

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-4691

(P2015-4691A)

(43) 公開日 平成27年1月8日(2015.1.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F	2 G O 4 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 G O 5 4
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 D	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7	
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C	

審査請求 有 請求項の数 48 O L 外国語出願 (全 117 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-200798 (P2014-200798)	(71) 出願人	508296347
(22) 出願日	平成26年9月30日 (2014. 9. 30)		シングレックス, インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2009-504277 (P2009-504277) の分割		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94
原出願日	平成19年4月4日 (2007. 4. 4)		502, アラメダ, ハーバー ベイ パー
(31) 優先権主張番号	60/789, 304	(74) 代理人	100079108
(32) 優先日	平成18年4月4日 (2006. 4. 4)		弁理士 稲葉 良幸
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100109346
(31) 優先権主張番号	60/793, 664		弁理士 大貫 敏史
(32) 優先日	平成18年4月19日 (2006. 4. 19)	(72) 発明者	ゴイクス, フィリップ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94
(31) 優先権主張番号	60/808, 662		611, オークランド, フローレンス テ
(32) 優先日	平成18年5月26日 (2006. 5. 26)		ラス 5612
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高感度のマーカー分析および分子検出のための方法および組成物

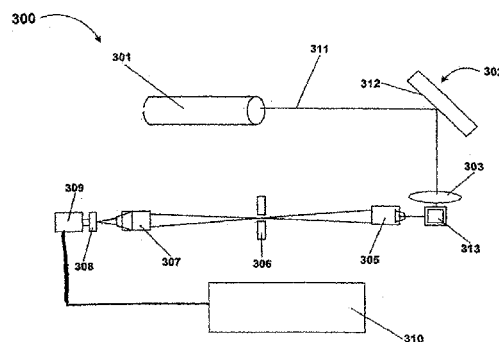
(57) 【要約】

【課題】 この分野のさらなる発展を提供する。

【解決手段】

分子の高感度検出のための方法、キット、および組成物を開示する。これらの方法、キット、および組成物は、試料中の分子の濃度を1フェモトモル、1アトモル、またはそれ以下のレベルまで決定する際に有用である。これらの方法、キット、および組成物は、試料の希釈を必要としないで、広範囲、例えば7 logの範囲にわたる濃度の決定も可能にする。

【選択図】 図1 A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の単一タンパク質分子を検出するためのアナライザーシステムキットであって、前記キットは、アナライザーと、蛍光部分および前記タンパク質分子の結合相手を含む少なくとも 1 つの標識とを含み、前記アナライザーは、

- a) 前記蛍光部分を刺激するための電磁放射線源、
- b) 前記標識を通過させるためのキャピラリーフローセル、
- c) 前記キャピラリーフローセル内で前記標識を移動するための原動力源、
- d) 前記電磁放射線源から放出される電磁放射線を受け取るための、前記キャピラリーフローセル内に画定されるインタロゲーション空間、および
- e) 前記刺激された蛍光部分の電磁気特性を測定するための、前記インタロゲーション空間に作動可能に接続された電磁放射線検出器

を含み、前記蛍光部分は該部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約 200 個の光子を放出することができ、前記レーザーは前記蛍光部分を含む直径約 5 ミクロン以上のスポットに集束され、前記レーザーによって前記スポットに向けられる全エネルギーは約 3 マイクロジュール以下であるキット。

【請求項 2】

前記電磁放射線源がレーザーであり、前記レーザーは少なくとも約 3、5、10 または 20 mW の出力を有する、請求項 1 に記載のアナライザーシステム。

【請求項 3】

前記蛍光部分が蛍光分子を含む、請求項 1 に記載のアナライザーシステム。

【請求項 4】

前記蛍光分子が色素分子である、請求項 3 に記載のアナライザーシステム。

【請求項 5】

前記色素分子が少なくとも 1 つの置換インドリウム環系を含み、前記インドリウム環の 3 位炭素上の置換基は化学反応性基または共役物質を含む、請求項 4 に記載のアナライザーシステム。

【請求項 6】

前記インタロゲーション空間を 1 つだけ含む、請求項 1 に記載のアナライザーシステムキット。

【請求項 7】

前記電磁放射線源が連続波電磁放射線源である、請求項 1 に記載のアナライザーシステム。

【請求項 8】

前記連続波電磁放射線源が発光ダイオードまたは連続波レーザーである、請求項 7 に記載のアナライザーシステム。

【請求項 9】

前記原動力が圧力である、請求項 1 に記載のアナライザーシステム。

【請求項 10】

前記検出器がアバランシェフォトダイオード検出器である、請求項 1 に記載のアナライザーシステム。

【請求項 11】

前記インタロゲーション空間にレーザー光を屈折させ、前記刺激された色素分子を画像化するための共焦点光学配置をさらに含み、前記共焦点光学配置は少なくとも約 0.8 の開口数を有する対物レンズを含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 12】

複数の試料を自動的に採取し、試料容器と前記インタロゲーション空間の間の流体連通 (fluid communication) を提供することが可能な試料採取システムをさらに含む、請求項 1 に記載のアナライザーシステム。

【請求項 13】

前記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み、前記回収システムは前記試料の実質的にすべてを回収することが可能である、請求項 1 に記載のアナライザーシステム。

【請求項 1 4】

生体試料中のタンパク質の単一分子の有無を判定する方法であって、前記分子を標識で標識する工程と、単一分子検出器で前記標識の有無を検出する工程とを含み、前記標識は、その蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約 200 個の光子を放出することができる蛍光部分を含み、該レーザーは該蛍光部分を含む直径約 5 ミクロン以上のスポットに集束され、該レーザーによって該スポットに向けられる全エネルギーは約 3 マイクロジュール以下である方法。

10

【請求項 1 5】

前記試料中の前記単一分子の検出限界は、約 10、1、0.1、0.01 または 0.001 フェムトモル未満である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記検出限界が約 1 フェムトモル未満である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記検出工程が前記蛍光部分によって放出される電磁放射線を検出することを含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記単一分子検出器がインタロゲーション空間を 1 つだけ含む、請求項 1 4 に記載の方法。

20

【請求項 1 9】

前記蛍光部分を電磁放射線に曝露することをさらに含み、前記電磁放射線はレーザーによって提供される、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記レーザーが約 20 mW 未満の出力で前記部分を刺激する、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記レーザーが約 1000、250、100、50、25 または 10 マイクロ秒未満の間、前記部分を刺激する、請求項 2 0 に記載の方法。

30

【請求項 2 2】

前記標識が前記分子との結合に特異的な結合相手をさらに含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記結合相手が抗体である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記蛍光部分が蛍光色素分子を含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記色素分子が少なくとも 1 つの置換インドリウム環系を含み、該インドリウム環の 3 位炭素上の置換基は化学反応性基または共役物質を含む、請求項 2 4 に記載の方法。

40

【請求項 2 6】

前記色素分子が AlexaFluor 488、AlexaFluor 532、AlexaFluor 647、AlexaFluor 680、または AlexaFluor 700 からなる群から選択される AlexaFluor 分子である、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記色素分子が AlexaFluor 647 色素分子である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記蛍光部分が複数の AlexaFluor 647 分子を含む、請求項 2 4 に記載の方法。

50

【請求項 29】

前記複数の AlexaFluor 647 分子が約 2 ~ 4 個の AlexaFluor 647 分子を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記蛍光部分が量子ドットである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 31】

前記試料中のタンパク質の濃度を測定することをさらに含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 32】

前記標識の有無の前記検出が、

10

(i) 前記試料の一部をインタロゲーション空間に通過させる工程と、

(i i) 前記標識が存在する場合、前記蛍光部分を刺激して光子を放出するのに十分な電磁放射線への曝露を前記インタロゲーション空間に享受させる工程と、

(i i i) 工程 (i i) の前記曝露の間に放出される光子を検出する工程とを含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 33】

前記インタロゲーション空間のバックグラウンド光子レベルを決定することをさらに含み、前記バックグラウンドレベルは、工程 (i i) の場合と同様であるが前記インタロゲーション空間における標識なしで電磁放射線を該インタロゲーション空間に享受させた場合の該インタロゲーション空間の平均光子放出を表す、請求項 32 に記載の方法。

20

【請求項 34】

工程 (i i i) で検出される光子の量を閾値光子レベルと比較することをさらに含み、ここで、前記閾値光子レベルは前記バックグラウンド光子レベルの関数であり、工程 (i i i) で検出される光子の量が閾値レベルよりも多い場合は前記標識が存在することを示し、工程 (i i i) で検出される光子の量が閾値レベル以下である場合は前記標識が無いことを示す、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

対象における生物学的状態の有無を判断するための方法であって、

a) 前記対象から得られる試料のイムノアッセイを実施する工程であって、前記イムノアッセイはマーカーの複数の標識を前記試料中の複数の前記マーカー分子に結合することを含み、前記標識は前記マーカーに特異的であり、1つの標識はマーカー1分子と結合し、前記標識は、蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約 200 個の光子を放出することができる蛍光部分と結合した抗体を含み、前記レーザーは前記蛍光部分を含む直径約 5 ミクロン以上のスポットに集束され、前記レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約 3 マイクロジュール以下である工程と、

30

b) 単一分子検出器で単一の標識を検出することを含む、前記標識を検出する工程と、

c) 工程 b) で検出される標識数に基づいて前記試料中の前記マーカーの濃度を決定する工程と

を含む方法。

40

【請求項 36】

工程 b) で得られる前記濃度を、前記生物学的状態の有無を示すことが既知である前記マーカーの濃度または濃度範囲と比較することをさらに含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

蛍光部分に結合する生体分子の結合相手を含む、前記生体分子を検出するための標識であって、前記蛍光部分は該部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約 200 個の光子を放出することができ、前記レーザーは前記蛍光部分を含む直径約 5 ミクロン以上のスポットに集束され、前記レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約 3 マイクロジュール以下であり、前記蛍光部分は約 2 ~ 4 個の蛍光実体を含む標識。

【請求項 38】

50

前記生体分子がタンパク質または小分子である、請求項 37 に記載の標識。

【請求項 39】

前記生体分子がタンパク質である、請求項 38 に記載の標識。

【請求項 40】

前記蛍光実体が蛍光色素分子を含む、請求項 37 に記載の標識。

【請求項 41】

前記蛍光色素分子が少なくとも 1 つの置換インドリウム環系を含み、該インドリウム環の 3 位炭素上の置換基は化学反応性基または共役物質を含む、請求項 37 に記載の標識。

【請求項 42】

前記色素分子が AlexaFluor 488、AlexaFluor 532、AlexaFluor 647、AlexaFluor 680 または AlexaFluor 700 からなる群から選択される AlexaFluor 分子である、請求項 40 に記載の標識。

【請求項 43】

前記色素分子が AlexaFluor 647 色素分子である、請求項 42 に記載の標識

。

【請求項 44】

前記結合相手が抗体である、請求項 37 に記載の標識。

【請求項 45】

前記色素分子が第 1 の型および第 2 の型の色素分子を含む、請求項 37 に記載の標識タンパク質。

【請求項 46】

前記第 1 の型および第 2 の型の色素分子が異なる発光スペクトルを有する、請求項 45 に記載の標識タンパク質。

【請求項 47】

色素分子の第 1 の型の数と第 2 の型の数との比が、約 3 : 1、2 : 1、1 : 1、1 : 2 または 1 : 3 である、請求項 46 に記載の標識タンパク質。

【請求項 48】

試料中の種の濃度を決定するアナライザーであって、少なくとも約 10^{-5} の濃度のダイナミックレンジにわたって前記濃度を決定することができるアナライザー。

【請求項 49】

前記ダイナミックレンジが約 1 フェムトモルから約 100 ピコモルである、請求項 48 に記載のアナライザー。

【請求項 50】

生物学的状態のマーカーを確立する方法であって、

i) 第 1 の集団から得られる生体試料中の前記マーカーの濃度範囲を確立する工程を含み、該確立工程は前記マーカーの単一分子を検出することによって前記生体試料中の前記マーカーの濃度を測定することを含む、方法。

【請求項 51】

前記第 1 の集団が前記生物学的状態を示さない集団である、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

第 2 の集団から得られる生体試料中の前記マーカーのレベル範囲の範囲を確立する工程をさらに含み、前記第 2 の集団のメンバーが前記生物学的状態を示し、前記確立工程が、前記マーカーの単一分子を検出することによって前記生体試料中の前記マーカーのレベルを測定することを含む、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 53】

前記第 1 および第 2 の集団が異なる、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

前記第 2 の集団の少なくとも 1 つのメンバーは前記第 1 の集団のメンバーであるか、または前記第 1 の集団の少なくとも 1 つのメンバーは前記第 2 の集団のメンバーである、請求項 52 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 55】

第2の集団の実質的にすべてのメンバーが前記生物学的状態を発現した第1の集団のメンバーである、請求項54に記載の方法。

【請求項 56】

前記マーカの単一分子の前記検出が、前記マーカの検出限界が約1000、100、50、20、10、5、1、または0.5フェムトモル未満の前記試料中の前記マーカである方法を用いて実施される、請求項50に記載の方法。

【請求項 57】

前記生物学的状態が表現型の状態、生物に影響を及ぼす状態、発現状態、年齢、健康、病状、疾患、疾患過程、病状期、感染、毒性、または化学因子、環境因子、もしくは薬物因子に対する応答（例えば薬物応答フェノタイピング、薬物毒性フェノタイピング、または薬剤効果フェノタイピング）である、請求項50に記載の方法。

10

【請求項 58】

前記生物学的状態が病状である、請求項57に記載の方法。

【請求項 59】

前記マーカがポリペプチドまたは小分子である、請求項50に記載の方法。

【請求項 60】

前記状態が疾患状態である、請求項57に記載の方法。

【請求項 61】

前記疾患状態が、癌、心血管疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、神経疾患、感染症、および妊娠関連障害からなる群から選択される、請求項60に記載の方法。

20

【請求項 62】

前記状態が病状期の状態である、請求項61に記載の方法。

【請求項 63】

前記病状期の状態が癌病状期の状態である、請求項62に記載の方法。

【請求項 64】

前記状態が治療応答の状態である、請求項57に記載の方法。

【請求項 65】

前記治療が薬物治療である、請求項64に記載の方法。

【請求項 66】

前記応答が治療効果および副作用からなる群から選択される、請求項65に記載の方法。

30

【請求項 67】

前記応答が治療効果である、請求項66に記載の方法。

【請求項 68】

前記応答が副作用である、請求項66に記載の方法。

【請求項 69】

前記副作用が有害作用である、請求項68に記載の方法。

【請求項 70】

前記検出が、蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約200個の光子を放出することができる蛍光部分を含む標識で前記マーカを標識することを含み、前記レーザーは前記蛍光部分を含む直径約5ミクロン以上のスポットに集束され、前記レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約3マイクロジュール以下である、請求項50に記載の方法。

40

【請求項 71】

前記蛍光部分が、少なくとも1つの置換インドリウム環系を含む分子を含み、該インドリウム環の3位炭素上の置換基は化学反応性基または共役物質基を含む、請求項70に記載の方法。

【請求項 72】

前記蛍光部分が、AlexaFluor488、AlexaFluor532、Ale

50

x a F l u o r 6 4 7、A l e x a F l u o r 6 8 0 または A l e x a F l u o r 7 0 0 からなる群から選択される色素を含む、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記蛍光部分が A l e x a F l u o r 6 4 7 を含む、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記標識が前記マーカの結合相手をさらに含む、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記結合相手が前記マーカに特異的な抗体を含む、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記抗体がポリクローナル抗体を含む、請求項 7 5 に記載の方法。

10

【請求項 7 7】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記第 1 および第 2 の範囲に基づいて前記マーカの閾値レベルを確立することをさらに含み、個体から得られる生体試料中の前記閾値レベルを上回るレベルの前記マーカの存在は、前記個体における前記生物学的状態の存在の実質的により高い可能性を示す、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 7 9】

生物の生物学的状態の有無を検出するための方法であって、

i) 前記生物から得られる生体試料中のマーカの濃度を測定する工程、この場合、前記マーカは請求項 5 0 に記載の方法によって確立されるマーカである、および

20

i i) 前記生物の前記マーカの濃度に基づいて前記生物学的状態の有無を判定する工程

を含む方法。

【請求項 8 0】

生物の生物学的状態の有無を検出するための方法であって、

i) 前記生物から得られる複数の生体試料中のマーカの濃度を測定する工程、この場合、前記マーカは請求項 5 0 に記載の方法によって確立されるマーカである、および

i i) 前記複数の試料中の前記マーカの前記濃度に基づいて前記生物学的状態の有無を判定する工程

30

を含む方法。

【請求項 8 1】

前記試料は異なる種類のものである、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記判定工程が、前記異なる種類の試料中の前記マーカの濃度の比較に基づく、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記試料が同じ種類であり、間隔をあけて採取される、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記生体試料が血液、血漿または血清である、請求項 5 0 に記載の方法。

40

【請求項 8 5】

生物の生物学的状態と関連する 1 つ以上のマーカを請求項 1 に記載のシステムを用いて特定する工程と、前記 1 つ以上のマーカを、前記生物の前記生物学的状態の有無を検出するための診断薬として商品化する工程とを含むビジネス方法。

【請求項 8 6】

前記 1 つ以上のマーカがポリペプチドまたは小分子である、請求項 8 5 に記載のビジネス方法。

【請求項 8 7】

前記 1 つ以上のマーカが新規の化学実体である、請求項 8 5 に記載のビジネス方法。

【請求項 8 8】

50

報酬に対して診断サービスを実施する工程をさらに含む、請求項 85 に記載のビジネス方法。

【請求項 89】

前記 1 つ以上のバイオマーカーに基づく診断製品を販売する工程をさらに含む、請求項 85 に記載のビジネス方法。

【請求項 90】

生物の生物学的状態と関連する 1 つ以上のマーカーを請求項 501 に記載のシステムを用いて特定する工程と、前記生物が前記生物学的状態を有するか否かを判定する診断サービスを提供する工程とを含むビジネス方法。

【請求項 91】

前記診断サービスが C L I A 認定の研究所によって提供される、請求項 90 に記載のビジネス方法。

【請求項 92】

前記診断サービスが医療サービス提供者、保険業者、または患者に提供される、請求項 91 に記載のビジネス方法。

【請求項 93】

マーカーを検出するための標識であって、前記標識は前記マーカーの結合相手および蛍光部分を含み、前記蛍光部分は該部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約 200 個の光子を放出することができ、前記レーザーは前記蛍光部分を含む直径約 5 ミクロン以上のスポットに集束され、前記レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約 3 マイクロジュール以下である標識。

【請求項 94】

前記蛍光部分が蛍光分子を含む、請求項 93 に記載の標識。

【請求項 95】

前記蛍光部分が複数の蛍光分子を含む、請求項 94 に記載の標識。

【請求項 96】

前記標識が約 2 ~ 10、2 ~ 8、2 ~ 6、2 ~ 4、3 ~ 10、3 ~ 8、3 ~ 6 個の蛍光分子を含む、請求項 95 に記載の標識。

【請求項 97】

前記標識が約 2 ~ 4 個の蛍光分子を含む、請求項 96 に記載の標識。

【請求項 98】

前記蛍光色素分子が少なくとも 1 つの置換インドリウム環系を含み、該インドリウム環の 3 位炭素上の置換基は化学反応性基または共役物質を含む、請求項 97 に記載の標識。

【請求項 99】

前記蛍光分子が、AlexaFluor 488、AlexaFluor 532、AlexaFluor 647、AlexaFluor 680 または AlexaFluor 700 からなる群から選択される、請求項 97 に記載の標識。

【請求項 100】

前記蛍光分子が、AlexaFluor 488、AlexaFluor 532、AlexaFluor 680 または AlexaFluor 700 からなる群から選択される、請求項 9 に記載の標識。

【請求項 101】

前記結合相手が抗体を含む、請求項 93 に記載の標識。

【請求項 102】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 101 に記載の標識。

【請求項 103】

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 102 に記載の標識。

【請求項 104】

前記抗体が炎症マーカーに特異的である、請求項 101 に記載の標識。

【請求項 105】

10

20

30

40

50

前記抗体が、ケモカイン、成長因子、プロテアーゼおよび阻害剤、細胞接着分子、幹細胞因子、シグナル伝達およびアポトーシスの分子、神経栄養因子、ならびに発現タンパク質からなる群から選択されるマーカーに特異的である、請求項 104 に記載の標識。

【請求項 106】

前記抗体が成長因子に特異的である、請求項 105 に記載の標識。

【請求項 107】

前記抗体がサイトカインに特異的である、請求項 101 に記載の標識。

【請求項 108】

前記サイトカインが、請求項 108 に記載の標識。

【請求項 109】

前記蛍光部分が蛍光分子を含む、請求項 101 に記載の標識。

【請求項 110】

前記蛍光部分が複数の蛍光分子を含む、請求項 110 に記載の標識。

【請求項 111】

前記標識が約 2 ~ 10、2 ~ 8、2 ~ 6、2 ~ 4、3 ~ 10、3 ~ 8、3 ~ 6 個の蛍光分子を含む、請求項 111 に記載の標識。

【請求項 112】

前記標識が約 2 ~ 4 個の蛍光分子を含む、請求項 112 に記載の標識。

【請求項 113】

前記蛍光色素分子が少なくとも 1 つの置換インドリウム環系を含み、該インドリウム環の 3 位炭素上の置換基は化学反応性基または共役物質を含む、請求項 112 に記載の標識。

【請求項 114】

前記蛍光分子が、AlexaFluor488、AlexaFluor532、AlexaFluor647、AlexaFluor680、またはAlexaFluor700 からなる群から選択される、請求項 112 に記載の標識。

【請求項 115】

前記蛍光分子が、AlexaFluor488、AlexaFluor532、AlexaFluor680、またはAlexaFluor700 からなる群から選択される、請求項 101 に記載の標識。

【請求項 116】

前記蛍光分子がAlexaFluor647 分子である、請求項 101 に記載の標識。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、本明細書中にその全体について参照により取り入れ、かつ、米国特許法第 120 条の優先権を主張する、2005 年 1 月 28 日に出願の米国特許出願 11 / 048660 の一部継続出願である。米国特許出願 11 / 048660 は、2004 年 9 月 28 日に出願の米国特許仮出願 60 / 613881、2004 年 10 月 27 日に出願の米国特許仮出願 60 / 624785、および 2004 年 12 月 13 日に出願の米国特許仮出願 60 / 636158 の利益を主張する。

【0002】

本出願は、本明細書中にその全体について参照により取り入れる 2006 年 4 月 4 日に出願の米国特許仮出願 60 / 789304、2006 年 4 月 19 日に出願の米国特許仮出願 60 / 793664、2006 年 5 月 26 日に出願の米国特許仮出願 60 / 808662、2006 年 11 月 28 日に出願の米国特許仮出願 60 / 861498、および 2006 年 12 月 4 日に出願の米国特許仮出願 60 / 872986 に対する米国特許法第 119 条の優先権を主張する。

【0003】

背景技術

10

20

30

40

50

生物医学研究、医学診断、予後診断、モニタリングおよび治療法選択、生物テロ探知、ならびに少体積および低濃度の分析物の複数試料の分析を含む他の分野の進歩は、ますます低い濃度の試料中の粒子を感度よく検出することを可能とする試料分析システムの開発をもたらした。米国特許第 4 7 9 3 7 0 5 号および第 5 2 0 9 8 3 4 号は、極めて感度の高い検出が達成された従前のシステムを記載する。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、この分野のさらなる発展を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0005】

一態様では、本発明は装置を含む。

【0006】

装置の一部の実施形態では、本発明は、試料中の単一タンパク質分子を検出するためのアナライザーシステムキットを含み、該キットは、アナライザーと、蛍光部分およびタンパク質分子の結合相手を含む少なくとも 1 つの標識とを含み、アナライザーは、a) 蛍光部分を刺激するための電磁放射線源、b) 標識を通過させるためのキャピラリーフローセル、c) キャピラリーフローセル内で標識を移動するための原動力源、d) 電磁放射線源から放出される電磁放射線を受け取るための、キャピラリーフローセル内に画定されるインタロゲーション空間 (interrogation space)、および e) 刺激された蛍光部分の電磁気特性を測定するための、インタロゲーション空間に作動可能に接続された電磁放射線検出器を含み、蛍光部分は該部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約 200 個の光子を放出することができ、レーザーは蛍光部分を含む直径約 5 ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約 3 マイクロジュール以下である。本発明の装置の一部の実施形態では、アナライザーシステムは、インタロゲーション空間を 1 つだけ含む。本発明の装置の一部の実施形態では、電磁放射線源はレーザーであり、レーザーは少なくとも約 3、5、10 または 20 mW の出力を有する。本発明の装置の一部の実施形態では、蛍光部分は蛍光分子を含む。一部の実施形態では、蛍光分子は色素分子である。一部の実施形態では、色素分子は少なくとも 1 つの置換インドリウム環系を含み、インドリウム環の 3 位炭素上の置換基は化学反応性基または共役物質を含む。一部の実施形態では、蛍光部分は、量子ドットである。本発明の装置の一部の実施形態では、電磁放射線源は連続波電磁放射線源である。一部の実施形態では、連続波電磁放射線源は、発光ダイオードまたは連続波レーザーである。本発明の装置の一部の実施形態では、原動力は圧力である。本発明の装置の一部の実施形態では、検出器はアバランシェフォトダイオード検出器である。

