検出混合物中に溶出されるアッセイ混合物は、不正確に高いシグナルを生成する。

【0011】

第1の態様において、本発明は、検出可能種が特異的に結合する分析物の単一分子に相関する検出可能種の単一分子を検出するアッセイを行う方法を提供する。この方法は、捕獲抗体 - 分析物 - 検出抗体のサンドイッチ複合体から本質的に全ての非結合の検出可能種を分離し、その後検出可能種を検出することを含む。したがって、例示的一実施形態において、本発明は、第1の容器中において、分析物と分析物に特異的に結合する捕獲種の間 10
に複合体を形成することを含む方法を提供する。捕獲種は磁性粒子に固定化されている。分析物の捕獲後、やはり第1の容器中において、複合体を、分析物に特異的に結合する検出可能種と接触させることにより、検出可能種の固定化複合体を形成する。次いで、固定化複合体を第1の容器から除去し、検出可能種を含まない第2の容器に移す。次に第2の容器中において、検出可能種を固定化複合体から溶出する。単一分子検出に好適な装置を用いて、検出可能種の単一分子を検出する。

【0012】

様々な実施形態において、検出可能種の単一分子は、本質的に同じ構造を有する検出可能種の複数の分子の1個である。様々な他の実施形態において、検出可能種の2つ以上の 20
集団が存在し、各集団は様々な構造の検出可能種を含んでいる。例示的一実施形態において、捕獲種は抗体である。様々な実施形態において、検出可能種は標識抗体、例えば、フルオロフォアで標識されている抗体である。

【0013】

例示的一実施形態において、本発明は、検出可能種の単一分子が、検出可能種が特異的に結合するサイトカイン及び増殖因子から選択される1種である分析物の単一分子に相関する、先に記載した方法を提供する。様々な実施形態において、アッセイは、約5 pg / mL以下の量の検出可能種を検出することができる。ある実施形態において、アッセイは、約2 pg / mL以下の量の検出可能種の単一分子を検出する。

【0014】

本発明の方法は、頑強なダイナミックレンジを有するアッセイも提供する。例えば、様々な実施形態において、本発明は、少なくとも約2 log、好ましくは少なくとも3 log、より好ましくは少なくとも約4 logのダイナミックレンジを有するアッセイを提供する。

【0015】

様々な実施形態において、本発明は、単一分子アッセイの結果に基づいて診断、予後、治療の状態、及び/又は治療の方法を決定する方法を提供する。方法は実質的に先に述べた通りであるが、さらなるエレメントとして、単一分子ベースによって単一分子上の検出可能種の複数の単一分子を定量し(平均濃度とは異なる)、この定量に由来する量を、診断、予後、治療の状態、又は治療の方法に相関させる。

【0016】

本発明は、本発明の方法を行うための試薬及びキットも含む。一実施形態において、キットは、本発明の方法において測定される分析物(例えば、サイトカイン)に対する抗体を含む。キットは、アッセイ希釈液、標準、対照、及び/又は検出可能な標識をさらに含むことができる。アッセイ希釈液、標準、及び/又は対照は、特定の試料マトリックスに対して最適化されていてよい。例えば、血液、血清、又は血漿の試料において測定するための希釈液、標準、及び対照は、i) ヒトの血液、血清、若しくは血漿、ii) 動物の血液、血清、若しくは血漿、又はiii) 人工の血液、血清、若しくは血漿の代替物を含むことができる。

【0017】

10

20

30

40

50

様々な疾患を診断及び/又はモニタリングするための本発明の方法を行うための、並びに疾患を治療する有効性に対して薬物又は薬物候補をスクリーニングするための診断マーカー（単数又は複数）として、様々なサイトカインが潜在的に有用である。さらに、下記に詳しく記載するように、本発明のある実施形態は、これらの分析物及び他の分析物においてマーカー（単数又は複数）として働くための特定の候補のサイトカイン（単数又は複数）の有効性を決定するための方法を提供する。当業者であれば、本発明の方法を用いて、過度の実験をせずに、本明細書に詳しく列挙しておらず、実際にまだ発見されていないサイトカイン及び他のマーカーを含めた1つ又は複数の選択されたサイトカイン又は他のマーカーの能力が、本発明の様々な診断方法及びスクリーニング方法を行う際にその測定されたレベル/プロファイルを用いることができるマーカーとして有用であると決定することができる。

10

【0018】

本発明のさらなる目的、利点、及び態様は、以下の発明を実施するための形態から明らかである。

【0019】

本明細書に添付され、本明細書の一部を形成している図面は、本発明の特定の態様を示すために含めた。本発明、及び本発明で提供される構成要素及びシステム操作の明白な概念は、図面に示されている、例示的であり、したがって非限定的である実施形態を参照することによって容易に明らかになる。ここで同参照番号（2つ以上の図に見出される場合は、同じエレメントを指す。本発明は、1つ又は複数のこれらの図面を、本明細書に示した説明と組み合わせて参照することによって、よく理解され得る。図面に例示された特徴は必ずしも縮尺通りではないことが留意されるべきである。

20

【図面の簡単な説明】**【0020】**

【図1】本発明の方法において有用である例示的な光学システムの略図である。

【図2】曲線のあてはめの正確度を示す図である。8回の連続したアッセイの実行によって生成したcTnI（心筋トロポニン-I）標準曲線の逆補間（パネルA、定量化の全範囲及びパネルB、定量化の下端の範囲）。

【図3】100体の異なる供血者から得たリチウムヘパリン血漿検体中のcTnIの度数分布を示すグラフである。

30

【図4A】健康なヒトボランティアから得た血漿中のIL-2及びIL-5の度数分布を示すグラフである。

【図4B】健康なヒトボランティアから得た血漿中のIL-7及びIL-21の度数分布を示すグラフである。

【図5A】本発明の方法を使用して測定した、健康なボランティアからの試料中の種々のインターロイキン（IL-2、IL-5、IL-7及びIL-1b）の濃度を示す表である。

【図5B】本発明の方法を使用して測定した、健康なボランティアからの試料中の種々のインターロイキン（IFN-g、IL-21、IL-6及びIL-17A）の濃度を示す表である。

40

【図5C】本発明の方法を使用して測定した、健康なボランティアからの試料中の種々のインターロイキン（TNF-a、IL-4、IL-1a及びGM-CSF）の濃度を示す表である。

【図5D】本発明の方法を使用して測定した、健康なボランティアからの試料中の種々のインターロイキン（IL-12、G-CSF、IL-22及びIL-10）の濃度を示す表である。

【図5E】本発明の方法を使用して測定した、健康なボランティアからの試料中の種々のインターロイキン（MIP-1a、IL-15、IL-22及びIL-10）の濃度を示す表である。

【図6】図5からの、種々のインターロイキン濃度の比を示す表である。

50

【発明を実施するための形態】

【0021】

序文

試料中の、分析、臨床、予後、及び/又は診断の対象の種の単一分子を検出するための本発明の方法の例を本明細書に開示する。様々な実施形態において、試料は対象から採取する。アッセイは、疾患のマーカー、炎症のマーカー、及び/又はサイトカインの測定など、生物学的試料中の分析物の測定を含むことができ、分析物のレベルは疾患の存在又は重症度を示す。

【0022】

本発明の様々な実施形態は、様々な疾患を検出及び/又は識別し、このような疾患の経過及び/又は結果を予測するための方法、このような疾患を治療する方法、並びにこのような疾患の進行を防止又は停止するのに用いる薬剤に関する。本発明の例示的实施形態は、本発明のアッセイ様式に従って診断テストを投与し、及び/又は繰り返し投与することによって患者における疾患の進行又は治療をモニタリングする方法に関する。一例において、診断方法を用いて、薬物又は薬物候補で治療した患者、動物モデル、組織試料、及び細胞培養物からの試料における、疾患に特異的な分析物のレベルに対する、薬物又は薬物候補の影響を測定することによって、疾患を治療するための薬物又は薬物候補の有効性を評価する。

10

【0023】

様々な実施形態において、本発明は、サイトカインが関与し、又は関係付けられる疾患を検出するための診断テストを行うための方法を提供する。例示的一実施形態は、診断上価値のある疾患のサイトカインマーカーを同定するためのアッセイである。様々な実施形態において、本発明は、本発明の方法における診断マーカー（単数又は複数）として働くための、疾患を診断及び/又はモニタリングするための、並びに疾患を治療する有効性に対して薬物又は薬物候補をスクリーニングするための、特定のサイトカイン（単数又は複数）などの特定の候補分析物の有効性を決定するための方法を提供する。

20

【0024】

様々な実施形態において、混合液内の特異的な単一分子だけが標識される。特異的な標識化は、標的の単一分子を標識された結合パートナーと組み合わせることによって実現されてよく、この場合、結合パートナーは、相補的な結合表面によって標的の単一分子と特異的に相互作用する。パートナー同士の間での結合力は、疎水性、真水性、イオン結合及び水素結合、ファンデルワールス引力、又は配位錯体の形成など、共有結合的相互作用又は非共有結合的相互作用であってよい。結合パートナーの例には、細胞膜受容体に対するアゴニストとアンタゴニスト、毒素と毒液、抗体とウイルスのエピトープ、ホルモン（例えば、オピオイドペプチド、ステロイドなど）とホルモン受容体、酵素と酵素基質、補助因子と標的配列、薬物と薬物標的、オリゴヌクレオチドと核酸、タンパク質とモノクローナル抗体、抗原と特異的な抗体、ポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドとポリヌクレオチド結合性タンパク質、ビオチンとアビジン又はステレプトアビジン、酵素と酵素補助因子、及びレクチンと特異的な炭水化物がある。結合パートナーとして働くことができる例示的受容体には、天然に存在する受容体、例えば、チロキシン結合性グロブリン、レクチン、細胞の表面上に見られる様々なタンパク質（分化クラスター、又はCD単一分子）などが含まれる。

30

40

【0025】

一実施形態において、試料を、ビーズ又は微粒子、例えば、結合パートナー（例えば、標的の単一分子と反応する捕獲種）でコーティングされている磁性粒子と反応させる。ビーズを試料のあらゆる非結合の成分から分離する。一実施形態において、捕獲された分析物を検出可能種と接触させ、その後非結合の材料を除去し、分析物-検出可能種の複合体を、任意選択で洗浄され溶出混合物で処理されている別の容器に移し、溶出混合物は分析物を検出可能種から解離する。個々の分子は、本発明において用いるための単一分子分析器によって検出される検出可能種である。

50

【0026】

定義

本明細書で用いられる「分析物」及び「結合パートナー」の語は、結合の相互作用に關与する分子を意味する。例示によると、分析物及び結合剤は、あらゆる有機の、無機の、又は生物学的な薬剤を含むことができる。このような薬剤の非限定的な例には、DNA又はRNAフラグメント（例えば、オリゴヌクレオチド）、アプタマー、ペプチド、及びタンパク質（例えば、抗体）、抗原、及び有機小分子（例えば、薬剤、戦争物質、殺虫剤、除草剤、農業用肥料）が含まれる。特定の一アッセイにおいて、リガンドと受容体の間の結合の相互作用を分析する。例示的一アッセイにおいて、分析物と結合パートナーの結合は、検出可能種の提供におけるステップであり、その1つ又は複数の分子を本発明のアッセイにおいて検出することができる。したがって、検出可能種は分析物の代理であり、検出可能種の分子は分析物の分子に相關し、対応する。相關は、1対1である必要はないが、推定することができ、又は実験的に決定することができる。分析物は、動物（例えば、哺乳動物、例えば、ヒト、トリ、サカナなど）、植物、酵母菌、細菌、ウイルス、原虫などを含めたあらゆる原核生物又は真核生物の個体に由来する。本発明は、分析物の起源又は分析物を含む試料の起源に関して限定されない。

10

【0027】

本明細書で用いられる「試料」は、本質的にあらゆる対象の源からの材料を含む。試料の非限定的な例には、血液、血清、血漿、気管支肺胞洗浄液、尿、脳脊髄液、胸膜滲出液、滑液、腹水、羊水、胃液、リンパ液、腸液、組織ホモジネート、細胞抽出液、唾液、痰、糞便、生理学的分泌物、涙、粘液、汗、乳汁、精液、精漿、腔分泌物、潰瘍及び他の表面噴出物からの液、水疱、及び膿瘍、並びに正常の、悪性の、及び疑わしい組織の生検を含む組織の抽出物、又は分析物を含み得る身体のあらゆる他の成分からなる群から選択されるものが含まれる。いくつかの実施形態において、試料は、血液、血漿、又は血清からなる群から選択される。本発明の方法のいくつかの実施形態において、試料は、対象の分析物分子に特異的な、蛍光標識した抗体と接触させた血清試料であり、前記分析物は、標識された分析物分子の存在、非存在、及び/又は濃度を検出することを含む。いくつかの実施形態において、選択された体積単位における検出可能種の分析物分子の数を計数し、定量することによって、濃度を決定する。いくつかのこれらの実施形態において、方法は、標識された分析物分子の前記存在、非存在、及び/又は濃度に基づいて、診断、予後、治療の状態、及び/又は治療の方法を決定することをさらに含む。

20

30

【0028】

本明細書で用いられる「結合パートナー」は、本発明のアッセイにおいて、対象の分析物に結合する種を意味する。例示的結合パートナーには、「捕獲種」及び「検出可能種」が含まれ、これらは本質的に交換可能に用いられる。結合パートナーの非限定的な例には、タンパク質（例えば、抗体、受容体）、核酸、炭水化物、アミノ酸、脂質、毒素、毒液、薬物、ウイルス、細菌、細胞、及びこれらのあらゆる組合せが含まれる。様々な実施形態において、結合パートナーが検出可能種である場合、結合パートナーは検出可能な標識で標識される。いくつかの実施形態において、結合パートナーが捕獲種である場合、結合パートナーは共有結合的又は非共有結合的な相互作用によって磁性粒子に結合する。

40

【0029】

本明細書で用いられる「検出可能種」は、分析物に対する第1の検出可能な結合パートナー、又は分析物と結合する様々な結合パートナーに対する検出可能な結合パートナーを意味する。例示的一実施形態において、検出可能種は、分析物に対する、又は分析物に対する様々な結合パートナーに特異的に結合する。様々な実施形態において、検出可能種の単一分子は本発明の方法を用いて検出可能である。本発明の多くの実施形態において、免疫アッセイ（例えば、サンドイッチ、E l i s a など）に関する当技術分野における基礎的知識が適用可能であり、例示的検出可能種は検出可能標識にコンジュゲートしている抗体である。ある実施形態において、検出可能種の単一分子は本発明の方法によって検出可能である。様々な実施形態において、検出可能種は分析物に可逆的に結合し、したがって

50

周囲の環境が変わるとき、分析物は検出可能種から放出される。好ましい一実施形態において、検出可能種は分析物に対する代理であり、推定することができ、又は実験的に決定することができるやり方において分析物の単一分子と関連している。

【0030】

「捕獲種」は、試料中の、少なくとも1つの非分析物の汚染性物質から、分析物の分離を可能にする、分析物を特異的に認識する、分析物に対する結合パートナーを意味する。様々な実施形態において、分析物と捕獲種の間形成された複合体は、1つ又は複数の洗浄ステップを通して安定であり、分析物の本質的に全ての汚染性物質からの分離を可能にする。様々な実施形態において、捕獲種は分析種に可逆的に結合し、したがって、周囲の環境が変わるとき、分析物は捕獲種から放出される。例示的捕獲種は抗体、例えば、サイトカイン、増殖因子、又は他の生物学的に関連のある分析物に対する抗体である。

10

【0031】

本明細書で用いられる、「磁性粒子」の語は、永久双極子モーメント又は誘起双極子モーメントを有する磁性ビーズ又は磁性粒子を意味する。本発明において用いられる例示的磁性粒子には、分析物及び粒子に対して粒子と結合パートナー（「捕獲種」）の間のコンジュゲートを可能にする反応性官能性が含まれる。本質的に、この特徴を有するあらゆる様式の磁性粒子が、本発明において有用である。例えば、多糖がコーティングする常磁性微粒子又はナノ粒子を用いて粒子を標識してもよい。M o l d a y に発行された米国特許第4,452,773号は、磁性の鉄-デキストラン磁性粒子の調製を記載しており、生物学的材料に付着するのに適する粒子を調製する様々な方法を記載する概要を提供している。急勾配磁力分離方法において用いられる磁性粒子に対するポリマー性コーティングの記載は、M i l t e n y i に発行されたドイツ国特許第3720844号及び米国特許第5,385,707号に見出され、両方ともその全文が参照によって本明細書に援用される。常磁性の磁性粒子を調製するための方法は、米国特許第4,770,183号に記載されている。

20

【0032】

磁性粒子は、あらゆる好適な方法によってそれに付着している結合パートナー分子で官能基化されている。例えば、磁性粒子は、当技術分野では知られているプロセスに従って、例えば、当技術分野では知られているいくつかのカップリング反応の1つで（G . T . H e r m a n s o n , B i o c o n j u g a t e T e c h n i q u e s (A c a d e m i c P r e s s , 1 9 9 6 年) ; L . I l i u m , P . D . E . J o n e s , M e t h o d s i n E n z y m o l o g y , 1 1 2 巻 , 6 7 ~ 8 4 頁 (1 9 8 5 年))、核酸、例えば、DNA（オリゴヌクレオチド）又はRNAのフラグメント、ペプチド又はタンパク質、アダプター、及び有機小分子にコンジュゲートしてよい。本発明のある実施形態において、官能基化された磁性粒子は、それに共有結合している結合パートナー分子（例えば、DNA、RNA、又はタンパク質）を有する。結合パートナー分子は、非共有結合的な（例えば、ファンデルワールス、疎水性-疎水性、親水性-親水性、又はイオン性の）相互作用によって磁性粒子に結合している。例示的实施形態において、結合パートナー分子は、ビオチン-ストレプトアビジンの相互作用によって磁性粒子にコンジュゲートしている。様々な実施形態において、磁性粒子はストレプトアビジンで官能基化されており、結合パートナーはアビジンで官能基化されている。他の実施形態において、磁性粒子はビオチンで官能基化されており、結合パートナーはストレプトアビジンにコンジュゲートしている。

30

40

【0033】

結合パートナー分子での磁性粒子の官能基化には、例えば、指定される磁性粒子に対してあらゆる数々の望ましい結合パートナーを付着させるための標準の液体処理ロボット及び96ウェルの様式を用いて平行して行うことができる、1段階又は2段階の反応を典型的に必要とする。試料をQC測定用に吸引することができる。各バッチの磁性粒子は、アッセイ対アッセイの変動が最小になるように、多重アッセイ用の材料を潜在的に提供する。磁性粒子を、必要とされるまで緩衝化されたバルク懸濁液中に貯蔵することができる。

50

【0034】

分析物を、磁性粒子 - 固定化した捕獲種に付着させるための正確な方法は本発明を行うのに重要ではなく、数々の代替が当技術分野において知られている。付着は、一般的に、分析物分子の、磁性粒子のコーティングにコンジュゲートし、相互作用のために官能基を提供する特異的な結合パートナーとの相互作用によるものである。抗体は結合パートナーの例である。抗体が高親和性の結合システムの1種（例えば、ビオチン）にカップリングすることができ、分析物分子が他の1種（例えば、アビジン）に付着することができる。抗マウスIg及び抗ラットIgなどの、第1の抗体の種特異的なエピトープを認識する第2の抗体を、本発明において用いることもできる。間接的なカップリング方法により、様々な分析物分子とともに、例えば、抗体、アビジンなど、磁力的にカップリングする単一の実体の使用が可能になる。

10

【0035】

本明細書で用いられる「標識」の語は、本発明において用いる単一分子分析器において、1つ若しくは複数の単一分子、又は1つ若しくは複数の検出可能種を個々に検出可能にするあらゆる種を意味する。本発明において用いる標識には、色素タグ、電荷タグ、質量タグ、量子ドット、又はビーズ、磁性タグ、光散乱タグ、高分子色素、及びポリマーに付着する色素が含まれる。

【0036】

蛍光の標識、又は色素は、本発明において用いる標識のタイプの実例である。蛍光標識の例は、HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH PRODUCTS (R. Haugland、第9版、Molecular Probes Pub.、(2004年))に見出すことができる。色素には、材料に色を加え、及び/又は発光若しくは蛍光の光の産生を可能にする非常に様々な化合物が含まれる。色素は、特異的な波長で光を吸収し、又は光を放射することができる。色素は、インターカレートし、又は分析物分子に対して非共有結合的若しくは共有結合的に結合することができる。色素はそれ自体、副溝構造、十字部、ループ、又は分析物分子の他の高次構造エレメントなど、分析物上の様々な構造を検出すプローブを構成することができる。色素は、BODIPY及びALEXA色素、Cy[n]色素、SYBR色素、エチジウムブロマイド及び関連色素、アクリジンオレンジ、二量体シアニン色素（例えば、TOTO、YOYO、BOBO、TOPRO POPRO、及びPOPO、並びにこれらの誘導体）、bis-ベンズイミド、OliGreen、PicoGreen及び関連色素、シアニン色素、フルオレセイン、LDS751、DAPI、AMCA、カスケードブルー（Cascade Blue）、CL-NERF、Dansyl、ジアルキルアミノクマリン、4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメ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、エオジン、エリスロシン、フルオレセイン、ヒドロキシクマリン、イソスルファンブルー、リサミンローダミンB、マラカイトグリーン、メトキシクマリン、ナフトフルオレセイン、NBD、オレゴングリーン、PyMPO、ピレン、ローダミン、ロドールグリーン（Rhodol Green）、2',4',5',7'-テトラプロモスルホンフルオレセイン、テトラメチルローダミン、テキサスレッド、X-ローダミン、ジオミック色素（Dyomic dye）系、Atto-tec色素系、クマリン、フィコピリタンパク質（フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン）、緑色、黄色、赤色、及び他の蛍光タンパク質、アップコンバージョンホスファ（up-converting phosphors）、並びに量子ドットを含むことができる。当業者であれば、本発明の範囲内で用いることができる他の色素を認めるであろう。これは網羅的な列挙ではなく、許容される色素は、本発明の方法を用いて、標識された分析物分子の検出を可能にするのに用いることができる、現在知られていない、又は将来知られる色素が全て含まれる。