【0007】

本発明の装置の一部の実施形態では、アナライザーシステムはインタロゲーション空間にレーザー光を屈折させ、刺激された色素分子を画像化するための共焦点光学配置をさらに含み、共焦点光学配置は少なくとも約 0.8 の開口数を有する対物レンズを含む。本発明の装置の一部の実施形態では、アナライザーシステムは、複数の試料を自動的に採取し、試料容器とインタロゲーション空間の間の流体連通を提供することが可能な試料採取システムをさらに含む。本発明の装置の一部の実施形態では、アナライザーシステムは、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み、回収システムは実質的に試料のすべてを回収することが可能である。

【0008】

一部の実施形態では、本発明は試料中の種の濃度を決定するアナライザーを含み、アナライザーは少なくとも約 10^5 のダイナミックレンジ (dynamic range) の濃度にわたって濃度を決定することができる。一部の実施形態では、ダイナミックレンジは約 1 フェモトモルから約 100 ピコモルである。

【0009】

10

20

30

40

50

他の態様では、本発明は方法を含む。

【0010】

一部の実施形態では、本発明は、生体試料中のタンパク質の単一分子の有無を判定する方法を含み、該方法は、分子を標識で標識する工程と、単一分子検出器で標識の有無を検出する工程とを含み、標識は、蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約200個の光子を放出することができる蛍光部分を含み、レーザーは蛍光部分を含む直径約5ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約3マイクロジュール以下である。一部の実施形態では、単一分子検出器は、インタロゲーション空間を1つだけ含む。本発明の方法の一部の実施形態では、試料中の単一分子の検出限界は、約10、1、0.1、0.01または0.001フェムトモル未満である。一部の実施形態では、検出限界は約1フェムトモル未満である。本発明の方法の一部の実施形態では、単一分子検出器で標識の有無を検出する工程は、蛍光部分によって放出される電磁放射線を検出することを含む。本発明の方法の一部の実施形態では、該方法は、電磁放射線に蛍光部分を曝露することをさらに含む。一部の実施形態では、電磁放射線はレーザーによって提供される。一部の実施形態では、レーザーは約20mW未満の出力で前記部分を刺激する。一部の実施形態では、レーザーは約1000、250、100、50、25または10マイクロ秒未満の間、前記部分を刺激する。本発明の方法の一部の実施形態では、標識は分子との結合に特異的な結合相手をさらに含む。一部の実施形態では、結合相手は抗体である。本発明の方法の一部の実施形態では、蛍光部分は蛍光色素分子を含む。一部の実施形態では、色素分子は少なくとも1つの置換インドリウム環系を含み、インドリウム環の3位炭素上の置換基は化学反応性基または共役物質を含む。一部の実施形態では、色素分子はAlexaFluor488、AlexaFluor532、AlexaFluor647、AlexaFluor680、またはAlexaFluor700からなる群から選択されるAlexFluor分子である。一部の実施形態では、色素分子はAlexaFluor647色素分子である。一部の実施形態では、蛍光部分は複数のAlexaFluor647分子を含む。一部の実施形態では、複数のAlexaFluor647分子は、約2~4個のAlexaFluor647分子を含む。一部の実施形態では、蛍光部分は量子ドットである。本発明の方法の一部の実施形態では、本方法は試料中のタンパク質の濃度を測定することをさらに含む。本発明の方法の一部の実施形態では、標識の有無を検出する工程は、(i)試料の一部をインタロゲーション空間に通過させる工程と、(ii)標識が存在する場合、蛍光部分が光子を放出するように刺激するのに十分な電磁放射線への曝露をインタロゲーション空間に享受させる工程と、(iii)工程(ii)の曝露の間に放出される光子を検出する工程とを含む。本発明の方法の一部の実施形態では、本方法はインタロゲーション空間のバックグラウンド光子レベルを決定することをさらに含み、バックグラウンドレベルは、工程(ii)の場合と同様であるが、インタロゲーション空間における標識なしで電磁放射線をインタロゲーション空間に享受させた場合のインタロゲーション空間の平均的光子放出を表す。本発明の方法の一部の実施形態では、本方法は、工程(iii)で検出される光子の量を閾値光子レベルと比較することをさらに含み、ここで、閾値光子レベルはバックグラウンド光子レベルの関数であり、工程(iii)で検出される光子の量が閾値レベルよりも多い場合は標識が存在することを示し、工程(iii)で検出される光子の量が閾値レベル以下である場合は標識が無いことを示す。

【0011】

一部の実施形態では、本発明は、対象における生物学的状態の有無を判断するための方法であって、a)対象から得られる試料のイムノアッセイを実施する工程であって、イムノアッセイはマーカーのための複数の標識を試料中のマーカーの複数の分子に結合することを含み、標識はマーカーに特異的であり、1つの標識がマーカーの1つの分子と結合し、標識は、蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約200個の光子を放出することができる蛍光部分と結合した抗体を含み、レーザーは蛍光部分を含む直径約5ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに

向けられる全エネルギーは約 3 マイクロジュール以下である工程と、b) 単一分子検出器で単一の標識を検出することを含む、標識を検出する工程と、c) 工程 b) で検出される標識数に基づいて試料中のマーカの濃度を決定する工程とを含む方法を伴う。本発明の方法の一部の実施形態では、本方法は、工程 b) で得られる濃度を、生物学的状態の有無を示すことが知られているマーカの濃度または濃度範囲と比較することをさらに含む。本発明の方法の一部の実施形態では、対象はヒトである。一部の実施形態では、試料は血液、血清、血漿、尿、または吐き出された呼吸凝縮物である。

【0012】

他の態様では、本発明は組成物を提供する。

【0013】

一部の実施形態では、本発明は、蛍光部分に結合する生体分子の結合相手を含む、生体分子を検出するための標識を提供し、蛍光部分は該部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約 200 個の光子を放出することができ、レーザーは蛍光部分を含む直径約 5 ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約 3 マイクロジュール以下であり、蛍光部分は約 2 ~ 4 個の蛍光実体を含む。本発明の組成物の一部の実施形態では、生体分子はタンパク質または小分子である。一部の実施形態では、生体分子はタンパク質である。一部の実施形態では、蛍光実体は蛍光色素分子を含む。一部の実施形態では、蛍光色素分子は少なくとも 1 つの置換インドリウム環系を含み、該インドリウム環の 3 位炭素上の置換基は化学反応性基または共役物質を含む。一部の実施形態では、色素分子は Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 680 または Alexa Fluor 700 であることができる Alexa Fluor 分子である。一部の実施形態では、色素分子は Alexa Fluor 647 色素分子である。本発明の方法の一部の実施形態では、色素分子は第 1 の型および第 2 の型の色素分子を含む。一部の実施形態では、第 1 の型および第 2 の型の色素分子は、異なる発光スペクトルを有する。一部の実施形態では、色素分子の第 1 の型の数と第 2 の型の数との比は、4 : 1、3 : 1、2 : 1、1 : 1、1 : 2、1 : 3 または 1 : 4 である。本発明の方法の一部の実施形態では、結合相手は抗体である。

【0014】

一態様では、本発明は方法を提供する。

【0015】

一部の実施形態では、本発明は、i) 第 1 の集団から得られる生体試料中のマーカの濃度範囲を確立する工程により、生物学的状態のマーカを確立する方法を提供し、前記確立工程は、前記マーカの単一分子を検出することによって前記生体試料中の前記マーカの濃度を測定することを含む。一部の実施形態では、前記第 1 の集団は、前記生物学的状態を示さない集団である。一部の実施形態では、該方法は、第 2 の集団から得られる生体試料中の前記マーカのレベル範囲の範囲を確立する工程をさらに含み、前記第 2 の集団のメンバーは生物学的状態を示し、前記確立工程は、前記マーカの単一分子を検出することによって前記生体試料中の前記マーカレベルを測定することを含む。一部の実施形態では、第 1 および第 2 の集団は異なる。一部の実施形態では、前記第 2 の集団の少なくとも 1 つのメンバーは前記第 1 の集団のメンバーであるか、前記第 1 の集団の少なくとも 1 つのメンバーは前記第 2 の集団のメンバーである。一部の実施形態では、第 2 の集団の実質的にすべてのメンバーは、生物学的状態を有する第 1 の集団のメンバーである。一部の実施形態では、前記マーカの単一分子を検出することは、前記マーカの検出限界が約 1000、100、50、20、10、5、1 または 0.5 フェムトモル未満の前記試料中の前記マーカである方法を用いて実施される。一部の実施形態では、生物学的状態は、表現型状態、生物に影響を及ぼす状態、発現状態 (a state of development)、年齢、健康、病状、疾患、疾患過程、病状期 (disease staging)、感染、毒性、または化学因子、環境因子、もしくは薬物因子に対する応答 (例えば、薬物応答フェノタイピング (drug response phenotyping)、薬物毒性フェノタイピング、または薬剤効果フェノタ

10

20

30

40

50

イピング)である。一部の実施形態では、生物学的状態は病状である。一部の実施形態では、マーカーはポリペプチドまたは小分子である。一部の実施形態では、該状態は、疾患状態、例えば癌、心血管疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、神経疾患、感染症、または妊娠関連障害である。一部の実施形態では、状態は病状期の状態である。一部の実施形態では、該病状期の状態は癌病状期の状態である。一部の実施形態では、状態は治療応答状態である。一部の実施形態では、該治療は薬物治療である。一部の実施形態では、該応答は、治療効果および副作用からなる群から選択される。一部の実施形態では、該効果は治療効果である。一部の実施形態では、該応答は副作用、例えば有害作用である。一部の実施形態では、検出工程は、その蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約200個の光子を放出することができる蛍光部分を含む標識で前記マーカーを標識することを含み、レーザーは蛍光部分を含む直径約5ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約3マイクロジュール以下である。一部の実施形態では、前記蛍光部分は、少なくとも1つの置換インドリウム環系を含む分子を含み、該インドリウム環の3位炭素上の置換基は化学反応性基または共役物質基を含む。一部の実施形態では、前記蛍光部分は、AlexaFluor488、AlexaFluor532、AlexaFluor647、AlexaFluor680またはAlexaFluor700からなる群から選択される色素を含む。一部の実施形態では、前記蛍光部分はAlexaFluor647を含む。一部の実施形態では、前記標識は、前記マーカーの結合相手をさらに含む。一部の実施形態では、前記結合相手は前記マーカーに特異的な抗体を含む。一部の実施形態では、前記抗体はポリクローナル抗体を含む。一部の実施形態では、前記抗体はモノクローナル抗体である。一部の実施形態では、本方法は前記第1および第2の範囲に基づいて前記マーカーの閾値レベルを確立することをさらに含み、個体からの生体試料中の、前記閾値レベルを上回るレベルの前記マーカーの存在は、前記個体における生物学的状態の存在の実質的に高い可能性を示す。

【0016】

一部の実施形態では、本発明は、生物の生物学的状態の有無を検出するための方法を提供し、該方法は、i)前記生物から得られる生体試料中のマーカーの濃度を測定する工程、この場合、前記マーカーは、第1の集団から得られる生体試料中の前記マーカーの濃度範囲を確立することを含む方法によって確立されるマーカーであり、前記確立は、前記マーカーの単一分子を検出することによって前記生体試料中の前記マーカーの濃度を測定することを含む、およびii)前記生物の前記マーカーの前記濃度に基づいて前記生物学的状態の有無を判定する工程を含む。

【0017】

さらなる実施形態では、本発明は、生物における生物学的状態の有無を検出するための方法を提供し、該方法は、i)前記生物から得られる複数の生体試料中のマーカーの濃度を測定する工程であって、前記マーカーは、第1の集団から得られる生体試料中の前記マーカーの濃度範囲を確立することを含む方法によって確立されるマーカーであり、前記確立は、前記マーカーの単一分子を検出することによって前記生体試料中の前記マーカーの濃度を測定することを含む工程と、ii)前記複数の試料中の前記マーカーの前記濃度に基づいて前記生物学的状態の有無を判定する工程とを含む。一部の実施形態では、前記試料は異なる種類のものである。一部の実施形態では、前記判定工程は、前記異なる種類の試料中の前記マーカーの濃度の比較に基づく。一部の実施形態では、試料は同じ種類であり、間隔をあけて採取される。一部の実施形態では、生体試料は血液、血漿、または血清である。

【0018】

一部の実施形態では、本発明は、生物の生物学的状態と関連する1つ以上のマーカーを請求項1に記載のシステムを用いて特定する工程と、前記1つ以上のマーカーを前記生物の前記生物学的状態の有無を検出するための診断薬として商品化する工程とを含むビジネス方法を提供する。一部の実施形態では、前記1つ以上のマーカーがポリペプチドまたは

小分子である請求項 36 に記載のビジネス方法が提供される。一部の実施形態では、1 つ以上のマーカーは新規な化学実体である。一部の実施形態では、前記ビジネス方法は、報酬に対して診断サービスを実施する工程をさらに含む。一部の実施形態では、前記ビジネス方法は、前記 1 つ以上のバイオマーカーに基づく診断製品を販売する工程をさらに含む。

【0019】

一部の実施形態では、本発明は、第 1 の集団から得られる生体試料中のそのマーカーの濃度範囲を確立することを含む方法を用いて 1 つ以上のマーカーを特定する工程であって、前記確立は、生物の生物学的状態と関連する前記マーカーの単一分子を検出することによって前記生体試料中の前記マーカーの濃度を測定することを含む工程と、前記生物が前記生物学的状態を有するか否かを判定する診断サービスを提供する工程とを含むビジネス方法を提供する。一部の実施形態では、前記診断サービスは、C L I A 認定の研究所によって提供される。一部の実施形態では、前記診断サービスは、医療サービス提供者 (healthcare provider)、保険業者または患者に提供される。

10

【0020】

一態様では、本発明は組成物を提供する。

【0021】

一部の実施形態では、本発明は、マーカーを検出するための標識を提供し、該標識はマーカーの結合相手および蛍光部分を含み、蛍光部分は該部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約 200 個の光子を放出することができ、レーザーは蛍光部分を含む直径約 5 ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約 3 マイクロジュール以下である。一部の実施形態では、蛍光部分は蛍光分子を含む。一部の実施形態では、蛍光部分は複数の蛍光分子を含む。一部の実施形態では、標識は約 2 ~ 10、2 ~ 8、2 ~ 6、2 ~ 4、3 ~ 10、3 ~ 8、3 ~ 6 個の蛍光分子を含む。一部の実施形態では、標識は約 2 ~ 4 個の蛍光分子を含む。一部の実施形態では、蛍光色素分子は少なくとも 1 つの置換インドリウム環系を含み、インドリウム環の 3 位炭素上の置換基は化学反応性基または共役物質を含む。一部の実施形態では、蛍光分子は、AlexaFluor 488、AlexaFluor 532、AlexaFluor 647、AlexaFluor 680 または AlexaFluor 700 からなる群から選択される。一部の実施形態では、蛍光分子は、AlexaFluor 488、AlexaFluor 532、AlexaFluor 680 または AlexaFluor 700 からなる群から選択される。一部の実施形態では、結合相手は抗体を含む。一部の実施形態では、前記抗体はモノクローナル抗体である。一部の実施形態では、前記抗体はポリクローナル抗体である。一部の実施形態では、前記抗体は炎症マーカーに特異的である。一部の実施形態では、前記抗体は、ケモカイン、成長因子、プロテアーゼおよび阻害剤、細胞接着分子、幹細胞因子、シグナル伝達およびアポトーシスの分子、神経栄養因子、ならびに発現タンパク質 (developmental protein) からなる群から選択されるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は成長因子に特異的である。一部の実施形態では、抗体はサイトカインに特異的である。一部の実施形態では、サイトカインは IL - 12 p 70、IL - 10、IL - 1 α 、IL - 3、IL - 12 p 40、IL - 1 α 、IL - 12、IL - 6、IL - 4、IL - 18、IL - 10、IL - 5、エオタキシン、IL - 16、MIG、IL - 8、IL - 17、IL - 7、IL - 15、IL - 13、IL - 2 R (可溶性)、IL - 2、LIF / HILDA、IL - 1 β 、Fas / CD 95 / Apo - 1 または MCP - 1 からなる群から選択される。一部の実施形態では、蛍光部分は蛍光分子を含む。一部の実施形態では、蛍光部分は複数の蛍光分子を含む。一部の実施形態では、標識は約 2 ~ 10、2 ~ 8、2 ~ 6、2 ~ 4、3 ~ 10、3 ~ 8、または 3 ~ 6 個の蛍光分子を含む。一部の実施形態では、標識は約 2 ~ 4 個の蛍光分子を含む。一部の実施形態では、蛍光色素分子は少なくとも 1 つの置換インドリウム環系を含み、該インドリウム環の 3 位炭素上の置換基は化学反応性基または共役物質を含む。一部の実施形態では、蛍光分子は、AlexaFluor 488、AlexaFluor 532、

20

30

40

50

AlexaFluor647、AlexaFluor680、またはAlexaFluor700からなる群から選択される。一部の実施形態では、蛍光分子は、AlexaFluor488、AlexaFluor532、AlexaFluor680、またはAlexaFluor700からなる群から選択される。一部の実施形態では、蛍光分子はAlexaFluor647分子である。

【0022】

参照による取り入れ

本明細書で指摘するすべての刊行物および特許出願は、個々の刊行物または特許出願が各々具体的かつ個別に参照により取り入れるために示されているかのごとく参照により本明細書に取り入れられる。

10

【0023】

本発明の新規な特徴は、添付の請求項に具体的に記載されている。本発明の原理を利用する例示的な実施形態を記載している以下の詳細な説明および以下の添付の図面を参照として、本発明の特徴および利点のより十分な理解が得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1A】単一粒子アナライザーの構成要素の配置の略図を示す図であり、1つの電磁放射線源および1つの電磁気検出器を含むアナライザーを示す図である。

【図1B】単一粒子アナライザーの構成要素の配置の略図を示す図であり、2つの電磁放射線源および1つの電磁気検出器を含むアナライザーを示す図である。

20

【図2A】単一粒子アナライザーのキャピラリーフローセルの略図を示す図であり、1つの電磁放射線源を含むアナライザーのフローセルを示す図である。

【図2B】単一粒子アナライザーのキャピラリーフローセルの略図を示す図であり、2つの電磁放射線源を含むアナライザーのフローセルを示す図である。

【図3A】単一粒子アナライザーのレーザーおよび検出器オブティックスの従来配置を示す略図を示す図であり、1つの電磁放射線源および1つの電磁気検出器を有するアナライザーの配置を示す図である。

【図3B】単一粒子アナライザーのレーザーおよび検出器オブティックスの共焦点配置を示す略図を示す図であり、2つの電磁放射線源および2つの電磁気検出器を有するアナライザーの配置を示す図である。

30

【図4】cTnIの濃度範囲の線形化標準曲線を示す図である。

【図5】cTnIの生物学的閾値（カットオフ濃度）が、10%の対応するCVで99パーセンタイルにおいて確立したときに、7pg/mlのcTnI濃度にあることを示す図である。

【図6】本発明のアナライザーシステムを用いて判定されたcTnIのアッセイ結果と、米国国立標準技術研究所によって提供された標準品測定値との相関（ $R^2 = 0.9999$ ）を示す図である。

【図7】救急室において胸部痛を示した患者から得られた連続血清試料中のcTnIの検出を示す図である。本発明のアナライザーシステムで行われた測定と、市販のアッセイで行われた測定とを比較した。

40

【図8】cTnIの正常な生物学的濃度および胸部痛を示す患者から得られた血清試料中のcTnI濃度の分布を示す図である。

【図9】LTE4の競合曲線を示す図である。LODは、1.5pg/mlのLTE4であると判定された。

【図10】Akt1の濃度に関する標準曲線を示すグラフの図である。LODは、25pg/mlのAkt1と算出された。

【図11】TGFβの濃度に関する標準曲線を示すグラフの図である。LODは、350pg/mlのAkt1と算出された。

【図12】試料中の単一タンパク質分子を検出するためのアナライザーシステムと、蛍光部分およびタンパク質分子の結合相手を含む少なくとも1種の標識とを含むキットの概略

50

を示す図であり、アナライザーは、蛍光部分を刺激するための電磁放射線源；標識を通過させるためのキャピラリーフローセル；キャピラリーフローセル内で標識を移動するための原動力源；電磁放射線源から放出される電磁放射線を受け取るための、キャピラリーフローセル内に画定されたインタロゲーション空間；および刺激された蛍光部分の電磁気特性を測定するための、インタロゲーション空間に作動可能に接続された電磁放射線検出器を含み、蛍光部分は該部分の励起波長の光を放出するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約200個の光子を放出することができ、レーザーは蛍光部分を含む直径約5ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約3マイクロジュール以下である。

【図13】単一粒子アナライザーシステムのために開発されたサンドイッチ分子イムノアッセイにおいて測定されたTREM-1の標準曲線を示す図である。アッセイの線形範囲が100～1500fMである。

【図14A】IL-6標準曲線を示す図であり、市販のキット(R&D Systems、ミネソタ州ミネアポリス)によって希釈されたIL-6標準品が、0.1pg/mlと10pg/mlとの間で線形応答を表すことを示す。

【図14B】IL-6標準曲線を示す図であり、1pg/ml以下のIL-6標準曲線を示す図である。

【図14C】血液バンクドナーのEDTA検体において同定されたIL-6およびIL-8の分布を示す図である。

【図14D】アナライザーの検出を、分子(デジタルシグナル)の計数から高濃度の分析物で生成する光子(アナログシグナル)の合計の検出へと切り替えることによって、低濃度の任意の分析物の検出範囲をより高濃度へ拡張できることを示す図である。単一粒子アナライザーは、6logの拡張された線形ダイナミックレンジを有する。

【図14E】デジタル検出からアナログ検出への切り替えに基づいた6logの検出範囲を示す図である。

【図14F】個々の粒子によって放出された光子(デジタルシグナル)を計数することによって決定されたIL-6の低濃度範囲(0.1fg/ml～10fg/ml)、およびIL-6のより高濃度範囲(10fg/ml～1pg/ml)を示す、非線形化標準曲線を示す図である。

【図15】本発明のアッセイと従来のアッセイとの比較を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0025】

概要

I. 緒言

II. 本発明の方法および組成物による高感度検出のための分子

A. 一般

B. マーカー

III. 標識

A. 結合相手

1. 抗体

B. 蛍光部分

1. 色素

2. 量子ドット

C. 結合相手蛍光部分組成物

IV. 分子の高感度分析

A. 試料

B. 試料調製

C. 対象の分子の検出および濃度の決定

V. 分子の高感度分析に好適な機器およびシステム

A. 装置/システム

10

20

30

40

50

- B．単一粒子アナライザー
 - 1．電磁放射線源
 - 2．キャピラリーフローセル
 - 3．原動力
 - 4．検出器
- C．試料採取システム
- D．試料調製システム
- E．試料回収
- V I．分子の高感度分析を用いる方法
 - A．方法 10
 - B．マーカーの例
 - 1．心臓損傷
 - 2．感染症
 - 3．サイトカイン
 - 4．炎症性マーカー
 - 5．疾患状態についてのマーカー（関節炎）
 - 6．T G F β
 - 7．A k t 1
 - 8．F a s リガンド
 - C．ビジネス方法 20
- V I I．キット
- 【 0 0 2 6 】
 - I．緒言

本発明は、単一分子の高感度検出および試料中の分子濃度の決定のための機器、キット、組成物、および方法を提供する。本発明の機器、組成物、方法、およびキットの感度および精度は、一部の実施形態では、限定するものではないが、好適な波長および出力の電磁放射線源、好適なインタロゲーション空間サイズ、高開口数レンズ、単一光子の検出が可能な検出器、ならびに単一分子を計数するためのデータ分析システムから選択される因子の組合せによって達成することができる。本発明の機器は、「単一分子検出器」または「単一粒子検出器」と称され、用語「単一分子アナライザー」および「単一粒子アナライザー」にも包含される。本発明のキットおよび方法の感度および精度は、一部の実施形態では、本発明の機器を、限定するものではないが、単一分子のレベルでその分子の検出を可能にする特性を示す分子の標識および本明細書に記載される機器で標識を分析する方法から選択される因子の組合せとともに用いることによって達成される。
- 【 0 0 2 7 】

本発明の機器、キット、および方法は、単一タンパク質分子または小分子の高感度および正確な検出および試料中の前記分子の濃度の決定のために特に役立つ。
- 【 0 0 2 8 】

したがって、本発明は、一部の実施形態で、単一分子の検出による分子の高感度検出および濃度決定のための機器およびキット、そのような検出および決定のための標識、ならびに試料の分析においてそのような機器および標識を用いる方法を提供する。具体的には、本発明の機器、キット、および方法の感度および精度は、極めて低い濃度、例えば約 1 0 0、1 0、1、0 . 1、0 . 0 1、または 0 . 0 0 1 フェムトモル未満の濃度の分子、例えば生物学的状態のマーカーの検出および濃度決定を可能にする。さらなる実施形態では、本発明の機器およびキットは、試料の希釈および他の処理の必要なしに濃度の広いダイナミックレンジにわたって、例えば、1 0 ⁵ 倍、1 0 ⁶ 倍、または 1 0 ⁷ 倍を超える濃度範囲にわたって、試料中の例えば分子などの種の濃度を決定することが可能である。
- 【 0 0 2 9 】