20

30

40

【0037】

例示的一実施形態において、検出可能な標識は、発光標識、又は光散乱標識である。一実施形態において、検出可能な標識は発光標識である。本発明の範囲から逸脱することな

50

しに他の発光標識を用いることができるが、有用な発光標識には、数ある中で、蛍光標識、化学発光標識、及び生物発光標識が含まれる。さらに、蛍光消光もモニタリングすることができる。さらに、本発明の範囲から逸脱することなしに、他の光散乱標識を用いることができる。有用な光散乱標識には、数ある中で、金、銀、白金、セレン、及び酸化チタンなどの金属が含まれる。検出可能な標識は、分析物分子の内因的な性質及び外因的な性質のあらゆる組合せによって生成することもできる。

【0038】

本発明において用いることができる光散乱タグには、白金、金、銀、セレン、及び酸化チタンなどの金属が含まれる。当業者であれば、他の微粒子又はビーズも光散乱タグとして用いることができることを認めるであろう。他の有用な標識には、電気泳動速度、及び / 又は電気泳動では分離することができない同じ若しくは異なるサイズの標的の分析物分子の分離に影響を及ぼす標識が含まれる。このような標識は、電荷 / 重量タグと呼ばれる。電荷 / 重量タグが付着することにより、その電気泳動の移動度及び分離に影響を及ぼす方法で、及び影響を及ぼす程度に、電荷の、標的の分析物分子の翻訳の摩擦抵抗に対する比が変化する。

10

【0039】

別の一実施形態において、標識は、電荷、又は質量、又は電荷と質量の組合せを変化させる。分析物分子に結合している電荷 / 質量タグは、電界におけるこれらの挙動における空間的相違によって、又は電界におけるこれらの挙動における速度の相違によって、非結合の分析物の分子又は非結合のタグから識別することができる。

20

【0040】

分析物分子に対する結合パートナーを標識するための方法、結合パートナーを検出可能種に変換するための方法は、当業者にはよく知られている。分析物分子に対する標識の付着は、直接的な付着、又は結合パートナーの使用を含めたあらゆる知られている方法を用いることができる。いくつかの場合において標識化の方法は非特異的である。例えば、核酸の特異的なヌクレオチド配列に関係なく核酸を全て標識する方法が知られている。他の場合において、標識されたオリゴヌクレオチドが標的の核酸配列に特異的に結合する場合におけるように、標識化は特異的である。

【0041】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、試料における複数の分析物分子に対して分析を行うことを含む。これらのいくつかの実施形態において、複数の分析物分子の検出された分析物分子の各々は標識を含み、この場合検出された各分析物分子は、標識の同一性、標識の強度、移動度、又はこれらの組合せからなる群から選択される特徴によって他分子と識別される。

30

【0042】

本明細書で用いられる「ビン (bin)」の語は、その間に検出可能種からのシグナルが検出 / 測定される予め決定された時間を意味する。例示的一実施形態において、ピンは、その間に発光標識からの光子が検出 / 測定される時間の単位である。

【0043】

「事象光子 (単数又は複数)」の語は、本発明の方法において検出可能な光子の収集物を意味する。事象光子 (単数又は複数) は、ピンにおける光子が検出される時間における所与の点の、「ピン」内に位置する光子である。事象光子は、ピン内の光の振幅の尺度として数量化できる。

40

【0044】

「全光子 (単数又は複数)」の語は、本発明の方法において検出可能な光子の収集物を意味する。全光子は、ピンにおける光子を全て合計することによって測定される。

【0045】

実施形態

第1の態様において、本発明は、検出可能種が特異的に結合する分析物の分析物分子に相関する検出可能種の分析物分子を検出するアッセイを行う方法を提供する。本発明のこ

50

の方法及び他の方法において、分析物に特異的に結合していない本質的に全ての検出可能種がアッセイ混合物から除去された後に検出可能種が検出され、測定され、且つ/又は定量されるのが一般的に好ましい。

【0046】

様々な実施形態において、本発明の方法は、第1の容器中において、分析物と、分析物に特異的に結合する捕獲種の間で複合体を形成することを含む。捕獲種は磁性粒子に固定化されている。分析物の捕獲の後、依然として第1の容器中において、複合体を、分析物に特異的に結合する検出可能種と接触させることにより、検出可能種の固定化複合体を形成する。次いで、固定化複合体を第1の容器から除去し、検出可能種を含まない第2の容器に移す。次に第2の容器中において、検出可能種を固定化複合体から溶出する。分析物分子を検出するのに好適な装置を用いて、検出可能種の単一分子を検出する。

10

【0047】

ある実施形態において、検出可能種の単一分子は、本質的に同じ構造を有する検出可能種の複数の分子のうち1個である。他の様々な実施形態において、検出可能種の2つ又はそれを超える個体数が存在し、各個体数は、識別可能な異なる構造の検出可能種を含んでいる。

【0048】

様々な実施形態において、本発明は、本発明のアッセイの結果に基づいて、診断、予後、治療の状態、及び治療の方法を決定する方法を提供する。例示的方法には、単一分子ベースによって単一分子上の検出可能種の複数の分析物分子を定量し（平均濃度とは別のものとして）、この定量に由来する量を、診断、予後、治療の状態、又は治療の方法に相関させる、さらなるエレメントとともに、先に記載したステップが含まれる。

20

【0049】

単一分子分析器を用いて少なくとも1個の分析物分子を検出するための方法も提供する。有用な単一分子分析器の特定の特徴は、広範囲の分析物分子を検出する能力である。分析器によって検出することができる分析物分子には、それだけには限定されないが、有機及び無機の分子及び生物学的薬剤、超分子複合体、細胞小器官、ビーズ、分子の会合、超分子複合体の会合、並びに生物体が含まれる。本発明の分析器及び方法を用いて検出可能な分析物の非限定的な例には、タンパク質などの生体高分子、例えば、サイトカイン、核酸、炭水化物、並びに有機及び無機両方の小分子化学実体が含まれる。後者の例には、それだけには限定されないが、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、酵素阻害薬、神経毒、オピオイド、催眠薬、抗ヒスタミン薬、トランキライザー、抗痙攣薬、筋肉弛緩薬及び抗パーキンソン物質、鎮痙薬及び筋収縮薬、縮瞳薬及び抗コリン薬、免疫抑制薬（例えば、シクロスポリン）、抗緑内障溶質、抗寄生虫薬及び/又は抗原虫溶質、降圧薬、鎮痛薬、解熱薬及び抗炎症薬（例えば、非ステロイド性抗炎症薬）、局所麻酔薬、眼科（ophthalmics）、プロスタグランジン、抗うつ薬、抗精神病物質、制吐薬、造影剤、特異的ターゲティング剤、神経伝達物質、タンパク質及び細胞応答調節薬が含まれる。

30

【0050】

同様に、検出可能な化学実体は、アミノ酸、ヌクレオチド、脂質、糖、薬物、毒素、毒液、基質、ファルマコフォア、及びこれらのあらゆる組合せなどの小分子を包含する。タンパク質は、細胞集合体、血液型、病原体、病原体に対する免疫応答、免疫複合体、糖類、レクチン、天然に存在する受容体などの検出など、広範囲の治療及び診断における対象でもある。検出可能な分子の他の例には、ナノ粒子、微粒子、 dendrimer、染色体、細胞小器官、ミセル、及び担体分子が含まれる。

40

【0051】

本発明の方法において検出可能なものには、単一分子の複合体から構成される単一種、標識が結合している生物体、2つ又はそれを超える核酸の複合体、及び1つ若しくは複数の抗体又は抗体フラグメントに結合している標的の単一分子の複合体もある。2つ又はそれを超えるタイプの単一分子が検出される場合の例示的複合体には、タンパク質、受容体

50

、DNA、RNA、PNA、LNA、炭水化物、オルガネラ、ウイルス、細胞、細菌、真菌、それらのフラグメント、及びこれらの組合せから選択される単一分子が含まれる。当業者であれば、本明細書に提供する多数の例に鑑みて、これら及び他の単一分子を検出するのに、本発明の分析器及び関連方法を適応させる方法を認めるであろう。

【0052】

一実施形態において、本発明の方法によって検出される化学実体には、合成の、又は天然に存在するホルモン、天然に存在する薬物、合成の薬物、汚染物質、アレルゲン、アフェクター (a f f e c t e r) 分子、増殖因子、ケモカイン、サイトカイン、リンホカイン、アミノ酸、オリゴペプチド、化学的中間体、ヌクレオチド、及びオリゴヌクレオチドが含まれる。

10

【0053】

本発明の方法は、試料中の、通常の会合を有する、又は所望の情報を提供する複数のタイプの単一分子、即ち「パネル」の存在、非存在、及び/又は濃度を検出することを含む。本明細書で用いる「パネル」は、その存在が本発明のアッセイによって検出され得る1群の分析物分子を包含する。分析物分子は、本発明のシステムによってその検出が可能になる内因的な特徴を有してよく、又は検出されるために標識化を必要としてもよい。したがって、本発明の方法は、1パネルの分析物分子の1つ若しくは複数の1種の存在、非存在、及び/又は濃度を検出するための好適な標識、又は複数の標識に試料を接触させることを含むことができる。このような分析物分子のパネルは、例えば、バイオテロ試料の分析、医学的試験、診断、予後、モニタリング、及び/又は治療の選択、生物医学的研究、法医学、農学的分析、及び工業的応用において有用である。例えば、パネルは、特定のタイプの診断 (例えば、感染性生物のパネル、心臓血管疾患、癌若しくは特定のタイプの癌、糖尿病、関節炎、アルツハイマー病などの疾患に対するマーカーのパネル、又は様々な系統の機能を評価するためのパネル、例えば、内分泌のパネル) に関連してよく、パネルは、バイオテロに関連してよく (例えば、バイオテロの生物体若しくは毒素の可能性のあるパネル)、パネルは医学的スクリーニングにおいて有用であってよく (例えば、特定の遺伝子多型、或いは特定の疾患又は病理学的状態に関連する突然変異に関連する、又は通常若しくは過正常の状態に関連するタンパク質のパネル)、パネルは予後に関連してよい (例えば、特定の症候群、疾患、又は障害 (例えば、癌) に関連するマーカーのパネルを用いて、症候群、疾患、又は障害を根絶するための治療後の症候群、疾患、又は障害の再発及び/又は進行を決定することができる)。パネルはまた、血液試料をスクリーニングするのに有用であり、数々の感染性物質、及び/又はそれに対して血液がスクリーニングされる抗体を含むことができる。同様に、単一の試料を本発明の方法において分析して、あらゆる数々の乱用物質、環境物質、又は獣医学的に重要な物質を検出することができる。本発明の利点は、これにより、障害、疾患、又は症候群を有すると疑われる個体に対して運転して障害、疾患、又は症候群に対する原因物質を同時に検出することができる試験のパネルを構築することができるようになることである。パネルが有用である他の領域には研究が含まれる。

20

30

【0054】

本発明は、本発明の方法を行うための試薬及びキットも含む。一実施形態において、キットは、本発明の方法において測定される分析物 (例えば、サイトカイン) に対する抗体を含む。キットは、アッセイ希釈液、標準、対照、及び/又は検出可能な標識をさらに含むことができる。アッセイ希釈液、標準、及び/又は対照は、特定の試料マトリックスに対して最適化することができる。例えば、血液、血清、又は血漿試料における測定に対して、希釈液、標準、及び対照は、i) ヒトの血液、血清、若しくは血漿、ii) 動物の血液、血清、若しくは血漿、又はiii) 人口の血液、血清、又は血漿代替物を含むことができる。

40

【0055】

本発明によって検出可能な分析物タンパク質分子の一例として、様々なサイトカインは、様々な疾患を診断及び/又はモニタリングするための、及び疾患の治療における有効性

50

に対して薬物又は薬物候補をスクリーニングするための、本発明の方法を行うための、診断マーカー（単数又は複数）として潜在的に有用であることが注目される。実際、以下により詳しく記載する通り、本発明のある実施形態は、そのような診断マーカー（単数又は複数）として働くことができる特定の候補のサイトカイン（単数又は複数）の有効性を決定するための方法を提供する。本発明の方法を用いて、当業者であれば過度の実験を行わずに、その測定されたレベル/プロファイルが本発明の様々な診断方法及びスクリーニング方法を行うのに用いることができるマーカーとして有用であると、本明細書に詳しく列挙されておらず、実際にまだ発見されていないサイトカイン及び他のマーカーを含めた1つ又は複数の選択されたサイトカイン又は他のマーカーの能力を決定することができる。

【0056】

サイトカイン

様々な実施形態において、本発明のアッセイ方法を用いて検出される分析物分子は、免疫応答の調節に關与する分泌されるタンパク質であるサイトカインなどの炎症マーカーを含む。サイトカインには、インターロイキン（IL）、インターフェロン（IFN）、ケモカイン、腫瘍壊死因子（TNF）、及び様々なコロニー刺激因子（CSF）が含まれる。研究及び診断の両方に対して、サイトカインは、数々の状態、疾患、病理などのマーカーとして有用であり、いくつかの異なるパネルにおいて含まれていてよい。現在、その協調的な又は不調和な調節が臨床的に注目されているサイトカイン/ケモカインは100種を超えて存在する。現在マーカーのパネルにおいて用いられ、本発明の方法及び組成物において用いられるパネルにおいて用いることができる例示的サイトカインには、それだけ

BDNF、CREB pS133、CREB Total、DR-5、EGF、ENA-78、エオタキシン、脂肪酸結合性タンパク質、FGF-basic、G-CSF、GCP-2、GM-CSF、GRO-KC、HGF、ICAM-1、IFN-、IFN-、IL-10、IL-11、IL-12、IL-12p40、IL-12p40/p70、IL-12p70、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-1、IL-1、IL-1ra、IL-1ra/IL-IF3、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IP-10、JE/MCP-1、KC、KC/GROa、LIF、リンホタシン（Lymphotacin）、M-CSF、MCP-1、MCP-1(MCAF)、MCP-3、MCP-5、MDC、MIG、MIP-1、MIP-1、MIP-1、M

IIP-2、MIP-3、OSM、PDGF-BB、RANTES、Rb(pT821)、Rb(total)、RbPSpT249/252、Tau(pS214)、Tau(pS396)、Tau(total)、組織因子、TNF-、TNF-、TNF-RI、TNF-RII、VCAM-I、VEGFが含まれる。本発明で用いられるサイトカインの語には、可溶性サイトカイン受容体も含まれる。

【0057】

当業者であれば理解されるように、サイトカインは、本発明の方法によって検出可能な有用なマーカーの代表例である。サイトカインに焦点をあてたのは説明を明確にするためであり、サイトカインを参照して本明細書に記載する方法は、他のマーカーの分析物分子の検出に等しく適する。

【0058】

様々な実施形態において、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、有望な取組みは本発明の方法を用いて複数のサイトカインに関して各試料を分析することである。

【0059】

本発明の様々な実施形態によると、サイトカイン又は他の疾患マーカー候補のレベルを、疾患を有すると臨床的に診断された個体、或いは疾患を有すると疑われる（例えば、医師の問診、内視鏡検査、画像化、及び/又は生検などの従来の診断方法を用いて）個体から、並びに健康個体から収集した試料において測定する。本発明の非限定的な例の範囲内では、正常と疾患患者を識別するマーカーとして価値のある特定のサイトカインは、デー

10

20

30

40

50

タの目視検査を用いて、例えば、一次元若しくは多次元のグラフ上にプロットしたデータ、又は統計学的分析の方法（例えば、対照の個体と疾患患者の間の統計学的に重みをつけた差、及び/又は受信者動作特性（ROC）曲線分析）を用いることによって同定され得る。本発明のこの実施形態及び他の実施形態において用いるデータ分析のさらなる方式を本明細書の以下に述べる。

【0060】

本発明のいくつかの実施形態において、疾患の存在又は程度の決定は、1つ又は複数のサイトカインのレベルを、疾患の非存在、存在、又は程度を示すサイトカインプロファイルと比較することを含むことができる。一例において、血液、血清、及び血漿試料中の1つ又は複数のサイトカインのレベルを、疾患の存在又は程度を示すサイトカインプロファイルと比較する。例示的一実施形態において、比較のステップは、サイトカインレベルを検出のカットオフ値と比較すること、サイトカインレベルの比を検出のカットオフ比値と比較すること、2つのサイトカインのレベルを2つの分析物の相関プロットにおける検出のカットオフラインと比較すること、多数のサイトカインのレベルを多分析物の相関プロットにおける検出のカットオフ曲線若しくは表面と比較すること、及び/又は多数のサイトカインのレベルを多分析物相関プロットにおける検出帯域（例えば、検出面積若しくは検出体積）と比較することを含むことができる。

10

【0061】

本発明の一実施形態は、疾患を診断するための方法を含む。方法は、本明細書に記載する単一分子検出を用いて試料中のサイトカインのレベルを測定すること、及び測定したレベルから対象における疾患の存在又は非存在を診断することを含む。

20

【0062】

本発明の様々な実施形態において、疾患を有すると疑われる患者から得た試料などの試料中のサイトカインのレベルを測定すること、及び測定したレベルから前記患者における疾患の存在又は非存在を診断することを含む、疾患を検出するための方法を提供する。一実施形態において、試料は、血液、血清、又は血漿の試料である。

【0063】

本発明のいくつかの実施形態において、方法は、患者が炎症性疾患を有する場合は測定したサイトカインレベルから決定すること、及び/又は測定したサイトカインレベルから炎症性疾患による炎症のレベルを決定すること、及び/又は炎症性疾患の進行若しくはそのような疾患に対する治療の有効性をモニタリングするために様々な時間に試料を得、測定することを伴う。一実施形態において、方法はサイトカインのレベルを測定することを含む。

30

【0064】

ある実施形態において、本発明は、複数のサイトカインを測定することを含む方法を提供し、これらのサイトカインのレベルを、疾患を示すと決定されるサイトカインのプロファイルと比較することを含むこともできる。様々な試料を分析することができる。ある実施形態において、試料を、ヒト患者から非外科的な侵襲性的方法によって得ることができ、例えば、血液、血清、血漿、糞便、又は尿の試料を含むことができる。

【0065】

特定のサイトカインの特定のレベルは、様々な集団から測定したレベルに基づいて、高い又は低いと決定することができる。例示的集団には、制限なく、強直性脊椎炎患者、関節外の併発を有する患者、軸関節の破壊を有する患者、及び健康個体の集団が含まれる。特定の症候群、疾患、又は障害と同定される他のサイトカインは当業者には知られており、本明細書に開示し、例示する方法において利用することができる。

40

【0066】

当技術分野において、同様の疾患の徴候を表す患者は、患者の血清、血漿、滑液、組織、脳脊髄液、又は他の体液の試料内に様々なレベルの特定のサイトカインを有し得ることが認められている。したがって、末梢の血液、血清、血漿、滑液、組織、脳脊髄液、又は他の体液のサイトカインプロファイルの決定は、各患者個体に対する適切な治療プロトコ

50

ールを決定するのに用いることができる。例えば、同様の症状を有する2人の患者では、患者の血清内のIL-10レベルが異なることがある。低レベルの患者はIL-10治療の恩恵を受け、IL-10高レベルの患者は、生物学的薬物と呼ばれる医薬品のクラスである抗IL-10抗体薬物などのIL-10阻害薬での治療の恩恵を受けることがある。このように、患者からのサイトカインのプロファイルの決定は、適切な治療を決定し、治療に対する個々の患者の反応を測定するのに用いることができる情報を医師及び患者に提供する手助けとなり得る。

【0067】

本発明の一実施形態は、第一のサイトカインのレベルを測定すること、例えば、炎症性疾患を有する、又は有すると疑われる患者から得た試料において測定すること、1つ又は複数のさらなるサイトカインのレベルを測定すること（この場合、1つ又は複数のさらなるサイトカインは第1のサイトカインと異なる）、及び測定したレベルから、疾患からの炎症の程度を決定することを含む方法を含んでいる。

10

【0068】

相互からの分析物のサイトカイン分子のタイプを識別するための例示的方法を本明細書に記載する。とりわけ、分析物の単一分子に相関する検出可能種の単一分子を検出するための方法は（原動力が電気運動である場合は、）組合せの標識シグナル強度（例えば、異なる単一分子上の異なる数の標識）、標識同一性（例えば、異なる単一分子上の異なる標識）、及び標識の移動性（例えば、異なる単一分子に対する異なる移動性）、又はこれらの組合せを用いることができる。

20

【0069】

本発明の方法のある実施形態は、選択されたサイトカインの測定されたレベルに基づいて第1の疾患と第2の疾患をさらに識別することができる。例えば、第1の疾患と第2の疾患を識別する例示的方法は、測定されたサイトカインレベルを識別のカットオフ値と比較することを含み、この場合測定されたレベルが識別のカットオフ値未満であればクローン病を示すと考えられ、識別のカットオフ値を超えたら潰瘍性大腸炎を示すと考えられる。

【0070】

例示的一実施形態において、患者が疾患を有する場合、第1のサイトカインレベルから、及び1つ又は複数のさらなるサイトカインレベルから決定することは、1つ又は複数のサイトカインレベルを、疾患を示すと決定されるサイトカインのプロファイルと比較することを含む。比較のステップは、サイトカインレベルを検出のカットオフ値と比較すること、レベルの比を検出のカットオフ比値と比較すること、及び/又はレベルを多重分析物相関プロットにおける検出のカットオフライン、曲線、若しくは表面に比較することを含むことができる。

30

【0071】

比較のステップは、レベルを識別カットオフ値と比較すること、レベルの比を識別カットオフ比値と比較すること、及び/又はレベルを識別カットオフラインと比較することを含むことができる。