本発明の機器、キット、および方法の高感度は、検出感度の欠如のために従来可能でなかった生物学的マーカーなどのマーカーの使用の確立、ならびに新しいマーカーの確立を

30

40

50

可能にする。生物学的状態の決定に利用される可能性はあるが、低い範囲が知られていないゆえに現在実際に利用されていない多数のマーカーが現在入手可能である。場合によっては、マーカーの異常に高いレベルは現在の方法によって検出可能であるが、正常範囲は確立されていない。いくつかの場合では、マーカーの上の正常範囲は検出可能であるが、下の正常範囲および正常未満のレベルは検出可能でない。いくつかの場合では、例えば腫瘍に特異的なマーカーまたは感染のマーカーの場合、マーカーの任意のレベルは生物学的状態の存在可能性を示し、検出感度を向上させることは早期診断のために有利である。場合により、複数の時点にわたるマーカー濃度の変化率または変化の欠如は最も有益な情報を提供するが、本分析方法では、一般に最も治療可能である初期状態における時点別の試料採取が不可能である。いくつかの場合では、複雑な試料処理および時間のかかる分析を必要とする方法などの臨床場面で実用的でも有用でもない面倒な方法を用いることのみによって、マーカーを臨床上有用なレベルで検出することができる。さらに、十分に低い濃度で存在するために存在が現行の方法によって検出するのが極めて困難または不可能である、生物学的状態の潜在的なマーカーがある。

10

【0030】

本発明の分析法および組成物は、マーカーが従来検知されなかった濃度での生物学的状態のマーカーの検出を可能にする感度、精度、および信頼性のレベルを提供し、したがって、確認マーカーまたは限られた研究場面だけで有用なマーカーから、診断型、予後診断型、治療指向型、または臨床場面および/または治験などの大規模な臨床場面で役立つその他の型のマーカーへの、そのようなマーカーの「再目的化」を可能にする。このような方法では、そのようなマーカーの正常および異常な範囲の決定が可能となる。

20

【0031】

このように再目的化されたマーカーは、例えば正常状態（正常範囲）の検出、応答体（responder）/ 不応答体（non-responder）（例えば薬剤投与などの治療に対する応答）の検出；初期の疾患または病理の発生の検出（例えば、最も早期の癌の検出、心臓虚血の早期検出）；病状期（例えば、癌）；疾患モニタリング（例えば、糖尿病モニタリング、治療後の癌再発のモニタリング）；疾患メカニズムの研究；および薬物治療の毒性などの治療毒性の研究のために用いることができる。

【0032】

したがって、本発明は、マーカーの高感度検出のための方法および組成物、ならびに正常および異常なレベルの値のマーカーを確立するさらなる方法を提供する。さらなる実施形態では、本発明は、マーカーについて確立された値に基づく診断、予後診断、および/または治療選択の方法を提供する。本発明は、そのような方法で用いる組成物、例えばマーカーの超高感度検出のための検出試薬も提供する。

30

【0033】

II. 本発明の方法および組成物による高感度検出のための分子

本発明の機器、キット、および方法は、多くの異なる種類の単一分子の高感度検出および濃度決定のために用いることができる。具体的には、機器、キット、および方法は、生物学的状態のマーカーの高感度検出および濃度決定に役立つ。本明細書で用いる用語「単一分子の検出」は、直接的および間接的な検出を指す。例えば、単一分子は蛍光標識で標識することができ、分子-標識複合体は本明細書で記載の機器で検出することができる。あるいは、単一分子を蛍光標識で標識し、次いで蛍光標識を単一分子から分離し、標識を本明細書で記載の機器で検出することができる。単一分子の検出との用語は、両方の形の検出を包含する。

40

【0034】

A. 一般

本発明のアナライザーおよび関連した方法を用いて検出することができる分子の例には、バイオポリマー、例えば、タンパク質、核酸、炭水化物、および有機および無機の小分子が含まれる。具体的には、本明細書で記載される機器、キット、および方法は、生体試料中の単一分子のタンパク質および小分子の検出、ならびに試料中のそのような分子の濃

50

度決定に役立つ。

【0035】

用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「オリゴペプチド」は本明細書で互換的に用いられ、ペプチド結合で連結される2個以上のアミノ酸を含む任意の組成物を含む。ポリペプチドは、20個の天然アミノ酸と通常称される20個のアミノ酸以外のアミノ酸を含むことができることは理解されよう。また、ポリペプチドは、末端アミノ酸を含め、当技術分野で既知である任意の手段によって修飾される（天然または非天然の）1つ以上のアミノ酸を含むことができる。ポリペプチドの修飾の例には、グリコシル化によるものまたは他の翻訳後修飾が含まれる。本発明のポリペプチドに存在することができる修飾には、限定するものではないが、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質もしくは脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、 γ カルボキシル化、糖化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化（arginylation）などのタンパク質への転移RNA媒介性のアミノ酸付加、およびユビキチン化が含まれる。

10

【0036】

本機器、キット、および方法によって検出される分子は、遊離であっても、あるいは複合体（例えば抗体-抗原複合体）またはより一般にはタンパク質-タンパク質複合体（例えばトロポニン複合体）の一部であってもよい。

20

【0037】

B．生物学的状態のマーカー

一部の実施形態では、本発明は、生物学的マーカーの高感度検出のためならびに診断、予後診断、および/または治療方法の決定におけるそのようなマーカーの使用のための組成物および方法を提供する。

【0038】

本発明のマーカーは、例えば、生物の生物学的状態（例えば、疾患状態または非疾患状態などの状態）と関連する任意の組成物および/もしくは分子または組成物および/もしくは分子の複合体であることができる。マーカーは、例えば、小分子、ポリペプチド、DNA、およびRNAなどの核酸、リン脂質もしくはミセルなどの脂質、ミトコンドリアもしくはクロロプラストなどの細胞成分などであることができる。本発明によって企図されるマーカーは、既知であってもなくてもよい。例えば、一部の実施形態では、本明細書の方法は、対象となる生物学的状態または対象となる状態のマーカーとして用いることができる新規ポリペプチドを特定することができ、他の実施形態では、既知のポリペプチドが対象となる生物学的状態または状態のマーカーとして特定される。本発明のシステムを用いることで、罹患組織から「漏れた」ものなど、生物の生物学的状態の判定において潜在的に高い有用性を有するが低濃度でしか存在しない、ポリペプチドなどのマーカーを観察することが可能である。潜在的に高い有用性を有する他のマーカーまたはポリペプチドは、疾患に関連があるもの、例えば腫瘍-宿主環境で生成されるものであることができる。生物学的状態に関する情報を提供する任意の好適なマーカーを本発明の方法および組成物において用いることができる。本明細書で用いる用語「マーカー」は、生物から得られる試料中で検出することができ、その検出または定量化がその生物の生物学的状態に関する情報を提供する、任意の分子を包含する。

30

40

【0039】

生物学的状態には、限定するものではないが、表現型状態、生物に影響を及ぼす状態、発現状態、年齢、健康、病状、疾患の検出、過程、または病状期、感染、毒性、または化学因子、環境因子、もしくは薬物因子に対する応答（例えば薬物応答フェノタイピング、薬物毒性フェノタイピング、または薬剤効果フェノタイピング）が含まれる。

50

【 0 0 4 0 】

本明細書で用いる用語「生物」は、少なくとも1つの細胞を含む任意の生物を指す。生物は単細胞生物と同じくらい単純であってもよいし、哺乳動物と同じくらい複雑であってもよい。本発明の生物は、好ましくは哺乳動物である。そのような哺乳動物は、例えば、ヒトまたは霊長類などの動物（例えば、サル、チンパンジーなど）、飼いなされた動物（例えば、イヌ、ネコ、ウマなど）、飼育動物（例えば、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウシなど）、または実験動物（例えば、マウス、ラットなど）でよい。好ましくは、生物はヒトである。

【 0 0 4 1 】

一部の実施形態では、本発明の方法および組成物は、マーカーのクラス、例えばサイトカイン、成長因子、腫瘍マーカー、炎症マーカー、内分泌マーカー、自己免疫マーカー、甲状腺マーカー、心血管マーカー、糖尿病マーカー、感染症マーカー、神経マーカー、呼吸器マーカー、胃腸マーカー、筋骨格マーカー、皮膚科学障害および代謝マーカーを指向する。

10

【 0 0 4 2 】

下の表1は、本発明の方法および組成物で測定されたこれらの種類のマーカーの例を提供し、本発明の方法および組成物によって検出されたマーカーの濃度および特定のマーカーについて本発明の単一粒子アナライザーシステムで計数した粒子数を提供する。

【 0 0 4 3 】

【 表 1 】

20

表 1

マーカーの種類およびその種類の例示的なマーカー

サイトカイン	モル濃度	分子
IL-12p70	2.02×10^{-14}	$6.09 \times 10^{+5}$
IL-10	5.36×10^{-14}	$1.61 \times 10^{+6}$
IL-1 α	5.56×10^{-14}	$1.67 \times 10^{+6}$

【表 2】

IL-3	5.85×10^{-14}	$1.76 \times 10^{+6}$
IL-12p40	6.07×10^{-14}	$1.83 \times 10^{+6}$
IL-1ra	6.12×10^{-14}	$1.84 \times 10^{+6}$
IL-12	8.08×10^{-14}	$2.44 \times 10^{+6}$
IL-6	9.53×10^{-14}	$2.87 \times 10^{+6}$
IL-4	1.15×10^{-13}	$3.47 \times 10^{+6}$
IL-18	1.80×10^{-13}	$5.43 \times 10^{+6}$
IP-10	1.88×10^{-13}	$1.13 \times 10^{+7}$
IL-5	1.99×10^{-13}	$5.98 \times 10^{+6}$
エオタキシン	2.06×10^{-13}	$1.24 \times 10^{+7}$
IL-16	3.77×10^{-13}	$1.14 \times 10^{+7}$
MIG	3.83×10^{-13}	$1.15 \times 10^{+7}$
IL-8	4.56×10^{-13}	$1.37 \times 10^{+7}$
IL-17	5.18×10^{-13}	$1.56 \times 10^{+7}$
IL-7	5.97×10^{-13}	$1.80 \times 10^{+7}$
IL-15	6.13×10^{-13}	$1.84 \times 10^{+7}$
IL-13	8.46×10^{-13}	$2.55 \times 10^{+7}$
IL-2R (可溶性)	8.89×10^{-13}	$2.68 \times 10^{+7}$
IL-2	8.94×10^{-13}	$2.69 \times 10^{+7}$
LIF/HILDA	9.09×10^{-13}	$5.47 \times 10^{+7}$
IL-1 β	1.17×10^{-12}	$3.51 \times 10^{+7}$
Fas/CD95/Apo-1	1.53×10^{-12}	$9.24 \times 10^{+7}$
MCP-1	2.30×10^{-12}	$6.92 \times 10^{+7}$
腫瘍	モル濃度	分子
EGF	4.75×10^{-14}	$2.86 \times 10^{+6}$
TNF- α	6.64×10^{-14}	$8.00 \times 10^{+6}$
PSA (第3世代)	1.15×10^{-13}	$6.92 \times 10^{+6}$
VEGF	2.31×10^{-13}	$6.97 \times 10^{+6}$
TGF- β 1	2.42×10^{-13}	$3.65 \times 10^{+7}$
FGFb	2.81×10^{-13}	$1.69 \times 10^{+7}$
TRAIL	5.93×10^{-13}	$3.57 \times 10^{+7}$
TNF-RI (p55)	2.17×10^{-12}	$2.62 \times 10^{+8}$
炎症	モル濃度	分子
ICAM-1 (可溶性)	8.67×10^{-15}	$5.22 \times 10^{+4}$
RANTES	6.16×10^{-14}	$3.71 \times 10^{+6}$
MIP-2	9.92×10^{-14}	$2.99 \times 10^{+6}$
MIP-1 β	1.98×10^{-13}	$5.97 \times 10^{+6}$
MIP-1 α	2.01×10^{-13}	$6.05 \times 10^{+6}$
MMP-3	1.75×10^{-12}	$5.28 \times 10^{+7}$

10

20

30

40

【表 3】

内分泌	モル濃度	分子
17β-エストラジオール (E2)	4.69×10^{-14}	$2.82 \times 10^{+6}$
DHEA	4.44×10^{-13}	$2.67 \times 10^{+7}$
ACTH	1.32×10^{-12}	$7.96 \times 10^{+7}$
ガストリン	2.19×10^{-12}	$1.32 \times 10^{+8}$
成長ホルモン (hGH)	2.74×10^{-12}	$1.65 \times 10^{+8}$
自己免疫	モル濃度	分子
GM-CSF	1.35×10^{-13}	$8.15 \times 10^{+6}$
C反応性タンパク質 (CRP)	3.98×10^{-13}	$2.40 \times 10^{+7}$
G-CSF	1.76×10^{-12}	$1.06 \times 10^{+8}$
甲状腺	モル濃度	分子
サイクリックAMP	9.02×10^{-15}	$5.43 \times 10^{+5}$
カルシトニン	3.25×10^{-14}	$1.95 \times 10^{+6}$
副甲状腺ホルモン (PTH)	1.56×10^{-13}	$9.37 \times 10^{+6}$
心血管	モル濃度	分子
B-ナトリウム排泄増加性ペプチド	2.86×10^{-13}	$1.72 \times 10^{+7}$
NT-proBNP	2.86×10^{-12}	$8.60 \times 10^{+7}$
C反応性タンパク質 (HS)	3.98×10^{-13}	$2.40 \times 10^{+7}$
βトロノグロブリン (BTG)	5.59×10^{-13}	$3.36 \times 10^{+7}$
糖尿病	モル濃度	分子
C-ペプチド	2.41×10^{-15}	$1.45 \times 10^{+5}$
レプチン	1.89×10^{-13}	$1.14 \times 10^{+7}$
感染症	モル濃度	分子
IFN-γ	2.08×10^{-13}	$1.25 \times 10^{+7}$
IFN-α	4.55×10^{-13}	$2.74 \times 10^{+7}$
代謝	モル濃度	分子
生体無傷のPTH (1-84)	1.59×10^{-12}	$1.44 \times 10^{+8}$
PTH	1.05×10^{-13}	$9.51 \times 10^{+6}$

10

20

30

【0044】

サイトカイン

研究および診断のために、サイトカインは多数の状態、疾患、病状などのマーカーとして有用であり、本発明の組成物および方法はサイトカインの検出および定量的ための標識、そのような標識を用いてサイトカインの正常および異常なレベルを決定する方法、ならびにそのようなレベルに基づく診断、予後診断、および/または治療法決定の方法を含む。

40

【0045】

現在、協調または不調和の調節が臨床上の関心である100個以上のサイトカイン/ケモカインがある。特定の疾患の経過をサイトカインレベルの変化と関連させるため、理想的な手法では、所与のサイトカインまたは複数のサイトカインについて試料を高感度で分析することが必要とされる。マーカーパネルにおいて現在用いられ、本発明の方法および組成物で用いることができる例示的なサイトカインには、限定するものではないが、B D

50

NF、CREB pS 133、CREB全体、DR - 5、EGF、ENA - 78、エオタキシン、脂肪酸結合タンパク質、FGF塩基性、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、GCP - 2、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子GM-CSF(GM-CSF)、成長関連オンコジーン-ケラチノサイト(GRO-KC)、HGF、ICAM - 1、IFN - α 、IFN - γ 、インターロイキンIL - 10、IL - 11、IL - 12、IL - 12 p40、IL - 12 p40 / p70、IL - 12 p70、IL - 13、IL - 15、IL - 16、IL - 17、IL - 18、IL - 1 α 、IL - 1 β 、IL - 1ra、IL - 1ra / IL - 1F3、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 9、インターフェロン誘導性タンパク質(10 IP - 10)、JE / MCP - 1、ケラチノサイト(KC)、KC / GRO α 、LIF、リンホタシン(Lymphotacin)、M-CSF、単球化学誘引タンパク質 - 1(monocyte chemoattractant protein-1)(MCP - 1)、MCP - 1(MCAF)、MCP - 3、MCP - 5、MDC、MIG、マクロファージ炎症性(MIP - 1 α)、MIP - 1 β 、MIP - 1 γ 、MIP - 2、MIP - 3 β 、OSM、PDGF - BB、活性化で調節される発現および分泌された正常T細胞(regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted)(RANTES)、Rb(pT821)、Rb(全体)、Rb pSpT249 / 252、Tau(pS214)、Tau(pS396)、Tau(全体)、組織因子、腫瘍壊死因子 α (TNF - α)、TNF - β 、TNF - RI、TNF - RII、VCAM - 1、およびVEGFが含まれる。一部の実施形態では、サイトカインはIL - 12 p70、IL - 10、IL - 1 α 、IL - 3、IL - 12 p40、IL - 1ra、IL - 12、IL - 6、IL - 4、IL - 18、IL - 10、IL - 5、エオタキシン、IL - 16、MIG、IL - 8、IL - 17、IL - 7、IL - 15、IL - 13、IL - 2R(可溶性)、IL - 2、LIF / HILDA、IL - 1 β 、Fas / CD95 / Apo - 1、またはMCP - 1である。

【0046】

成長因子

成長因子には、EGFリガンド、例えばアンフィレグリン、LRIG3、ベータセルリン、ニューレグリン - 1 / NRG1、EGF、ニューレグリン - 3 / NRG3、エピゲン、TGF α 、エプレグリン、TMEFF1 / トモレグリン - 1、HB - EGF、TMEFF2、LRIG1；EGF R / ErbB受容体ファミリー、例えばEGF R、ErbB3、ErbB2、ErbB4；FGFファミリー、例えばFGFリガンドFGF酸性、FGF - 12、FGF塩基性、FGF - 13、FGF - 3、FGF - 16、FGF - 4、FGF - 17、FGF - 5、FGF - 19、FGF - 6、FGF - 20、FGF - 8、FGF - 21、FGF - 9、FGF - 22、FGF - 10、FGF - 23、FGF - 11、KGF / FGF - 7、FGF受容体FGF R1 ~ 4、FGF R3、FGF R1、FGF R4、FGF R2、FGF R5、FGF調節因子FGF - BP；ヘッジホッグファミリー デザートヘッジホッグ、ソニックヘッジホッグ、インディアンヘッジホッグ；ヘッジホッグ関連分子および調節因子 BOC、GLI - 3、CDO、GSK - 3 α / β 、DISP1、GSK - 3 α 、Gas1、GSK - 3 β 、GLI - 1、Hip、GLI - 2；IGFファミリーIGFリガンドIGF - I、IGF - II、IGF - I受容体(CD221)IGF - IR、およびIGF結合タンパク質(IGFBP)ファミリーALS、IGFBP - 5、CTGF / CCN2、IGFBP - 6、Cyr61 / CCN1、IGFBP - L1、エンドカン、IGFBP - rp1 / IGFBP - 7、IGFBP - 1、IGFBP - rp10、IGFBP - 2、NOV / CCN3、IGFBP - 3、WISP - 1 / CCN4、IGFBP - 4；受容体チロシンキナーゼAx1、FGF R4、C1q R1 / CD93、FGF R5、DDR1、Flt - 3、DDR2、HGF R、Dtk、IGF - I R、EGF、R IGF - II R、Eph、INSRR、EphA1、インスリンR / CD220、EphA2、M-CSF R、EphA3、Mer、EphA4、MSP R / Ron、EphA5、MuSK、EphA6、PDGF R α 、EphA7、PDGF R β 、EphA8、Ret、EphB1、RTK様オーファン受

容体 1 / R O R 1、E p h B 2、R T K 様 オーファン 受容体 2 / R O R 2、E p h B 3、S C F R / c - k i t、E p h B 4、T i e - 1、E p h B 6、T i e - 2、E r b B 2、T r k A、E r b B 3、T r k B、E r b B 4、T r k C、F G F、R 1 ~ 4 V E G F R、F G F R 1、V E G F R 1 / F l t - 1、F G F R 2、V E G F R 2 / K D R / F l k - 1、F G F R 3、V E G F R 3 / F l t - 4；プロテオグリカン および調節因子 プロテオグリカンアグレカン、ミメカン、アグリン、N G 2 / M C S P、ピグリカン、オステオアドヘリン、デコリン、ポドカン、D S P G 3、 δ -サルコグリカン、エンドカン、シンデカン - 1 / C D 1 3 8、エンドグリカン、シンデカン - 2、エンドリペリン / ペルレカン、シンデカン - 3、グリピカン 2、シンデカン - 4、グリピカン 3、テスチカン 1 / S P O C K 1、グリピカン 5、テスチカン 2 / S P O C K 2、グリ 10
ピカン 6、テスチカン 3 / S P O C K 3、ルミカン、ベルシカン、プロテオグリカン調節因子アリルスルファターゼ A / A R S A、グルコサミン (N - アセチル) - 6 - スルファターゼ / G N S、エキソストシン様 2 / E X T L 2、H S 6 S T 2、エキソストシン様 3 / E X T L 3、イズロネート 2 - スルファターゼ / I D S、G a l N A c 4 S - 6 S T；S C F、F l t - 3 リガンド および M - C S F F l t - 3、M - C S F R、F l t - 3 リガンド、S C F、M - C S F、S C F R / c - k i t；T G F β スーパーファミリー (炎症性マーカーで記載のものと同じ)；V E G F / P D G F ファミリーニューロピリン - 1、P 1 G F、ニューロピリン - 2、P 1 G F - 2、P D G F、V E G F、P D G F R α 、V E G F - B、P D G F R β 、V E G F - C、P D G F - A、V E G F - D、P D G F - A B、V E G F R、P D G F - B、V E G F R 1 / F l t - 1、P D G F 20
- C、V E G F R 2 / K D R / F l k - 1、P D G F - D、V E G F R 3 / F l t - 4；W n t 関連分子 D i c k k o p f タンパク質 および W n t 阻害剤 D k k - 1、D k k - 4、D k k - 2、S o g g y - 1、D k k - 3、W I F - 1 フリズルド (Frizzled) および関連タンパク質 フリズルド - 1、フリズルド - 8、フリズルド - 2、フリズルド - 9、フリズルド - 3、s F R P - 1、フリズルド - 4、s F R P - 2、フリズルド - 5、s F R P - 3、フリズルド - 6、s F R P - 4、フリズルド - 7、M F R P W n t リガンド W n t - 1、W n t - 8 a、W n t - 2 b、W n t - 8 b、W n t - 3 a、W n t - 9 a、W n t - 4、W n t - 9 b、W n t - 5 a、W n t - 1 0 a、W n t - 5 b、W n t - 1 0 b、W n t - 7 a、W n t - 1 1、W n t - 7 b；他の W n t 関連分子 A P C、クレメン - 2、A x i n - 1、L R P - 1、 β -カテニン、L R P - 6、D i s h e v e l l e d - 1、ノリン (Norrin)、D i s h e v e l l e d - 3、P K C β 1、グリピカン 3、ピゴパス - 1 (Pygopus-1)、グリピカン 5、ピゴパス - 2、G S K - 3 α / β 、R - スポンジン 1、G S K - 3 α 、R - スポンジン 2、G S K - 3 β 、R - スポンジン 3、I C A T、R T K 様 オーファン 受容体 1 / R O R 1、クレメン - 1、R T K 様 オーファン 受容体 2 / R O R、および他の成長因子 C T G F / C C N 2、 β -N G F、C y r 6 1 / C C N 1、ノリン、D A N C E、N O V / C C N 3、E G - V E G F / P K 1、オステオクリン、ヘパソシン、P D - E C G F、H G F、プログラヌリン、L E C T 2、トロンボポエチン、L E D G F、W I S P - 1 / C C N 4 が含まれる。

【 0 0 4 7 】

炎症マーカー

炎症マーカーには、I C A M - 1、R A N T E S、M I P - 2、M I P - 1 β 、M I P - 1 α および M M P - 3 が含まれる。さらなる炎症マーカーには、接着分子、例えばインテグリン α 1 β 1、 α 2 β 1、 α 3 β 1、 α 4 β 1、 α 5 β 1、 α 6 β 1、 α 7 β 1、 α 8 β 1、 α 9 β 1、 α V β 1、 α 4 β 7、 α 6 β 4、 α D β 2、 α L β 2、 α M β 2、 α V β 3、 α V β 5、 α V β 6、 α V β 8、 α X β 2、 α I I b β 3、 α I E L b β 7、 β - 2 インテグリン、 β - 3 インテグリン、 β - 2 インテグリン、 β - 4 インテグリン、 β - 5 インテグリン、 β - 6 インテグリン、 β - 7 インテグリン、 β - 8 インテグリン、 α - 1 インテグリン、 α - 2 インテグリン、 α - 3 インテグリン、 α - 4 インテグリン、 α - 5 インテグリン、 α - 6 インテグリン、 α - 7 インテグリン、 α - 8 インテグリン、 α - 9 インテグリン、 α - D インテグリン、 α - L インテグリン、 α - M インテグリン、 α 40
50