【0072】

一実施形態において、サイトカインレベルをサイトカイン識別カットオフ値と比較することによって第1の疾患を第2の疾患と識別し、サイトカインレベルがサイトカイン識別カットオフ値未満であれば第1の疾患を示すと考えられ、サイトカイン識別カットオフ値を超えれば第2の疾患を示すと考えられる。さらに別の一実施形態において、サイトカインレベルをサイトカイン識別カットオフラインと比較することによって潰瘍性大腸炎はクローン病と識別され、この場合、サイトカインレベルがサイトカイン識別カットオフライン未満であればクローン病を示すと考えられ、サイトカイン識別カットオフラインを超えれば潰瘍性大腸炎を示すと考えられる。

40

【0073】

さらに別の一実施形態において、測定したサイトカインレベルを、相関プロット上の第

50

1の検出カットオフラインと第2の識別カットオフライン間に位置する領域と規定されるサイトカインプロファイルに比較することによって、第1の疾患を第2の疾患と識別する。

【0074】

さらに別の一実施形態において、(a)患者の試料を得ること、(b)本発明の方法に従って患者の試料内の1つ又は複数のサイトカインレベルを測定すること、(c)測定したサイトカインレベルを、重症の炎症性疾患又は自己免疫疾患の状態を発症する又は有する患者において見出されるサイトカインの予め規定されたレベルと比較すること、及び(d)前記患者が重症の炎症性疾患又は自己免疫疾患の状態を発症しやすくなるか否かを決定することを含む、炎症性疾患又は自己免疫疾患の状態を有する患者が重症の炎症性疾患又は自己免疫疾患の状態を発症しやすくなっているか否かを決定するための方法を提供する。

10

【0075】

一実施形態において、患者において測定された2つ又はそれを超えるサイトカインを、これらの2つ又はそれを超えるサイトカインプロファイル(例えば、潰瘍性大腸炎を有する患者、クローン病を有する患者、及び健康個体を示す、相関プロット上の値、比、ライン、又は帯域)と比較することによって、潰瘍性大腸炎をクローン病と識別する。

【0076】

一実施形態において、第1のサイトカインレベルがサイトカイン検出のカットオフ値を超え、さらなるサイトカインのレベルがサイトカイン検出のカットオフ値未満であると疾患を示すと考えられる。別の一実施形態において、第1のサイトカインレベルのさらなる1つのサイトカインレベルに対する比が検出のカットオフ比値を超えると疾患を示すと考えられる。さらに別の一実施形態において、サイトカインレベルがサイトカイン検出のカットオフラインを超えると疾患を示すと考えられる。

20

【0077】

本発明の他の様々な実施形態において、疾患を治療するための薬物又は薬物候補の有効性を評価するための方法を提供する。例えば、本発明は、疾患を有するヒト若しくは非ヒト動物、及び/又はモデル系統、例えば、組織、細胞培養物、若しくは生化学系統を薬物又は薬物候補に曝露すること、ヒト若しくは非ヒト動物若しくはモデル系統から得た試料中のサイトカインのレベルを測定すること、並びに本発明の方法によって測定されたサイトカインレベルから薬物若しくは薬物候補の有効性を決定することを含む、薬物及び/又は薬物候補の有効性を評価するための方法を含む。

30

【0078】

別の一例において、本発明は、疾患を有するヒト若しくは非ヒト動物、及び/又はモデル系統、例えば、組織、細胞培養物、若しくは生化学系統を薬物又は薬物候補に曝露すること、ヒト若しくは非ヒト動物若しくはモデル系統から得た試料中の第1のサイトカインのレベルを測定すること、同じヒト若しくは非ヒト動物若しくはモデル系統から得た同じ試料若しくは異なる試料中の1つ又は複数のさらなるサイトカインのレベルを測定すること(この場合、1つ又は複数のさらなるサイトカインは第1のサイトカインと異なる)、並びに測定されたレベルから薬物若しくは薬物候補の有効性を決定することを含む、薬物又は薬物候補の有効性を評価するための方法を含む。

40

【0079】

方法は、1つ又は複数のサイトカインレベルを、薬物又は薬物候補で治療しなかった対照のヒト又は非ヒト動物におけるレベルと比較することも含むことができる。これらの薬物評価方法におけるヒト又は非ヒト動物は、疾患の挙動を模範とする組織、細胞培養物、又は生化学系統などの *in vitro* の疾患モデル系統と置き換えることができる。

【0080】

また、(a)炎症性疾患又は自己免疫疾患の状態の患者に治療を受けさせること、(b)前記患者から試料を得ること、(c)患者試料内の複数のサイトカインのレベルを測定すること、(d)複数のサイトカインのレベルを、予め規定したサイトカインレベルと比

50

較すること、及び(e)治療が効果的であったか否かを決定すること、を含む炎症性疾患又は自己免疫疾患の状態に対する治療を評価するための方法も提供する。

【0081】

方法は、有効性の決定に基づいた治療レジメンの改変に関する決定を行うことをさらに含むことができる。様々な実施形態において、患者の試料には、末梢血、血清、血漿、脳脊髄液、組織試料、皮膚、又は他の体液試料が含まれる。予め決定されたレベルは、患者の試料中に見出されるサイトカインの中央値のレベルに対する情報を含むことができる。予め決定されたレベルは、1つ又は複数のサイトカインの治療前のレベル、健康対象及び/又は疾患を有する患者において観察された1つ又は複数のサイトカインのレベルを含むことができる。例示的一実施形態において、患者の試料は、関節外の併発を有する患者及び/又は大関節の破壊を有する患者からのものである。

10

【0082】

本発明の一実施形態に従って、診断上価値のあるサイトカインを、本明細書の以下に記載する群から選択することができる。さらに、この実施形態に従って、これらのサイトカインに付随する様々な徴候の診断、予後、及び治療の経過を、本発明の方法を用いて決定することができる。

【0083】

インターロイキン-1 (IL-1) は、ヒトケラチノサイトによって大量に発現される。IL-1 は、様々な源からの活性型マクロファージ(肺胞のマクロファージ、クッパー細胞、脾臓及び腹膜の粘着性のマクロファージ)によっても生成され、また末梢好中球顆粒球、内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞、ケラチノサイト、皮膚のランゲルハンス細胞、破骨細胞、アストロサイト、胸腺及び角膜の上皮細胞、T細胞、並びにB細胞によっても生成される。

20

【0084】

IL-1の合成は、TNF-、IFN-、IFN-、及びIFN-を含めた他のサイトカインによって、また細菌の内毒素、ウイルス、分裂促進因子、及び抗原によっても誘発され得る。ヒト皮膚の線維芽細胞において、IL-1及びTNF-はIL-1の合成を誘発する。ヒト単核細胞は、細菌の内毒素に対して非常に感受性であり、ピコグラム/mL量の内毒素に反応してIL-1を合成する。ヒト単球において、細菌のリポ多糖は、IL-1よりもIL-1に対しておよそ10倍多いmRNA及びそれぞれのタンパク質を誘発する。

30

【0085】

IL-1の主な生物学的活性はTヘルパー細胞の刺激であり、Tヘルパー細胞は誘発されてIL-2を分泌し、IL-2受容体を発現する。ウイルス感染したマクロファージは、T細胞成熟欠損患者における日和見感染及び細胞の形質転換を支持することがあるIL-1阻害物質(IL-1ra)を大量に生成する。

【0086】

IL-1はNK細胞及び線維芽細胞、胸腺細胞、神経膠芽腫細胞の増殖及び活性化を刺激する。これはアストログリア及びミクログリアの増殖も促進し、アストログリオシス及び脱髄などの病理学的過程に関与することがある。IL-1は、ヒト胃癌細胞及び甲状腺癌細胞に対する自己分泌増殖調節因子であると思われる。IL-1は、ある種の腫瘍細胞タイプに対する抗増殖活性及び細胞破壊活性も有する。IL-1は、静脈血栓、動脈硬化、血管炎、及び播種性血管内凝固などの病理学的過程において重要な役割を果たす。IL-1は、線維芽細胞、滑膜細胞、軟骨細胞、内皮細胞、肝細胞、及び破骨細胞などの炎症細胞におけるアラキドン酸(とりわけプロスタサイクリン及びPGE2)の代謝を顕著に増強する。IL-1は破骨細胞を活性化し、したがって新しい骨の形成を抑制する。しかし、IL-1の濃度が低いと新しい骨の増殖が促進される。IL-1は、脂肪細胞における酵素リポタンパク質リパーゼを阻害する。血管平滑筋細胞及び皮膚の線維芽細胞において、IL-1は、これらの細胞の分裂促進因子であるbFGFの合成を誘発する。インターロイキン-2(IL-2)同様、IL-1もニューロンの電気生理学的挙動を変調す

40

50

る。IL - 1 は、また中枢神経系に直接影響を及ぼす。

【0087】

IL - 2 は、従来の治療に抵抗性である癌を有する患者を治療するのにますます用いられている (Waldmannら、Annals of the New York Academy of Sciences、685巻、603~10頁、1993年)。客観的且つ永続的な臨床反応が、メラノーマ又は急性骨髄性白血病を有するある割合の患者においても記述されている (Broomら、British Journal of Cancer、66巻、1185~7頁、1992年)。

【0088】

IL - 4 は、ホジキンリンパ腫に対する自己分泌増殖調節因子であると考えられている (Okabeら、Lymphoma、8巻、57~63頁、1992年)。

10

【0089】

IL - 4 は、単球及びT細胞によるIL - 1、IL - 6、及びTNF - などの炎症性サイトカインの生成を阻害するので、炎症性疾患及び自己免疫疾患の治療において臨床的に重要である可能性がある。IL - 4 は大腸癌及び乳癌の増殖を阻害する (Toiら、Cancer Research、52巻、275~9頁、1992年)。IL - 4 は、リンホカイン活性化キラー細胞 (LAK細胞) の発生を増大することが示されている。IL - 4 は、慢性リンパ性白血病の病原において本質的な役割を果たすことがあり、慢性リンパ性白血病は、悪性B細胞の死及び増殖の両方を防ぐことによってその分化が中間段階で停止された、分裂が遅く、長命のモノクローナルB細胞の蓄積を特徴とする。IL - 4 は、アポトーシス及び保護遺伝子であるBCL - 2の発現の上方制御によって、慢性リンパ性白血病のB細胞を死滅から保護する (Dancescuら、Journal of Experimental Medicine、176巻、1319~26頁、1992年)。

20

【0090】

IL - 6 血清レベルの決定は、骨髄腫の活性をモニタリングし、腫瘍細胞の重量を計算するのに有用であることがある。IL - 6 の低血清レベルは、単クローン性ガンマグロブリン血症及びくすり型骨髄腫において見られ、進行性疾患を有する患者及び形質細胞白血病を有する患者において血清IL - 6 レベルは顕著に増大する (Van Oersら、Ann. Hematology、66巻、219~23頁 (1993年))。

30

【0091】

IL - 6 の発現の調節解除は、おそらく数々の疾患の病原に関与する主要な因子の1つである (Leger-Ravetら、Blood、78巻、2923~30頁、1991年)。IL - 6 の過大な過剰産生が、関節リウマチ、多発性骨髄腫、レンネルト (Lenneret) 症候群 (組織球性リンパ腫)、キャッスルマン病 (形質細胞の大量の浸潤を有するリンパ節腫脹、高ガンマグロブリン血症、貧血、及び急性期タンパク質濃度の亢進)、心臓粘液腫、及び肝硬変などの様々な病理学的状態において観察されている (Hsuら、Hum. Pathol.、24巻、833~9頁、1993年)。神経膠芽腫によるIL - 6 の構成的な合成、及び脳脊髄液中へのIL - 6 の分泌は、血清における急性期タンパク質及び免疫複合体のレベルの増大を説明することができる (Mulleら、Research Immunology、143巻、777~9頁、1991年)。

40

【0092】

IL - 6 は慢性多発性関節炎の病原においてもおそらく役割を果たしている、というのは滑液中に過剰濃度のIL - 6 が見られるからである。造血細胞に対するその効果によって、あるタイプの貧血及び血小板減少症の治療にはIL - 6 が適切であり得ることが示唆されている (Brachら、International Journal of Clinical and Laboratory Research、22巻、143~51頁、1992年)。IL - 3 で前治療し、引き続きIL - 6 を投与すると、血小板計数値を増大することが示されている。IL - 6 は、他のサイトカイン (例えば、IL - 2) と併用して、いくつかの腫瘍タイプの治療に有用であり得る (Dullensら、In

50

v i v o、5巻、567～70頁、1991年)。

【0093】

細菌性及びウイルス性の髄膜炎において、脳脊髄液中に非常に高レベルのIL-6が頻りに観察される。移植を受けた患者の尿中における高濃度のIL-6の検出は、移植片対宿主反応の早期の指標であることがある(Kishimotoら、Blood、74巻、1～10頁、1990年)。羊水中におけるIL-6の検出は羊水内感染の指標であることがある。炎症性腸疾患において、IL-6の血漿レベルの増大は疾患状態の指標であることがある(Wolvekampら、Immunology Letters、24巻、1～9頁、1990年)。糸球体増殖性糸球体腎炎を有する患者における尿中IL-6レベルの増大は疾患状態の指標でもある(Van Snickら、Annual Review of Immunology、8巻、253～78頁、1990年)。手術後血清IL-6レベルをモニタリングすると、炎症状態の推定及び急性期反応の早期検出に、C反応性タンパク質レベルをモニタリングするより有用であることがある(Ohzatoら、Surgery、111巻、201～9頁、1992年)。血清及び尿中IL-6レベルは、川崎病活性を予測する因子であることが示されている(Furukawaら、European Journal of Pediatrics、151巻、44～7頁、1992年)。

10

【0094】

したがって、IL-7は、単独で、又はIL-2と併用して、自己骨髄移植後の患者における悪性腫瘍に対する強化免疫療法として用いられ得ることが示唆されている。

20

【0095】

炎症性皮膚疾患及び皮膚T細胞リンパ腫の病原におけるIL-7の関与が、IL-7の増殖促進効果及びケラチノサイトによるIL-7の合成によって示唆される。

【0096】

IL-8は、乾癬及び関節リウマチにおいて臨床上関連があり得る。乾癬性鱗屑において濃度の増大が観察され、これは、これらの細胞において高い増殖率が観察されることを説明することができる(Gillitzerら、Journal of Investigative Dermatology、97巻、73～9頁、1991年)。IL-8はまた、様々な炎症過程のマーカーである可能性がある。

30

【0097】

IL-10は、活性の非ホジキンリンパ腫を有する患者のサブグループの血清中に検出されている。IL-10レベルは、中間又は高悪性度の非ホジキンリンパ腫を有する患者の生存が劣ることに関連すると思われる(Blayら、Blood、82巻、2169～74頁、1993年)。

【0098】

IL-12の最も強力な誘発因子は細菌、細菌生成物、及び寄生体である。IL-12は、ヘアリーセル白血病を有する患者を含めた数々の状態において、ナチュラルキラー細胞が媒介する細胞毒性を増強することが示されている(Bigdaら、Leuk. Lymphoma、10巻、121～5頁、1993年)。

40

【0099】

IL-13は、活性型CD4(+)T細胞クローンの存在下、高度に精製された表面IgD陽性の、又は全てのB細胞の培養物中、相当なレベルのIgM及びIgGを誘発するがIgAは誘発しない。IL-13は、細菌のリポ多糖によって誘発される組織因子の発現を強力に阻害し、IL-1又はTNFの発熱性の効果を低減し、したがって炎症のメディエータが誘発するプロコアギュラントの変化に対して内皮及び単球の表面を保護することが示されている。IL-13は、in vitroで初期の血液由来ヒトマクロファージにおけるヒト免疫不全ウイルス1型の生成を阻害する。

【0100】

IL-13は、in vitroで初期の血液由来ヒトマクロファージにおけるヒト免疫不全ウイルス1型の生成を阻害する。

50

【0101】

IL-15はT細胞の増殖を刺激する。さらに、IL-15は、細胞溶解性細胞及び（リンホカインが活性化するキラー）LAK細胞の産生を誘発することもできる。IL-15は、NK細胞に特異的な成熟因子として機能すると思われる。IL-15はまた、*in vivo*でNK細胞の生存因子として機能することも示されている。高親和性のIL-15の結合性が、末梢血単球、及びNK細胞を含めた多くのリンパ球の細胞型に対して観察されている。

【0102】

インターロイキン-17（IL-17）は、血管内皮細胞の遊走及び脊髄の形成を刺激する血管新生のメディエータとして機能し、血管新生を促進する様々な増殖因子の生成を調節する（Numasakiら、*Blood*、101巻（7）、2620～7頁、2002年）。

10

【0103】

インターロイキン-18（IL-18）は、T細胞によるIFN- γ 生成の誘発因子をコードしており（Okamuraら、*Nature*、378巻、88～91頁、1995年；Micallefら、*Cancer Immunology and Immunotherapy*、43巻、361～367頁、1996年）、IL-12よりも強力な誘発因子であるナチュラルキラー細胞は（Tsutsuiら、*J Immunology*、157巻、3967～3973頁、1996年）、単球及びマクロファージが様々なIL-18種を大量に生成することを実証している（Kikkawaら、*Biochemical Biophysical Research Communications*、281巻（2）、461～7頁、2001年）。

20

【0104】

IL-18は、急性免疫反応の間にマクロファージ及び未熟な樹状細胞によって生成される。

【0105】

IL-18は、炎症促進性サイトカインの1つであると考えられている。IL-18の重要な機能は、細胞媒介性免疫反応に必要とされる機能的に異なるサブセットのTヘルパー細胞の調節である（Nakanishiら、*Annual Reviews of Immunology*、19巻、423～74頁、2001年）。IL-18は、Th1細胞に対する増殖因子及び分化因子として機能する。

30

【0106】

顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）は、単球、マクロファージ、及び好中球によって、細胞活性化後に分泌される（Demetriら、*Blood*、78巻、2791～2808頁、1991年）。これは間質細胞、線維芽細胞、及び内皮細胞によっても生成される。上皮性の癌、急性骨髄性白血病細胞、及び様々な腫瘍細胞系（膀胱癌、髄芽腫）もこの因子を発現する。G-CSFの合成は、細菌の内毒素、TNF、IL-1、及びGM-CSFによって誘発され得る。骨髄を回収する前に組換えヒトG-CSFで前処理すると、移植片を改善することができる。G-CSFで処理する一般的な効果の1つは、重度の感染症及び発熱の発症を著しく低減することであると思われ、これらはコストマン症候群を有する患者に生じることが通常観察される（Jakubowskiら、*New England Journal of Medicine*、320巻、38～42頁、1989年）。G-CSF処置はまた、様々な抗腫瘍薬のレジメンでの投与量の増大を可能にする（Gianniら、*Journal of Clin. Oncol.*、10巻、1955～62頁、1992年）。

40

【0107】

GM-CSFは、血液細胞の異常な成熟又は白血球生成の減少のいずれかによって特徴付けられる全ての疾患における造血の生理学的再構成に使用され得る。GM-CSFは化学療法が誘発する血球減少を矯正し、血球減少が関連する、感染症及び出血の傾向に対抗するのに用いることができる（Fanら、*In vivo*、5巻、571～8頁、19

50

91年)。いくつかの研究は、GM-CSFの使用が細胞毒性薬物治療に対する耐性を増強し、細胞毒性薬物治療の副作用によって必要とされる投与量の低減を防ぐのに用いられ得ることを実証している(Negrinら、Advances in Pharmacology、23巻、263~296頁、1992年)。現在、GM-CSFは骨髄移植における重要な進歩を象徴し、標準的な治療法となっている(Armitageら、Semin. Hematology、29巻、s14~8頁、1992年)。GM-CSFは自己骨髄移植又は同種骨髄移植を受けている患者、及び骨髄移植後の生着の遅い患者における造血系の再構成を増強する(Schusterら、Infection、20巻、S95~9頁、1992年)。

【0108】

*in vitro*におけるいくつかの腫瘍細胞型の増殖は、腫瘍関連細胞の表面の抗原の合成も刺激し得るIFN- γ によって阻害される。腎臓癌において、IFN- γ はEGFに対する受容体の発現を低減する。IFN- γ はまた、*in vitro*で線維芽細胞及び単球の増殖を阻害する。IFN- γ はまた、*in vitro*でB細胞の増殖を阻害し、抗体の合成を阻止する。IFN- γ は、いくつかのミトコンドリア遺伝子の発現も選択的に阻止する。

【0109】

IFN- γ は、低親和性IgE受容体CD23の合成を増強する。活性型の単球において、IFN- γ はネオプテリンの合成を誘発する。IFN- γ はまた、 α 2-ミクログロブリンの血清濃度を増強する。IFN- γ は、いくつかのミトコンドリア遺伝子の発現を選択的に阻止する。

【0110】

他のインターフェロン同様、IFN- γ は抗ウイルス薬及び抗寄生虫薬として用いることができる(Stuart-Harrisら、Med. Journal of Aust.、156巻、869~72頁、1992年)。IFN- γ は、慢性多発性関節炎の治療において有効であることも示されている(Macholdら、Ann. Rheum. Dis.、51巻、1039~43頁、1992年)。この治療はマクロファージ活性の変調をおそらく伴うもので、関節痛を著しく低減し、様々な臨床パラメータを改善し、コルチコステロイドの投与量を低減させる。IFN- γ は、AIDS患者の日和見感染の治療においても価値があることがある。IFN- γ は、重症のアトピー性皮膚炎において炎症、臨床症状、及び好酸球増加を低減することも示されている(Hanifinら、Am. Acad. Dermatology、28巻、189~97頁、1993年)。

【0111】

腫瘍壊死因子- α (TNF- α)は、マクロファージ、単球、好中球、T細胞、NK細胞によって、これらを細菌リポ多糖によって刺激した後に分泌される(Beutlerら、Annual Review of Biochemistry、57巻、505~18頁、1988年)。化学療法薬とは対照的に、TNF- α は悪性細胞を特異的に攻撃する。広範な前臨床試験により、ヌード(免疫不全)マウスにおける皮下のヒト異種移植片及びリンパ節転移に対するTNF- α の直接的な細胞分裂抑制効果及び細胞毒性効果、並びに好中球、マクロファージ、及びT細胞を含めた様々な免疫エフェクター細胞に対する様々な免疫調節効果の実証されている(Giffordら、Biotherapy、3巻、103~11頁、1991年)。