- V インテグリン、 α - X インテグリン、 α - I I b インテグリン、 α I L E b インテグリン；インテグリン関連分子、例えば β I G - H 3、メルシン、C D 4 7、M E P E、C D 1 5 1、オステオポンチン、I B S P / シアロタンパク質 I I、R A G E、I G S F 8；セレクチン、例えば E - セレクチン、P - セレクチン、L - セレクチン；リガンド、例えば C D 3 4、G l y C A M - 1、M a d C A M - 1、P S G L - 1、ビトロネクチック、ビトロネクチン受容体、フィブロネクチン、ビトロネクチン、コラーゲン、ラミニン、I C A M - 1、I C A M - 3、B L - C A M、L F A - 2、V C A M - 1、N C A M、P E C A M が含まれる。さらなる炎症マーカーには、サイトカイン、例えば I F N - α 、I F N - β 、I F N - ε 、I F N - κ 、I F N - τ 、I F N - ζ 、I F N - ω 、I F N - γ 、I L 2 9、I L 2 8 A、および I L 2 8 B、I L - 1、I L - 1 α 、および β 、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 1 0、I L - 1 1、I L - 1 2、I L - 1 3、I L - 1 4、I L - 1 5、I L - 1 6、I L - 1 7、I L - 1 8、I L - 1 9、I L - 2 0、I L - 2 1、I L - 2 2、I L - 2 3、I L - 2 4、I L - 2 5、I L - 2 6、I L - 2 7、I L - 2 8、I L - 2 9、I L - 3 0、T C C R / W S K - 1 が含まれる。さらなる炎症マーカーには、サイトカイン受容体、例えば一般的な β 鎖、I L - 3 R α 、I L - 3 R β 、G M - C S F R、I L - 5 R α 、一般的な γ 鎖 / I L - 2 R γ 、I L - 2 R α 、I L - 9 R、I L - 2 R β 、I L - 4 R、I L - 2 1 R、I L - 1 5 R α 、I L - 7 R α / C D 1 2 7、I L - 1 r a / I L - 1 F 3、I L - 1 R 8、I L - 1 R I、I L - 1 R 9、I L - 1 R I I、I L - 1 8 R α / I L - 1 R 5、I L - 1 R 3 / I L - 1 R A c P、I L - 1 8 R β / I L - 1 R 7、I L - 1 R 4 / S T 2 S I G I R R、I L - 1 R 6 / I L - 1 R r p 2、I L - 1 1 R α 、I L - 3 1 R A、C N T F R α 、レプチン R、G - C S F R、L I F R α 、I L - 6 R、O s m R β 、I F N - α / β R 1、I F N - α / β R 2、I F N - γ R 1、I F N - γ R 2、I L - 1 0 R α 、I L - 1 0 R β 、I L - 2 0 R α 、I L - 2 0 R β 、I L - 2 2 R、I L - 1 7 R、I L - 1 7 R D、I L - 1 7 R C、I L - 1 7 B R、I L - 1 3 R α 2、I L - 2 3 R、I L - 1 2 R β 1、I L - 1 2 R β 2、T C C R / W S X - 1、I L - 1 3 R α 1 が含まれる。さらなる炎症マーカーには、ケモカイン、例えば C C L - 1、C C L - 2、C C L - 3、C C L - 4、C C L - 5、C C L - 6、C C L - 7、C C L - 8、C C L - 9、C C L - 1 0、C C L - 1 1、C C L - 1 2、C C L - 1 3、C C L - 1 4、C C L - 1 5、C C L - 1 6、C C L - 1 7、C C L - 1 8、C C L - 1 9、C C L - 2 0、C C L - 2 1、C C L - 2 2、C C L - 2 3、C C L - 2 4、C C L - 2 5、C C L - 2 6、C C L - 2 7、C C L - 2 8、M C K - 2、M I P - 2、C I N C - 1、C I N C - 2、K C、C I N C - 3、L I X、G R O、胸腺ケモカイン - 1、C X C L - 1、C X C L - 2、C X C L - 3、C X C L - 4、C X C L - 5、C X C L - 6、C X C L - 7、C X C L - 8、C X C L - 9、C X C L - 1 0、C X C L - 1 1、C X C L - 1 2、C X C L - 1 3、C X C L - 1 4、C X C L - 1 5、C X C L - 1 6、C X C L - 1 7、X C L 1、X C L 2、ケメリンが含まれる。さらなる炎症マーカーには、ケモカイン受容体、例えば C C R - 1、C C R - 2、C C R - 3、C C R - 4、C C R - 5、C C R - 6、C C R - 7、C C R - 8、C C R - 9、C C R - 1 0、C X C R 3、C X C R 6、C X C R 4、C X C R 1、C X C R 5、C X C R 2、C h e m R 2 3 が含まれる。さらなる炎症マーカーには、腫瘍壊死因子 (T N F)、例えば T N F - α 、4 - 1 B B リガンド / T N F S F 9、L I G H T / T N F S F 1 4、A P R I L / T N F S F 1 3、リンフォトキシン、B A F F / T N F S F 1 3 B、リンフォトキシン β / T N F S F 3、C D 2 7 リガンド / T N F S F 7、O X 4 0 リガンド / T N F S F 4、C D 3 0 リガンド / T N F S F 8、T L 1 A / T N F S F 1 5、C D 4 0 リガンド / T N F S F 5、T N F - α / T N F S F 1 A、E D A、T N F - β / T N F S F 1 B、E D A - A 2、T R A I L / T N F S F 1 0、F a s リガンド / T N F S F 6、T R A N C E / T N F S F 1 1、G I T R リガンド / T N F S F 1 8、T W E A K / T N F S F 1 2 が含まれる。さらなる炎症マーカーには、T N F スーパーファミリー受容体、例えば 4 - 1 B B / T N

FRSF9、NGF R/TNFRSF16、BAFF R/TNFRSF13C、オステオプロテゲリン/TNFRSF11B、BCMA/TNFRSF17、OX40/TNFRSF4、CD27/TNFRSF7、RANK/TNFRSF11A、CD30/TNFRSF8、RELT/TNFRSF19L、CD40/TNFRSF5、TACI/TNFRSF13B、DcR3/TNFRSF6B、TNF RI/TNFRSF1A、DcTRAIL R1/TNFRSF23、TNF RII/TNFRSF1B、DcTRAIL R2/TNFRSF22、TRAIL R1/TNFRSF10A、DR3/TNFRSF25、TRAIL R2/TNFRSF10B、DR6/TNFRSF21、TRAIL R3/TNFRSF10C、EDAR、TRAIL R4/TNFRSF10D、Fas/TNFRSF6、TROY/TNFRSF19、GITR/TNFRSF18、TWEAK R/TNFRSF12、HVEM/TNFRSF14、XEDARが含まれる。さらなる炎症マーカーには、TNFスーパーファミリー調節因子、例えばFADD、TRAF-2、RIP1、TRAF-3、TRADD、TRAF-4、TRAF-1、TRAF-6が含まれる。さらなる炎症マーカーには、急性期反応物質および急性期タンパク質が含まれる。さらなる炎症マーカーには、TGFβスーパーファミリーリガンド、例えばアクチビン、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB、アクチビンC、BMP（骨形成タンパク質）、BMP-2、BMP-7、BMP-3、BMP-8、BMP-3b/GDF-10、BMP-9、BMP-4、BMP-10、BMP-5、BMP-15/GDF-9B、BMP-6、デカペンタプレジック、増殖/分化因子（GDF）、GDF-1、GDF-8、GDF-3、GDF-9、GDF-5、GDF-11、GDF-6、GDF-15、GDF-7、GDNFファミリーリガンド、アルテミン（Artemin）、ニュールチュリン（Neurturin）、GDNF、ペルセフィン、TGFβ、TGFβ1、TGFβ3、TGFβ1、TGFβ5、LAP（TGFβ1）、潜在型TGFβbp1、潜在型TGFβ1、潜在型TGFβbp2、TGFβ1.2、潜在型TGFβbp4、TGFβ2、Lefty、MIS/AMH、Lefty-1、Nodal、Lefty-A、アクチビンRIA/ALK-2、GFRα-1/GDNFRα-1、アクチビンRIB/ALK-4、GFRα-2/GDNFRα-2、アクチビンRIIA、GFRα-3/GDNFRα-3、アクチビンRIIB、GFRα-4/GDNFRα-4、ALK-1、MIS RII、ALK-7、Ret、BMPRII/ALK-3、TGFβRI/ALK-5、BMPRII/ALK-6、TGFβRII、BMPRIIb、エンドグリン（Endoglin）/CD105、TGFβRIIIが含まれる。さらなる炎症マーカーには、TGFβスーパーファミリーモジュレーター、例えばAmnionless、NCAM-1/CD56、BAMBI/NMA、Noggin、BMP-1/PCP、NOMO、Caronte、PRDC、Cerberus1、SKI、Chordin、Smad1、Chordin様1、Smad2、Chordin様2、Smad3、COCO、Smad4、CRIM1、Smad5、Cripto、Smad7、Crossveinless2、Smad8、Cryptic、SOST、DAN、潜在型TGFβbp1、デコリン、潜在型TGFβbp2、FLRG、潜在型TGFβbp4、フォリスタチン（Follistatin）、TMEFF1/トモレグリン-1、フォリスタチン様1、TMEFF2、GASP-1/WF1KKNRP、TSG、GASP-2/WF1KKN、TSK、グレムリン、バソリン（Vasorin）が含まれる。さらなる炎症マーカーには、EGFリガンド、例えばアンフィレグリン、LRIG3、ベータセルリン、ニューレグリン-1/NRG1、EGF、ニューレグリン-3/NRG3、エピゲン、TGFα、エピレグリン、TMEFF1/トモレグリン-1、HB-EGF、TMEFF2、LRIG1が含まれる。さらなる炎症マーカーには、EGFR/ErbB受容体ファミリー、例えばEGFR、ErbB3、ErbB2、ErbB4が含まれる。さらなる炎症マーカーには、フィブリノーゲンが含まれる。さらなる炎症マーカーには、SAAが含まれる。さらなる炎症マーカーには、グリアマーカー、例えばα1-抗トリプシン、C反応性タンパク質（CRP）、α2-マクログロブリン、グリア原線維酸性タンパク質（GFAP）、Mac-1、F4/80が含まれる。さらなる炎症マーカーには、ミエロ

ペルオキシダーゼが含まれる。さらなる炎症マーカーには、補体マーカー、例えばC3d、C1q、C5、C4d、C4bp、およびC5a～C9が含まれる。さらなる炎症マーカーには、主要組織適合複合体(MHC)糖タンパク質、例えばHLA-DRおよびHLA-A、D、Cが含まれる。さらなる炎症マーカーには、小グリアマーカー、例えばCR3受容体、MHC I、MHC II、CD31、CD11a、CD11b、CD11c、CD68、CD45 RO、CD45 RD、CD18、CD59、CR4、CD45、CD64、およびCD44が含まれる。さらなる炎症マーカーには、α2マクログロブリン受容体、線維芽細胞成長因子、FcγRI、FcγRII、CD8、LCA(CD45)、CD18()、CD59、Apo J、クラスチリン(clusterin)、2型プラスミノゲン活性化因子阻害剤、CD44、マクロファージコロニー刺激因子受容体、MRP14、27E10、4-ヒドロキシノネナール-タンパク質複合体、IκB、NFκB、cPLA₂、COX-2、マトリクスメタロプロテイナーゼ、膜脂質過酸化、およびATPアーゼ活性が含まれる。HSPC228、EMP1、CDC42、TLE3、SPRY2、p40BBP、HSPC060、もしくはNAB2、またはHSPA1A、HSPA1B、MAPRE2、およびOAS1発現のダウンレギュレーション、TACE/ADAM17、α1-酸性糖タンパク、血管新生因子-1、MIF、血管新生因子-2、CD14、β-デフェンシン2、MMP-2、ECF-L/CHI3L3、MMP-7、EGF、MMP-9、EMAP-II、MSP、EN-RAGE、一酸化窒素

、エンドセリン-1、オステオアクチビン/GPNMB、FPR1、PDGF、FPR1、ペントラキシン3/TSG-14、FPR2、Gas6、PLUNC、GM-CSF、RAGE、S100A10、S100A8、S100A9、HIF-1α、サブスタンスP、TFPI、TGFβ1、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4、TLR4、LBP、TREM-1、ロイコトリエンA4、ヒドロラーゼTSG-6、リポカリン-1、uPA、M-CSFおよびVEGF。

【0048】

腫瘍マーカーには、EGF、TNF-α、PSA、VEGF、TGF-β1、FGFb、TRAIL、およびTNF-RI(p55)が含まれる。

【0049】

内分泌機能のマーカーには、17β-エストラジオール(E2)、DHEA、ACTH、ガストリン、および成長ホルモン(hGH)が含まれる。

【0050】

自己免疫マーカーには、GM-CSF、C反応性タンパク質、およびG-CSFが含まれる。

【0051】

甲状腺機能のマーカーには、サイクリックAMP、カルシトニン、および副甲状腺ホルモンが含まれる。

【0052】

心血管マーカーには、心筋トロポニンI、心筋トロポニンT、脳性ナトリウム利尿ペプチド、NT-proBNP、C反応性タンパク質HS、およびβトロポグロブリンが含まれる。

【0053】

糖尿病マーカーには、Cペプチドおよびレプチンが含まれる。

【0054】

感染症のマーカーには、IFN-γおよびIFN-αが含まれる。

【0055】

代謝マーカーには、バイオインタクト(Bio-intact)PTH(1-84)およびPTHが含まれる。

【0056】

生物学的状態のマーカー

10

20

30

40

50

マーカーは、対象となる特定の表現型状態の存在を示すことができる。表現型状態の例には、環境の変化、薬物療法、遺伝子操作もしくは突然変異、傷害、食事の変更、加齢、あるいは単一の生物またはあるクラスもしくはサブクラスの生物の他の任意の特性から生じる表現型が含まれる。

【0057】

一部の実施形態では、対象となる表現型状態は、臨床診断された疾患状態である。そのような疾患状態には、例えば癌、心血管疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、神経疾患、感染症、および妊娠関連障害が含まれる。あるいは、マーカーを用いて健康の状態を検出することができる。

【0058】

癌表現型は、本発明の一部の態様に含まれる。本明細書での癌の例としては、限定するものではないが、乳癌、皮膚癌、骨癌、前立腺癌、肝癌、肺癌、脳腫瘍、喉頭、胆嚢、膵臓、直腸、副甲状腺、甲状腺、副腎、神経組織、頭頸部、結腸、胃、気管支、腎臓の各癌、基底細胞癌、潰瘍型および乳頭型の扁平上皮癌、転移性皮膚癌、骨肉腫、ユーイング肉腫、*veticulum*細胞肉腫、骨髄腫、巨細胞腫、小細胞肺腫瘍、非小細胞肺癌胆石、ランゲルハウス島細胞腫、一次脳腫瘍、急性および慢性のリンパおよび顆粒球腫瘍、毛様細胞腫瘍、アデノーマ、過形成、髄様癌、褐色細胞腫、粘膜神経腫、腸の神経節細胞腫、過形成角膜神経腫瘍、マルファン症候群様体質腫瘍 (*marfanoid habitus tumor*)、ウィルム腫瘍、精上皮腫、卵巣腫瘍、平滑筋腫瘍、子宮頸部異形成、および *in situ* 癌、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、軟部組織肉腫、悪性カルチノイド、局所皮膚病変、菌状息肉腫、横紋筋肉腫、カポジ肉腫、骨肉腫および他の肉腫、悪性高カルシウム血症、腎臓細胞腫瘍、真性赤血球増加症、腺癌、多形神経グリア芽細胞腫、白血病、リンパ腫、悪性黒色腫、類表皮癌、ならびに他の癌腫および肉腫がある。

【0059】

心血管疾患は、本発明の他の用途に含めることができる。心血管疾患の例には、限定するものではないが、うっ血性心不全、高血圧症、不整脈、アテローム性動脈硬化症、コレステロール、ウルフ - パーキンソン - ホワイト症候、QT延長症候群、狭心症、頻脈、徐脈、心房性細動、心室性細動、うっ血性心不全、心筋虚血症、心筋梗塞、心臓タンポナーデ、心筋炎、心膜炎、催不整脈性右室異形成、肥大型心筋症、ウィリアムズ症候群、心臓弁膜症、心内膜炎、細菌性、肺閉塞症、大動脈弁狭窄症、レイノー病、レイノー病、コレステロール塞栓症、ワレンベルグ症候群、ヒッペル - リンダウ病、および末梢血管拡張症が含まれる。

【0060】

炎症性疾患および自己免疫疾患は、本発明の他の実施形態に含めることができる。炎症性疾患および自己免疫疾患の例には、限定するものではないが、慢性関節リウマチ、非特異的関節炎、喉頭の炎症性疾患、炎症性腸障害、乾癬、甲状腺機能低下症（例えば、橋本病）、大腸炎、I型糖尿病、骨盤内炎症性疾患、中枢神経系の炎症性疾患、側頭動脈炎、リウマチ性多発性筋痛、強直性脊椎炎、結節性多発動脈炎、ライター症候群、強皮症、全身性エリテマトーデスが含まれる。

【0061】

本発明の方法および組成物は、アデノウイルス、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*)、クラジミア・ニューモニエ (*Chlamydia pneumoniae*)、トラコーマクラミジア (*Chlamydia trachomatis*)、コレラトキシン、コレラトキシンβ、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*)、サイトメガロウイルス、ジフテリア毒素、エプスタイン - バー N A、エプスタイン - バー E A、エプスタイン - バー V C A、ヘリコバクターピロリ、B型肝炎ウイルス (HBV) コア、B型肝炎ウイルス (HBV) エンベロープ、B型肝炎ウイルス (HBV) *Survace* (A y)、C型肝炎ウイルス (HCV) コア、C型肝炎ウイルス (HCV) NS3、C型肝炎ウイルス (HCV) NS4、C型肝炎ウイルス (HCV) NS5、A型肝炎、D型肝炎、E型肝炎ウイルス (HEV) *orf 2 3 KD*、E型肝炎ウイルス (HEV) *orf 2 6 KD*、E型肝炎ウイルス (HEV) *orf 3 3 K*

10

20

30

40

50

D、ヒト免疫不全ウイルス(HIV) - 1 p 2 4、ヒト免疫不全ウイルス(HIV) - 1 g p 4 1、ヒト免疫不全ウイルス(HIV) - 1 g p 1 2 0、ヒト乳頭腫ウイルス(HPV)、単純疱疹ウイルスHSV - 1 / 2、単純疱疹ウイルスHSV - 1 g D、単純疱疹ウイルスHSV - 2 g G、ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV) - 1 / 2、インフルエンザA型、インフルエンザA型H3N2、インフルエンザB型、リーシュマニア・ドノバニ(Leishmania donovani)、ライム病、耳下腺炎、M.ニューモニエ(M. pneumoniae)、結核菌(M. tuberculosis)、1型パラインフルエンザウイルス、2型パラインフルエンザウイルス、3型パラインフルエンザウイルス、ポリオウイルス、RSウイルス(RSV)、風疹、麻疹、ストレプトリシンO、テタヌストキシン、T.パリダム(T. pallidum) 1 5 k d、T.パリダム(T. pallidum) p 4 7、T.クルジ(T. cruzi)、トキソプラズマ、およびパリエラ・ゾーター(Varicella Zoater)のマーカを含む、感染症のマーカに関する研究情報も提供することができる。

10

【0062】

III. 標識

一部の実施形態では、本発明は、マーカなどの分子の高感度検出および定量的ための標識を含む方法および組成物を提供する。

【0063】

当業者は、標的分子を標識して粒子混合物中におけるそれらの検出または識別を可能にするために、多くの手法を用いることができることを認めている。標識は、標識および標的の非特異的または特異的相互作用を利用する方法を含む任意の既知手段によって結合することができる。標識は、検出可能なシグナルを提供するか、電界における粒子の運動性に影響を及ぼすことができる。さらに、標識化は、直接にまたは結合相手を通して達成することができる。

20

【0064】

一部の実施形態では、標識は対象となる分子に対する結合相手を含み、結合相手は蛍光部分に結合される。本発明の組成物および方法は、強い蛍光部分、例えば該蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約200個の光子を放出することができる蛍光部分を利用することができ、該レーザーは蛍光部分を含む直径約5ミクロン以上のスポットに集束され、該レーザーによって該スポットに向けられる全エネルギーは約3マイクロジュール以下である。本発明の組成物および方法に好適な該部分は、以下に詳述する。

30

【0065】

一部の実施形態では、本発明は、蛍光部分に結合する生体分子の結合相手を含む、生体分子を検出するための標識を提供し、前記蛍光部分は該部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約200個の光子を放出することができ、該レーザーは蛍光部分を含む直径約5ミクロン以上のスポットに集束され、該レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約3マイクロジュール以下である。一部の実施形態では、前記部分は複数の蛍光実体、例えば約2~4、2~5、2~6、2~7、2~8、2~9、2~10個、または3~5、3~6、3~7、3~8、3~9もしくは3~10個の蛍光実体を含む。一部の実施形態では、前記部分は約2~4個の蛍光実体を含む。一部の実施形態では、生体分子はタンパク質または小分子である。一部の実施形態では、生体分子はタンパク質である。蛍光実体は、蛍光色素分子でもよい。一部の実施形態では、蛍光色素分子は少なくとも1つの置換インドリウム環系を含み、該インドリウム環の3位炭素上の置換基は化学反応性基または共役物質を含む。一部の実施形態では、色素分子はAlexaFluor488、AlexaFluor532、AlexaFluor647、AlexaFluor680、またはAlexaFluor700からなる群から選択されるAlexaFluor分子である。一部の実施形態では、色素分子はAlexaFluor488、AlexaFluor532、AlexaFluor680、またはAlexaFluor700からなる群から選択されるAlexaFluor分子である。一部の実施形態では、色素分子はAlexaFluor647色素分子である。一部の実施

40

50

形態では、色素分子は第 1 の型および第 2 の型の色素分子、例えば 2 つの異なる A l e x a F l u o r 分子を含み、第 1 の型および第 2 の型の色素分子は異なる発光スペクトルを有する。色素分子の第 1 の型の数と第 2 の型の数との比は、例えば 4 : 1、3 : 1、2 : 1、1 : 1、1 : 2、1 : 3、または 1 : 4 でよい。結合相手は、例えば、抗体であることができる。

【 0 0 6 6 】

一部の実施形態では、本発明はマーカーを検出するための標識を提供し、該標識はそのマーカーの結合相手および蛍光部分を含み、該蛍光部分は該部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約 2 0 0 個の光子を放出することができ、該レーザーは蛍光部分を含む直径約 5 ミクロン以上のスポットに集束され、該レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約 3 マイクロジュール以下である。一部の実施形態では、蛍光部分は蛍光分子を含む。一部の実施形態では、蛍光部分は複数の蛍光分子、例えば約 2 ~ 1 0、2 ~ 8、2 ~ 6、2 ~ 4、3 ~ 1 0、3 ~ 8、3 ~ 6 個の蛍光分子を含む。一部の実施形態では、標識は約 2 ~ 4 個の蛍光分子を含む。一部の実施形態では、蛍光色素分子は少なくとも 1 つの置換インドリウム環系を含み、該インドリウム環の 3 位炭素上の置換基は化学反応性基または共役物質を含む。一部の実施形態では、蛍光分子は、A l e x a F l u o r 4 8 8、A l e x a F l u o r 5 3 2、A l e x a F l u o r 6 4 7、A l e x a F l u o r 6 8 0、または A l e x a F l u o r 7 0 0 からなる群から選択される。一部の実施形態では、蛍光分子は、A l e x a F l u o r 4 8 8、A l e x a F l u o r 5 3 2、A l e x a F l u o r 6 8 0、または A l e x a F l u o r 7 0 0 からなる群から選択される。一部の実施形態では、結合相手は抗体を含む。一部の実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。一部の実施形態では、抗体はポリクローナル抗体である。

10

20

【 0 0 6 7 】

抗体は、任意の好適なマーカーに特異的であることができる。一部の実施形態では、抗体は、サイトカイン、成長因子、腫瘍マーカー、炎症マーカー、内分泌マーカー、自己免疫マーカー、甲状腺マーカー、心血管マーカー、糖尿病マーカー、感染症マーカー、神経病マーカー、呼吸器マーカー、胃腸マーカー、筋骨格マーカー、皮膚科学障害および代謝マーカーからなる群から選択されるマーカーに特異的である。

【 0 0 6 8 】

一部の実施形態では、抗体は、サイトカインであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、サイトカインは、B D N F、C R E B p S 1 3 3、C R E B 全体、D R - 5、E G F、E N A - 7 8、エオタキシン、脂肪酸結合タンパク質、F G F 塩基性、顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F)、G C P - 2、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 G M - C S F (G M - C S F)、成長関連オンコジーン - ケラチノサイト (G R O - K C)、H G F、I C A M - 1、I F N - α 、I F N - γ 、インターロイキン I L - 1 0、I L - 1 1、I L - 1 2、I L - 1 2 p 4 0、I L - 1 2 p 4 0 / p 7 0、I L - 1 2 p 7 0、I L - 1 3、I L - 1 5、I L - 1 6、I L - 1 7、I L - 1 8、I L - 1 α 、I L - 1 β 、I L - 1 r a、I L - 1 r a / I L - 1 F 3、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、インターフェロン誘導性タンパク質 (1 0 I P - 1 0)、J E / M C P - 1、ケラチノサイト (K C)、K C / G R O a、L I F、リンホタシン、M - C S F、単球化学誘引タンパク質 - 1 (M C P - 1)、M C P - 1 (M C A F)、M C P - 3、M C P - 5、M D C、M I G、マクロファージ炎症性 (M I P - 1 α)、M I P - 1 β 、M I P - 1 γ 、M I P - 2、M I P - 3 β 、O S M、P D G F - B B、活性化で調節される発現および分泌された正常 T 細胞 (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) (R A N T E S)、R b (p T 8 2 1)、R b (全体)、R b p S p T 2 4 9 / 2 5 2、T a u (p S 2 1 4)、T a u (p S 3 9 6)、T a u (全体)、組織因子、腫瘍壊死因子 α (T N F - α)、T N F - β 、T N F - R I、T N F - R I I、V C A M - 1 および V E G F からなる群から選択される。