【0112】

現在CCL2と呼ばれるマクロファージ走化タンパク質-1(MCP-1)は、*in vivo*で単球及びマクロファージの殺腫瘍活性を活性化する。MCP-1は、細胞表面抗原(CD11c、CD11b)の発現、並びにサイトカインIL-1及びIL-6の発現を調節する(Jiangら、1992)。CCL2は、脱顆粒及びヒスタミンの放出を誘発する、ヒト好塩基球の強力な活性化因子である(Bischoffら、Journal of Experimental Medicine、175巻、1271~5頁、1992年)。IL-3、IL-5、又はGM-CSFによって活性化された好塩基球に

10

20

30

40

50

において、CCL2はロイコトリエンC4の合成を増強する(Bischoffら、European Journal of Immunology、23巻、761~7頁、1993年)。CCL2は、化学走性以外の生物学的活性を表すことも示されている。これは、CHAK(CC-ケモカイン活性化キラー)として知られているキラー細胞の増殖及び活性化を誘発することができ、CHAKはIL-2によって活性化された細胞(LAK細胞)に似ている(Horaら、Proc Natl Acad Science USA、89巻、1745~9頁、1992年)。CCL2は強力なヒスタミン誘発因子の1つでもある。

【0113】

血管内皮増殖因子(VEGF)は、神経及び他の腫瘍の病態生理において重要であり、おそらくヒトグリオーマに対する血管新生の強力なプロモーターとして機能する。VEGFの合成は低酸素によっても誘発される。VEGFに対する反応として観察される細胞の血管外遊走は、遠位部位のコロニー形成を決定する重要な因子である可能性がある。VEGFの血管透過性に対する影響のために、VEGFは、正常及び病理学的な条件下での血液脳関門の機能の変化にも関与している可能性がある。

10

【0114】

上皮成長因子(EGF)は、線維芽細胞、腎上皮細胞、ヒトグリア細胞、卵巣顆粒膜細胞、及び甲状腺細胞を含めた、表皮細胞及び上皮細胞の増殖を制御及び刺激する。EGFは単独で、及び他のサイトカインと併用して、創傷治癒過程を媒介する重要な因子である。EGFは、消化管粘膜に対する栄養物質である可能性があり、粘膜細胞の増殖を刺激する能力があるため胃保護の役割を果たす可能性がある。EGFは、胃酸の合成を阻害しない濃度で潰瘍の治癒を効果的に促進することが示されている。

20

【0115】

本発明の方法によって検出可能な、ある種のサイトカインに関連する例示的、非限定的な徴候を、本明細書以下に記載する。記載する例示的サイトカインは各々、単一分子ベースで検出され得るものであり、又は事象光子若しくは全光子を計数することによって検出され得るものである。

【0116】

様々な例示的实施形態において、疾患状態は強直性脊椎炎であり、検出されるサイトカインは、CCL4、CCL2、CCL11、EGF、IL-1、IL-2、IL-5、IL-6、IL-7、CXCL8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、TNF-、IFN、GM-CSF、G-CSF、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

30

【0117】

様々な例示的实施形態において、疾患状態は乾癬性関節炎であり、検出されるサイトカインは、GM-CSF、IL-17、IL-2、IL-10、IL-13、IFN-、IL-6、CCL4/MIP-1、CCL11/エオタキシン、EGF、CCL2/MCP-1、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

【0118】

様々な例示的实施形態において、疾患状態は反応性関節炎であり、検出されるサイトカインは、IL-12、IFN-、IL-1、IL-13、IL-17、CCL4/MIP-1、TNF-、IL-4、GM-CSF、CCL11/エオタキシン、EGF、IL-6、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

40

【0119】

様々な例示的实施形態において、疾患状態は腸疾患に基づく関節炎であり、検出されるサイトカインは、CXCL8/IL-8、IL-10、IL-4、G-CSF、CCL2/MCP-1、CCL11/エオタキシン、EGF、IFN-、TNF-、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

【0120】

様々な例示的实施形態において、疾患状態は潰瘍性大腸炎(UC)であり、検出される

50

サイトカインは、IL - 7、CXCL8 / IL - 8、IFN - 、TNF - 、EGF、VEGF、IL - 1、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

【0121】

様々な例示的实施形態において、疾患状態はクローン病（CD）であり、検出されるサイトカインは、TNF - 、IFN - 、IL - 1、IL - 6、IL - 7、IL - 13、IL - 2、IL - 4、GM - CSF、G - CSF、CCL2 / MCP - 1、EGF、VEGF、CXCL8 / IL - 8、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

【0122】

様々な例示的实施形態において、疾患状態は関節リウマチであり、検出されるサイトカイン分子は、IFN - 、IL - 1、TNF - 、G - CSF、GM - CSF、IL - 6、IL - 4、IL - 10、IL - 13、IL - 5、CCL4 / MIP - 1、CCL2 / MCP - 1、EGF、VEGF、IL - 7、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

10

【0123】

様々な例示的实施形態において、疾患状態は全身性エリテマトーデスであり、検出されるサイトカインの分子は、IL - 10、IL - 2、IL - 4、IL - 6、IFN - 、CCL2 / MCP - 1、CCL4 / MIP - 1、CXCL - 8 / IL - 8、VEGF、EGF、IL - 17、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

【0124】

様々な例示的实施形態において、疾患状態は家族性地中海熱（FMF）であり、検出されるサイトカインの分子は、G - CSF、IL - 2、IFN - 、TNF - 、IL - 1、CXCL8 / IL - 8、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

20

【0125】

様々な例示的实施形態において、疾患状態は筋萎縮性側索硬化症（ALS）であり、検出されるサイトカインの分子は、CCL2 / MIP - 1、CXCL8 / IL - 8、IL - 12、IL - 1、VEGF、IL - 13、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

【0126】

様々な例示的实施形態において、疾患状態は過敏性腸症候群（IBS）であり、検出されるサイトカインの分子は、TNF - 、IFN - 、IL - 1、IL - 6、IL - 7、GM - CSF、G - CSF、CCL2 / MCP - 1、CXCL8 / IL - 8、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

30

【0127】

様々な例示的实施形態において、疾患状態は若年性関節リウマチ（JRA）であり、検出されるサイトカインの分子は、IFN - 、IL - 1、TNF - 、G - CSF、GM - CSF、IL - 6、IL - 4、IL - 10、IL - 13、IL - 5、IL - 7、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

【0128】

様々な例示的实施形態において、疾患状態はシェーグレン症候群であり、検出されるサイトカインの分子は、CCL2 / MCP - 1、IL - 12、CXCL8 / IL - 8、CCL11 / エオタキシン、TNF - 、IL - 2、IFN - 、IL - 15、IL - 17、IL - 1、IL - 1、IL - 6、GM - CSF、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

40

【0129】

様々な例示的实施形態において、疾患状態は初期の関節炎であり、検出されるサイトカインの分子は、CCL4 / MIP1、CXCL8 / IL - 8、IL - 2、IL - 12、IL - 17、IL - 13、TNF - 、IL - 4、IL - 5、IL - 10、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

【0130】

様々な例示的实施形態において、疾患状態は神経炎症であり、検出されるサイトカイン

50

の分子は、CCL2/MCP-1、IL-12、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、IL-6、IL-17、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

【0131】

様々な実施形態において、本発明のアッセイにおいて測定される特定のサイトカインには、それだけには限定されないが、IL-1、IL-1、IL-2、IL-4、IL-8、IL-12、IL-21、G-CSF、GM-CSF、hTNF、mTNF、IFN、及びhVEGFが含まれる。本発明の一態様に従って、分析物が、サイトカインが関係する、或いはその検出及び/又は定量が診断又は予後の利益を生じる疾患を有する患者、或いは有することが疑われる患者から非外科的な侵襲性の採取技術によって得られた試料、例えば、血液、血清、血漿、糞便、又は尿の試料において測定されるのが有利である。

10

【0132】

いくつかの実施形態において、方法は、本発明の検出方法を用いて1つを超える、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20種、又はそれを超えるサイトカインのレベルを決定することを含む。

【0133】

例示的一実施形態において、本発明は、検出可能種の単一分子が、前記検出可能種が特異的に結合する、サイトカイン及び増殖因子から選択される1種である分析物の単一分子に相関する、先に記載した方法を提供する。様々な実施形態において、アッセイは、約5 pg/mL以下の量の前記検出可能種を検出することができる。ある実施形態において、アッセイは、約2 pg/mL以下の量の検出可能種の単一分子を検出する。

20

【0134】

本発明は、頑強なダイナミックレンジのアッセイも提供する。例示的实施形態において、検出のダイナミックレンジは、少なくとも約2 log、好ましくは少なくとも約3 log、より好ましくは少なくとも約4 logである。

【0135】

本発明のアッセイは、サイトカイン及び他の疾患マーカーに対して高度に感度が高い。例えば、一実施形態において、方法は、約5 pg/mL、4 pg/mL、3 pg/mL、2 pg/mL、1 pg/mL、0.5 pg/mL以下の量、及びさらには約0.1 pg/mL以下の量の少なくとも1つのサイトカインを検出することができるアッセイを提供する。

30

【0136】

様々な実施形態において、本発明は、約2 pg/mL未満、約1 pg/mL未満、約0.8 pg/mL未満、約0.6 pg/mL未満、約0.4 pg/mL未満、又は約0.3 pg/mL未満の濃度のIL-2を検出する方法を提供する。様々な実施形態において、検出される量は、健康対象において見出されるIL-2の量に対応する。

【0137】

例示的一実施形態において、本発明は、約0.1 pg/mL以下である(例えば、約0.07 pg/mL)IL-2に対する感度(検出限界(LOD))を有する、IL-2に対するアッセイを提供する。様々な実施形態において、本発明のアッセイは、約0.1 pg/mLから約2 pg/mLまで、好ましくは約0.16 pg/mLから約1.5 pg/mLまでの範囲の血漿中IL-2を定量する。例示的アッセイのIL-2に対するLODは、約0.1 pg/mL以下(例えば、約0.07 pg/mL)であり、約0.1 pg/mLから約2 pg/mLまで、好ましくは約0.16 pg/mLから約1.5 pg/mLまでの範囲内の血漿中IL-2を定量する。一実施形態において、血漿は健康対象からのものである。

40

【0138】

様々な実施形態において、本発明は、約20 pg/mL未満、約10 pg/mL未満、約8 pg/mL未満、約6 pg/mL未満、又は約4 pg/mL未満の濃度のIL-5を

50

検出する方法を提供する。様々な実施形態において、検出される量は、健康対象において見出される I L - 5 の量に対応する。

【 0 1 3 9 】

例示的一実施形態において、本発明は、約 1 . 2 p g / m L 以下である（例えば、約 0 . 9 p g / m L ） I L - 5 に対する感度（検出限界（ L O D ））を有する、 I L - 5 に対するアッセイを提供する。様々な実施形態において、本発明のアッセイは、約 1 . 5 p g / m L から約 1 9 . 5 p g / m L まで、好ましくは約 2 . 0 p g / m L から約 1 9 p g / m L までの範囲の血漿中 I L - 5 を定量する。例示的アッセイの I L - 5 に対する L O D は、約 1 . 2 p g / m L 以下（例えば、約 0 . 9 p g / m L ）であり、約 1 . 5 p g / m L から約 1 9 . 5 p g / m L まで、好ましくは約 2 . 0 p g / m L から約 1 9 p g / m L までの範囲内の血漿中 I L - 5 を定量する。一実施形態において、血漿は健康対象からのものである。

10

【 0 1 4 0 】

様々な実施形態において、本発明は、約 3 p g / m L 未満、約 2 p g / m L 未満、約 1 p g / m L 未満、約 0 . 8 p g / m L 未満、又は約 0 . 6 p g / m L 未満の濃度の I L - 7 を検出する方法を提供する。様々な実施形態において、検出される量は、健康対象において見出される I L - 2 の量に対応する。

【 0 1 4 1 】

例示的一実施形態において、本発明は、約 0 . 0 2 p g / m L 以下である（例えば、約 0 . 0 1 2 p g / m L ）、 I L - 7 に対する感度（検出限界（ L O D ））を有する、 I L - 7 に対するアッセイを提供する。様々な実施形態において、本発明のアッセイは、約 0 . 5 p g / m L から約 3 p g / m L まで、好ましくは約 0 . 4 p g / m L から約 2 . 7 p g / m L までの範囲の血漿中 I L - 7 を定量する。例示的アッセイの I L - 7 に対する L O D は、約 0 . 0 2 p g / m L 以下（例えば、約 0 . 0 1 2 p g / m L ）であり、約 0 . 5 p g / m L から約 3 p g / m L まで、好ましくは約 0 . 4 p g / m L から約 2 . 7 p g / m L までの範囲内の血漿中 I L - 7 を定量する。一実施形態において、血漿は健康対象からのものである。

20

【 0 1 4 2 】

様々な実施形態において、本発明は、約 1 2 p g / m L 未満、約 1 0 p g / m L 未満、約 8 p g / m L 未満、約 6 p g / m L 未満、又は約 4 p g / m L 未満の濃度の I L - 2 1 を検出する方法を提供する。様々な実施形態において、検出される量は、健康対象において見出される I L - 2 の量に対応する。

30

【 0 1 4 3 】

例示的一実施形態において、本発明は、約 0 . 1 p g / m L 以下である（例えば、約 0 . 0 6 p g / m L ）、 I L - 2 1 に対する感度（検出限界（ L O D ））を有する、 I L - 2 1 に対するアッセイを提供する。様々な実施形態において、本発明のアッセイは、約 2 p g / m L から約 1 0 p g / m L まで、好ましくは約 1 . 8 p g / m L から約 9 . 3 p g / m L までの範囲の血漿中 I L - 2 1 を定量する。例示的アッセイの I L - 2 1 に対する L O D は、約 0 . 1 p g / m L 以下（例えば、約 0 . 0 6 p g / m L ）であり、約 2 p g / m L から約 1 0 p g / m L まで、好ましくは約 1 . 8 p g / m L から約 9 . 3 p g / m L までの範囲内の血漿中 I L - 2 1 を定量する。一実施形態において、血漿は健康対象からのものである。

40

【 0 1 4 4 】

様々な実施形態において、本発明は、約 1 2 p g / m L 未満、約 0 . 4 p g / m L 未満、約 0 . 3 p g / m L 未満、約 0 . 2 p g / m L 未満、又は約 0 . 1 p g / m L 未満の濃度の I L - 1 b を検出する方法を提供する。様々な実施形態において、検出される量は、健康対象において見出される I L - 1 b の量に対応する。

【 0 1 4 5 】

例示的一実施形態において、本発明は、約 0 . 1 p g / m L 以下である（例えば、約 0 . 0 6 p g / m L ）、 I L - 1 b に対する感度（検出限界（ L O D ））を有する、 I L -

50

1 b に対するアッセイを提供する。様々な実施形態において、本発明のアッセイは、約 0.03 pg/mL から約 0.3 pg/mL まで、好ましくは約 0.05 pg/mL から約 0.2 pg/mL までの範囲内の血漿中 IL-1b を定量する。例示的アッセイの IL-1b に対する LOD は、約 0.1 pg/mL 以下（例えば、約 0.06 pg/mL）であり、約 0.03 pg/mL から約 0.3 pg/mL まで、好ましくは約 0.05 pg/mL から約 0.2 pg/mL までの範囲内の血漿中 IL-1b を定量する。一実施形態において、血漿は健康対象からのものである。

【0146】

様々な実施形態において、本発明は、約 7 pg/mL 未満、約 6 pg/mL 未満、約 5 pg/mL 未満、約 4 pg/mL 未満、又は約 3 pg/mL 未満の濃度の IFN γ を検出する方法を提供する。様々な実施形態において、検出される量は、健康対象において見出される IL-1b の量に対応する。

10

【0147】

例示的一実施形態において、本発明は、約 0.1 pg/mL 以下である（例えば、約 0.09 pg/mL）、IFN γ に対する感度（検出限界（LOD））を有する、IFN γ に対するアッセイを提供する。様々な実施形態において、本発明のアッセイは、約 7 pg/mL から約 2 pg/mL まで、好ましくは約 6.7 pg/mL から約 2.6 pg/mL までの範囲内の血漿中 IFN γ を定量する。例示的アッセイの IFN γ に対する LOD は、約 0.1 pg/mL 以下（例えば、約 0.06 pg/mL）であり、約 7 pg/mL から約 2 pg/mL まで、好ましくは約 6.7 pg/mL から約 2.6 pg/mL までの範囲内の血漿中 IFN γ を定量する。一実施形態において、血漿は健康対象からのものである。

20

【0148】

様々な実施形態において、本発明は、約 9 pg/mL 未満、約 6 pg/mL 未満、約 3 pg/mL 未満、約 2 pg/mL 未満、又は約 1 pg/mL 未満の濃度の IL-6 を検出する方法を提供する。様々な実施形態において、検出される量は、健康対象において見出される IL-1b の量に対応する。

【0149】

例示的一実施形態において、本発明は、約 0.01 pg/mL 以下である（例えば、約 0.003 pg/mL）、IL-6 に対する感度（検出限界（LOD））を有する、IL-6 に対するアッセイを提供する。様々な実施形態において、本発明のアッセイは、約 9 pg/mL から約 0.5 pg/mL まで、好ましくは約 8.9 pg/mL から約 0.48 pg/mL までの範囲内の血漿中 IL-6 を定量する。例示的アッセイの IL-6 に対する LOD は、約 0.01 pg/mL 以下（例えば、約 0.06 pg/mL）であり、約 9 pg/mL から約 0.5 pg/mL まで、好ましくは約 8.9 pg/mL から約 0.48 pg/mL までの範囲内の血漿中 IL-6 を定量する。一実施形態において、血漿は健康対象からのものである。

30

【0150】

様々な実施形態において、本発明は、約 1 pg/mL 未満、約 0.8 pg/mL 未満、約 0.6 pg/mL 未満、約 0.4 pg/mL 未満、又は約 0.1 pg/mL 未満の濃度の IL-17A を検出する方法を提供する。様々な実施形態において、検出される量は、健康対象において見出される IL-17A の量に対応する。

40

【0151】

例示的一実施形態において、本発明は、約 0.1 pg/mL 以下である（例えば、約 0.08 pg/mL）、IL-17A に対する感度（検出限界（LOD））を有する、IL-17A に対するアッセイを提供する。様々な実施形態において、本発明のアッセイは、約 0.7 pg/mL から約 0.05 pg/mL まで、好ましくは約 0.6 pg/mL から約 0.06 pg/mL までの範囲内の血漿中 IL-17A を定量する。例示的アッセイの IL-17A に対する LOD は、約 0.1 pg/mL 以下（例えば、約 0.08 pg/mL）であり、約 0.7 pg/mL から約 0.05 pg/mL まで、好ましくは約 0.6 p

50

g / mL から約 0 . 0 6 p g / mL までの範囲内の血漿中 I L - 1 7 A を定量する。一実施形態において、血漿は健康対象からのものである。

【 0 1 5 2 】

様々な実施形態において、本発明は、約 3 p g / mL 未満、約 2 p g / mL 未満、約 1 p g / mL 未満、約 0 . 8 p g / mL 未満、又は約 0 . 6 p g / mL 未満の濃度の T N F a を検出する方法を提供する。様々な実施形態において、検出される量は、健康対象において見出される T N F a の量に対応する。

【 0 1 5 3 】

例示的一実施形態において、本発明は、約 0 . 0 1 p g / mL 以下である（例えば、約 0 . 0 0 6 p g / mL ）、 T N F a に対する感度（検出限界（ L O D ））を有する、 T N F a に対するアッセイを提供する。様々な実施形態において、本発明のアッセイは、約 0 . 3 p g / mL から約 0 . 5 p g / mL まで、好ましくは約 2 . 7 p g / mL から約 0 . 6 p g / mL までの範囲内の血漿中 T N F a を定量する。例示的アッセイの T N F a に対する L O D は、約 0 . 0 1 p g / mL 以下（例えば、約 0 . 0 8 p g / mL ）であり、約 0 . 3 p g / mL から約 0 . 5 p g / mL まで、好ましくは約 2 . 7 p g / mL から約 0 . 6 p g / mL までの範囲内の血漿中 T N F a を定量する。一実施形態において、血漿は健康対象からのものである。

10

【 0 1 5 4 】

様々な実施形態において、本発明は、約 1 . 5 p g / mL 未満、約 1 p g / mL 未満、約 0 . 7 5 p g / mL 未満、約 0 . 5 p g / mL 未満、又は約 0 . 4 p g / mL 未満の濃度の I L - 4 を検出する方法を提供する。様々な実施形態において、検出される量は、健康対象において見出される I L - 4 の量に対応する。

20

【 0 1 5 5 】

例示的一実施形態において、本発明は、約 0 . 1 5 p g / mL 以下である（例えば、約 0 . 1 1 p g / mL ）の I L - 4 に対する感度（検出限界（ L O D ））を有する、 I L - 4 に対するアッセイを提供する。様々な実施形態において、本発明のアッセイは、約 1 p g / mL から約 0 . 1 p g / mL まで、好ましくは約 0 . 8 p g / mL から約 0 . 2 p g / mL までの範囲内の血漿中 I L - 4 を定量する。例示的アッセイの I L - 4 に対する L O D は、約 0 . 1 5 p g / mL 以下（例えば、約 0 . 1 1 p g / mL ）であり、約 1 p g / mL から約 0 . 1 p g / mL まで、好ましくは約 0 . 8 p g / mL から約 0 . 2 p g / mL までの範囲内の血漿中 I L - 4 を定量する。一実施形態において、血漿は健康対象からのものである。