30

40

50

【0069】

一部の実施形態では、サイトカインは、IL - 12 p70、IL - 10、IL - 1 α 、IL - 3、IL - 12 p40、IL - 1 α 、IL - 12、IL - 6、IL - 4、IL - 18、IL - 10、IL - 5、エオタキシン、IL - 16、MIG、IL - 8、IL - 17、IL - 7、IL - 15、IL - 13、IL - 2R (可溶性)、IL - 2、LIF / HILDA、IL - 1 β 、Fas / CD95 / Apo - 1、およびMCP - 1からなる群から選択される。

【0070】

一部の実施形態では、抗体は、成長因子であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、TGF β である成長因子であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、成長因子は、GFリガンド、例えばアンフィレグリン、LRIG3、ベータセルリン、ニューレグリン - 1 / NRG1、EGF、ニューレグリン - 3 / NRG3、エビゲン、TGF α 、エプレグリン、TMEFF1 / トモレグリン - 1、HB - EGF、TMEFF2、LRIG1；EGFR / ErbB受容体ファミリー、例えばEGFR、ErbB3、ErbB2、ErbB4；FGFファミリー、例えばFGFリガンドFGF酸性、FGF - 12、FGF塩基性、FGF - 13、FGF - 3、FGF - 16、FGF - 4、FGF - 17、FGF - 5、FGF - 19、FGF - 6、FGF - 20、FGF - 8、FGF - 21、FGF - 9、FGF - 22、FGF - 10、FGF - 23、FGF - 11、KGF / FGF - 7、FGF受容体FGFR1 ~ 4、FGFR3、FGFR1、FGFR4、FGFR2、FGFR5、FGF調節因子FGF - BP；ヘッジホッグファミリー デザートヘッジホッグ、ソニックヘッジホッグ、インディアンヘッジホッグ；ヘッジホッグ関連分子および調節因子 BOC、GLI - 3、CDO、GSK - 3 α / β 、DISP1、GSK - 3 α 、Gas1、GSK - 3 β 、GLI - 1、Hip、GLI - 2；IGFファミリー IGFリガンドIGF - I、IGF - II、IGF - I受容体 (CD221) IGF - IR、およびIGF結合タンパク質 (IGFBP) ファミリーALS、IGFBP - 5、CTGF / CCN2、IGFBP - 6、Cyr61 / CCN1、IGFBP - L1、エンドカン、IGFBP - rp1 / IGFBP - 7、IGFBP - 1、IGFBP - rP10、IGFBP - 2、NOV / CCN3、IGFBP - 3、WISP - 1 / CCN4、IGFBP - 4；受容体チロシンキナーゼAx1、FGFR4、C1qR1 / CD93、FGFR5、DDR1、Flt - 3、DDR2、HGF R、Dtk、IGF - I R、EGF、R IGF - II R、Eph、INSRR、EphA1、インスリンR / CD220、EphA2、M-CSFR、EphA3、Mer、EphA4、MSP R / Ron、EphA5、MuSK、EphA6、PDGFR α 、EphA7、PDGFR β 、EphA8、Ret、EphB1、RTK様オーファン受容体1 / ROR1、EphB2、RTK様オーファン受容体2 / ROR2、EphB3、SCFR / c-kit、EphB4、Tie - 1、EphB6、Tie - 2、ErbB2、TrkA、ErbB3、TrkB、ErbB4、TrkC、FGF、R1 ~ 4 VEGFR、FGFR1、VEGFR1 / Flt - 1、FGFR2、VEGFR2 / KDR / Flk - 1、FGFR3、VEGFR3 / Flt - 4；プロテオグリカンおよび調節因子 プロテオグリカンアグレカン、ミメカン、アグリ、NG2 / MCS P、ピグリカン、オステオアドヘリン、デコリン、ポドカン、DSPG3、 δ - サルコグリカン、エンドカン、シンデカン - 1 / CD138、エンドグリカン、シンデカン - 2、エンドリペリン / ペルレカン、シンデカン - 3、グリピカン2、シンデカン - 4、グリピカン3、テスチカン1 / SPOCK1、グリピカン5、テスチカン2 / SPOCK2、グリピカン6、テスチカン3 / SPOCK3、ルミカン、ベルシカン、プロテオグリカン調節因子

【0071】

アシルスルファターゼA / ARSA、グルコサミン (N - アセチル) - 6 - スルファターゼ / GNS、エキソストシン様2 / EXTL2、HS6ST2、エキソストシン様3 / EXTL3、イズロネート2 - スルファターゼ / IDS、GalNAc4S - 6ST；S

CF、Flt-3リガンドおよびM-CSF Flt-3、M-CSF R、Flt-3リガンド、SCF、M-CSF、SCF R/c-kit; TGFβスーパーファミリー(炎症性マーカーで記載のものと同じ); VEGF/PDGFファミリーニューロピリン-1、PIGF、ニューロピリン-2、PIGF-2、PDGF、VEGF、PDGFRα、VEGF-B、PDGFRβ、VEGF-C、PDGF-A、VEGF-D、PDGF-AB、VEGF R、PDGF-B、VEGF R1/Flt-1、PDGF-C、VEGF R2/KDR/Flk-1、PDGF-D、VEGF R3/Flt-4; Wnt関連分子 Dickkopfタンパク質およびWnt阻害剤 Dkk-1、Dkk-4、Dkk-2、Soggy-1、Dkk-3、WIF-1 フリズルドおよび関連タンパク質 フリズルド-1、フリズルド-8、フリズルド-2、フリズルド-9、フリズルド-3、sFRP-1、フリズルド-4、sFRP-2、フリズルド-5、sFRP-3、フリズルド-6、sFRP-4、フリズルド-7、MFRP Wntリガンド Wnt-1、Wnt-8a、Wnt-2b、Wnt-8b、Wnt-3a、Wnt-9a、Wnt-4、Wnt-9b、Wnt-5a、Wnt-10a、Wnt-5b、Wnt-10b、Wnt-7a、Wnt-11、Wnt-7b; 他のWnt関連分子 APC、クレメン-2、Axin-1、LRP-1、β-カテニン、LRP-6、Dishevelled-1、ノリン、Dishevelled-3、PKCβ1、グリピカン3、ピゴパス-1、グリピカン5、ピゴパス-2、GSK-3α/β、R-スポンジン1、GSK-3α、R-スポンジン2、GSK-3β、R-スポンジン3、ICAT、RTK様オーファン受容体1/ROR1、クレメン-1、RTK様オーファン受容体2/ROR、および他の成長因子CTGF/CCN2、β-NGF、Cyr61/CCN1、ノリン、DANCE、NOV/CCN3、EG-VEGF/PK1、オステオクリン、ヘパソシン、PD-ECGF、HGF、プログラヌリン、LECT2、トロンプオエチン、LEDGF、またはWISP-1/CCN4である。

【0072】

一部の実施形態では、抗体は、癌のマーカー(腫瘍マーカー)であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、EGFである癌のマーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、TNF-αである癌のマーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、PSAである癌のマーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、VEGFである癌のマーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、TGFβである癌のマーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、FGFbである癌のマーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、TRAILである癌のマーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、TNF-R1(p55)である癌のマーカーであるマーカーに特異的である。

【0073】

さらなる実施形態では、抗体は、αフェトプロテインである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、ERβ/NR3A2である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、Erbb2である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、カリクレイン3/PSAである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、ERα/NR3A1である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、プロゲステロンR/NR3C3である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、A33である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、MIAである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、オーロラAである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、MMP-2である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、Bcl-2である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、MMP-3である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、カドヘリン13である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、MMP-9である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、E-カドヘリンである癌のマーカーに特異的である。

ーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、NEK2である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、炭酸脱水酵素IXである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、ネスチンである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、βカテニンである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、NG2/MCSPである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、カテプシンDである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、オステオポンチンである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、CD44である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、p21/CIP1/CDKN1Aである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、CEACAM-6である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、p27/Kip1である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、コルヌリン(Cornulin)である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、p53である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、DPPA4である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、プロラクチンである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、ECM-1である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、PSP94である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、EGFである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、S100Bである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、EGFRである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、S100Pである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、EMMPRIN/CD147である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、SCFR/c-kitである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、線維芽細胞活性化タンパク質α/FAPである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、セルピンE1/PAI-1である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、FGF酸性である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、血清アミロイドA4である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、FGF塩基性である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、サバイビン(Survivin)である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、ガレクチン-3である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、TEM8である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、グリピカン3である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、TIMP-1である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、HIN-1/セクレトグロブリン(Secretoglobulin)3A1である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、TIMP-2である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、IGF-Iである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、TIMP-3である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、IGFBP-3である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、TIMP-4である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、IL-6である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、TNF-α/TNFSF1Aである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、カリクレイン6/ニューロシンである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、TRAF-4である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、M-CSFである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、uPAである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、マトリプターゼ/ST14である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、uPARである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、メソテリン(Mesothelin)である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、VCAM-1である癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、メチオニンアミノペプチダーゼである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、VEGFである癌のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、メチ

10

20

30

40

50

オニンアミノペプチダーゼ 2 である癌のマーカーに特異的である。

【 0 0 7 4 】

一部の実施形態では、抗体は、炎症マーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I C A M - 1 である炎症マーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、R A N T E S である炎症マーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、M I P - 2 である炎症マーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、M I P - 1 β である炎症マーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、M I P - 1 α である炎症マーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、M M P - 3 である炎症マーカーであるマーカーに特異的である。

10

【 0 0 7 5 】

一部の実施形態では、抗体は、内分泌機能のマーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、1 7 β - エストラジオール (E 2) である内分泌機能のマーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、D H E A である内分泌機能のマーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、A C T H である内分泌機能のマーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、ガストリンである内分泌機能のマーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、成長ホルモンである内分泌機能のマーカーであるマーカーに特異的である。

20

【 0 0 7 6 】

一部の実施形態では、抗体は、自己免疫疾患のマーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、G M - C S F である自己免疫疾患のマーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、C 反応性タンパク質 (C R P) である自己免疫疾患のマーカーであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、G - C S F である自己免疫疾患のマーカーであるマーカーに特異的である。

【 0 0 7 7 】

一部の実施形態では、抗体は、甲状腺機能のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、環状 A M P である甲状腺機能のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、甲状腺機能のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、カルシトニンである甲状腺機能のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、甲状腺機能のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、副甲状腺ホルモンである甲状腺機能のマーカーに特異的である。

30

【 0 0 7 8 】

一部の実施形態では、抗体は、心血管機能のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、脳性ナトリウム利尿ペプチド (B-natriuretic peptide) である心血管機能のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、N T - p r o B N P である心血管機能のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、C 反応性タンパク質 H S である心血管機能のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、 β トロポグロブリンである心血管機能のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、心筋トロポニンである心血管機能のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、心筋トロポニン I である心血管機能のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、心筋トロポニン T である心血管機能のマーカーに特異的である。

40

【 0 0 7 9 】

一部の実施形態では、抗体は、糖尿病のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、C ペプチドである糖尿病のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、レプチンである糖尿病のマーカーに特異的である。

【 0 0 8 0 】

一部の実施形態では、抗体は、感染症のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I F N - γ である感染症のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I F N - α である感染症のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は

50

、T R E M - 1である感染症のマーカーに特異的である。

【 0 0 8 1 】

一部の実施形態では、抗体は、代謝のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、バイオインタクトP T H (1 - 8 4)である代謝のマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、P T Hである代謝のマーカーに特異的である。

【 0 0 8 2 】

一部の実施形態では、抗体は、I L - 1 β であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、T N F - α であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I L - 6であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、T n I (心筋トロポニンI)であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I L - 8であるマーカーに特異的である。

10

【 0 0 8 3 】

一部の実施形態では、抗体は、A b e t a 4 0であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、A b e t a 4 2であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、c A M Pであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、F A Sリガンドであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、F G F塩基性であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、G M - C S Fであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I F N - α であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I F N - γ であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I L - 1 aであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I L - 2であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I L - 4であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I L - 5であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I L - 7であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I L - 1 2であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I L - 1 3であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I L - 1 7であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、M C P - 1であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、M I P - 1 aであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、R A N T E Sであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、V E G Fであるマーカーに特異的である。

20

30

【 0 0 8 4 】

一部の実施形態では、抗体は、A C Eであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、アクチビンAであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、アジポネクチンであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、アジプシンであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、A g R Pであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、A K T Iであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、アルブミンであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、ベータセルリンであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、ボンベシンであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、C D 1 4であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、C D - 2 6であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、C D - 3 8であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、C D - 4 0 Lであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、C D - 4 0 sであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、C D K 5であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、補体C 3であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、補体C 4であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、C ペプチドであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、C R Pであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、E G Fであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、E セレクチンであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、F A Sであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、F A S

40

50

L Gであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、フェツイン A (fetu in A) であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、フィブリノーゲンであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、グレリンであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、グルカゴンであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、成長ホルモンであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、ハプトグロブリンであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、肝細胞成長因子であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、H G F であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I C A M 1 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I F N G であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I G F 1 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I L - 1 R A であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I l - 6 s r であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I L - 8 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I L - 1 0 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I L - 1 8 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I L G F B P 1 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I L G F B P 3 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、インスリン様成長因子 1 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、L E P であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、M - C S F であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、M M P 2 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、M M P 9 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、N G F であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、P A I - 1 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、R A G E であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、R S P 4 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、レジスチンであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、性ホルモン結合グロブリンであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、S O C X 3 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、T G F β であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、トロンボプラスチンであるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、T N F R 1 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、V C A M - 1 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、V W F であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、T S H であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、E P I T O M E であるマーカーに特異的である。

【0085】

一部の実施形態では、抗体は、心筋トロポニン I であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、T R E M - 1 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I L - 6 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、I L - 8 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、ロイコトリエン T 4 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、A k t 1 であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、T G F β であるマーカーに特異的である。一部の実施形態では、抗体は、F a s リガンドであるマーカーに特異的である。

【0086】

一部の実施形態では、蛍光部分は蛍光分子を含む。一部の実施形態では、蛍光部分は、複数の蛍光分子、例えば約 2 ~ 10、2 ~ 8、2 ~ 6、2 ~ 4、3 ~ 10、3 ~ 8 または 3 ~ 6 個の蛍光分子を含む。一部の実施形態では、標識は、約 2 ~ 4 個の蛍光分子を含む。一部の実施形態では、蛍光分子は少なくとも 1 つの置換インドリウム環系を含む分子を含み、該インドリウム環の 3 位炭素上の置換基は化学反応性基または共役物質基を含む。一部の実施形態では、蛍光分子は、A l e x a F l u o r 4 8 8、A l e x a F l u o r 5 3 2、A l e x a F l u o r 6 4 7、A l e x a F l u o r 6 8 0、または A l e x a F l u o r 7 0 0 からなる群から選択される。一部の実施形態では、蛍光分子は、A l e

x a F l u o r 4 8 8、A l e x a F l u o r 5 3 2、A l e x a F l u o r 6 8 0、または A l e x a F l u o r 7 0 0 からなる群から選択される。一部の実施形態では、蛍光分子は A l e x a F l u o r 6 4 7 分子である。

【0087】

A．結合相手

検出するマーカーなどの分子の形態に対する必要な特異性を有する任意の好適な結合相手を用いることができる。マーカーなどの分子がいくつかの異なる形態を有する場合は、結合相手の様々な特異性が可能である。好適な結合相手は当技術分野で既知であり、抗体、アプタマー、レクチン、および受容体を含む。結合相手の有用で多用途の種類は、抗体である。

10

【0088】

1．抗体

したがって、一部の実施形態では、結合相手は検出される分子に特異的な抗体である。本明細書で用いる用語「抗体」は幅広い用語であり、限定するものではないが、天然の抗体、ならびに例えば単鎖抗体、キメラ抗体、二官能基抗体、およびヒト化抗体を含む非天然の抗体、ならびにそれらの抗原結合性フラグメントを指すのに、その通常の意味で用いられる。エピトープの選択または分子に対して抗体が作製される該分子の領域の選択が、例えば存在する場合は分子の様々な形態に対するあるいは全体（例えば、分子のすべてまたは実質的にすべて）に対する特異性を決定することは理解されよう。

20

【0089】

抗体作製法は十分確立されている。当業者は、例えば Antibodies, A Laboratory Manual、Harlow and David Lane 編、Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、Cold Spring Harbor, N.Y. に記載のように、抗体作製に多くの手法を利用できることを認識するであろう。抗体を模倣する結合断片または Fab フラグメントを、様々な手法によって遺伝情報から調製することもできることも (Antibody Engineering: A Practical Approach (Borrebäck, C. 編)、1995、Oxford University Press、Oxford; J. Immunol. 149、3914~3920 (1992))、当業者は理解しよう。分子、例えばタンパク質およびマーカーに対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体も市販されている (R and D Systems、Minneapolis、Minnesota; HyTest、HyTest Ltd.、Turku Finland; Abcam Inc.、Cambridge、MA、USA、Life Diagnostics, Inc.、West Chester、PA、USA; Fitzgerald Industries International, Inc.、Concord、MA 01742-3049 USA; BiosPacifc、Emeryville、CA)。

30

【0090】

一部の実施形態では、抗体はポリクローナル抗体である。他の実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。

40

【0091】

捕捉結合相手および検出結合相手の対、例えば、捕捉および検出抗体の対を本発明の実施形態で用いることができる。したがって、一部の実施形態では、一般的に2つの結合相手、例えば2つの抗体が用いられる不均一 (heterogeneous) アッセイプロトコルを用いる。一方の結合相手は、通常固体支持体上に固定化される捕捉相手であり、他方の結合相手は、典型的には検出可能な標識が結合する検出結合相手である。そのような抗体の対は、BiosPacifc、Emeryville、CA などの上記の供給元から入手可能である。抗体の対は、当技術分野で周知の方法によって設計および調製することもできる。本発明の組成物は抗体の対を含み、抗体の対の一方のメンバーは本明細書で記載の標識であり、他方のメンバーは捕捉抗体である。

50

【 0 0 9 2 】

一部の実施形態では、様々な種と交差反応する抗体を捕捉抗体、検出抗体、またはその両方として用いることが有益である。そのような実施形態は、例えば心臓損傷のマーカーとしての血液中への心筋トロポニンの放出を決定することによる、薬物毒性の測定を含む。交差反応抗体により、ある種、例えばヒト以外の種での毒性の研究が行うこと可能となり、アッセイの試薬中に同じ抗体または抗体の対を使用した他の種、例えばヒトの研究または臨床観察へとその結果を直接移動することが可能となり、したがってアッセイ間の変動が減少する。したがって、一部の実施形態では、マーカー、例えば心筋トロポニン、例えば心筋トロポニン I に対する結合相手として用いられる 1 つ以上の抗体は、交差反応性抗体であってもよい。一部の実施形態では、抗体は、ヒト、サル、イヌ、およびマウスからなる群から選択される少なくとも 2 種からのマーカー、例えば心筋トロポニンと交差反応する。一部の実施形態では、抗体は、ヒト、サル、イヌ、およびマウスからなる群のすべてからのマーカー、例えば心筋トロポニンと交差反応する。

10

【 0 0 9 3 】

B . 蛍光部分

本発明で用いる標識の一部の実施形態では、結合相手、例えば抗体は蛍光部分に結合される。該蛍光部分の蛍光は、本明細書で記載の単一分子検出器などの単一分子検出器での検出を可能にするのに十分である。

【 0 0 9 4 】

本明細書で用いる用語「蛍光部分」は、その全体の蛍光が、その部分が本明細書で記載される単一分子検出器で検出することができるようなものである 1 つ以上の蛍光実体を含む。したがって、蛍光部分は、単一の実体（例えば、量子ドットまたは蛍光分子）または複数の実体（例えば、複数の蛍光分子）を含むことができる。本明細書で用いる用語「部分」が蛍光実体の群、例えば複数の蛍光色素分子を指す場合、検出する十分な蛍光を群としての該実体が提供する限り、個々の実体は別々に結合相手に結合するか、あるいは実体と一緒に結合することができることは理解されよう。

20

【 0 0 9 5 】

一般的に、蛍光部分の蛍光は、蛍光部分がバックグラウンドレベルを超えて単一分子検出器で検出可能であるのに十分な量子効率および光退色の欠如の組合せを含み、アッセイの所望の検出限界、正確度および精度に必要な一致性を有する。例えば、一部の実施形態では、蛍光部分の蛍光は、本明細書で記載される機器において、約 10、5、4、3、2、1、0.1、0.01、0.001、0.0001 または 0.000001 pg/ml 未満の検出限界、および約 20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1% 以下未満、例えば約 10% 以下の変動係数で、分子、例えばマーカーの検出および / または定量を可能にするものである。一部の実施形態では、蛍光部分の蛍光は、本明細書で記載される機器において、約 5、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001 pg/ml 未満の検出限界、および約 10% 未満の変動係数で、分子、例えばマーカーの検出および / または定量を可能にするものである。

30

【 0 0 9 6 】

本明細書で用いる用語「検出限界」は、対象となる物質の分子を含有しているとして試料を特定することができる最低濃度、例えばゼロでない最初の値を含む。これは、ゼロの変動性および標準曲線の勾配によって定義することができる。例えば、アッセイの検出限界は、標準曲線を描き、標準曲線のゼロ値を決定し、その値に 2 つの標準偏差を加えることで決定することができる。この値と等しいシグナルを発生する対象となる物質の濃度は、「検出下限」濃度である。

40

【 0 0 9 7 】

さらに、蛍光部分は選択されるアッセイにおける使用と一致する特性を有する。一部の実施形態では、アッセイはイムノアッセイであり、蛍光部分が抗体に結合される。蛍光部分は、それが他の抗体もしくはタンパク質と凝集しないような特性、またはそれがアッセイの必要な正確度および精度と一致する凝集を起さないような特性を有しなければならない

50

い。一部の実施形態では、好ましい蛍光部分は、例えば、１）高い吸収係数と、２）高い量子収率と、３）高い光安定性（低い光退色）と、および４）本発明のアナライザーおよびシステムを用いて分析することができるように（例えば、対象となるタンパク質の沈殿および蛍光部分を結合したタンパク質の沈殿を引き起こさないように）、対象となる分子（例えば、タンパク質）を標識することとの適合性との組合せを有する色素分子などの蛍光部分である。

【００９８】

本発明の一部の実施形態で有用な蛍光部分、例えば単一の蛍光色素分子または複数の蛍光色素分子は、ＥＭ放射によって刺激したときのそれらの光子放射特性によって定義することができる。例えば、一部の実施形態では、本発明は、蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに平均で少なくとも約１０、２０、３０、４０、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３５０、４００、５００、６００、７００、８００、９００または１０００個の光子を放出することが可能である蛍光部分、例えば単一の蛍光色素分子または複数の蛍光色素分子を含む蛍光部分を利用し、レーザーは蛍光部分を含む直径約５ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約３マイクロジュール以下である。全エネルギーは、レーザーの出力と色素部分の曝露時間との多くの異なる組合せによって達成することができることは理解されよう。例えば、１ｍＷの出力のレーザーは３ミリ秒、３ｍＷは１ミリ秒、６ｍＷは０．５ミリ秒、１２ｍＷは０．２５ミリ秒などのように用いることができる。

10

20

【００９９】

一部の実施形態では、本発明は、蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに平均で少なくとも約５０個の光子を放出することが可能である蛍光色素部分、例えば単一の蛍光色素分子または複数の蛍光色素分子を利用し、レーザーは蛍光部分を含む直径約５ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約３マイクロジュール以下である。一部の実施形態では、本発明は、蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに平均で少なくとも約１００個の光子を放出することが可能である蛍光色素部分、例えば単一の蛍光色素分子または複数の蛍光色素分子を利用し、レーザーは蛍光部分を含む直径約５ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約３マイクロジュール以下である。一部の実施形態では、本発明は、蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに平均で少なくとも約１５０個の光子を放出することが可能である蛍光色素部分、例えば単一の蛍光色素分子または複数の蛍光色素分子を利用し、レーザーは蛍光部分を含む直径約５ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約３マイクロジュール以下である。一部の実施形態では、本発明は、蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに平均で少なくとも約２００個の光子を放出することが可能である蛍光色素部分、例えば単一の蛍光色素分子または複数の蛍光色素分子を利用し、レーザーは蛍光部分を含む直径約５ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約３マイクロジュール以下である。一部の実施形態では、本発明は、蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに平均で少なくとも約３００個の光子を放出することが可能である蛍光色素部分、例えば単一の蛍光色素分子または複数の蛍光色素分子を利用し、レーザーは蛍光部分を含む直径約５ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約３マイクロジュール以下である。一部の実施形態では、本発明は、蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに平均で少なくとも約５００個の光子を放出することが可能である蛍光色素部分、例えば単一の蛍光色素分子または複数の蛍光色素分子を利用し、レーザーは蛍光部分を含む直径約５ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約３マイクロジュール以下である。

30

40

【０１００】

50

一部の実施形態では、蛍光部分は、平均で少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個の蛍光実体、例えば蛍光分子を含む。一部の実施形態では、蛍光部分は、平均でたった約 2、3、4、5、6、7、8、9、10 または 11 個の蛍光実体、例えば蛍光分子しか含まない。一部の実施形態では、蛍光部分は、平均約 1 ~ 11、または約 2 ~ 10、または約 2 ~ 8、または約 2 ~ 6、または約 2 ~ 5、または約 2 ~ 4、または約 3 ~ 10、または約 3 ~ 8、または約 3 ~ 6、または約 3 ~ 5、または約 4 ~ 10、または約 4 ~ 8、または約 4 ~ 6、または約 2、3、4、5、6 以上の個数の蛍光実体を含む。一部の実施形態では、蛍光部分は、平均約 2 ~ 8 個の蛍光部分を含む。一部の実施形態では、平均約 2 ~ 6 個の蛍光実体。一部の実施形態では、蛍光部分は平均約 2 ~ 4 個の蛍光実体を含む。一部の実施形態では、蛍光部分は平均約 3 ~ 10 個の蛍光実体を含む。一部の実施形態では、蛍光部分は平均約 3 ~ 8 個の蛍光実体を含む。一部の実施形態では、蛍光部分は平均約 3 ~ 6 個の蛍光実体を含む。「平均」とは、試料が複数の結合相手蛍光部分ユニットを含む、本発明の標識の群の代表的試料である所与の試料において、標準の分析法で決定される、蛍光部分を構成する特定の蛍光実体と結合相手とのモル比が、特定される数または数の範囲に対応することを意味する。例えば、標識が、抗体である結合相手および特定の吸光度の複数の蛍光色素分子を含む蛍光部分を含む実施形態では、標識の溶液を適切なレベルに希釈し、タンパク質（抗体）のモル濃度を決定するために 280 nm の吸光度を取得し、蛍光色素分子のモル濃度を決定するために例えば 650 nm（AlexaFluor 647 の場合）の吸光度を取得する、分光光度アッセイを用いることができる。前者に対する後者のモル濃度の比は、各抗体に結合する蛍光部分における蛍光実体（色素分子）の平均数を表す。

【0101】

1. 色素

一部の実施形態では、本発明は、蛍光色素分子を含む蛍光実体を利用する。一部の実施形態では、本発明は、蛍光色素分子の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに平均で少なくとも約 50 個の光子を放出することができる蛍光色素分子を利用し、レーザーは該分子を含む直径約 5 ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約 3 マイクロジュール以下である。一部の実施形態では、本発明は、蛍光色素分子の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに平均で少なくとも約 75 個の光子を放出することができる蛍光色素分子を利用し、レーザーは該分子を含む直径約 5 ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約 3 マイクロジュール以下である。一部の実施形態では、本発明は、蛍光色素分子の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに平均で少なくとも約 100 個の光子を放出することができる蛍光色素分子を利用し、レーザーは該分子を含む直径約 5 ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約 3 マイクロジュール以下である。一部の実施形態では、本発明は、蛍光色素分子の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに平均で少なくとも約 150 個の光子を放出することができる蛍光色素分子を利用し、レーザーは該分子を含む直径約 5 ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約 3 マイクロジュール以下である。一部の実施形態では、本発明は、蛍光色素分子の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに平均で少なくとも約 200 個の光子を放出することができる蛍光色素分子を利用し、レーザーは該分子を含む直径約 5 ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約 3 マイクロジュール以下である。

【0102】

本発明の蛍光部分に用いるための有用な蛍光実体の非包括的なリストを、下の表 2 に示す。一部の実施形態では、蛍光色素は、AlexaFluor 488、532、647、700、750、フルオレセイン、B-フィコエリトリン、アロフィコシアニン、PBXL-3 および Qdot 605 からなる群から選択される。一部の実施形態では、蛍光色素は、AlexaFluor 488、532、700、750、フルオレセイン、B-フ

イコエリトリン、アロフィコシアニン、P B X L - 3、および Q d o t 6 0 5 からなる群から選択される。

【 0 1 0 3 】

【表 4】

色素	表 2 蛍光実体				
	E Ex (nm)	E (M)-1	Em (nm)	MMw	
ビマン	380	5,700	458	282.31	
ダボキシル	373	22,000	551	362.83	
ジメチルアミノクマリン-4-酢酸	375	22,000	470	344.32	
マリーナブルー	365	19,000	460	367.26	
8-アニリノナフタレン-1-スルホン酸	372		480		10
カスケードブルー	376	23,000	420	607.42	
Alexa Fluor 405	402	35,000	421	1028.26	
カスケードブルー	400	29,000	420	607.42	
カスケードイエロー	402	24,000	545	563.54	
パシフィックブルー	410	46,000	455	339.21	
PyMPO	415	26,000	570	582.41	
Alexa 430	433	15,000	539	701.75	
Atto-425	438		486		20
NBD	465	22,000	535	391.34	
Alexa 488	495	73,000	519	643.41	
フルオレセイン	494	79,000	518	376.32	
オレゴングリーン488	496	76,000	524	509.38	
Atto 495	495		522		
Cy2	489	150,000	506	713.78	
DY-480-XL	500	40,000	630	514.60	
DY-485-XL	485	20,000	560	502.59	
DY-490-XL	486	27,000	532	536.58	30
DY-500-XL	505	90,000	555	596.68	
DY-520-XL	520	40,000	664	514.60	
Alexa Fluor 532	531	81,000	554	723.77	
BODIPY 530/550	534	77,000	554	513.31	
6-HEX	535	98,000	556	680.07	
6-JOE	522	75,000	550	602.34	
ローダミン6G	525	108,000	555	555.59	
Atto-520	520		542		40
Cy3B	558	130,000	572	658.00	
Alexa Fluor 610	612	138,000	628		
Alexa Fluor 633	632	159,000	647	約1200	
Alexa Fluor 647	650	250,000	668	約1250	
BODIPY 630/650	625	101,000	640	660.50	
Cy5	649	250,000	670	791.99	
Alexa Fluor 660	663	110,000	690		
Alexa Fluor 680	679	184,000	702		

【表 5】

Alexa Fluor 700	702	192,000	723	
Alexa Fluor 750	749	240,000	782	
B-フィコエリトリン	546、565	2,410,000	575	240,000
R-フィコエリトリン	480、546、565	1,960,000	578	240,000
アロフィコシアニン	650	700,000	660	700,000
PBXL-1	545		666	

【表 6】

色素	E Ex (nm)	E (M)-1	Em (nm)	MMw	10
PBXL-3	614		662		
Atto-tec色素					
名称	Ex (nm)	Em (nm)	QY	□ (ns)	
Atto 425	436	486	0.9	3.5	
Atto 495	495	522	0.45	2.4	
Atto 520	520	542	0.9	3.6	
Atto 560	561	585	0.92	3.4	20
Atto 590	598	634	0.8	3.7	
Atto 610	605	630	0.7	3.3	
Atto 655	665	690	0.3	1.9	
Atto 680	680	702	0.3	1.8	
Dyomics Fluors					
標識	Ex (nm)	モル吸光度* [l・mol ⁻¹ ・cm ⁻¹]	Em (nm)	分子量# [g・mol ⁻¹]	
DY-495/5	495	70,000	520	489.47	30
DY-495/6	495	70,000	520	489.47	
DY-495X/5	495	70,000	520	525.95	
DY-495X/6	495	70,000	520	525.95	
DY-505/5	505	85,000	530	485.49	
DY-505/6	505	85,000	530	485.49	
DY-505X/5	505	85,000	530	523.97	
DY-505X/6	505	85,000	530	523.97	
DY-550	553	122,000	578	667.76	40
DY-555	555	100,000	580	636.18	
DY-610	609	81,000	629	667.75	
DY-615	621	200,000	641	578.73	
DY-630	636	200,000	657	634.84	
DY-631	637	185,000	658	736.88	
DY-633	637	180,000	657	751.92	
DY-635	647	175,000	671	658.86	
DY-636	645	190,000	671	760.91	

【表 7】

DY-650	653	170.000	674	686.92	10
DY-651	653	160.000	678	888.96	
DYQ-660	660	117,000	-	668.86	
DYQ-661	661	116,000	-	770.90	
DY-675	674	110.000	699	706.91	
DY-676	674	145.000	699	807.95	
DY-680	690	125.000	709	634.84	
DY-681	691	125.000	708	736.88	
DY-700	702	96.000	723	668.86	
DY-701	706	115.000	731	770.90	
DY-730	734	185.000	750	660.88	20
DY-731	736	225.000	759	762.92	
DY-750	747	240.000	776	712.96	
DY-751	751	220.000	779	814.99	
DY-776	771	147.000	801	834.98	
DY-780-OH	770	70.000	810	757.34	
DY-780-P	770	70.000	810	957.55	
DY-781	783	98.000	800	762.92	
DY-782	782	102.000	800	660.88	
EVOblue-10	651	101.440	664	389.88	
EVOblue-30	652	102.000	672	447.51	

量子ドット: Qdot 525、565、585、605、655、705、800

【0104】

30

本発明で用いるのに好適な色素には、修飾されたカルボシアニン色素が含まれる。カルボシアニン色素の修飾には、3位に反応基または共役物質を受容するためのカルボシアニン色素のインドリウム環の修飾が含まれる。インドリウム環の修飾は、1位の窒素原子を介して結合した構造的に類似するカルボシアニン色素で標識した共役体よりも、タンパク質、核酸、および他の生体高分子上で一様に、かつ、実質的に強い蛍光性の色素共役体を提供する。実質的に同一の波長において構造的に類似する色素よりも強い蛍光発光を有することおよび生体高分子へ共役すると吸収スペクトルの影響が減少することに加え、修飾されたカルボシアニン色素は、ピーク吸光度の波長で、構造的に類似する色素よりも高い光安定性および高い吸光度（吸光係数）を有する。したがって、修飾されたカルボシアニン色素により、修飾された色素およびそれらの共役体を用いるアッセイの感度の向上がもたらされる。好ましい修飾された色素には、少なくとも1つの置換インドリウム環系を有し、該インドリウム環の3位炭素上の置換基が化学反応性基または共役物質を含む、化合物が含まれる。他の色素化合物には、アザベンズアゾリウム環部分および少なくとも1つのスルホン酸部分が導入された化合物が含まれる。本発明の様々な実施形態で個々の分子を検出するために用いることができる修飾されたカルボシアニン色素は、米国特許第6977305号（これを本明細書中にその全体について参照により取り入れる）に記載されている。したがって、一部の実施形態では、本発明の標識は、置換インドリウム環系を含み、該インドリウム環の3位炭素上の置換基が化学反応性基または共役物質基を含む、蛍光色素を利用する。

40

【0105】

50

一部の実施形態では、標識は、1つ以上のAlexa色素(Molecular Probes、Eugene、OR)を含む蛍光部分を含む。Alexa色素は、米国特許第6977305号、第6974874号、第6130101号、および第6974305号(これらを本明細書中にその全体について参照により取り入れる)に開示されている。本発明の一部の実施形態は、AlexaFluor647、AlexaFluor488、AlexaFluor532、AlexaFluor555、AlexaFluor610、AlexaFluor680、AlexaFluor700、およびAlexaFluor750からなる群から選択される色素を利用する。本発明の一部の実施形態は、AlexaFluor488、AlexaFluor532、AlexaFluor647、AlexaFluor700、およびAlexaFluor750からなる群から選択される色素を利用する。本発明の一部の実施形態は、AlexaFluor488、AlexaFluor532、AlexaFluor555、AlexaFluor610、AlexaFluor680、AlexaFluor700、およびAlexaFluor750からなる群から選択される色素を利用する。本発明の一部の実施形態は、約650~660nmの吸収極大および約660~670nmの放出極大を有するAlexaFluor647分子を利用する。AlexaFluor647色素は、単独でまたは他のAlexaFluor色素と一緒に用いられる。

10

【0106】

さらに、現在利用できる有機蛍光体は、ポリエチレンなどの親水基を加えることによってその疎水性を弱めることにより、改善することができる。あるいは、現在、AlexaFluor647色素などのスルホン化有機蛍光体は、それらを両性イオン性にすることによって酸性を弱めることができる。修飾された蛍光体で標識した抗体などの粒子は、イムノアッセイで表面およびタンパク質と非特異的に結合する可能性は低く、したがって、感度がより高く、かつ、バックグラウンドがより低いアッセイを可能にする。単一粒子を検出するシステムの感度を高める目的で蛍光色素の特性を修飾および改善するための方法は、当技術分野で既知である。好ましくは、修飾により、高量子収率を維持しつつ、ストークシフトが改善される。

20

【0107】

2. 量子ドット

一部の実施形態では、本発明のアナライザーシステムを用いて試料中の分子を検出するために用いる蛍光標識部分は、量子ドットである。半導体ナノクリスタルまたは人工原子としても知られる量子ドット(QD)は、100~1,000個の電子を含む2~10nmの範囲の半導体結晶である。一部のQDは、直径10~20nmであることができる。QDは高い量子収率を有し、これによってそれらは光学用途に特に有益となる。QDは、伝統的な蛍光団の励起状態と考えられるが最高200ナノ秒の非常により長い寿命を有することができる励起子の形成によって蛍光を発する、蛍光団である。この特性は、QDに低い光退色を提供する。QDのエネルギーレベルは、QDの大きさおよび形状ならびにQD電位の深さを変えることによって制御することができる。小さな励起性QDの光学特性の1つは呈色であり、それはドットの大きさで判定される。ドットが大きいほど、蛍光はより赤いかまたはスペクトルの赤端(red end)により近い。ドットが小さいほど、それはより青いかまたは青端(blue end)により近い。エネルギーを決定し、したがって蛍光発光の色を決定するバンドギャップエネルギーは、QDの大きさの2乗に反比例する。より大きなQDは、間隔のより狭いより多くのエネルギー準位を有し、したがって、より少ないエネルギーを含む光子、すなわちスペクトルの赤端により近いものをQDが吸収することが可能となる。ドットの放出周波数はバンドギャップによって決まることから、最高の精度でドットの出力波長を制御することが可能である。一部の実施形態では、単一粒子アナライザーシステムで検出されるタンパク質は、QDで標識する。一部の実施形態では、1つのQDで標識されたタンパク質を検出するために、異なる波長で異なるタンパク質の検出を可能にするフィルターを用いて単一粒子アナライザーを用いる。

30

40

【0108】

50

Q Dは広い励起特性および狭い放出特性を有し、それは、カラーフィルタリングと用いた場合、個々のシグナルを分解するのに、単一試料中の複数の標的の多重分析のための単一の電磁放射線源のみを必要とする。したがって、一部の実施形態では、アナライザーシステムは、1つの連続波レーザーおよび各々が1つのQ Dで標識された粒子を含む。コロイド状に調製されたQ Dは自由に浮遊し、金属配位結合官能基を介して様々な分子に結合することができる。これらの基には、限定するものではないが、チオール、アミン、ニトリル、ホスフィン、ホスフィンオキシド、ホスホン酸、カルボン酸、または他のリガンドが含まれる。表面に好適な分子を結合することによって、量子ドットは、ほとんどあらゆる溶媒に分散または溶解させることができ、あるいは様々な無機および有機のフィルムに導入することができる。量子ドット(Q D)は、マレイミドエステル結合反応を介して直接ストレプトアビジンに、あるいはマレイミド-チオール結合反応を介して抗体に結合することができる。これにより、表面に共有結合で結合した生体分子を有する材料となり、高い特異活性を有する共役体が生成される。一部の実施形態では、単一粒子アナライザーで検出されるタンパク質を1つの量子ドットで標識する。一部の実施形態では、量子ドットは直径10~20nmである。他の実施形態では、量子ドットは直径2~10nmである。有用な量子ドットには、Q D 605、Q D 610、Q D 655およびQ D 705が含まれる。特に好ましい量子ドットは、Q D 605である。

10

【0109】

C. 結合相手蛍光部分組成物

本発明の標識は、本明細書で記載される機器での検出および定量のために要求される蛍光を提供するために、蛍光部分に結合した結合相手(例えば、抗体)を一般に含む。本明細書で記載される単一分子検出器での検出の結合相手および蛍光部分の任意の好適な組合せを、本発明で標識として用いることができる。一部の実施形態では、本発明は生物学的状態のマーカーのための標識を提供し、該標識はそのマーカーに対する抗体および蛍光部分を含む。マーカーは、上述のマーカーのいずれかであることができる。抗体は、上述の任意の抗体であることができる。蛍光部分は、標識が、蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに平均で少なくとも約50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、350、400、500、600、700、800、900、または1000個の光子を放出することが可能であるように結合することができ、レーザーはその標識を含む直径約5ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約3マイクロジュール以下である。一部の実施形態では、蛍光部分は、その蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに平均で少なくとも約50、100、150、または200個の光子を放出することができる蛍光部分でよく、レーザーは蛍光部分を含む直径約5ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約3マイクロジュール以下である。蛍光部分は、置換インドリウム環系を含み、該インドリウム環の3位炭素上の置換基は化学反応性基または共役物質基を含む構造を有する色素分子を1つ以上含む蛍光部分でよい。標識組成物は、AlexaFluor488、532、647、700、または750からなる群から選択される色素分子を1つ以上含む蛍光部分を含むことができる。標識組成物は、AlexaFluor488、532、700、または750からなる群から選択される色素分子を1つ以上含む蛍光部分を含むことができる。標識組成物は、AlexaFluor488である色素分子を1つ以上含む蛍光部分を含むことができる。標識組成物は、AlexaFluor555である色素分子を1つ以上含む蛍光部分を含むことができる。標識組成物は、AlexaFluor610である色素分子を1つ以上含む蛍光部分を含むことができる。標識組成物は、AlexaFluor647である色素分子を1つ以上含む蛍光部分を含むことができる。標識組成物は、AlexaFluor680である色素分子を1つ以上含む蛍光部分を含むことができる。標識組成物は、AlexaFluor700である色素分子を1つ以上含む蛍光部分を含むことができる。標識組成物は、AlexaFluor750である色素分子を1つ以上含む蛍光部分を含むことができる。

20

30

40

50

【0110】

一部の実施形態では、本発明は、AlexaFluor分子、例えばマーカ-に特異的な抗体に結合されたAlexaFluor647分子などの記載群から選択されるAlexaFluor分子を含む、生物学的状態のマーカ-の検出のための組成物を提供する。一部の実施形態では、組成物は、マーカ-に対する抗体に結合した、平均1~11、または約2~10、または約2~8、または約2~6、または約2~5、または約2~4、または約3~10、または約3~8、または約3~6、または約3~5、または約4~10、または約4~8、または約4~6、または約2、3、4、5、6、または約6を超える個数のAlexaFluor647分子を含む。一部の実施形態では、本発明は、マーカ-に特異的な抗体に結合した、平均1~11、または約2~10、または約2~8、または約2~6、または約2~5、または約2~4、または約3~10、または約3~8、または約3~6、または約3~5、または約4~10、または約4~8、または約4~6、または約2、3、4、5、6、または約6を超える個数のAlexaFluor647分子を含む、生物学的状態のマーカ-の検出のための組成物を提供する。一部の実施形態では、本発明は、マーカ-に特異的な抗体に結合した平均約2~10個のAlexaFluor647分子を含む、生物学的状態のマーカ-の検出のための組成物を提供する。一部の実施形態では、本発明は、マーカ-に特異的な抗体に結合した平均約2~8個のAlexaFluor647分子を含む、生物学的状態のマーカ-の検出のための組成物を提供する。一部の実施形態では、本発明は、マーカ-に特異的な抗体に結合した平均約2~6個のAlexaFluor647分子を含む、生物学的状態のマーカ-の検出のための組成物を提供する。一部の実施形態では、本発明は、マーカ-に特異的な抗体に結合した平均約2~4個のAlexaFluor647分子を含む、生物学的状態のマーカ-の検出のための組成物を提供する。一部の実施形態では、本発明は、マーカ-に特異的な抗体に結合した平均約3~8個のAlexaFluor647分子を含む、生物学的状態のマーカ-の検出のための組成物を提供する。一部の実施形態では、本発明は、マーカ-に特異的な抗体に結合した平均約3~6個のAlexaFluor647分子を含む、生物学的状態のマーカ-の検出のための組成物を提供する。一部の実施形態では、本発明は、マーカ-に特異的な抗体に結合した平均約4~8個のAlexaFluor647分子を含む、生物学的状態のマーカ-の検出のための組成物を提供する。

10

20

30

【0111】

結合相手、例えば抗体への蛍光部分または蛍光部分を作る蛍光実体の結合は、任意の好適な手段によることができる。そのような方法は当技術分野で既知であり、例示的な方法は実施例で示す。一部の実施形態では、本発明の方法で用いる標識を形成するための結合相手への蛍光部分の結合の後であって、対象となるタンパク質を標識するために標識を利用する前に、濾過工程を実施することが有用である。例えば、抗体-色素標識は、使用前に、例えば0.2ミクロンフィルターまたは凝集体の除去に好適な任意のフィルターを介して濾過することができる。本発明のアッセイで使用する他の試薬も、例えば0.2ミクロンフィルターまたは好適な任意のフィルターを介して濾過することができる。理論に束縛されるものではないが、そのような濾過により、例えば抗体-色素標識の凝集体(aggregates)の一部が除去されると考えられる。そのような凝集体は対象となるタンパク質ヘユニットとして結合するが、溶離緩衝剤中で放出した際に分解しやすいので、偽陽性が生じることがある。すなわち、いくつかの標識が、対象となる単一タンパク質分子だけに結合した凝集体から検出される。理論に関係なく、濾過は以降のアッセイでの偽陽性を低減し、正確度および精度を改善することが分かった。

40

【0112】

イムノアッセイは、同じ分子(例えばマーカ-)に対する結合相手の対(例えば抗体)を用いるサンドイッチ形式をしばしば使用することは理解されよう。本発明は結合相手の対(例えば抗体)も包含し、ここで、両抗体は同じ分子(例えば同じマーカ-)に特異的であり、対の少なくとも1つのメンバーは本明細書で記載の標識である。したがって、結合相手および蛍光部分を含む任意の標識に関して、本発明は、第1の結合相手(例えば抗

50

体)が標識の一部であり、かつ、第2の結合相手(例えば抗体)が一般的に非標識であって捕捉結合相手の役目を果たす、結合相手の対も包含する。さらに、結合相手の対は、FRETアッセイで多用される。本発明で有用なFRETアッセイは、米国特許出願11/048660(これを本明細書中にその全体について参照により取り入れる)で開示され、本発明は、各々がFRET標識を含む結合相手の対も包含する。

【0113】

IV. 分子の高感度分析

一態様では、本発明は、i)分子が存在する場合には分子を標識で標識し、ii)標識の有無を検出する(ここで、標識の存在の検出は試料中の単一分子の存在を示している)ことによって、試料中の単一分子、例えば生物学的状態のマーカー分子の有無を判定するための方法を提供する。一部の実施形態では、この方法は、約100、80、60、50、40、30、20、15、12、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.01、0.005、または0.001フェムトモル未満の検出限界で分子を検出することができる。一部の実施形態では、この方法は、約100フェムトモル未満の検出限界で分子を検出することができる。一部の実施形態では、この方法は、約10フェムトモル未満の検出限界の分子を検出することができる。一部の実施形態では、この方法は、約1フェムトモル未満の検出限界で分子を検出することができる。一部の実施形態では、この方法は、約0.1フェムトモル未満の検出限界で分子を検出することができる。一部の実施形態では、この方法は、約0.01フェムトモル未満の検出限界で分子を検出することができる。一部の実施形態では、この方法は、約0.001フェムトモル未満の検出限界で分子を検出することができる。検出限界は、米国国立標準技術研究所標準品などの好適な標準を用いることによって決定することができる。

【0114】

この方法は、試料中の分子の単一分子を検出することによって、試料中の分子、例えば生物学的状態のマーカーの濃度を決定する方法も提供する。単一分子の「検出」には、分子を直接または間接的に検出することが含まれる。間接的な検出の場合には、単一分子に対応する標識、例えば単一分子に結合した標識を検出することができる。