30

【 0 1 5 6 】

様々な実施形態において、本発明は、約 1 p g / mL 未満、約 5 p g / mL 未満、約 0 . 3 p g / mL 未満、約 0 . 2 p g / mL 未満、又は約 0 . 1 p g / mL 未満の濃度の I L - 1 a を検出する方法を提供する。様々な実施形態において、検出される量は、健康対象において見出される I L - 1 a の量に対応する。

【 0 1 5 7 】

例示的一実施形態において、本発明は、約 0 . 1 p g / mL 以下である（例えば、約 0 . 0 6 p g / mL ）、 I L - 1 a に対する感度（検出限界（ L O D ））を有する、 I L - 1 a に対するアッセイを提供する。様々な実施形態において、本発明のアッセイは、約 0 . 6 p g / mL から約 0 . 0 5 p g / mL まで、好ましくは約 0 . 5 p g / mL から約 0 . 0 7 p g / mL までの範囲内の血漿中 I L - 1 a を定量する。例示的アッセイの I L - 1 a に対する L O D は、約 0 . 1 p g / mL 以下（例えば、約 0 . 0 6 p g / mL ）であり、約 0 . 6 p g / mL から約 0 . 0 5 p g / mL まで、好ましくは約 0 . 5 p g / mL から約 0 . 0 7 p g / mL までの範囲内の血漿中 I L - 1 a を定量する。一実施形態において、血漿は健康対象からのものである。

40

【 0 1 5 8 】

様々な実施形態において、本発明は、約 2 p g / mL 未満、約 1 . 5 p g / mL 未満、約 1 p g / mL 未満、約 0 . 8 p g / mL 未満、又は約 0 . 5 p g / mL 未満の濃度の G

50

M - C S Fを検出する方法を提供する。様々な実施形態において、検出される量は、健康対象において見出されるGM - C S Fの量に対応する。

【0159】

例示的一実施形態において、本発明は、約0.05 pg/mL以下である（例えば、約0.03 pg/mL）、GM - C S Fに対する感度（検出限界（LOD））を有する、GM - C S Fに対するアッセイを提供する。様々な実施形態において、本発明のアッセイは、約1.3 pg/mLから約0.2 pg/mLまで、好ましくは約1.1 pg/mLから約0.3 pg/mLまでの範囲内の血漿中GM - C S Fを定量する。例示的アッセイのGM - C S Fに対するLODは、約0.05 pg/mL以下（例えば、約0.06 pg/mL）であり、約1.3 pg/mLから約0.2 pg/mLまで、好ましくは約1.1 pg/mLから約0.3 pg/mLまでの範囲内の血漿中GM - C S Fを定量する。一実施形態において、血漿は健康対象からのものである。

10

【0160】

様々な実施形態において、本発明は、約2 pg/mL未満、約1 pg/mL未満、約0.5 pg/mL未満、約0.2 pg/mL未満、又は約0.1 pg/mL未満の濃度のIL - 12を検出する方法を提供する。様々な実施形態において、検出される量は、健康対象において見出されるIL - 12の量に対応する。

【0161】

例示的一実施形態において、本発明は、約0.008 pg/mL以下である（例えば、約0.01 pg/mL）、IL - 12に対する感度（検出限界（LOD））を有する、IL - 12に対するアッセイを提供する。様々な実施形態において、本発明のアッセイは、約1.2 pg/mLから約0.05 pg/mLまで、好ましくは約1 pg/mLから約0.08 pg/mLまでの範囲内の血漿中IL - 12を定量する。例示的アッセイのIL - 12に対するLODは、約0.008 pg/mL以下（例えば、約0.01 pg/mL）であり、約1.2 pg/mLから約0.05 pg/mLまで、好ましくは約1 pg/mLから約0.08 pg/mLまでの範囲内の血漿中IL - 12を定量する。一実施形態において、血漿は健康対象からのものである。

20

【0162】

様々な実施形態において、本発明は、約150 pg/mL未満、約100 pg/mL未満、約80 pg/mL未満、約60 pg/mL未満、又は約40 pg/mL未満の濃度のG - C S Fを検出する方法を提供する。様々な実施形態において、検出される量は、健康対象において見出されるG - C S Fの量に対応する。

30

【0163】

例示的一実施形態において、本発明は、約0.2 pg/mL以下である（例えば、約0.12 pg/mL）、G - C S Fに対する感度（検出限界（LOD））を有する、G - C S Fに対するアッセイを提供する。様々な実施形態において、本発明のアッセイは、約110 pg/mLから約30 pg/mLまで、好ましくは約97 pg/mLから約25 pg/mLまでの範囲内の血漿中G - C S Fを定量する。例示的アッセイのG - C S Fに対するLODは、約0.2 pg/mL以下（例えば、約0.01 pg/mL）であり、約110 pg/mLから約30 pg/mLまで、好ましくは約97 pg/mLから約25 pg/mLまでの範囲内の血漿中G - C S Fを定量する。一実施形態において、血漿は健康対象からのものである。

40

【0164】

様々な実施形態において、本発明は、約50 pg/mL未満、約40 pg/mL未満、約30 pg/mL未満、約20 pg/mL未満、又は約10 pg/mL未満の濃度のIL - 22を検出する方法を提供する。様々な実施形態において、検出される量は、健康対象において見出されるIL - 22の量に対応する。

【0165】

例示的一実施形態において、本発明は、約0.03 pg/mL以下である（例えば、約0.02 pg/mL）、IL - 22に対する感度（検出限界（LOD））を有する、IL

50

- 22に対するアッセイを提供する。様々な実施形態において、本発明のアッセイは、約40 pg/mLから約3 pg/mLまで、好ましくは約39 pg/mLから約4 pg/mLまでの範囲内の血漿中IL-22を定量する。例示的アッセイのIL-22に対するLODは、約0.03 pg/mL以下（例えば、約0.01 pg/mL）であり、約40 pg/mLから約3 pg/mLまで、好ましくは約39 pg/mLから約4 pg/mLまでの範囲内の血漿中IL-22を定量する。一実施形態において、血漿は健康対象からのものである。

【0166】

様々な実施形態において、本発明は、約40 pg/mL未満、約30 pg/mL未満、約20 pg/mL未満、又は約10 pg/mL未満の濃度のIL-10を検出する方法を提供する。様々な実施形態において、検出される量は、健康対象において見出されるIL-10の量に対応する。

10

【0167】

例示的一実施形態において、本発明は、約0.5 pg/mL以下である（例えば、約0.4 pg/mL）、IL-10に対する感度（検出限界（LOD））を有する、IL-10に対するアッセイを提供する。様々な実施形態において、本発明のアッセイは、約40 pg/mLから約8 pg/mLまで、好ましくは約35 pg/mLから約10 pg/mLまでの範囲内の血漿中IL-10を定量する。例示的アッセイのIL-10に対するLODは、約0.5 pg/mL以下（例えば、約0.4 pg/mL）であり、約40 pg/mLから約8 pg/mLまで、好ましくは約35 pg/mLから約10 pg/mLまでの範囲内の血漿中IL-10を定量する。一実施形態において、血漿は健康対象からのものである。

20

【0168】

様々な実施形態において、本発明は、約70 pg/mL未満、約60 pg/mL未満、約50 pg/mL未満、約40 pg/mL未満、又は約30 pg/mL未満の濃度のMIP-1aを検出する方法を提供する。様々な実施形態において、検出される量は、健康対象において見出されるMIP-1aの量に対応する。

【0169】

例示的一実施形態において、本発明は、約0.3 pg/mL以下である（例えば、約0.2 pg/mL）、MIP-1aに対する感度（検出限界（LOD））を有する、MIP-1aに対するアッセイを提供する。様々な実施形態において、本発明のアッセイは、約65 pg/mLから約25 pg/mLまで、好ましくは約63 pg/mLから約22 pg/mLまでの範囲内の血漿中MIP-1aを定量する。例示的アッセイのMIP-1aに対するLODは、約0.3 pg/mL以下（例えば、約0.2 pg/mL）であり、約65 pg/mLから約25 pg/mLまで、好ましくは約63 pg/mLから約22 pg/mLまでの範囲内の血漿中MIP-1aを定量する。一実施形態において、血漿は健康対象からのものである。

30

【0170】

さらに、本発明の検出方法は、広範なダイナミックレンジを有する頑強なアッセイを提供する。例えば、本発明の方法は、ダイナミックレンジが少なくとも1 log、1.5 log、2 log、2.5 log、3 log、3.5 log、及び最高4 log、及び少なくとも4 logを超えるアッセイを提供する。

40

【0171】

例示的一実施形態において、本発明は、患者が健康であるか、又は疾患、症候群、若しくは他の疾病に罹患しているか否かを決定する方法を提供する。方法は、分析物の試料を調製すること、及び本明細書に記載する分析物の単一分子に対応する検出可能種を検出することを含む。様々な実施形態において、検出されるサイトカインは、IL-2、IL-5、IL-7、IL-21、及びこれらの組合せから選択される1種である（図5）。サイトカインの測定される濃度を、サイトカインの濃度標準品又は健康個体に対応する閾値のサイトカイン濃度と比較する。試料中の測定されるサイトカイン濃度が、標準品にお

50

る濃度から、又は閾値の健康サイトカイン値から、予め決定された量を超えて逸脱する場合、これは対象が、疾患、症候群、又は他の疾病に罹患していることを示す。

【0172】

これらの実施形態に対する一変形において第1のサイトカイン濃度と第2のサイトカイン濃度の比をとる。次いで、この比を参照の比（例えば、健康対象におけるサイトカイン濃度に対応する比）と比較し、試料中で測定されたサイトカイン濃度の比の値が、参照の比の値から予め決定された量を超えて異なる場合、これは対象が、疾患、症候群、又は他の疾病に罹患していることを示す。例示的实施形態において、比は、 $[IL-5]/[IL-2]$ 、 $[IL-5]/[IL-7]$ 、 $[IL-5]/[IL-21]$ 、及びこれらの組合せから選択される（図6）。例示的实施形態において、 $[IL-5]/[IL-2]$ の比は、健康個体が約30以下、約20以下、約15以下、約10以下、又は約8以下であることを示す。例示的实施形態において、 $[IL-5]/[IL-7]$ の比は、健康個体が約25以下、約15以下、約10以下、約5以下、又は約3以下であることを示す。様々な実施形態において、 $[IL-5]/[IL-21]$ の比は、健康個体が約5以下、約4以下、約3以下、約2以下、又は約1以下であることを示す。

10

【0173】

試料調製

本発明の様々な実施形態は、ある試料パラメータは、感度及びダイナミックレンジの増強したアッセイをもたらすという認識に基づくものである。一般的に、先行技術は、小体積のアッセイ試料を調製し、それによってアッセイ感度の損失の一因となる移動損失を最小にすることからの利点を認めている。本発明は、当技術分野において有用であると一般に認められている体積より大きい体積を用いることによってアッセイの感度が増大する方法を提供する。より大きな液体体積の使用によって変化するアッセイの特徴の中には、アッセイ混合物内の非分析物種の非特異的なマトリックス効果の結合による、感度に対する有害作用がある。例示的一実施形態において、本発明は、低体積の同一のアッセイ混合物よりも低い規模のマトリックス結合効果を提供するのに十分な体積のアッセイ混合物を提供する。

20

【0174】

例えば、ある実施形態において、分析物と捕獲種間の複合体の形成は、少なくとも約25 μL の、例えば、約25 μL から約1000 μL まで、約40 μL から約800 μL まで、約60 μL から約500 μL まで、及び約75 μL から約300 μL までの量のバッファー溶液中で行われる。

30

【0175】

同様に、本発明者らは、特定の重量範囲の磁性粒子が固定化する捕獲種を用いて、磁性粒子が固定化する捕獲種と分析物の間に複合体が形成されると、アッセイの感度及びダイナミックレンジが増強されることを認めている。例示的一実施形態において、少なくとも約0.1 μg 、例えば、約0.1 μg から約40 μg まで、約0.5 μg から約20 μg まで、及び約1.0 μg から約10 μg までの、捕獲種にコンジュゲートしている磁性粒子が用いられる。

40

【0176】

様々な実施形態において、本発明のアッセイの感度は、分析物、捕獲種、及び検出可能種を含む複合体から検出可能種を溶出するのに利用される体積の規模を制御することによって増強される。したがって、一実施形態において、検出可能種の溶出体積はオリジナルの試料サイズよりも小さい。様々な実施形態において、溶出体積はオリジナルの試料体積よりも約2倍から約100倍小さく、例えば、オリジナルの試料体積よりも約2倍から約20倍小さい。様々な実施形態において、溶出体積はオリジナルの試料体積よりも約5倍から約15倍小さい。

【0177】

例示的一実施形態において、本発明の方法の間に、約200 μL の試料サイズは、オリジナルの試料体積よりも約2倍から約20倍小さい溶出体積に低減される。別の例示的一

50

実施形態において、本発明の方法の間に、約100 μ Lの試料サイズは、オリジナルの試料体積よりも約2倍から約20倍小さい溶出体積に低減される。他の例示的一実施形態において、約100 μ Lから約200 μ Lまでのオリジナルの試料体積は、約1 μ Lから約40 μ Lまで、例えば、約5 μ Lから約30 μ Lまで、又は約10 μ Lから約20 μ Lまでの体積に低減される。

【0178】

例示的一実施形態において、捕獲種と分析物の間の複合体は、約25 μ Lから約1000 μ Lまでのバッファー溶液に対して約0.1 μ gから約40 μ gまでの複数種の磁性粒子を含む混合物中に形成される。ある実施形態において、複合体は、約0.5 μ gから約25 μ gまでの複数種の磁性粒子を、約100 μ Lから約1000 μ Lまでの血漿試料と接触させることによって形成される。

10

【0179】

一実施形態において、提供する方法はサンドイッチアッセイに類似する。したがって、結合パートナーとしてモノクローナル抗体が用いられる。一次抗体は磁性粒子に連結して捕獲抗体として働く(「捕獲種」)。次いで試料を加え、抗体によって認識されるエピトープを有する単一分子が表面上の抗体に結合する。非結合の分析物分子を洗い流し、特異的に結合している分析物の分子だけを本質的に残す。結合している分析物分子/抗体が、検出可能標識を含んでいる検出抗体(「検出可能種」)と反応する。インキュベートして検出抗体と分析物分子の間を反応させ、非特異的に結合している検出抗体を洗い流す。例示的一実施形態において、他のアッセイ成分、とりわけ検出可能種が非存在である容器に磁性粒子を移すことによって、分析物-抗体-検出可能種の複合体が、混入している非結合の検出可能種を本質的に含まないようにする。溶出バッファーを用いて単一分子及び検出抗体を分離し、検出可能種は単一分子分析器中にある。或いは、検出可能種に結合している標識のみを放出し、検出し、それによって単一分子を間接的に検出することができる。当業者であれば理解される通り、捕獲種及び/又は検出可能種として抗体を使用するのは説明を明確にするためであり、本実施例中に組み入れる抗体を、本発明の精神から逸脱することなく、本質的にあらゆる他の捕獲種又は検出可能種に置き換えることができる。さらに、当業者であれば、非結合の検出可能種を分析物-抗体-検出可能種複合体から分離するための他の方法は本発明の範囲内であることを理解するであろう。

20

【0180】

様々な実施形態において、本方法の正確さは、繰返し可能な組成物の試料を使用することによって増強される。したがって、例示的一実施形態において、試料は、高濃度及び低濃度の試料成分の領域に分割され、又は均一な試料を生成するように均質化される。一実施形態において、試料は、その様々な成分の濃度勾配に分けられた血清試料である。例えば、1試料を遠心分離して、3層又はそれを越える層に検出可能に分離された試料が生成される。一例において、試料を、脂質層(例えば、脂質上層)、対象の分析物を含む中間層、及びフィブリン凝塊を含む層(例えば、フィブリン下層)を含む検出可能な3層に分離する。様々な例示的实施形態において、対象の分析物は中間層に存在する。本発明は、試料を中間層から回収するアッセイを提供する。

30

【0181】**検出**

本明細書に記載の方法により、単一分子がインタロゲーション空間を通過するとき、それらを1つずつ数え上げることができる。試料の濃度は、設定された時間の長さにおいて計数された単一分子の数及びインタロゲーション空間を通過する試料の体積から決定することができる。インタロゲーション空間が試料の流れの横断面全体を包含する場合、試料の濃度を算出するためには、設定された時間の長さにおいて計数された単一分子の数及び試料の流れの横断面を通過する体積のみが必要である。インタロゲーション空間が試料の流れよりも小さい場合、単一分子の濃度は、標準濃度の対照試料を用いて生成した標準曲線から、補間によって決定することができる。種々の実施形態では、単一分子の濃度は、測定された単一分子を内部の単一分子の標準と比較することによって決定することがで

40

50

きる。濃度は、計数された単一分子の数から推定することができる。例えば、試料の希釈度が分かると、出発試料中の単一分子の濃度を算出することができる。

【0182】

本発明の方法による、単一分子を検出するための例示的な装置は、共有の米国特許出願公開第20060078998号及び同第20080171352号に記載されている。適切なシステムの別の例は、図1の、Singulex, Inc.によって製造された光学システムである。

【0183】

ある例示的な実施形態では、単一分子の検出には、単一分子分析器を利用する。例示的な単一分子分析器としては、電磁放射線を放射するための電磁放射線源が挙げられる。放射線源は、場合によって連続的な波動放射源である。分析器は、電磁放射線源から放射される電磁放射線を受信するように配置された第1のインタロゲーション空間も含む。インタロゲーション空間は、場合によって調節可能であり、一部の実施形態では、約0.02 pL ~ 約300 pL、約0.05 pL ~ 約50 pL、又は約0.1 pL ~ 約25 pLの体積を有する。

10

【0184】

分析器は、前記検出可能種の単一分子の第1の電磁波の特徴を測定するための、第1のインタロゲーション空間に作動可能に接続されている第1の電磁放射線検出器も含む。種々の実施形態では、分析器は、少なくとも1つの試料を自動的にサンプリングし、試料コンテナと前記第1のインタロゲーション空間の間に流体連通を提供することができるサンプリングシステムも含む。特定の実施形態では、分析器システムは、第1のインタロゲーション空間と流体連通した試料回収システムをさらに含む。理想的には、回収システムによって、実質的に全試料の回収が可能である。分析器は、場合によって試料調製システムを含み得る。

20

【0185】

本発明の方法の非常に高い感度に寄与する特徴は、検出可能種を検出し、計数する方法であり、検出可能種は、一部の実施形態では、検出される単一分子に結合している、又は検出される単一分子に一致する。簡単に述べると、ある例示的な実施形態では、検出装置を通して流れる処理試料は、標識に使用された蛍光部分に対して適切な励起波長で光線を放射するレーザーからのEM照射に所与のインタロゲーション空間を所定の期間供し、その期間中に放射された光子を検出することによって、一連の検出事象に有効に分割される。検出器によって検出されたシグナルは、それぞれが予め選択された時間の長さ(ピンの幅)を有する任意の時間区分(ピン)に分割される。本発明の範囲から逸脱することなく他のピンの幅を使用することができるが、一実施形態では、ピンの幅は約10 μs ~ 約5 msの範囲で選択される。例示的なピンの幅は1 msである。各セグメントに含有されるシグナルの数は確立されている。

30

【0186】

所定の期間それぞれが「ピン」である。所与のピンにおいて検出された光子の総数が所定の閾値レベルを超える場合、そのピンに対して検出事象が登録される、即ち、標識が検出されている。光子の総数が所定の閾値レベルでない場合、検出事象は登録されない。一部の実施形態では、処理試料の濃度は、検出事象の大部分について、検出事象が、元の試料の対象の単一分子に対応する1つの、ウィンドウを通過する検出可能種のみを表す、つまり、単一のピンにおいて、少数の検出事象が2つ以上の標識を表すのに十分に希釈する。一部の実施形態では、さらなる改良を適用して、処理試料中の高い標識濃度、即ち、2つ以上の標識が単一の検出事象として検出される確率がもはや意味がない濃度を正確に検出できるようにする。

40

【0187】

ある例示的な実施形態では、この方法は、単一分子のみを計数することによる検出を提供する。本発明の方法は、単一のピンにおいて検出可能種の複数コピーを計数することも含み得る。したがって、別の実施形態では、本発明は、単一分子、事象光子、全光子及び

50

それらの組合せからの光子から選択される1種を計数することによる検出を提供する。

【0188】

一実施形態では、検出されたシグナルは、データを利用する前に、まず分析してノイズレベルを決定し、閾値を超えるシグナルを選択する。一実施形態では、ノイズレベルは、多くのピンにわたってシグナルを平均することによって決定する。他の実施形態では、バックグラウンドレベルは、平均ノイズレベル、又は二乗平均平方根ノイズから決定する。他の場合において、典型的なノイズ値は、選択された値又は統計値である。ほとんどの場合、ノイズはポアソン分布に従うことが予想される。

【0189】

種々の実施形態では、真のシグナル（ピーク、衝突、単一分子）とノイズを識別するために閾値を決定する。はねられる真のシグナルの数が最小であると同時に、無作為のノイズからの偽陽性シグナルの数が最小になるように、閾値の選択には注意しなければならない。閾値を選択するための方法は、ノイズレベルを超える固定値を決定し、ノイズシグナルの分布に基づいて閾値を算出することを含む。一実施形態では、閾値は、バックグラウンドレベルを超える標準偏差の固定値に設定する。ノイズのポアソン分布を想定して、この方法を使用し、実験の時間経過にわたる偽陽性シグナル数を見積もることができる。