【0115】

一部の実施形態では、本発明は、生物学的試料中のタンパク質の単一分子の有無を判定するための方法を提供し、この方法は、前記分子を標識で標識する工程と、単一分子検出器で前記標識の有無を検出する工程とを含み、前記標識は、蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約200個の光子を放出することができる蛍光部分を含み、レーザーは蛍光部分を含む直径約5ミクロン以上のスポットに集束され、レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約3マイクロジュール以下である。一部の実施形態では、単一分子検出器はインタロゲーション空間を1つだけ含むことができる。試料中の単一分子の検出限界は、約10、1、0.1、0.01、または0.001フェムトモル未満であることができる。一部の実施形態では、検出限界は約1フェムトモル未満である。検出は、前記蛍光部分によって放出される電磁放射線を検出することを含むことができる。この方法は、前記蛍光部分を、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20mWの出力を有するレーザーなどのレーザーによって提供される電磁放射線などの電磁放射線に曝露することをさらに含むことができる。一部の実施形態では、レーザーの刺激は、約10~1000マイクロ秒、または約1000、250、100、50、25、または10マイクロ秒の期間、インタロゲーション空間に光を提供する。一部の実施形態では、標識は、抗体など、前記分子との結合に特異的な結合相手をさらに含む。一部の実施形態では、蛍光部分は、インドリウム環の3位炭素上の置換基が化学反応性基または共役物質を含む少なくとも1つの置換インドリウム環系を含む色素分子などの蛍光色素分子を含む。一部の実施形態では、色素分子はAlexaFluor488、AlexaFluor532、AlexaFluor647、AlexaFluor680、またはAlexaFluo

r 7 0 0 からなる群から選択される A l e x F l u o r 分子である。一部の実施形態では、色素分子は A l e x a F l u o r 6 4 7 色素分子である。一部の実施形態では、蛍光部分は複数の A l e x a F l u o r 6 4 7 分子を含む。一部の実施形態では、複数の A l e x a F l u o r 6 4 7 分子は約 2 ~ 4 個の A l e x a F l u o r 6 4 7 分子、または約 3 ~ 6 個の A l e x a F l u o r 6 4 7 分子を含む。一部の実施形態では、蛍光部分は量子ドットである。この方法は、試料中の前記タンパク質の濃度を測定することをさらに含むことができる。

【 0 1 1 6 】

一部の実施形態では、前記標識の有無の検出は、(i) 前記試料の一部をインタロゲーション空間に通過させる工程と、(i i) 前記標識が存在する場合、前記蛍光部分を刺激して光子を放出するのに十分な電磁放射線への曝露を前記インタロゲーション空間に享受させる工程と、(i i i) 工程 (i i) の前記曝露の間に放出された光子を検出する工程とを含む。この方法は、前記インタロゲーション空間におけるバックグラウンドの光子レベルを決定することをさらに含むことができ、ここで、前記バックグラウンドのレベルは、工程 (i i) の場合と同様であるがインタロゲーション空間における標識なしで電磁放射線をインタロゲーション空間に享受させた場合のインタロゲーション空間の平均光子放出を表す。この方法は、工程 (i i i) で検出される光子の量を閾値光子レベルと比較することをさらに含むことができ、ここで、前記閾値光子レベルは前記バックグラウンドの光子レベルの関数であり、工程 (i i i) で検出される光子の量が閾値レベルよりも多い場合は前記標識の存在を示し、工程 (i i i) で検出される光子の量が閾値レベル以下である場合は前記標識が無いことを示す。

10

20

【 0 1 1 7 】

A . 試料

試料はあらゆる好適な試料であってよい。典型的には、試料は、生物学的液体などの生物学的試料である。このような液体には、制限するものではないが、気管支肺胞洗浄液 (B A L)、血液、血清、血漿、尿、鼻腔ぬぐい液 (nasal swab)、脳脊髄液、胸膜液、滑液、腹腔液、羊水、胃液、リンパ液、間質液、組織ホモジネート、細胞抽出液、唾液、痰、便、生理学的分泌物、涙、粘液、汗、乳汁、精液、精漿、膺分泌液、潰瘍および他の表面発疹、水疱、および膿瘍から得られる液、ならびに正常、悪性、および疑わしい組織の生検を含む組織の抽出物、または対象となる標的粒子を含み得る身体のあらゆる他の成分が含まれる。細胞もしくは組織の培養物、または培養液などの他の類似の検体も対象である。

30

【 0 1 1 8 】

一部の実施形態では、試料は血液試料である。一部の実施形態では、試料は血漿の試料である。一部の実施形態では、試料は血清の試料である。一部の実施形態では、試料は尿の試料である。一部の実施形態では、試料は鼻腔ぬぐい液である。

【 0 1 1 9 】

B . 試料の調製

一般に、測定が望まれる対象の分子 (例えば生物学的状態のマーカー) に対応する標識を生成するあらゆる試料調製方法を用いることができ、ここで、該標識は本明細書に記載される機器において検出可能である。当技術分野で既知であるように、1 つ以上の分子に標識を加える試料の調製は、均一または不均一の形式で行うことができる。一部の実施形態では、試料調製を均一の形式で形成する。均一の形式を使用するアナライザーシステムでは、未結合の標識は試料から除去されない。例えば、米国特許出願 1 1 / 0 4 8 6 6 0 を参照されたい。一部の実施形態では、対象の粒子または複数の粒子は、対象の粒子または複数の粒子に結合する標識した抗体または複数の抗体に加えることによって標識される。

40

【 0 1 2 0 】

一部の実施形態では、不均一のアッセイ形式が用いられ、この場合、典型的には未結合の標識を除去するための工程が用いられる。このようなアッセイ形式は当技術分野では周

50

知である。1つの特に有用なアッセイ形式は、サンドイッチイムノアッセイなどのサンドイッチアッセイである。この形式では、生物学的状態のマーカーなどの対象の分子を、捕捉結合相手を用いて固体支持体上などに捕捉する。次いで、不必要な分子および他の物質を場合により洗い流し、続いて検出結合相手および検出可能な標識（例えば蛍光部分）を含む標識を結合させることができる。さらなる洗浄により未結合の標識を除去し、次いで、必ずではないが、通常、未だ検出結合相手に結合している検出可能な標識を放出させる。代替の実施形態では、試料および標識を、間に（in between）（例えば同時に）、洗浄せずに捕捉結合相手に加える。他の変形形態は当業者であれば明らかであろう。

【0121】

一部の実施形態では、生物学的状態のマーカーなどの対象の分子を検出するための方法は、捕捉結合相手としてのモノクローナル抗体などの抗体とのサンドイッチアッセイを用いる。この方法は、結合表面上に固定化されている捕捉抗体に試料中の分子を結合させること、および検出抗体を含む標識を分子に結合させて「サンドイッチ」複合体を形成することを含む。標識は、例えば本発明の単一分子アナライザーを用いて検出される、本明細書に記載するような検出抗体および蛍光部分を含む。捕捉抗体および検出抗体の双方が分子に特異的に結合する。サンドイッチイムノアッセイの多くの例は知られており、いくつかのものはGrubbらの米国特許第4168146号およびTomらの米国特許第4366241号（（両方とも参照によって本明細書に組み入れられる））に記載されている。特異的なマーカーに特異的なさらなる例を実施例に記載する。

【0122】

捕捉結合相手は、マイクロタイタープレートまたは常磁性ビーズなどの固体支持体に結合していてもよい。一部の実施形態では、本発明は、常磁性ビーズに結合している、生物学的状態のマーカーなどの対象の分子の結合相手を提供する。捕捉が望まれる分子に特異的な任意の好適な結合相手を用いることができる。結合相手は、モノクローナル抗体などの抗体であってもよい。抗体の製造および供給源を、本明細書の他の箇所に記載する。捕捉抗体として有用であるとして本明細書で同定される抗体は、検出抗体としても有用であることができ、その逆も同様であることが理解されよう。

【0123】

抗体などの結合相手の固体支持体への結合は、共有結合であってもよいし、非共有結合であってもよい。一部の実施形態では、結合は非共有結合である。当技術分野では周知である非共有結合の一例は、ビオチン - アビジン / ストレプトアビジン相互作用である。したがって、一部の実施形態では、マイクロタイタープレートまたは常磁性ビーズなどの固体支持体が、ビオチン - アビジン / ストレプトアビジン相互作用などの非共有結合の結合によって、抗体などの捕捉結合相手に結合している。一部の実施形態では、結合は共有結合である。したがって、一部の実施形態では、マイクロタイタープレートまたは常磁性ビーズなどの固体支持体が、共有結合によって抗体などの捕捉結合相手に結合している。

【0124】

捕捉抗体の配向（orientation）が対象の分子の捕捉が最適化されるような共有結合が特に有用である。例えば、一部の実施形態では、マイクロタイタープレートまたは常磁性微小粒子などの固体支持体を、抗体などの結合相手の結合が共有結合による配向結合などの配向結合である場合に用いることができる。

【0125】

抗体の固体支持体への配向結合の例示的なプロトコルは以下の通りである：IgGを最終濃度が1mg/mlになるように0.1M酢酸ナトリウム緩衝液、pH5.5に溶解する。等体積の0.1M酢酸ナトリウム（pH5.5）溶液中の氷冷した20mM過ヨウ素酸ナトリウムを加える。IgGを氷上で1/2時間酸化させる。0.15体積の1Mグリセロールを加えることによって過剰の過ヨウ素酸試薬をクエンチする。低分子量の酸化反応副生成物を限外濾過によって除去する。酸化したIgG分画を好適な濃度（典型的にはIgG1ml当たり0.5マイクログラム）に希釈し、室温で少なくとも2時間、ヒドラジドで活性化したマルチウェルプレートと反応させる。マルチウェルプレートをホウ酸塩

10

20

30

40

50

緩衝食塩水または別の好適な緩衝液で洗浄することによって未結合の I g G を除去する。所望する場合、プレートを保存用に乾燥してもよい。マイクロビーズの材料がこのような結合に適している場合は、マイクロビーズに対して同様のプロトコルを採ることができる。

【 0 1 2 6 】

一部の実施形態では、固体支持体はマイクロタイタープレートである。一部の実施形態では、固体支持体は常磁性ビーズである。例示の常磁性ビーズは、S t r e p t a v i d i n C l (D y n a l 、 6 5 0 . 0 1 - 0 3) である。他の好適なビーズは、当業者には明らかである。抗体を常磁性ビーズに結合するための方法は、当技術分野では周知である。一例を実施例 2 に示す。

10

【 0 1 2 7 】

対象の分子を、固体支持体上に固定化した捕捉抗体などの捕捉結合相手と接触させる。血液試料からの血清の調製または試料を捕捉抗体と接触させる前の濃縮手順など、いくつかの試料調製を用いてもよい。イムノアッセイにおいてタンパク質を結合するためのプロトコルは、当技術分野では周知であり、実施例に含まれている。

【 0 1 2 8 】

結合に見込まれる時間は、条件に応じて変化する。いくつかの環境、特に臨床環境においては、結合時間が短い方が望ましいことは明らかであろう。常磁性ビーズなどの使用は、結合に必要とされる時間を短縮することができる。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体などの捕捉結合相手への結合に見込まれる時間は、約 1 2 、 1 0 、 8 、 6 、 4 、 3 、 2 、 もしくは 1 時間より短く、または約 6 0 、 5 0 、 4 0 、 3 0 、 2 5 、 2 0 、 1 5 、 1 0 、 もしくは 5 分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体などの捕捉結合相手への結合に見込まれる時間は約 6 0 分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体などの捕捉結合相手への結合に見込まれる時間は約 4 0 分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体などの捕捉結合相手への結合に見込まれる時間は約 3 0 分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体などの捕捉結合相手への結合に見込まれる時間は約 2 0 分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体などの捕捉結合相手への結合に見込まれる時間は約 1 5 分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体などの捕捉結合相手への結合に見込まれる時間は約 1 0 分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体などの捕捉結合相手への結合に見込まれる時間は約 5 分より短い。

20

30

【 0 1 2 9 】

一部の実施形態では、トロポニン粒子が捕捉抗体などの捕捉結合相手に結合した後、非特異的に結合し得る粒子、および試料中の他の不必要な物質を洗い流し、特異的に結合しているトロポニン粒子だけを実質的に残す。他の実施形態では、試料の添加と標識との添加の間に洗浄を用いず、これにより試料の調製時間がさらにより短縮することが理解されよう。したがって一部の実施形態では、対象の分子の、抗体などの捕捉結合相手への結合、および標識の、対象の分子への結合の両方に見込まれる時間は、約 1 2 、 1 0 、 8 、 6 、 4 、 3 、 2 、 もしくは 1 時間より短く、または約 6 0 、 5 0 、 4 0 、 3 0 、 2 5 、 2 0 、 1 5 、 1 0 、 もしくは 5 分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体などの捕捉結合相手への結合、および標識の、対象の分子への結合の両方に見込まれる時間は約 6 0 分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体などの捕捉結合相手への結合、および標識の、対象の分子への結合の両方に見込まれる時間は約 4 0 分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体などの捕捉結合相手への結合、および標識の、対象の分子への結合の両方に見込まれる時間は約 3 0 分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体などの捕捉結合相手への結合、および標識の、対象の分子への結合の両方に見込まれる時間は約 2 0 分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体などの捕捉結合相手への結合に、および標識の、対象の分子への結合の両方に見込まれる時間は約 1 5 分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体などの捕捉結合相手への結合、および標識の、対象の分子への結合の両方に見込まれる時間は約 1 0 分より短い。一

40

50

部の実施形態では、対象の分子の、抗体などの捕捉結合相手への結合、および標識の、対象の分子への結合の両方に見込まれる時間は約5分より短い。

【0130】

対象の分子を測定するのに用いられる捕捉抗体およびシグナルの抗体を含む、いくつかのイムノアッセイ診断試薬は、動物の血清由来であることができる。内因性のヒト異好性抗体、または他種の免疫グロブリンに結合する能力を有するヒト抗動物抗体は、10%を超える患者の血清または血漿に存在する。これら循環している異好性抗体は、イムノアッセイ測定を妨害し得る。サンドイッチイムノアッセイでは、これらの異好性抗体は、捕捉抗体および検出（診断）抗体を架橋し、それによって偽陽性シグナルを生成することができ、あるいは診断抗体の結合を阻止し、それによって偽陰性シグナルを生成することができる。競合的イムノアッセイでは、異好性抗体は分析用抗体に結合し、トロポニンへのその結合を阻害し得る。これらは、特に分離システムにおいて抗種抗体を用いる場合に、遊離のトロポニンから抗体-トロポニン複合体を分離することを阻止または増大することもできる。したがって、これら異好性抗体の妨害の影響を予測するのは困難である。したがって、任意の異好性抗体の結合を阻止するのに有利である。本発明の一部の実施形態では、イムノアッセイは、1つ以上の異好性抗体遮断薬を用いて試料から異好性抗体を枯渇する工程を含む。イムノアッセイにおいて試験される試料から異好性抗体を除去する方法は既知であり、検体を酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）中で90で15分間加熱し、1200gで10分間遠心する工程を含み、あるいは異好性抗体はポリエチレングリコール（PEG）を用いて沈殿することができ；タンパク質Aもしくはタンパク質Gを用いて、妨害性（interfering）異好性免疫グロブリンを検体から免疫抽出する工程を含み；または非免疫性のマウスIgGを加える工程を含む。本発明の方法の実施形態は、単一分子検出器で分析する前に試料を調製することを企図している。前処理の方法の適切さを決定することができる。異好性抗体によって引き起こされるイムノアッセイの妨害を最小にするための生化学物質は市販されている。例えば、h-CK-MMに対するIgG1モノクローナル抗体であるMAK33と呼ばれる製品は、Boehringer Mannheimから入手することができる。MAK33プラス製品は、IgG1およびIgG1-Fabの組合せを含む。polyMAK33はIgG1と重合したIgG1-Fabを含み、polyMAC2b/2aはIgG2bで重合したIgG2a-Fabを含むpolyMAC2b/2aを含む。異好性抗体を中和するための生化学物質の第2の市販の供給源は、Bioreclamation Inc、East Meadow、NYにより販売されているImmunoglobulin Inhibiting Reagentである。この製品は、多数の種から得られる免疫グロブリン（IgGおよびIgM）の調製物であり、主にBalb/cマウスから得られるマウスIgG2a、IgG2b、およびIgG3である。一部の実施形態では、タンパク質AまたはGに対する妨害性の抗体を結合することによって異好性抗体を試料から枯渇するなどの当技術分野で既知である方法を用いて、異好性抗体を試料から免疫抽出することができる。一部の実施形態では、異好性抗体は、1つ以上の異好性抗体阻害薬を用いて中和する。異好性阻害薬は、抗アイソフォーム異好性抗体阻害薬、抗イディオタイプ異好性抗体阻害薬、および抗-抗イディオタイプ異好性抗体阻害薬からなる群から選択することができる。一部の実施形態では、異好性抗体阻害薬の組合せを用いることができる。

【0131】

試料の添加および洗浄と一緒にあるいはその後、標識を添加する。タンパク質および他の分子に抗体および他の免疫標識を結合するためのプロトコルは当技術分野では周知である。標識結合工程が捕捉結合から離れている場合は、例えば臨床の環境においては、標識の結合に見込まれる時間が重要であり得る。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体-色素など、標識への結合に見込まれる時間は、約12、10、8、6、4、3、2、もしくは1時間より短く、または約60、50、40、30、25、20、15、10、もしくは5分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体-色素など、標識への結合に見込まれる時間は約60分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体-色

10

20

30

40

50

素など、標識への結合に見込まれる時間は約40分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体-色素など、標識への結合に見込まれる時間は約30分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体-色素など、標識への結合に見込まれる時間は約20分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体-色素など、標識への結合に見込まれる時間は約15分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体-色素など、標識への結合に見込まれる時間は約10分より短い。一部の実施形態では、対象の分子の、抗体-色素など、標識への結合に見込まれる時間は約5分より短い。過剰の標識は洗浄によって除去される。

【0132】

次いで、標識を対象のタンパク質から溶出する。好ましい溶出緩衝液は、顕著なバックグラウンドを作らずに標識を放出するのに有効である。溶出緩衝液が静菌性である場合も有用である。本発明で使用する溶出緩衝液には、カオトロブ（例えば、尿素またはグアニジウム化合物）、緩衝液（例えば、ホウ酸緩衝食塩水）、タンパク質担体（例えば、検出機器のキャピラリーチューブの壁をコーティングするためのヒトアルブミン、ウシアルブミン、もしくは魚類のアルブミンなどのアルブミン、またはIgG）、および界面活性剤（例えば、比較的低いバックグラウンドを生成するように選択されたイオン性または非イオン性の界面活性剤（例えば、Tween 20、Triton X-100、またはSDS））が含まれる。

【0133】

単一分子検出器中に採取される溶出緩衝液/標識のアリコートは、これと個体から得たオリジナルの試料とを区別するために「プロセッシング試料」と呼ぶ。

【0134】

別の一実施形態では、固相結合アッセイは、競合結合性のアッセイ形式を使用することができる。そのような一方法は、a) 結合表面上に固定化されている捕捉抗体にi) 試料中の生物学的状態のマーカーなどの対象の分子、およびii) 検出可能な標識を含む分子の標識された類似体（検出試薬）を競合的に結合すること、ならびにb) 単一粒子アナライザーを用いて標識の量を測定することを含む。別のそのような方法は、a) 検出可能な標識を有する抗体（検出試薬）にi) 試料中の生物学的状態のマーカーなどの対象の分子、およびii) 結合表面上に固定化されている分子の類似体（捕捉試薬）を競合的に結合すること、ならびにb) 単一粒子アナライザーを用いて標識の量を測定することを含む。本明細書における「分子の類似体」は、捕捉抗体への結合について分子と競合する種を意味する。競合的イムノアッセイの例は、Deutscherらの米国特許第4235601号、Liottoの米国特許第4442204号、およびBuechlerらの米国特許第5208535号（これらはすべて本明細書に参照によって組み入れられる）に開示されている。

【0135】

C. 対象の分子の検出および濃度の決定

溶出の後、標識を、例えば溶出緩衝液中で単一分子検出器を通過させる。プロセッシング試料は標識を含んでいなくてもよく、単一の標識を含んでいてもよく、または複数の標識を含んでいてもよい。標識の数は、（試料の希釈または分画を用いる場合に）捕捉工程の間に捕捉される生物学的状態のマーカーなどの対象の分子の分子数に対応し、あるいはは比例する。

【0136】

対象の分子とともに用いられる標識を検出することが可能な任意の好適な単一分子検出器を用いることができる。好適な単一分子検出器を本明細書に記載する。典型的には、検出器は、調製された試料を採取するための自動試料採取装置および任意選択により試料を回収するための回収システムを含む、システムの部分である。

【0137】

一部の実施形態では、キャピラリーフローシステムを利用し、かつ、キャピラリーフローセル、プロセッシング試料が通過するキャピラリー中のインタロゲーション空間を照射す

るためのレーザー、インタロゲーション空間から放出される放射線を検出するための検出器、およびプロセシング試料をインタロゲーション空間を介して移動させるための原動力源を含む、単一分子アナライザーで、プロセシング試料を分析する。一部の実施形態では、単一分子アナライザーは、インタロゲーション空間をプロセシング試料が通過するとき、該プロセシング試料から放出される光を集める顕微鏡対物レンズ、例えば高開口数顕微鏡対物レンズをさらに含む。一部の実施形態では、レーザーおよび検出器は、共焦点配置である。一部の実施形態では、レーザーは、連続波レーザーである。一部の実施形態では、検出器は、アバランシェフォトダイオード検出器である。一部の実施形態では、原動力源は、圧力を供給するためのポンプである。一部の実施形態では、本発明は、試料容器とインタロゲーション空間との間に流体連通 (flow communication) を提供する複数の試料を自動的に採取することが可能な試料採取システムを含むアナライザーシステムを提供する。一部の実施形態では、インタロゲーション空間は、約 0.001 と 500 pL との間の、または約 0.01 pL と 100 pL との間の、または約 0.01 pL と 10 pL との間の、または約 0.01 pL と 5 pL との間の、または約 0.01 pL と 0.5 pL との間の、または約 0.02 pL と 300 pL との間の、または約 0.02 pL と 50 pL との間の、または約 0.02 pL と 5 pL との間の、または約 0.02 pL と 0.5 pL との間の、または約 0.02 pL と 2 pL との間の、または約 0.05 pL と 50 pL との間の、または約 0.05 pL と 5 pL との間の、または約 0.05 pL と 0.5 pL との間の、または約 0.05 pL と 0.2 pL との間の、または約 0.1 pL と 25 pL との間の体積を有する。一部の実施形態では、インタロゲーション空間は、約 0.004 pL と 100 pL との間の体積を有する。一部の実施形態では、インタロゲーション空間は、約 0.02 pL と 50 pL との間の体積を有する。一部の実施形態では、インタロゲーション空間は約 0.001 pL と 10 pL との間の体積を有する。一部の実施形態では、インタロゲーション空間は約 0.001 pL と 10 pL との間の体積を有する。一部の実施形態では、インタロゲーション空間は約 0.01 pL と 5 pL との間の体積を有する。一部の実施形態では、インタロゲーション空間は約 0.02 pL と 5 pL との間の体積を有する。一部の実施形態では、インタロゲーション空間は約 0.05 pL と 5 pL との間の体積を有する。一部の実施形態では、インタロゲーション空間は約 0.05 pL と 10 pL との間の体積を有する。一部の実施形態では、インタロゲーション空間は約 0.5 pL と 5 pL との間の体積を有する。一部の実施形態では、インタロゲーション空間は約 0.02 pL と 0.5 pL との間の体積を有する。

【0138】

一部の実施形態では、本発明の方法で用いられる単一分子検出器は、キャピラリーフローシステムを利用し、キャピラリーフローセル、プロセシング試料が通過するキャピラリー中のインタロゲーション空間を照射するための連続波レーザー、インタロゲーション空間をプロセシング試料が通過するとき、インタロゲーション空間から放出される光を収集する高開口数顕微鏡対物レンズ、インタロゲーション空間から放出される放射線を検出するためのアバランシェフォトダイオード検出器、およびインタロゲーション空間を介してプロセシング試料を移動するための圧力を提供するためのポンプを含み、この場合、インタロゲーション空間は約 0.02 pL と 50 pL との間である。一部の実施形態では、本発明の方法で用いられる単一分子検出器は、キャピラリーフローシステムを利用し、キャピラリーフローセル、プロセシング試料が通過するキャピラリー中のインタロゲーション空間を照射するための連続波レーザー、インタロゲーション空間をプロセシング試料が通過するとき、インタロゲーション空間から放出される光を収集する高開口数顕微鏡対物レンズ (この場合、レンズは少なくとも約 0.8 の開口数を有する)、インタロゲーション空間から放出される放射線を検出するためのアバランシェフォトダイオード検出器、およびインタロゲーション空間を介してプロセシング試料を移動するための圧力を提供するためのポンプを含み、この場合、インタロゲーション空間は約 0.004 pL と 100 pL との間である。一部の実施形態では、本発明の方法で用いられる単一分子検出器は、キャピラリーフローシステムを利用し、キャピラリーフローセル、プロセシング試料が通過