【0190】

一実施形態では、本発明で利用する分析器又は分析システムにより、分析物、例えば、1ナノモル未満、又は1ピコモル未満、又は1フェムトモル未満、又は1アトモル未満、又は1zeptomol未満のレベルのバイオマーカーを検出することができる。一実施形態では、分析器又は分析システムにより、1つ又は複数の分析物、例えば、1つ又は複数のバイオマーカーの濃度の、1つの試料から別の試料までの、約0.1%未満、約1%未満、約2%未満、約5%未満、約10%未満、約20%未満、約30%未満、約40%未満、約50%未満、約60%未満、又は約80%未満の変化を、試料中にバイオマーカーが1ナノモル未満、又は1ピコモル未満、又は1フェムトモル未満、又は1アトモル未満、又は1zeptomol未満の濃度で存在するとき、及びそれぞれの試料のサイズが約100 μ L未満、約50 μ L未満、約40 μ L未満、約30 μ L未満、約20 μ L未満、約10 μ L未満、約5 μ L未満、約2 μ L未満、約1 μ L未満、約0.1 μ L未満、約0.01 μ L未満、約0.001 μ L未満、又は約0.0001 μ Lであるとき、検出することができる。一実施形態では、分析器又は分析システムにより、第1の試料から第2の試料の、分析物の約20%未満の濃度の変化を、分析物が、約1ピコモル未満の濃度で存在するとき、及びそれぞれの試料のサイズが約50 μ L未満であるとき、検出することができる。一実施形態では、分析器又は分析システムにより、第1の試料から第2の試料への分析物の約20%未満の濃度の変化を、分析物が約100フェムトモル未満の濃度で存在するとき、及びそれぞれの試料のサイズが約50 μ L未満であるとき、検出することができる。一実施形態では、分析器又は分析システムによって、第1の試料から第2の試料への分析物の約20%未満の濃度の変化を、分析物が約50フェムトモル未満の濃度で存在するとき、及びそれぞれの試料のサイズが約50 μ L未満であるとき、検出することができる。一実施形態では、分析器又は分析システムにより、第1の試料から第2の試料への分析物の約20%未満の濃度の変化を、分析物が約5フェムトモル未満の濃度で存在するとき、及びそれぞれの試料のサイズが約5 μ L未満であるとき、検出することができる。一実施形態では、分析器又は分析システムにより、第1の試料から第2の試料への分析物の約20%未満の濃度の変化を、分析物が約1フェムトモル未満の濃度で存在するとき、及びそれぞれの試料のサイズが約5 μ L未満であるとき、検出することができる。

【0191】

1つ又は複数の分析物の単一分子は、1つ又は複数の検出可能種における1つ又は複数

10

20

30

40

50

の標識を検出することによって検出することができる。本発明のある例示的な実施形態では、検出可能種の単一分子を検出可能にしている外因性の性質は、少なくとも2つの標識によってもたらされる。例えば、標的の単一分子は、2つ以上の標識で標識されており、各ラベルは、1つ又は複数の波長で検出される放射が他のラベル（単数又は複数）の放射と区別可能なので、別個である。この例では、単一分子は、遊離の標識（又は、分析物又は試料構成要素に付随的に結合したものと）、2つ以上の波長で検出された放射の比によって区別される。別の実施例において、単一分子は、2つ以上の標識で標識され、その標識の少なくとも2つは同じ波長で放射する。この例では、単一分子は、各単一分子に結合させた2つ、3つ、又はそれ以上の標識からの放射によって生成する蛍光の検出強度に基づいて区別される。

10

【0192】

別の実施形態では、色素は、同一又は重複する励起スペクトルを有するが、区別可能な放射スペクトルを持つ。色素は、実質的に異なる放射スペクトルを持つように選択することが好ましく、約10nm超で分離される最大放射を有することが好ましく、約25nm超で分離される最大放射を有することがより好ましく、約50nm超で分離される最大放射を有することがいっそう好ましい。機器を用いた方法を使用して2つの色素を区別することが望ましい場合、種々のフィルター及び回折格子によって、それぞれの放射スペクトルを独立に検出することができる。機器を用いた識別は、バンド幅が広い色素よりもバンド幅が狭い色素を選択することによって増強することもできるが、そのような色素は、必ず高振幅の放射を持たなければならない、又は統合されたシグナルの強さが失われることがシグナルの検出に不都合にならない十分な濃度で存在しなければならない。

20

【0193】

2つ以上の標識を使用する種々の実施形態では、第2の標識によって第1の標識の蛍光が消光し、その結果二重に標識された単一分子の蛍光シグナルが失われることがある。適切な蛍光発生/消光対としては、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 Quencher（商標）-1（Biosearch Technologies, Novato, CA）が挙げられる。

30

【0194】

別の実施例において、励起状態の2つの色素単一分子間の距離依存性相互作用である蛍光共鳴エネルギー転移（「FRET」）のために、2つの標識を使用することができる。この場合、供与体から光子が放射されずに供与体から受容体単一分子に励起が転移される。供与体及び受容体単一分子は、近接近していなければならない（例えば、～約100の範囲内）。適切な供与体、受容体の対としては、フルオレセイン/テトラメチルローダミン、LAEDANS/フルオレセイン、EDANS/dabcyl、フルオレセイン/QSY7、（R. Haugland、「Molecular Probes」、第9版、2004年）及び他の多くの当業者に公知のものが挙げられる。

【0195】

単一分子は、色素タグ及び質量タグなどの2種以上の標識で標識して検出及び/又は識別を容易にすることができる。例えば、分析物は、一方が標識されず、質量タグ又は質量/電荷タグとして働き、他方が色素タグを有するような2つの検出可能種（例えば、2つの区別可能な抗体）で標識することができる。一部の実施形態では、例えば、輸送力として電気泳動を使用する場合、タンパク質は、色素タグを持つ抗体にのみゆっくりした速度で結合する、同様のサイズのタンパク質と区別される（追加的に結合した抗体の質量又は質量/電荷が増加することによって引き起こされる）。

40

【0196】

データ処理

試料中の単一分子の検出データを収集した後、種々の実施形態では、データを、同じ実験条件下で取得した参照セットデータと比較して、分析的、診断的又は予後的な値の差異

50

の特徴を示す変動が分析物の単一分子の検出において存在するかどうかを決定する。例示的な実施形態では、試験データと参照データの差異は、疾患の状態、疾患の状態の進行、疾患の状態の期、又は疾患の状態に対する治療モダリティの有効性を示している。この比較を行ういくつもの手段が有効である。ある例示的な実施形態では、多変量解析を使用する。

【0197】

微妙な変動を有する試料から取得したデータ間の識別には、強力且つ繊細な分析方法の使用が必要である。これらの方法は、種々の原因によって生じ得る非線形性についてモデリングし、並びに器具の設定における日々のずれを説明しなければならない。試料の取扱いの間違い、縞ノイズ、基線の変化、バッチ間の変動、非診断的なデブリの存在、及び識別に不都合な影響を与える他の因子全てについても十分に説明し、モデリングすることが好ましい。最後に、強さを証明する方法のために、質の良いデータと質の悪いデータを区別し、参照セットを代表していない試料を除外しなければならない。代表していない試料は、外れ値の試料と称される。外れ値の試料は、参照セットの他の試料全てと統計的に異なる試料である。サイトカインなどの種の単一分子検出の場合、外れ値データセットは、単一分子のコピー数が最適に満たない試料、及び/又は非診断的なデブリが豊富な試料に由来し得る。

10

【0198】

種々の実施形態では、参照データセットは、選択された単一分子についてのデータセットにおける、全ての予想される変動を表している。次に、全試料のデータを、例えば、分光データの解析又は多変量解析の古典的な方法などの方法を使用して処理する。

20

【0199】

生体試料を分析するために多変量解析が使用されている。例えば、米国特許第4,975,581号(1990年12月4日発行)において、Robinsonらは、多変量解析を使用して既知の生体液における生体分析物の類似性を決定するための定量的な方法を記載している。

【0200】

主成分分析(PCA)及び識別分析を使用して正常な生体試料と異常な生体試料を区別する。Geら、Applied Spectroscopy 49巻:432~436頁(1995年)を参照されたい。米国特許第5,596,992号(1997年、1月28日発行)においてHaalandらは、正常な細胞試料と悪性の細胞試料の差異を検出するための、多変量的な方法の使用を教示している。

30

【0201】

本発明において、多変量解析を使用する場合、単一分子の検出データの比較は、前処理(即ち、平滑化及び/又は誘導体化)される可能性がある、又は、平滑化及び誘導体化されない可能性があるデータに対する部分最小二乗法(PLS)又は主成分分析(PCA)統計的方法によって行うことができる。主成分回帰(PCR)を使用する比較は、PCAを使用して行うことが好ましい。これらの統計的方法を行ういくつものコンピュータプログラムが利用可能であり、それらとしてPCR-32(登録商標)(Bio-Rad, Cambridge, Mass., USAから)及びPLS-PLUS(登録商標)及びDISCRIMINATE(登録商標)(Galactic Industries, Salem, NH, USAから)が挙げられる。根源的な理論及び算出についての考察は、例えば、Haalandら、Anal. Chem. 60巻:1193~1202頁(1988年);Cahnら、Applied Spectroscopy、42巻:865~872頁(1988年);及びMartensら、MULTIVARIATE CALIBRATION、John Wiley and Sons、New York、NY(1989年)において見ることができる。PCR及びPLSはどちらも、参照セットを作成するための参照単一分子試料の単一分子に由来するデータのライブラリーを使用し、ここで各データセットは本質的に同一の条件下で取得される。データ解析の技法は、データの比較(PCRの場合、このステップはPCAとして公知である)、及び線形回帰からなる

40

50

。因子又は主成分の線形結合を使用して再構築されたデータセットを導き出す。この再構築されたデータセットを、分類のための基礎になる未知検体のデータセットと比較する。

【0202】

本発明の特定の態様では、個々のデータセットに対して生成した予測スコアを、検出された単一分子の特定の種について取得したデータセット全体にわたって「平均する」。試料全体にわたる個々のデータセットからの「平均」スコアを、試料の集合全体にわたって「平均」する。「平均する」方法は、単純に予測値の算術に基づいた平均をとることからなっており、又は、当分野で公知の、母集団の分布を決定するための他の統計的方法に頼ってよい。この方法としては、例えば、中央値を決定すること、及び予測スコア集団の平均を決定することが挙げられる。集団が、決定された中央のどちらかの側に分散する程度を、例えば、標準偏差、四分位範囲、範囲及び平均偏差などの、ばらつきの測定を確立することによって評価する。本発明を実行するのに有用な、予測スコア集団の「平均」値及び集団の分散の程度の両方を確立するための他の方法は、当業者に明らかであろう。

10

【0203】

未知試料を分析する前に、同じ単一分子の別のデータセットを使用して参照を検証し最適化することができる。この第2のデータセットにより、モデルの順位を決定することによってPCRモデル又はPLSモデルの予測の正確度が増強される。最適な順位は、既知の診断についてのPCR予測又はPLS予測と比較することによる順位の範囲から決定する。最適と決定されたことから順位を上げる又は下げることは、PLS予測又はPCR予測に不都合な影響を与える恐れがある。例えば、最適から最適以下に順位が徐々に下がるにつれて、PCR又はPLSは、参照スペクトルにおける変動を次第に説明しなくなる。対照的に、順位が最適であると決定されたところを超えて徐々に上がると、PCR方法体系又はPLS方法体系によって、参照スペクトルにおける重要な情報ではなく無作為な変動のモデリングが引き起こされることになる。

20

【0204】

一般に、参照セットが含む単一分子の検出データが多いほど、モデルが良好になり、機器のずれ及び屈折率の変化によって生じ得るバッチ間の変動、基線の変化及び非線形性を説明する見込みが良好になる。参照データにより未知試料が真の代表になっている限り、下手な試料の取扱い及び調製による間違い、試料が不純であること、及びオペレーターのミスも同様に説明することができる。

30

【0205】

PCR分析及びPLS分析を使用することの別の利点は、これらの方法により、参照データに相対的な未知試料のノイズレベルデータが測定されることである。生体試料を、複数の摂動源に供する。これらの摂動の一部はデータの質に激しく影響を及ぼし、「診断」の結果に不都合に影響する。したがって、参照データに適合するデータと参照データに適合しないデータ（例えば、外れ値の試料）を区別することが好ましい。データセット（試料）の参照データに対する適合又はあてはまりの悪さを検出することにおいて、F値が強力なツールである。一般に、F値が参照のF値よりも相当大きいことにより、「あてはまりの悪さ」が示され、それは分析から除外すべきである。外れ値の試料を除外できることは、質が悪く、損なわれたデータから「診断」を作成することが回避されるので、PCR及びPLSに強さ及び信頼性を加える。F値は、Haalandら、Anal. Chem. 60巻：1193～1202頁（1988年）、及びCahnら、Applied Spectroscopy 42巻：865～872（1988年）に記載の方法によって算出することができる。

40

【0206】

異なる試料からの単一分子のデータ間を識別する場合、生体材料はもはや既知濃度の構成物を有さない。結果的に、例示的な実施形態では、参照データは、参照の1種として分類される試料に対して許容される変動の範囲を決定し、また参照データは、試料の作製における多様性を説明する前処理アルゴリズムも含むべきである。

【0207】

50

他のデータ処理アルゴリズムが本発明において有用である。例えば、本発明の一例示的な実施形態では、診断的に有益なサイトカイン（又は他のマーカー）は、まず、対照の個体と疾患患者の統計的に加重した差異を使用して同定することができ、 $D - N \cdot \frac{D^*}{N}$ として算出することができる。ここでDは特定の疾患を有すると診断される患者におけるサイトカインの濃度の中央値であり、Nは対照の個体の中央値であり、 (D^*) はDの標準偏差であり、 (N) はNの標準偏差である。規模が大きくなるほど、疾患集団と正常集団の統計的差異は大きくなる。

【0208】

本発明の一実施形態によると、対照の個体と疾患患者の統計的に加重した差異が、0.2、0.5、1、1.5、2、2.5又は3を超えるサイトカインが診断的に有益なマーカーとして同定される。

10

【0209】

当業者には当然のことながら、患者自身が「対照」であり得る。例えば、アッセイが、疾患の進行を治療する経過のモニタリングの一部である場合、治療の経過の開始時点又は疾患が発見若しくは診断されたときに患者から取得したデータは、治療又は疾患の進行による疾患マーカーの変化を評価するための参照データセットとして役立つ。患者からのデータが、参照データセット又は基線のデータセットとして役立つ、本発明のアッセイのための試料をもたらす他の実施形態は、当業者に明らかであろう。

【0210】

特定のサイトカイン（単数又は複数）などの、診断マーカー（単数又は複数）として機能する特定の候補分析物の有効性を決定するための、本発明の方法に有用な別の統計分析方法は、受信者動作特性（ROC）曲線分析である。ROC曲線は、陽性の試料又は対象及び陰性の試料又は対象を正確に同定するための診断の能力に対するカットオフの基準（例えば、アッセイのシグナル又は分析物のレベルなどの診断的指標に対するカットオフ値）の効果を調べるためのグラフによる手法である。例示的な分析において、ROC曲線の一方の軸は真陽性率（TPR、真陽性の試料/対象が、陽性であると正しく同定される確率）、又は、代替として、偽陰性率（FNR = 1 - TPR、真陽性の試料/対象が、陰性であると誤って同定される確率）である。他方の軸は、真陰性率（TNR、真陰性の試料が、陰性であると正しく同定される確率）、又は、代替として、偽陽性率（FPR = 1 - TNR、真陰性の試料が、陽性であると誤って同定される確率）である。ROC曲線は、試料/対象の集団に対するアッセイ結果を使用して、試料/対象を陽性又は陰性であると同定するのに使用する診断的なカットオフ値を変化させ、各カットオフ値に対して算出したTPR（又はFNR）及びTNR（又はFPR）の値をプロットすることによって生成する。曲線下面積（本明細書ではROC面積と称する）は、陽性の試料/対象と陰性の試料/対象を分離するための診断の能力の1つの指標である。

20

30

【0211】

データの診断的アッセイ及び統計分析の当業者は、本明細書において提供される教示及び手引きを考えれば、特定の適用のための必要（例えば、感度及び特異性）を最もよく満たす適切なカットオフ値、カットオフライン、カットオフ比、カットオフ帯域などを過度な負担なしで選択することができるであろう。例えば、受信者動作特性（ROC）曲線などの種々の統計的なツールは、アッセイの性能（例えば、予測された真陽性画分、偽陽性画分、真陰性画分及び偽陰性画分）に対する、カットオフの調節の効果を評価するために利用することができる。或いは、患者集団の統計分析により、特異的な分析物の値を、患者が疾患を有する確率又は有さない確率に変換することができ得る。参照範囲を決定するために個体集団を選択し分析することにおけるバックグラウンドについては、Boyd J. C. 「Reference Limits in the Clinical Laboratory」 in Professional Practice in Clinical Chemistry: A Companion Text; D. R. Dufour Ed., 1999年、Washington D. C.: American Assoc. CLIN. CHEM., Chapter 2、2-1から2-7頁を参照された

40

50

い。疾患の可能性についての決定の限界（即ち、カットオフ）を試験結果から選択又は計算することにおけるバックグラウンドについては、Boyd J. C. 「Statistical Aids for Test Interpretation」 in Professional Practice in Clinical Chemistry : A Companion Text ; D. R. Dufour Ed.、1999年、Washington D. C. : American Assoc. CLIN. CHEM.、Chapter 3、3 - 1から3 - 11頁を参照されたい。

【0212】

本発明の教示を考えれば、当業者は、第1のマーカ（例えば、第1のサイトカイン）及び1つ又は複数の追加のマーカ（例えば、第2のサイトカイン）の選択により、相関プロット軸を入れ換えることができ、したがって、患者試料の測定されたマーカレベルが特定のカットオフ比、カットオフライン及び/又はカットオフプロファイルを上回るか下回るかを決定するための基準によって疾患の状態が示され、それに合うように分析を調節することができることも理解するであろう。

10

【0213】

本発明は、分析物の単一分子の分析から取得したデータセットも提供する。ある例示的な実施形態では、データセットは、前記分析物の単一分子に対するアッセイから収集した分析物からのシグナルに対応する少なくとも1つのデータ点を含み、前記アッセイは、0.5 pg/ml未満の検出限界及び少なくとも2.5 logのダイナミックレンジを有する。

20

【0214】

別の態様では、本発明は、ビジネスモデルを提供する。一実施形態では、本発明は、事業体が本発明の方法を使用して試料のアッセイについて結果を得ること、前記結果を報告すること、そして、結果を報告することに対して、事業体に支払いがなされることを含むビジネスを行う方法を提供する。一部の実施形態では、事業体は、臨床検査改善修正（Clinical Laboratory Improvement Amendments）（CLIA）研究所である。一部の実施形態では、事業体は、CLIA研究所ではない研究所である。試料は、単一粒子検出器によって分析することができる任意の種類の試料であってよい。一部の実施形態では、試料は個体からのものである。個体は、本明細書に記載の任意の種類の個体であってよい。一部の実施形態では、個体は、治療方法のスクリーニング、診断、予後、モニタリング及び/又は決定が望まれる患者（例えば、動物、例えば、ヒト）である。一部の実施形態では、個体は、臨床試験又は前臨床試験に参加している個体（例えば、動物、例えば、ヒト）である。一部の実施形態では、試料は、研究計画、例えば、生物医学的研究、農業研究、工業研究、教育的研究、バイオテロリズム研究などに関わっている個体からのものである。一部の実施形態では、支払いは、結果報告を受け取る個体、例えば、医療の専門家及び/又は試料を得た個体によって、分析を行う事業体、例えば、CLIA研究所に対してなされ得る、又は、試料を得た個体によって、分析を行う事業体から報告を受け取る個体に対して、若しくは事業体自体に対して、若しくは両者に対して、若しくはそのいくつかの組合せに対してなされ得る。別の実施形態では、本発明は、個体からの試料のアッセイについての結果を得るために、単一粒子を検出することができる2つのインタロゲーション空間を備える検出器を医療の提供者が使用すること、前記結果を個体又はその代表者に報告すること、及び前記結果を報告することに対して個体から支払いがなされることを含むビジネスを行う方法を提供する。

30

40

【0215】

キット

本発明は、本発明の分析を行うためのキットも提供する。ある例示的な実施形態では、キットは、1つ又は複数の捕獲種、検出可能種、及び磁性粒子を含む。キットは、本発明の方法を行うのに使用する1つ又は複数の試薬も含む。本発明のアッセイを行うための説明書も提供される。IL-6の検出における例示的なキット及びその使用を例2に記載する。

50

【0216】

以下の実施例は、本発明の特定の実施形態を例示するために提供され、それら又は本発明の他の実施形態のいずれにも限定するものではない。

【実施例】

【0217】

(例1)

材料と方法

材料

抗体及び分析物(組換え)は、R & D Systems (Minneapolis, MN) から入手した。抗体の対応対については製造者の推奨に従った。抗体の標識に使用した蛍光色素及びビオチンサクシニミジルエステルは、Invitrogen (Carlsbad, CA) から入手した。ラット、イヌ及びサル の cTnI は、天然源から精製されたものであり、Hytest (Sweden) から入手した。ヒトクエン酸リチウム血漿検体は、Interstate blood bank (St. Louis, MO) から購入した。ストレプトアビジンで被覆した常磁性微粒子(MP)は、Invitrogen から入手した(MyOne, #650-01)。抗体は、製造者の推奨を活用して蛍光色素(検出抗体、通常ポリクローナル)及びビオチン(捕獲抗体、通常モノクローナル)で標識した。MPは、飽和条件下でビオチン標識した抗体で被覆し(製造者の推奨に従って)、洗浄し、アッセイバッファー中に保存した。アッセイバッファーは、1%BSA、トリス緩衝生理食塩水、pH7.4、0.05% Triton X-100及び異種親和性/HAMA抗体遮断試薬(Scantibodies Laboratories, Roche Life Sciencesから購入)からなり、製造者の推奨に従って使用した。

10

20

【0218】

Erennaイムノアッセイ

他に明記しない限り、典型的なErennaイムノアッセイは、以下の通り行った。試料又は標準物質(例えば50µL~100µL)を捕獲抗体で被覆したMP(例えば150µL)を含有するアッセイバッファーで希釈し、96ウェルプレート中、25で1~2時間、振とうしながらインキュベートした。全ての血漿試料又は血清試料を前処理なしでそのまま試験した。磁気ベッド(Ambion, Texas)を使用してMPを分離した。上清を除去し、MPを1回洗浄し、次いで検出抗体(アッセイバッファー中に希釈、50~500µg/mL)20µLを加え、25で60分、振とうしながらインキュベートした。MPを再度磁気的に分離し、トリス緩衝食塩水+0.05% Triton X-100を使用して6回洗浄した。残った洗浄バッファーを除去した後、溶出バッファー(4Mの尿素)20µLを加えた。この試薬は、抗体-分析物相互作用を破壊し、MPから検出抗体を遊離させる。次いで、各96ウェル中の溶液を384ウェルの濾過プレート(0.2ミクロン、AcroPrep, East Hills NY)に移し、3,000RPMで3分遠心分離して溶出バッファー中の検出抗体をMPから分離した。次いで、溶出、濾過された384ウェルプレート中の材料をErennaイムノアッセイシステム(Singulex, Inc.)に置いた。

30

40

【0219】

Erennaイムノアッセイシステム

Erennaイムノアッセイシステムは、単一分子計数技術に基づいている。(直径100マイクロメートルの)キャピラリーフローセルによって、384ウェルプレートの各ウェルから液体を少しずつ吸い上げ、汲み出す。液体は、キャピラリー内部のインタロゲーション空間を通過する。図1に示すように、レーザーから発生する光線は二色性ミラー及び共焦点顕微鏡レンズを経由してインタロゲーション空間内に向けられる。色素標識した抗体がこのインタロゲーション空間を通過すると、その抗体は、共焦点顕微鏡レンズ及び光子検出器を経由して測定される蛍光光線を放射する。検出器からの出力は、パルスの列であり、各パルスが検出された光子1つを表している。これらのパルスは、計数用電子

50

機器に送られ、そこでパルスは1ミリ秒ピンで計数される。出力シグナルの組合せを使用することによって4.5 + logダイナミックレンジを得る。最初に、バックグラウンドレベルを決定し、このレベルに基づいて、バックグラウンドを超える5標準偏差閾値を作成する。この閾値より大きい光線の閃光のみを計数する。これらの個々のピーク（シグナル強度ではない）を1分の間隔又は1,000ピークが得られるまでのいずれかにわたって合計する。最後のシグナルは、それらの測定された事象全ての合計であり、検出事象（DE）と称される。第2の出力は事象光子（EP）と称され、全検出事象において計数された全光子の合計である。2つの分子が同じ1ms計数ピンの検出器を通過する確率がかなりある場合、この測定を高濃度で使用する。分析物の濃度が最も高いところでは、EP事象は飽和し始め、全光子事象の合計である総光子（TP）を使用する。DE、EP及びTPシグナルを使用して、各シグナル種について加重した4パラメータロジスティック曲線のあてはめを生成する。未知の濃度を見積もるために、DEシグナル、EPシグナル及びTPシグナルをそれぞれの標準曲線から離して補間して3つの別々の濃度の見積もりを得る。これら3つの濃度を、標準曲線の傾きに基づく加重平均を使用して組み合わせる。これにより、> 4.5 log線形レポートレンジがもたらされる。

【0220】

結果

本節は、Erennaイムノアッセイシステムの性能についての全体的な見通しをもたらす目的で、異なる分析物を使用した一連の異なる実験からの例示的なデータを提示する。

【0221】

レポートレンジ、線形性、正確度及び再現性

ヒトIL-17アッセイを用いて生成した典型的なシグナルデータの例を表1に示す。標準曲線を構築するために使用するDEシグナル、EPシグナル及びTPシグナルを太字フォントで示す。曲線のあてはめの正確度を決定するために、表1のシグナル値を、曲線のあてはめアルゴリズムを使用して逆補間し、結果を測定pg/mL対予測pg/mLとして示す。

【表1】

表1. ヒトIL-17Erennaアッセイ標準曲線からのシグナル、逆補間値及び回収率

IL-17 pg/mL	検出事象数/分			光子事象数/分			総光子数/分			測定 IL-17 pg/mL			バイアス
	平均	SD	CV	平均	SD	CV	平均	SD	CV	平均	SD	CV	
1,000	8,920	2,268	25%	13,879,788	157,439	1%	159,161,873	2,366,288	1%	843	23.00	3%	84%
500	10,538	78	1%	10,910,741	285,636	3%	88,854,604	233,442	0%	468	1.23	0%	94%
250	10,185	171	2%	7,515,849	104,214	1%	46,946,733	3,717,269	8%	238	20.03	8%	95%
125	10,250	217	2%	5,237,108	363,035	7%	25,753,075	1,564,066	6%	119	9.74	8%	96%
63	10,005	45	0%	3,485,980	178,040	5%	14,781,797	870,996	6%	59	4.79	8%	94%
31	9,639	182	2%	2,406,459	91,291	4%	9,325,716	326,061	3%	32	1.59	5%	102%
16	8,507	103	1%	1,564,471	103,417	7%	6,690,690	176,886	3%	18	1.39	8%	116%
7.8	6,428	211	3%	915,104	47,403	5%	5,043,196	52,626	1%	9.6	0.57	6%	123%
3.9	3,999	54	1%	459,594	16,948	4%	4,077,945	30,411	1%	4.2	0.14	3%	108%
1.95	2,111	192	9%	212,996	20,496	10%	3,634,021	33,976	1%	1.73	0.19	11%	88%
0.98	1,189	33	3%	113,214	457	0%	3,414,771	10,274	0%	0.88	0.02	3%	90%
0.24	342	14	4%	31,199	628	2%	3,256,437	6,346	0%	0.22	0.01	5%	92%
0.12	211	8	4%	17,901	870	5%	3,236,763	24,896	1%	0.13	0.01	5%	103%
0.06	125	15	12%	10,823	1,176	11%	3,203,629	3,476	0%	0.06	0.01	19%	99%
0	64	12	19%	6,013	2,235	37%	3,211,483	8,892	0%	ND	-	-	-
													平均 99%

【0222】

平均バイアス（測定/予測）は99%（範囲84~123%）であり、60fg/mL ~ 1ng/mLで線形応答（R² = 0.99; y = 0.86 + 5.4）が観測され、これは4.3 logレポートレンジを超える正確な曲線のあてはめを表している。生体試料における定量化の正確度を、分析物（IL-17、IL-6及びヒト心筋トロポニン-I、cTnI）のヒト血漿パネルへのスパイク回収率（スパイク5pg/mL及びスパイク50pg/mL）を測定することによって決定した。平均%回収率は、どちらの濃度においても90%~110%であった（データは示さず）。8回の連続した実行にわたる（毎日1ロットの試薬及び新鮮に調製した校正物質を使用して6日間にわたった）Erenna

10

20

30

40

50

cTnI イムノアッセイ及び標準曲線の逆補間を使用した曲線のあてはめアルゴリズムの正確度を図2に示す。これらの実験において、使用した最高濃度の標準物質は100 pg/mLであった。示した標準曲線の上端及び下端のどちらにおいても線形応答 ($R^2 = 0.99$) が観測された。較正物質を逆補間決定するための8回のアッセイ実行のCVは、 > 0.78 pg/mLの全ての値について $< 10\%$ であった。CVは、 0.39 pg/mL及び 0.2 pg/mLの値について、それぞれ、 16% 及び 23% であった(表2)。既知量の分析物をスパイクした血漿又は血清を使用して、アッセイ間の精度及びアッセイ内の精度の試験を行った。これらの実験で得られた結果の例として、ヒトIL-17アッセイは $3 \sim 8\%$ (IL-17 > 0.4 pg/mL) の範囲及び 10% (0.2 pg/mL) のアッセイ内(4連)CV、並びに $3 \sim 9\%$ (IL-17 > 0.4 pg/mL) の範囲及び 11% (0.2 pg/mL) のアッセイ間(6回のアッセイ実行)がもたらされた。

10

20

30

40

50

【表2】

表2.8回のアッセイ実行(6日間)にわたるヒトcTnIアッセイ較正システムの再現性

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

【0223】

感度

Erenna イムノアッセイシステムについての検出の分析的な感度又は限界 (LoD; DEシグナルの線形部分の傾きで割ったゼロ分析物「バックグラウンド」からのシグナルの2つの標準偏差として定義される; バックグラウンドシグナルから95%の信頼度で区別することができる分析物濃度の最低レベルを表す) は、分析物によって変動し、使用した試料(標準物質)の体積に左右された。表3は、各アッセイについて2つの異なる試料体積を使用した10回の異なるErennaヒトイムノアッセイについてのLoDを示す。

【表3】

表3. Erenna システムイムノアッセイの感度 (LoD) に対する試料体積の影響

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

【0224】

試料の体積が多いと、一貫してLoDが低くなり、感度が増強された。例えば、 > 50 μ Lの試料体積ではLoDが 0.01 pg/mL (ヒトIL-6) ~ 0.12 pg/mL (ヒトVEGF) の範囲になった。試料の体積が減少するにつれて、LoDは比例して増

加した（平均比例関係 105%）。本発明者らは、最適な感度、試料中にスパイクされた分析物の回収及び希釈の線形性を得るために、試料（血漿）に対するアッセイバッファの体積比をアッセイ特異的な形で変動させる必要があることを見出した。表 3 に示したアッセイの体積は、そのような最適化を表す。全てのアッセイを、1～2 時間の捕獲及び 1 時間の検出の 2 ステップの形で行った。

【0225】

アッセイの感度に対するアッセイのインキュベーション時間の影響を理解するために実験を行った。これらの実験の目的は、Erenna システムを急速な試験環境で使用することの潜在的な適用性を理解することであった。これを実現するために、単一ステップの cTnI アッセイと組み合わせたインキュベーションのステップを、試料 50 μ L（加えてアッセイバッファ 150 μ L）を使用して行い、同時に捕獲反応及び検出反応（10 μ g / ウェルの MP 及び 100 ng / mL の検出抗体）を行った。インキュベーション時間が長くなるにつれて、アッセイの感度が改善した。これは、時間の関数として傾き応答が改善した（15 分、傾き 64；30 分、傾き 90；60 分、傾き 102；120 分、傾き 152）一方、アッセイのバックグラウンド（ゼロ分析物較正物質の DE シグナル）は時間を経ても一定のままであったことに起因した。注目すべきことに、NIST 参照材料を使用して 15 分のインキュベーションでさえも、LOD 0.61 pg / mL が得られた（データは示さず）。

10

【0226】

ヒト cTnI アッセイの感度を使用して、100 人のヒト血液供与者から得たヒト血漿中の cTnI（試料サイズ 50 μ L）の範囲を定義した。結果を図 3 に示す。値は < 2 pg / mL ~ 39 pg / mL の範囲であり、平均値は 2.19 + / - 4.1 pg / mL であった。3 つの血漿は、LOD である < 0.2 pg / mL の値を有した。百分位 99 位の値は 9 pg / mL であった。明白な外れ値 39 pg / mL をデータセットから除去した場合、集団の平均は 1.83 + / - 1.9 pg / mL であり、百分位 99 位は 8 pg / mL であった。

20

【0227】

（例 2）

材料と方法

【表 4】

30

材料

品目番号	明細	出荷条件
1.	ヒトIL-6標準希釈剤	冷パックと一緒に
2.	ヒトIL-6捕獲試薬	冷パックと一緒に
3.	ヒトIL-6検出試薬	冷パックと一緒に
4.	Erenna(商標)ヒトIL-6イムノアッセイキット説明書	N/A
5.	ヒトIL-6標準物質 (凍結、別の箱で出荷)	ドライアイス上
6.	10×洗浄バッファ	冷パックと一緒に
7.	溶出バッファ	冷パックと一緒に

40

【表 5】

追加の用品

品目 番号	明細	製造者 納入業者	構成要素 部品番号	製品用途	包装の詳細
1.	Erenna(商標) 10× システム バッファー	Singulex	02-0111- 00, 02- 0111-01	システム(分析)バッファー、 Ernnaシステムを 実行するために使用する流体	1L (10L 混合) 2L (20L 混合)
2.	12-チャンネル ペプチドの リザーバー	VWR	80092-466	試薬の移動	10/pkg
3.	96ウェルV底 PPプレート、 500 µL	Axygen	P-96-450V- C又はP-96- 450V-C-S	追加のアクセイプレート、 希釈	10プレート/ ユニット、 5ユニット/ ケース
4.	96ウェルディープ ウェルPPプレート (2.2 mL, 1.64 mL or 1.09 mL)	Axygen	P-2ML-SQ- C, P-DW-20-C 又は P-DW-11-C	標準曲線の調製 (サイズの選択)	可変
5.	384ウェル丸底 PP, 120 µL	Nunc	264573	受け器/分析プレート	20/pk 又は 120/cs
6.	AcroPrep(商標) 384濾過プレート、 100 µL、 試料の調製及び 検出用	Pall	5070	アッセイからのMPの除去	10/pkg
7.	改良型穴開け 可能シーラー、 ポリエチレン	Nunc	235306	分析プレートの恒久的な密封、 Erennaの実行前に使用	100ユニット/ パック、 100パック/ ケース
8.	AxySeal- PCRSPプレート シーリング フィルムシリーズ	Axygen	PCR-SP	インキュベーション/混合/ 保存の間のプレートの密封	100フィルム/ ケース

10

20

30

【表 6】

磁性粒子

品目 番号	明細	製造者、 供給業者	構成要素 部品番号	製品用途	包装の 詳細
1.	Dynal MPC® - 96S	Dynal™	120.27	希土類磁石、 洗浄中MPの捕獲	1プレート
2.	マイクロプレート洗浄 ステーション	---	---	磁石に捕獲した後の MPの洗浄	---
3.	遠心分離w/ プレートローター	---	---	濾過プレートによる MPの除去 ~1,200xg	1
4.	遠心分離アダプターカラー	Pall	5225	適合b/n384ウェル濾過 プレート、384ウェルアッセイ プレートの生成	2/pkg
5.	真空ポンプ	Welch	2511B-01	システムのバッファの脱気	1
6.	マイクロプレート インキュベーター/ 振とう機	Boekel Scientific	# 130000 The Jitterbug™	インキュベータープレート	1
7.	プレートシールローラー、 VWRプレートローラー、 フィルム+ホイール	VWR	60941-118	安全なプレートシール、 恒久的なプレートシール	1

10

20

30

40

【0228】

手順

96ウェルポリプロピレンプレートの各ウェルに捕獲試薬(100 µL)、その後標準物質/試料75 µLを加えた。プレートに蓋をし、室温で2時間インキュベート/振とうした。蓋を除去し、MPが定着/集積するのに十分な時間、プレートを磁石の上に置いた。上清を除去した。プレートを磁石に置いたまま、洗浄バッファ(250 µL)を加えた。2分後、バッファを除去した。プレートを磁石から除去し、IL-6検出試薬(20 µL)を加えた。プレートを120 x gでパルス遠心分離し、次いで蓋をし、室温で1時間インキュベート/振とうした。プレートを、MPが集積する間、約2分間磁石上に置いた。上清を除去した。洗浄バッファ(250 µL)を加え、磁石の近くに磁気的に集積したMPを回収した(3x)。各サイクルの間、バッファを吸引する前に、粒子を適用したそれぞれの洗浄バッファと一緒に2分間インキュベートした。磁石を除去し、洗浄バッファ(250 µL)を加え、プレートを10秒間振とうしてMPを再懸濁させた。プレートの全内容物を新しい96ウェルプレートに移した。移動させた後、プレートを磁石の上に置き、2分後に上清を除去した。プレートを磁石から除去し、洗浄バッファ(250 µL)を加えた。プレートを10秒間振とうした。洗浄ステップを繰り返した。プレートを磁石から除去し、各ウェルに溶出バッファ(20 µL)を加えた。プレートを120 x gでパルス遠心分離した。プレートに蓋をし、室温で30分間インキュベート/振とうした。濾過プレートを、384ウェルプレートを覆って置き、96ウェルプレートの内容物を384ウェルプレートに移した。濾過プレートコンボに蓋をし、1,200 x gで1時間遠心分離した。一番上の濾過プレートを除去し、廃棄した。一番上の濾過プレートを除去し、384ウェルプレートに蓋をし、穴開け可能なプレートシールカバーで蓋をし、アッセイ混合物を光学リーダーに移した(例えば、Erenna System, Singulex)。

【0229】

結果

以下は、例示的な曲線標準IL-6曲線である。

【表 7】

No. [群別]	平均			平均・FP's			平均・TP's			Est (C)		
	DE's	StDev	% CV	平均	StDev	% CV	平均	StDev	% CV	平均	StDev	% CV
37	9,828	57	1	2,728,786	93615	3	9,688,040	843,592	9	37.9	1.7	4
18.5	7,462	200	3	1,442,595	85859	6	6,603,869	178,146	3	17.4	1.0	6
9.25	5,350	379	7	856,045	36887	4	5,889,034	109,781	2	9.9	0.7	7
4.63	3,016	249	8	420,548	36860	9	5,271,331	103,553	2	4.3	0.7	17
2.31	1,587	57	4	206,927	8213	4	4,961,905	1,033	0	2.3	0.1	4
1.16	922	30	3	118,740	5344	5	5,050,734	253,349	5	1.1	0.22	20
0.58	507	44	9	61,654	6614	11	4,903,511	49,051	1	0.58	0.07	12
0.29	310	30	10	37,029	5315	14	4,852,156	48,862	1	0.28	0.04	15
0.14	209	7	3	25,680	6027	23	4,798,611	18,735	0	0.14	0.01	8
0.07	178	14	8	18,455	1217	7	4,826,107	127,787	3	0.09	0.02	25
0.035	148	12	8	16,506	1485	9	4,803,060	29,556	1	0.06	-	-
0	108	8	7	11,956	363	3	4,787,510	23,921	0	ND	-	-

10

【0 2 3 0】

本発明は、細胞種間の化学的差異を検出するため、及び正常細胞試料と疾患細胞試料を区別するための実質的に新規の方法を提供する。特定の実施例を提供したが、上記の説明は例示的であり、制限するものではない。本明細書を参照すれば、当業者には開示した方法の多くの変形が明らかになるであろう。したがって、本発明の範囲は、上記の説明を参照して決定されるのではなく、添付の特許請求の範囲、それに加えてその均等物の全範囲を参照して決定されるべきである。

【0 2 3 1】

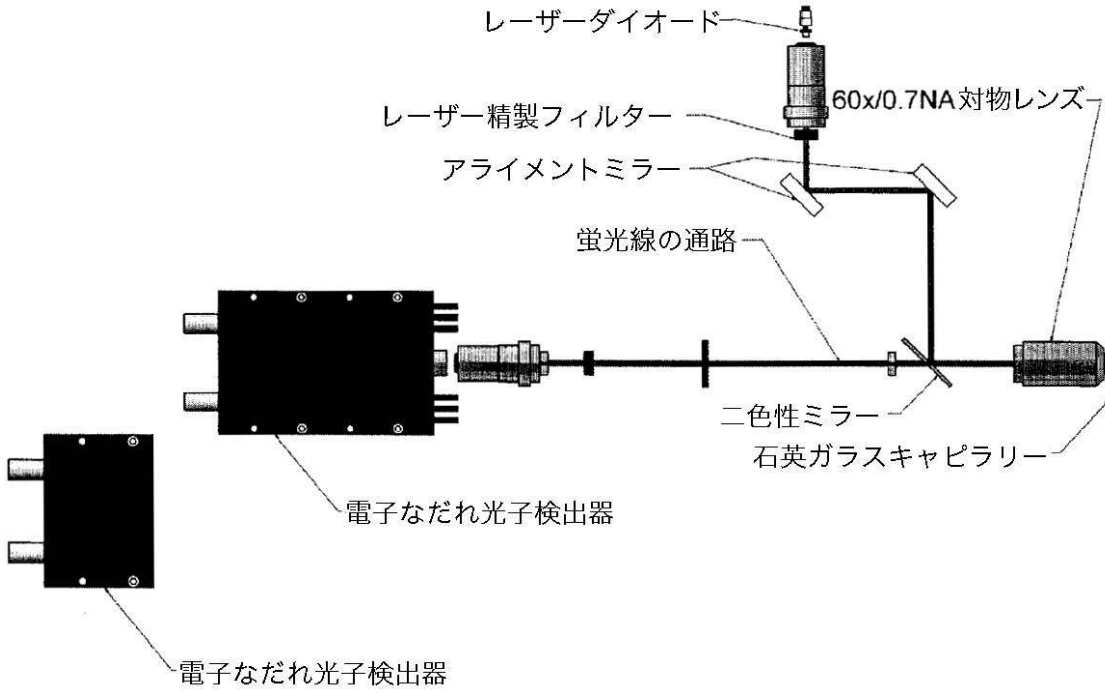
当業者には当然のことながら、上記の技法、特に診断に関連する種の単一分子の検出は、本明細書で例証したものに加えて、他の診断種に適用される。本明細書に記載し列挙した技法は、実施例としてのものであり、明示的な診断種を用いて使用することに本発明の範囲を限定するものではない。

20

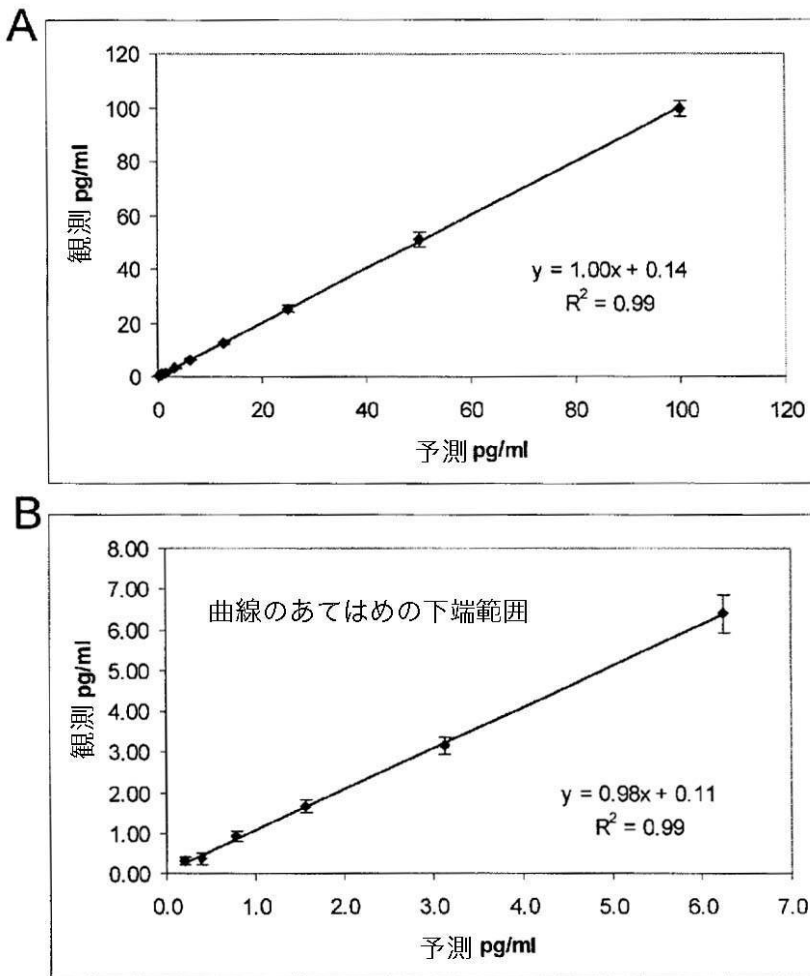
【0 2 3 2】

本明細書で言及した全ての刊行物、特許及び特許明細書は、個々の刊行物、特許又は特許明細書について、あらゆる目的でその全体が参照により本明細書に組み込まれることを特にそれぞれ示したのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれるものとする。

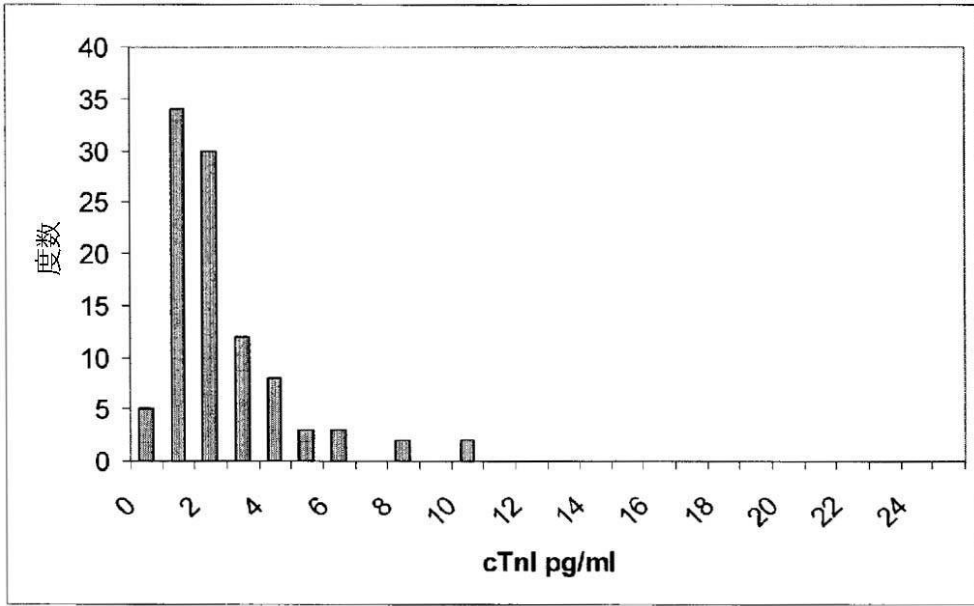
【 図 1 】



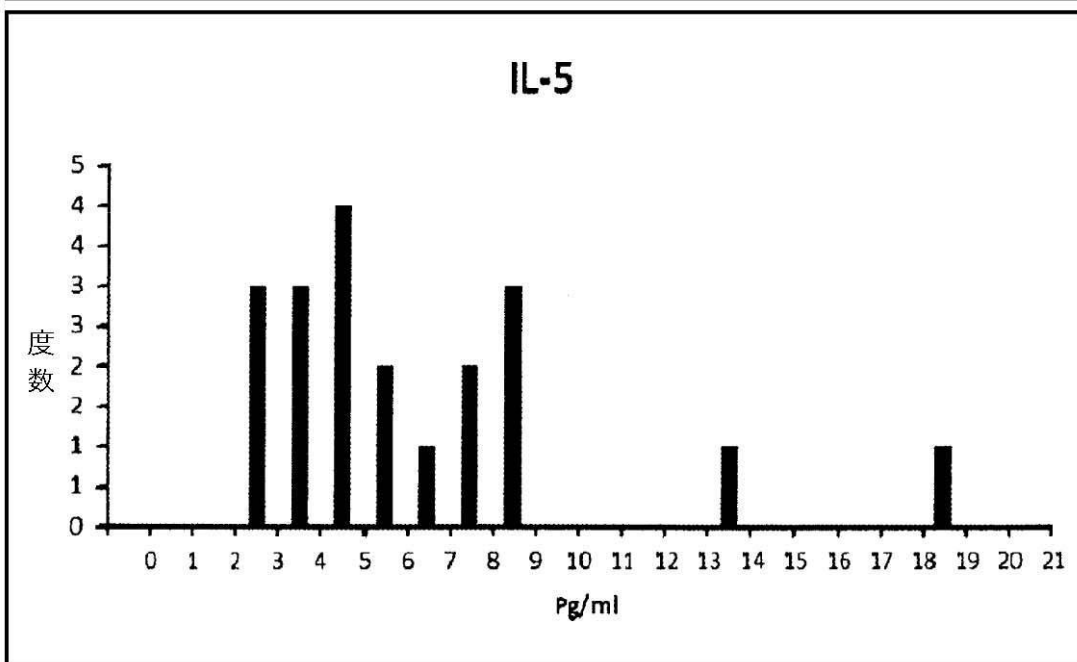
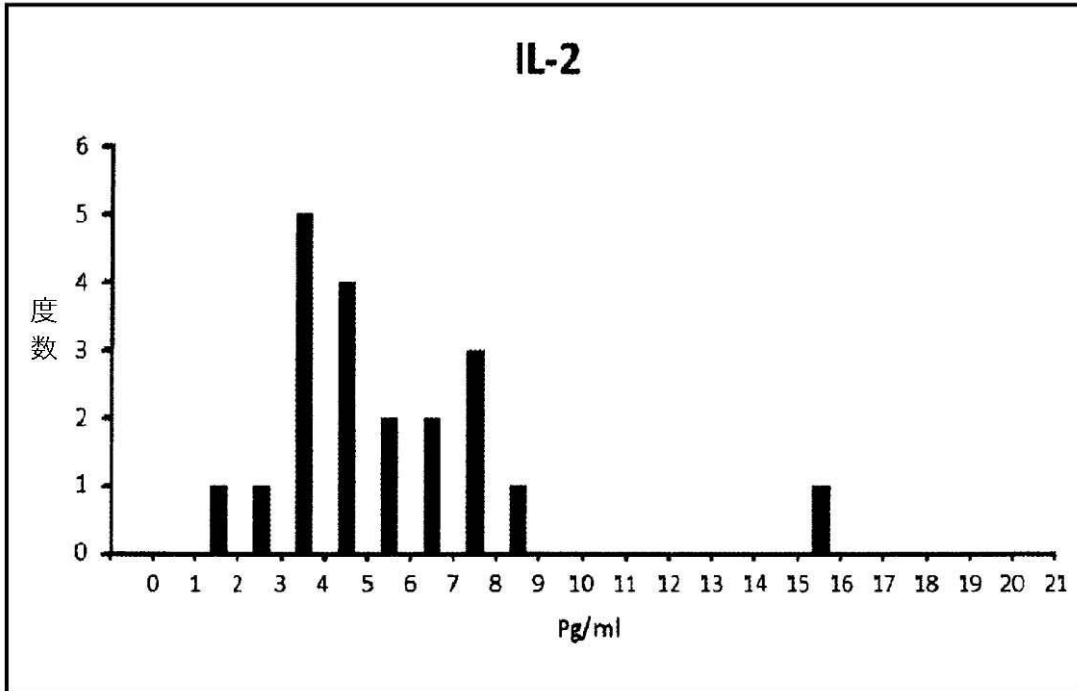
【 図 2 】



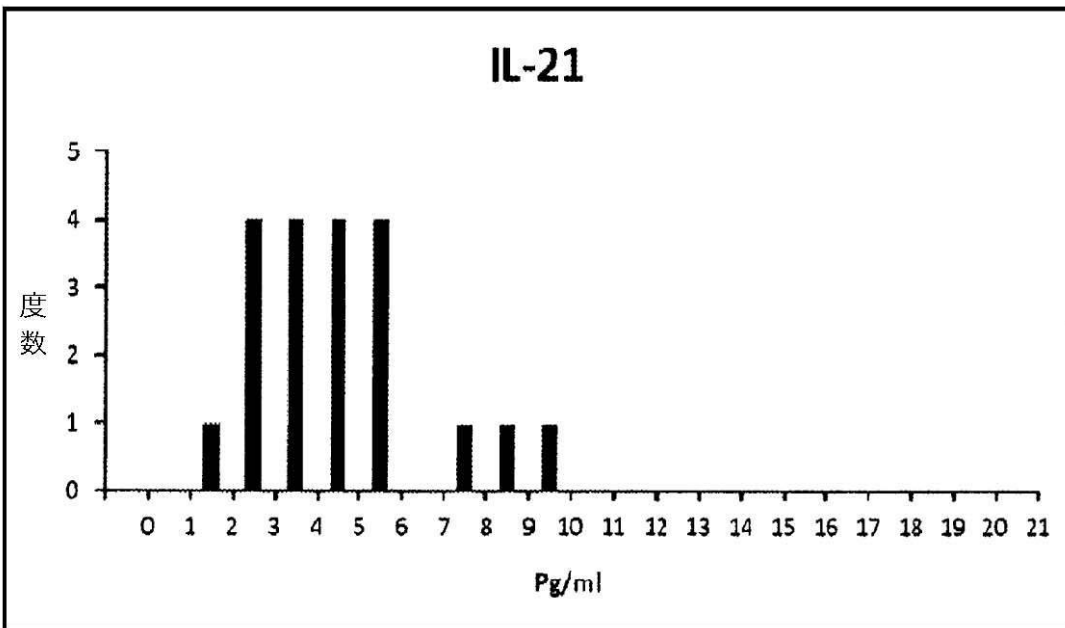
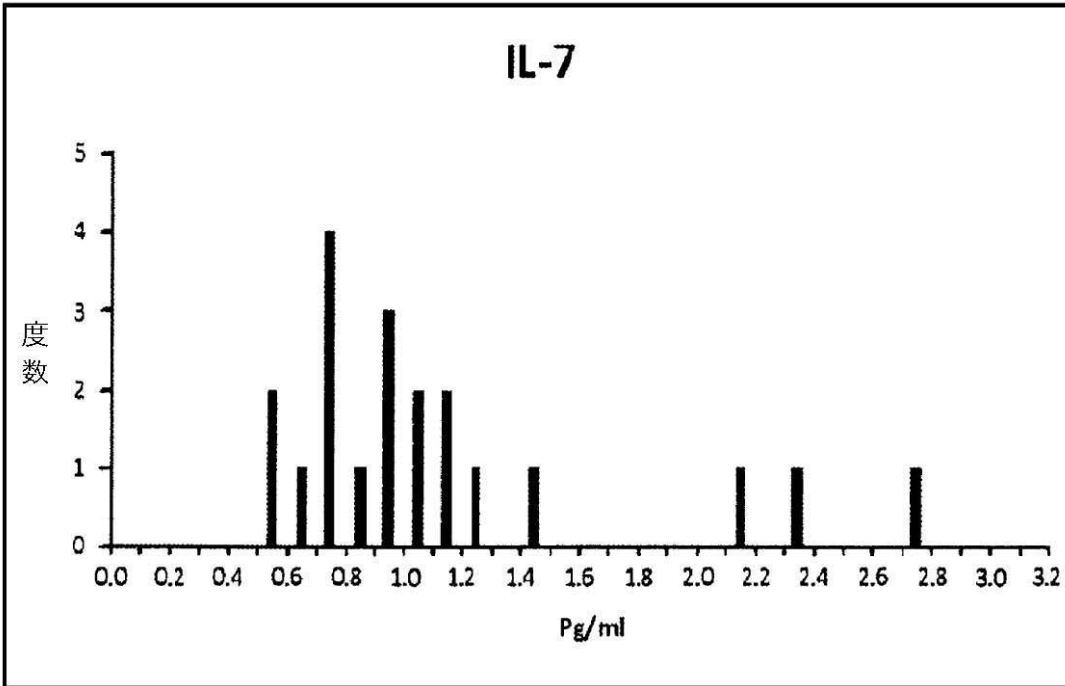
【 図 3 】



【図 4 A】



【 図 4 B 】



【 図 5 A 】

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

【 5 B 】

試料 ID	性別	年齢	n	IFN- γ			IL-21			IL-6			IL-17A		
				[IFN γ] pg/ml	SD	CV%	[IL-21] pg/ml	SD	CV%	[IL-6] pg/ml	SD	CV%	[IL-17A] pg/ml	SD	CV%
1	F	48	3	3.07	0.18	6	1.85	0.20	11	1.07	0.02	1	ND	-	-
2	M	33	3	5.07	0.63	12	3.81	0.44	11	4.09	0.49	12	0.34	0.03	8
3	F	41	3	3.38	0.18	5	5.73	0.44	8	8.90	1.38	15	0.23	0.01	4
4	F	45	3	3.49	0.52	15	4.98	0.19	4	1.94	0.03	2	0.07	0.01	13
5	M	40	3	3.20	0.10	3	7.18	0.38	5	0.83	0.07	9	0.10	0.01	14
6	M	52	3	2.75	0.12	4	5.17	0.10	2	4.30	0.27	6	ND	-	-
7	M	58	3	2.68	0.25	9	5.53	1.63	30	2.91	0.04	1	ND	-	-
8	M	50	3	2.66	0.11	4	2.12	0.05	2	0.48	0.06	12	ND	-	-
9	M	41	3	5.13	0.55	11	4.72	0.24	5	1.26	0.04	3	ND	-	-
10	M	37	3	4.65	0.16	3	9.26	0.87	9	0.81	0.08	9	0.18	0.03	16
11	M	20	3	4.18	0.30	7	8.76	0.34	4	0.56	0.02	3	0.35	0.03	9
12	M	42	3	2.56	0.21	8	2.83	0.52	18	2.88	0.34	12	0.51	0.62	122
13	M	23	3	5.01	0.44	9	3.45	0.34	10	0.79	0.14	17	ND	-	-
14	M	48	3	6.65	0.40	6	5.85	0.53	9	0.85	0.05	6	0.06	0.03	41
15	M	47	3	4.82	0.39	8	3.61	0.24	7	1.84	0.48	26	0.27	0.04	15
16	M	40	3	2.95	0.08	3	2.28	0.47	21	1.08	0.07	6	ND	-	-
17	F	34	3	5.02	0.01	0	3.49	0.24	7	0.64	0.09	14	0.10	0.00	4
18	M	45	3	3.68	0.32	9	4.43	0.59	13	1.22	0.10	8	0.16	0.03	17
19	M	27	3	3.79	0.08	2	2.93	0.24	8	0.99	0.02	2	ND	-	-
20	M	45	3	3.80	0.29	8	4.41	0.32	7	2.16	0.09	4	0.58	0.08	13

【 図 5 C 】

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

【 図 5 D 】

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

【 図 5 E 】

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

【 図 6 】

試料 ID	性別	年齢	n	IL-5/IL-2	IL-5/IL-7	IL-5/IL-21
1	F	48	3	8.5	4.6	1.6
2	M	33	3	9.7	10.1	1.8
3	F	41	3	22.3	9.2	1.4
4	F	45	3	10.8	5.2	0.9
5	M	40	3	3.4	2.3	0.7
6	M	52	3	9.0	4.6	0.8
7	M	58	3	10.1	1.6	0.6
8	M	50	3	10.7	2.6	1.3
9	M	41	3	30.3	10.2	3.1
10	M	37	3	18.0	12.5	0.9
11	M	20	3	27.3	21.4	2.1
12	M	42	3	12.9	2.7	0.7
13	M	23	3	8.2	10.9	1.6
14	M	48	3	7.7	6.1	1.1
15	M	47	3	11.9	16.1	2.5
16	M	40	3	9.1	4.1	1.5
17	F	34	3	7.1	5.9	1.2
18	M	45	3	5.6	3.6	0.9
18	M	27	3	17.9	17.4	2.5
20	M	45	3	6.6	1.4	0.8

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 09/57532
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/537; G01N 33/543 (2010.01) USPC - 436/538; 436/518; 436/526 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): G01N 33/537; G01N 33/543 (2010.01) USPC: 436/538; 436/518; 436/526 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Journal of Clinical Pathology, 1991, Vol 44 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB): assay, biotin, streptavidin, single molecule, fibrin clot, plasma, lipid, layer, middle layer, upper layer esp@cenet: singulex, John Todd, fibrin, layer, clot Google Scholar: assay upper middle layer fibrin clot lipids		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/0064113 A1 (GOIX et al.) 13 March 2008 (13.03.2008), abstract; para [0005], [0006], [0007], [0009], [0061], [0063], [0067], [0071], [0076], [0077], [0079], [0099], [0127], [0128], [0145], [0160], [0161], [0162], [0163], [0165], [0166], [0196], [0199], [0205], [0206], [0238], [0240], [0267], [0271], [0341], [0344], [0358], [0359], [0362], [0363], [0365], Table 1.	1-3, 5-40, and 50 ----- 4
Y	HIRST et al. Production of plasma selectively depleted in fibrinogen by affinity chromatography. Journal of Clinical Pathology, 1991, Vol 44, Pages 306-308, especially page 306, abstract; page 306, right column; page 308, left column, first paragraph.	4
Y	JP 9166591 A (MASAYUKI) 24 June 1997 (24.06.1997), abstract.	4
A	WO 99/026067 A1 (WATKINS et al.) 27 May 1999 (27.05.1999)	1-40 and 50
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 January 2010 (10.01.2010)		Date of mailing of the international search report 07 FEB 2010
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: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/57532

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
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 claims 1-40, 50 are directed to a method of performing an assay detecting a single molecule of a detectable species correlating to a single molecule of an analyte to which said detectable species specifically binds and wherein said detecting comprises using a single molecule analyzer.

Group II claims 41-43 are directed to a method of performing an assay detecting a single molecule of a detectable antibody correlating to a single molecule of an analyte to which said detectable antibody specifically binds.

-- Please see continuation on extra sheet --

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-40 and 50

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/US 09/57532

Continuation of Box (II): Lack of Unity -

Group III claims 44-47 are directed to a method of performing an assay of a sample detecting a single molecule of a detectable species correlating to a single molecule of an analyte which is a member selected from a cytokine and a growth factor.

Group IV claim 48 are directed to a method of determining a member selected from diagnosis, prognosis, state of treatment and method of treatment based on a result of a single molecule assay.

Group V claim 49 is directed to a data set from an assay.

Groups V has no shared technical feature with any of groups I-IV. Groups I-IV all have the shared technical features of a method for performing an assay comprising in a first vessel forming a complex between said analyte and a capture species specifically binding said analyte, wherein said capture species is immobilized on a magnetic particle following, contacting said complex with said detectable species which specifically binds to said analyte thereby forming an immobilized complex of said detectable species and detecting said single molecule of said detectable species. However, this is not an improvement over the prior art of WO99026067 A1 to Watkins et al. (27 May 1999) that specifically teaches a method for performing an assay (abstract) comprising in a first vessel (pg. 13 ln 24-26), forming a complex between said analyte and a capture species specifically binding said analyte, wherein said capture species is immobilized on a magnetic particle (pg 10 ln 28), following, contacting said complex with said detectable species which specifically binds to said analyte thereby forming an immobilized complex of said detectable species (pg 11 ln 2-6), and detecting said single molecule of said detectable species (pg 11 ln 8-10). In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 21/64 F

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

(74)代理人 100097870
弁理士 梶原 斎子

(74)代理人 100140556
弁理士 新村 守男

(74)代理人 100114719
弁理士 金森 久司

(74)代理人 100143258
弁理士 長瀬 裕子

(74)代理人 100124969
弁理士 井上 洋一

(74)代理人 100132492
弁理士 弓削 麻理

(74)代理人 100163485
弁理士 渡邊 義敬

(74)代理人 100112243
弁理士 下村 克彦

(72)発明者 トッド、ジョン
アメリカ合衆国、カリフォルニア、ラファイエット、オーチャード ロード 1 0 9 6

Fターム(参考) 2G043 BA16 CA03 DA02 EA01 FA02 HA01 HA02 KA09

专利名称(译)	单分子检测		
公开(公告)号	JP2012503202A	公开(公告)日	2012-02-02
申请号	JP2011528006	申请日	2009-09-18
[标]申请(专利权)人(译)	神谷来克斯公司		
[标]发明人	トッドジョン		
发明人	トッド、ジョン		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/6827 G01N33/54333 G01N33/6869 G01N33/74 G01N2333/46 G01N2333/4712 G01N2333/475 G01N2333/525 G01N2333/535 G01N2333/54 G01N2333/5412 G01N2333/5418 G01N2333/545 G01N2333/555		
FI分类号	G01N33/543.501.F G01N33/53.P G01N33/543.541.A G01N33/543.575 G01N33/53.U G01N21/64.F		
F-TERM分类号	2G043/BA16 2G043/CA03 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/FA02 2G043/HA01 2G043/HA02 2G043/KA09		
代理人(译)	池田幸 新村守男 井上洋一 下村胜彦		
优先权	61/098712 2008-09-19 US		
其他公开文献	JP2012503202A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了在分析，诊断或预后测定中使用的物种的单分子分析。在示例性实施方案中，测定使用通过新方法制备的样品，提供意想不到的灵敏度和稳健性的测定。通过参考细胞因子测定以非限制性方式描述该方法。