するキャピラリー中のインタロゲーション空間を照射するための連続波レーザー、インタロゲーション空間をプロセッシング試料が通過するときにインタロゲーション空間から放出される光を収集する高開口数顕微鏡対物レンズ（この場合、レンズは少なくとも約 0.8 の開口数を有する）、インタロゲーション空間から放出される放射線を検出するためのアバランシェフォトダイオード検出器、およびインタロゲーション空間を介してプロセッシング試料を移動するための圧力を提供するためのポンプを含み、この場合、インタロゲーション空間は約 0.05 pL と約 10 pL との間である。一部の実施形態では、本発明の方法で用いられる単一分子検出器はキャピラリーフローシステムを利用し、キャピラリーフローセル、プロセッシング試料が通過するキャピラリー中のインタロゲーション空間を照射するための連続波レーザー、インタロゲーション空間をプロセッシング試料が通過するときに
10
インタロゲーション空間から放出される光を収集する高開口数顕微鏡対物レンズ（この場合、レンズは少なくとも約 0.8 の開口数を有する）、インタロゲーション空間から放出される放射線を検出するためのアバランシェフォトダイオード検出器、およびインタロゲーション空間を介してプロセッシング試料を移動するための圧力を提供するためのポンプを含み、この場合インタロゲーション空間は約 0.05 pL と約 5 pL との間である。一部の実施形態では、本発明の方法で用いられる単一分子検出器はキャピラリーフローシステムを利用し、キャピラリーフローセル、プロセッシング試料が通過するキャピラリー中の
20
インタロゲーション空間を照射するための連続波レーザー、インタロゲーション空間をプロセッシング試料が通過するときにインタロゲーション空間から放出される光を収集する高開口数顕微鏡対物レンズ（この場合、レンズは少なくとも約 0.8 の開口数を有する）、インタロゲーション空間から放出される放射線を検出するためのアバランシェフォトダイオード検出器、およびインタロゲーション空間を介してプロセッシング試料を移動するための圧力を提供するためのポンプを含み、この場合インタロゲーション空間は約 0.5 pL と約 5 pL との間である。これらの実施形態のいずれかにおいて、アナライザーはインタロゲーション空間を 1 つだけ含むことができる。

【0139】

一部の実施形態では、単一分子検出器は、試料中の対象の分子に対する濃度を決定することが可能であり、この場合、試料の濃度における範囲は、少なくとも約 100 倍、または 1000 倍、または 10000 倍、または 100000 倍、または 300000 倍、または 1000000 倍、または 10000000 倍、または 30000000 倍の範囲を超えていてもよい。
30

【0140】

一部の実施形態では、本発明の方法は、検出器に導入される第 1 の試料と第 2 の試料との間の分析物(analyte)の濃度における約 50%、40%、30%、20%、15%、または 10% 未満の差を検出することが可能である単一分子検出器を利用し、アナライザーに導入される第 1 の試料および前記第 2 の試料の体積は、約 100、90、80、70、60、50、40、30、20、15、10、5、4、3、2、または 1 μ l 未満であり、分析物は約 100、90、80、70、60、50、40、30、20、15、10、5、4、3、2、または 1 フェムトモル未満の濃度で存在する。一部の実施形態では、本発明の方法は、検出器に導入される第 1 の試料と第 2 の試料との間の分析物の濃度における
40
約 50% 未満の差を検出することが可能である単一分子検出器を利用し、アナライザーに導入される第 1 の試料および前記第 2 の試料の体積は約 100 μ l 未満であり、分析物は約 100 フェムトモル未満の濃度で存在する。一部の実施形態では、本発明の方法は検出器に導入される第 1 の試料と第 2 の試料との間の分析物の濃度における約 40% 未満の差を検出することが可能である単一分子検出器を利用し、アナライザーに導入される第 1 の試料および前記第 2 の試料の体積は約 50 μ l 未満であり、分析物は約 50 フェムトモル未満の濃度で存在する。一部の実施形態では、本発明の方法は検出器に導入される第 1 の試料と第 2 の試料との間の分析物の濃度における約 20% 未満の差を検出することが可能である単一分子検出器を利用し、アナライザーに導入される第 1 の試料および前記第 2 の試料の体積は約 20 μ l 未満であり、分析物は約 20 フェムトモル未満の濃度で存在す
50

る。一部の実施形態では、本発明の方法は検出器に導入される第1の試料と第2の試料との間の分析物の濃度における約20%未満の差を検出することが可能である単一分子検出器を利用し、アナライザーに導入される第1の試料および前記第2の試料の体積は約10 μ l 未満であり、分析物は約10フェムトモル未満の濃度で存在する。一部の実施形態では、本発明の方法は検出器に導入される第1の試料と第2の試料との間の分析物の濃度における約20%未満の差を検出することが可能である単一分子検出器を利用し、アナライザーに導入される第1の試料および前記第2の試料の体積は約5 μ l 未満であり、分析物は約5フェムトモル未満の濃度で存在する。

【0141】

単一分子検出器およびシステムを、以下により詳しく記載する。1より大きい (more than one) インタロゲーションウィンドウを有する検出器、電動学的または電気泳動の流れなどを利用する検出器など、本発明の方法で有用な単一分子アナライザーのさらなる実施形態は、米国特許出願 11 / 048660 (その全文が本明細書に参照によって組み入れられる) に見出すことができる。

【0142】

運転の間に機器を洗浄してもよい。キャピラリーのコンディショニングを維持するために、すなわちキャピラリーの表面を試料間で比較的一定に保って変動性を低減するために、試料の塩および界面活性剤の濃度を維持する洗浄緩衝液を一部の実施形態で用いることができる。

【0143】

本発明の機器および方法の非常に高い感度に寄与する特徴は、標識を検出および計数する方法であり、該方法は、一部の実施形態では、検出する単一分子に結合するか、あるいはより典型的には検出すべき単一分子に対応する。簡潔に述べると、キャピラリーの所与のインタロゲーション空間に対し、標識に用いられる蛍光部分に好適な励起波長の光を放出するレーザーからのEM放射線を所定の時間享受させ、その時間の間に放出された光子を検出することにより、キャピラリーを通して流れるプロセッシング試料を効果的に分けて一連の検出事象とする。各々の所定時間は「ビン(bin)」である。所定のビ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、検出事象がそのビンに対して登録される；すなわ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は、検出事象は登録されない。一部の実施形態では、プロセッシング試料の濃度は十分に希薄であるので、パーセント値の大きい検出事象では、該検出事象はウィンドウを通過した標識がたった1個であることを表しているが、このことはオリジナルの試料中の単一の対象の分子に相当し、すなわちいくつかの数の検出事象は単一のビンにおいて標識が2つ以上 (more than one) であることを表す。一部の実施形態では、プロセッシング試料中のより高い濃度の標識、すなわち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重要ではないとはいえない濃度の標識を正確に検出できるようにするために、さらなる精製が適用される。

【0144】

本発明の範囲から逸脱することなしに他のビン時間を用いることができるが、一部の実施形態では、ビン時間は約1マイクロ秒から約5msの範囲で選択される。一部の実施形態では、ビン時間は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、250、300、400、500、600、700、750、800、900、1000、2000、3000、4000、または5000マイクロ秒を超える。一部の実施形態では、ビン時間は約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、250、300、400、500、600、700、750、800、900、1000、2000、3000、4000、または5000マイクロ秒未満である。一部の実施形態では、ビン時間は約1から1000マイクロ秒である。一部の実施形態では、ビン時間は約1から750マイクロ秒である。一部の実施形態では、ビン時間は約1から500マイクロ秒である。一部の実施形態では、ビン時間は約1から250

マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 1 から 100 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 1 から 50 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 1 から 40 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 1 から 30 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 1 から 500 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 1 から 20 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 1 から 10 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 1 から 500 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 1 から 5 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 5 から 500 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 5 から 250 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 5 から 100 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 5 から 50 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 5 から 20 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 5 から 10 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 10 から 500 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 10 から 250 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 10 から 100 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 10 から 50 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 10 から 30 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 10 から 20 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 5 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 5 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 6 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 7 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 8 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 9 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 10 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 11 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 12 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 13 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 14 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 5 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 15 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 16 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 17 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 18 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 19 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 20 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 25 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 30 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 40 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 50 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 100 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 250 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 500 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 750 マイクロ秒である。一部の実施形態では、ピン時間は約 1000 マイクロ秒である。

【0145】

一部の実施形態では、バックグラウンドノイズレベルを、平均のノイズレベルからあるいはノイズの二乗平均平方根から決定する。他の場合には、典型的なノイズ値または統計学的な値を選択する。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。したがって、一部の実施形態では、試料中の粒子 - 標識複合体の濃度の決定は、バックグラウンドノイズレベルを決定することを含む。

【0146】

したがって、キャピラリーフローセルを通して標識が流れるとき、標識はレーザー光線によって照射されて光子のバースト (burst) を生成する。標識によって放出される光子は、試料に存在するバックグラウンドノイズ量の原因となる所定の閾値エネルギーレベルを上回るエネルギーを有する光子のバーストだけを考慮に入れることにより、バックグラウンドの光またはバックグラウンドノイズ放射から識別される。バックグラウンドノイズは、典型的には、例えば試料、分析用の試料を調製するのに用いられる緩衝液または希釈液に存在する非標識の粒子に固有の蛍光によって生成される低周波の発光、ラマン散乱、および電気ノイズを含む。一部の実施形態では、バックグラウンドノイズに割り当てられ

た値を、複数のピンにおいて検出されるバックグラウンドシグナルノイズの平均として計算するが、これは所定の長さの時間の間にインタロゲーション空間において検出された光子シグナルの測定値である。したがって一部の実施形態では、バックグラウンドノイズを、その試料に特異的な数として、各試料について計算する。

【0147】

バックグラウンドノイズの値が与えられれば、閾値のエネルギーレベルを割り当てることができる。上記で論じたように、バックグラウンドノイズから真のシグナル（標識の蛍光に起因する）を識別するために閾値を決定する。ランダムノイズからの偽陽性シグナルの数が最小になる一方で拒絶される真のシグナル数も最小になるように、閾値を選択する上で注意を払わなければならない。閾値を選択するための方法には、ノイズレベルを上回る固定値を決定すること、およびノイズシグナルの分布に基づいて閾値を計算することが含まれる。一実施形態では、閾値をバックグラウンドレベルを上回る固定数の標準偏差に設定する。ノイズのポアソン分布を想定すると、この方法を用いて実験の時間経過にわたる偽陽性シグナルの数を評価することができる。一部の実施形態では、閾値レベルは、バックグラウンドノイズを上回る4シグマの値として計算される。例えば、200個の光子という平均バックグラウンドノイズレベルが与えられれば、アナライザーシステムは、256個の光子であるように、200個の光子の平均バックグラウンドノイズレベルを上回る $4\sqrt{200}$ の閾値レベルを確立する。したがって、一部の実施形態では、試料中の標識の濃度を決定することは、閾値レベル（該閾値レベルを上回ると光子シグナルは標識が存在していることを表す）を確立することを含む。逆に、閾値レベルのエネルギーレベルを上回らないエネルギーレベルを有する光子シグナルは、標識が無いことを示している。

10

20

【0148】

試料の濃度を決定するために多くのピン測定を行い、各ピン測定について標識の有無を確認する。典型的には、1分間に60000以上の測定を行うことができる（例えば、ピンサイズが1msである実施形態では、ピンサイズが小さいほど測定の数是对応して大きくなる、例えば、10マイクロ秒のピンサイズに対して1分間当たり6000000測定）。したがって、決定的な単一回の測定はなく、方法により高い誤差限界がもたらされる。標識を含まないと決定されたピン（「ノー」ピン）は考慮に入れず、標識を含むと決定されたピン（「イエス」ピン）でなされた測定だけがプロセッシング試料中の標識の濃度を決定する上で考慮に入れる。「ノー」ピンまたは標識なしのピンにおいてなされた測定を考慮に入れないことで、シグナルノイズ比および測定の正確さは増大する。したがって、一部の実施形態では、試料中の標識の濃度の決定は、標識の存在を反映するピン測定を検出することを含む。

30

【0149】

シグナルノイズ比またはアナライザーシステムの感度は、粒子・標識複合体が検出されるピン測定中にバックグラウンドノイズを検出する時間を最小にすることによって増大することができる。例えば、インタロゲーション空間を250マイクロ秒内に通過するとき1個の粒子・標識複合体が検出される1ミリ秒間続くピン測定では、1ミリ秒のうちの750マイクロ秒がバックグラウンドノイズ放射を検出するのに費やされる。シグナルノイズ比は、ピン時間を短縮することによって改善することができる。一部の実施形態では、ピン時間は1ミリ秒である。他の実施形態では、ピン時間は750、500、250マイクロ秒、100マイクロ秒、50マイクロ秒、25マイクロ秒、または10マイクロ秒である。他のピン時間は本明細書に記載する通りである。

40

【0150】

測定に影響を及ぼす他の要因は、蛍光部分の明るさまたは薄暗さ、流速、およびレーザーのパワーである。標識の検出を可能にする関連する要因の様々な組合せは、当業者であれば明らかであろう。一部の実施形態では、流速を変更せずにピン時間を調節する。ピン時間が低減すれば、ピン時間の間にインタロゲーション空間に適用される全エネルギーを一定に維持するためにインタロゲーション空間に向けられるレーザー出力を増大しなければならないことは当業者であれば理解されよう。例えば、ピン時間を1000マイクロ秒

50

から250マイクロ秒に低減した場合、第1近似として、レーザー出力を約4倍に増大しなければならない。これらの設定により、先の設定で与えられた1000 μ sの間に計数された光子の数と同数の光子を250 μ sで検出することができ、より低いバックグラウンド、したがってより大きな感度で、試料をより早く分析できるようになる。さらに、試料の処理加工を早めるために、流速を調節してもよい。これらの数字は例示にすぎず、当業者であれば、望ましい結果を達成するために適宜パラメータを調節することができる。

【0151】

一部の実施形態では、インタロゲーション空間は、試料のストリームの横断面(cross-section)全体を包含する。インタロゲーション空間が試料のストリームの横断面全体を包含する場合、設定された長さの時間に計数された標識の数および試料のストリームの横断面を横切る体積だけが、プロセッシング試料中の標識の濃度を計算するのに必要とされる。一部の実施形態では、例えばインタロゲーション空間をレーザー光線によって照射されたスポットのサイズにより画定することによって、インタロゲーション空間が試料のストリームの横断面面積よりも小さいと画定することができる。一部の実施形態では、アナライザーの開口部306(図1A)または358および359(図1B)を調節し、検出器に対する対物レンズによって画像化される照射体積を低減することにより、インタロゲーション空間を画定することができる。インタロゲーション空間が試料のストリームの横断面面積よりも小さいと画定される実施形態では、標識の濃度は、標準濃度が既知の1つ以上の試料を用いて生成された標準曲線から複合体によって放出されたシグナルを補間することによって決定することができる。さらに他の実施形態では、測定された粒子を標識の内部標準と比べることによって標識の濃度を決定することができる。希釈試料を分析する実施形態では、出発試料中の対象の分子の濃度を計算する上で希釈要因を考慮に入れる。

10

20

【0152】

上記で論じたように、インタロゲーション空間が試料のストリームの横断面すべてを包含する場合、設定された時間の長さ(ピン)において試料のストリームの横断面を通過して計数された標識の数およびピンにおいてインタロゲートされる(interrogated)試料の体積だけが、試料の濃度を計算するのに必要とされる。「イエス」ピンに含まれる標識の総数が決定され、プロセッシング試料中の標識の濃度を決定するための分析で用いられるピンの総数によって表される試料の体積に関連付けられる。したがって、一実施形態では、プロセッシング試料中の標識の濃度を決定することは、「イエス」ピンを検出した標識の総数を決定すること、および検出された標識の総数を分析された試料の総体積に関連付けることを含む。分析される試料の総体積は、特定の時間間隔でキャピラリーフローセルを通過してインタロゲーション空間を横切る試料の体積である。あるいは、多数のピンにおいて標識によって放出されたシグナルを、既知濃度の標識を含む標準試料により同数のピンにおいて標識により放出されたシグナルを決定することにより作成した標準曲線から補間することにより、試料中の標識複合体の濃度を決定する。

30

【0153】

一部の実施形態では、ピンにおいて検出される個々の標識の数は、プロセッシング試料中の粒子の相対的な濃度に関連している。約 10^{-16} M未満の濃度などの比較的低い濃度では、標識の数はピンにおいて検出される光子シグナルに比例する。したがって、低濃度の標識では、光子シグナルはデジタルシグナルとして与えられる。約 10^{-16} Mを超える濃度などの比較的高い濃度では、2個以上の標識が約同時にインタロゲーション空間を横切って計数される公算(likelihood)が重大になるにつれ、標識と光子シグナルとの比例関係は失われる。したがって、一部の実施形態では、約 10^{-16} Mを超える濃度の試料中の個々の粒子は、ピン測定の時間の長さを短縮することによって分解される。

40

【0154】

あるいは、他の実施形態では、任意の1つのピンに存在する複数の粒子によって放出される総光子シグナルを検出する。これらの実施形態によって、ダイナミックレンジは少なくとも3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、または8logを超える本発明の単一分子検出器が許容される。

50

【0155】

本明細書で用いる「ダイナミックレンジ」との用語は、異なる濃度の一連の試料の濃度を変更するための希釈または他の処理を必要とせずに機器によって定量化することができる試料濃度の範囲を指し、この場合、該濃度は意図された使用に適切な正確さで決定される。例えば、マイクロタイタープレートが1つ目のウェル中に対象の分析物に対して1フェムトモル濃度の試料を含み、別のウェル中に対象の分析物に対して10000フェムトモル濃度の試料を含み、第3のウェル中に対象の分析物に対して100フェムトモル濃度の試料を含む場合、少なくとも4logのダイナミックレンジおよび1フェムトモルの定量の下限を有する機器により、希釈など、濃度を調節するためのさらなる処理を必要としないで全試料の濃度を正確に定量することができる。正確さは、ダイナミックレンジをまたがる一続きの標準の濃度を用い、かつ、標準曲線を構築するなどの標準の方法で決定することができる。得られる標準曲線に適合する標準品測定を、例えば r^2 が約0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.91、0.92、0.93、0.94、0.95、0.96、0.97、0.98、または0.99を超える正確さの測度として用いることができる。

10

【0156】

ダイナミックレンジの増大は、検出器からのデータを分析する様式を変更することにより、および/または検出器とインタロゲーション空間との間に減衰器を用いることにより達成される。プロセッシング試料が十分に希釈されているために各検出事象すなわちビンにおける閾値レベルを上回る各々の光子のバースト(「事象光子(event photons)」)がたった1個の標識をおそらく表している低い側の端の範囲において、データを分析して単一分子として検出事象を計数する。すなわち、上記に記載したように、各ビンは、標識の存在に対して単に「イエス」または「ノー」として分析される。より濃縮されているプロセッシング試料では、2つ以上の標識が単一のビンを占有する可能性が重大になり、かなりの(significant)数のビンにおける事象光子の数が単一の標識について予想される数を実質的に上回ることが見出され、例えば、かなりの数のビンにおける事象光子の数は単一の標識について予想される事象光子の数の2倍、3倍、または3倍超に相当する。これらの試料に対して、機器はそのデータ分析の方法を、プロセッシング試料のビンに対する事象光子の総数を積分する方法に変更する。この総数は、すべてのビンにおける標識の総数に比例するであろう。多くの標識がほとんどのビンにおいて存在するさらにより濃縮したプロセッシング試料では、バックグラウンドノイズは各ビンから得られる全シグナルの重要でない(insignificant)部分となり、機器は、データ分析方法をビン1つ当たりのすべての光子を計数する方法(バックグラウンドを含む)に変更する。ダイナミックレンジにおけるよりさらなる増大は、検出器に到達する光の強度が別に正確に光子を計数する検出器の能力を超えるような、すなわち検出器を飽和にするような濃度である場合に、フローセルと検出器との間に減衰器を使用することによって達成することができる。

20

30

【0157】

機器は、検出器から入力を受け取り、実施中の試料に適切な分析方法を決定し、このような分析に基づいた値を出力するデータ分析システムを含むことができる。データ分析システムは、減衰器が機器に含まれている場合、減衰器を用いるまたは用いないとの指示をさらに出力することができる。

40

【0158】

このような方法を利用することによって、機器のダイナミックレンジを劇的に増大することができる。したがって、一部の実施形態では、機器は、約1000(3log)、10000(4log)、100000(5log)、350000(5.5log)、1000000(6log)、3500000(6.5log)、10000000(7log)、35000000(7.5log)、または100000000(8log)を超えるダイナミックレンジにわたって試料の濃度を測定することができる。一部の実施形態では、機器は、約100000(5log)を超えるダイナミックレンジにわたって試料の濃度を測定することが可能である。一部の実施形態では、機器は、約10000000

50

(6 log)を超えるダイナミックレンジにわたって試料の濃度を測定することが可能である。一部の実施形態では、機器は、約10000000(7 log)を超えるダイナミックレンジにわたって試料の濃度を測定することが可能である。一部の実施形態では、機器は、約1~10フェムトモルから少なくとも約1000、10000、100000、350000、1000000、3500000、10000000、または35000000フェムトモルまでのダイナミックレンジにわたって試料の濃度を測定することが可能である。一部の実施形態では、機器は、約1~10フェムトモルから少なくとも約10000フェムトモルまでのダイナミックレンジにわたって試料の濃度を測定することが可能である。一部の実施形態では、機器は、約1~10フェムトモルから少なくとも約1000000フェムトモルまでのダイナミックレンジにわたって試料の濃度を測定することが可能である。一部の実施形態では、機器は、約1~10フェムトモルから少なくとも約10000000フェムトモルまでのダイナミックレンジにわたって試料の濃度を測定することが可能である。一部の実施形態では、機器は、約1~10フェムトモルから少なくとも約100000000フェムトモルまでのダイナミックレンジにわたって試料の濃度を測定することが可能である。

10

20

30

40

【0159】

一部の実施形態では、本発明のアナライザーまたはアナライザーシステムは、1ナノモル、または1ピコモル、または1フェムトモル、または1アトモル、または1zeptomol未満の検出限界において生物マーカーなどの分析物を検出することが可能である。一部の実施形態では、アナライザーまたはアナライザーシステムは、生物マーカーが試料中に1ナノモル、または1ピコモル、または1フェムトモル、または1アトモル、または1zeptomol未満の濃度で存在する場合、および各試料のサイズが約100、50、40、30、20、10、5、2、1、0.1、0.01、0.001、または0.0001 μ l未満である場合に、約0.1、1、2、5、10、20、30、40、50、60、または80%未満の分析物または多数の分析物(例えば生物マーカーまたは複数の生物マーカー)の濃度における一試料から別の試料への変化を検出することが可能である。一部の実施形態では、アナライザーまたはアナライザーシステムは、分析物が約1ピコモル未満の濃度で存在する場合、および各試料のサイズが約50 μ l未満である場合に、約20%未満の第1の試料から第2の試料への分析物の濃度の変化を検出することが可能である。一部の実施形態では、アナライザーまたはアナライザーシステムは、分析物が約100フェムトモル未満の濃度で存在する場合、および各試料のサイズが約50 μ l未満である場合に、約20%未満の第1の試料から第2の試料への分析物の濃度の変化を検出することが可能である。一部の実施形態では、アナライザーまたはアナライザーシステムは、分析物が約50フェムトモル未満の濃度で存在する場合、および各試料のサイズが約50 μ l未満である場合に、約20%未満の第1の試料から第2の試料への分析物の濃度の変化を検出することが可能である。一部の実施形態では、アナライザーまたはアナライザーシステムは、分析物が約5フェムトモル未満の濃度で存在する場合、および各試料のサイズが約5 μ l未満である場合に、約20%未満の第1の試料から第2の試料への分析物の濃度の変化を検出することが可能である。一部の実施形態では、アナライザーまたはアナライザーシステムは、分析物が約1フェムトモル未満の濃度で存在する場合、および各試料のサイズが約5 μ l未満である場合に、約20%未満の第1の試料から第2の試料への分析物の濃度の変化を検出することが可能である。

【0160】

V. 分子の高感度分析に好適な機器およびシステム

本発明の方法は、単一分子検出器などの高感度の分析機器を利用する。このような単一分子検出器は、以下に記載する実施形態を含む。

【0161】

50

一部の実施形態では、本発明は、試料中の単一タンパク質分子を検出するためのアナライザーシステムキットを提供し、前記システムは、試料中の単一タンパク質分子を検出するためのアナライザーシステムと、蛍光部分およびタンパク質分子の結合相手を含む少なくとも1つの標識とを含み、該アナライザーは、蛍光部分を刺激するための電磁放射線源；標識を通過させるためのキャピラリーフローセル；キャピラリーフローセル内で標識を移動するための原動力源；電磁放射線源から放出される電磁放射線を受け取るための、キャピラリーフローセル内に画定されるインタロゲーション空間；および刺激された蛍光部分の電磁気特性を測定するための、インタロゲーション空間に作動可能に接続された電磁放射線検出器を含み、該蛍光部分は蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約200個の光子を放出することができ、該レーザーは蛍光部分を含む直径約5ミクロン以上のスポットに集束され、該レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約3マイクロジュール以下である。

10

【0162】

本発明のアナライザーキットの一実施形態を図12に示す。キットは、タンパク質分子の結合相手および蛍光部分を含む、タンパク質分子についての標識を含む。キットは、蛍光部分を刺激するための電磁放射線源301、標識を通過させるためのキャピラリーフローセル313；キャピラリーフローセル内で標識を移動するための原動力源（図示せず）；電磁放射線源から放出される電磁放射線を受け取るための、キャピラリーフローセル内に画定されるインタロゲーション空間314（図2A）；および刺激された蛍光部分の電磁気特性を測定するための、インタロゲーション空間に作動可能に接続された電磁放射線検出器309を含む、単一タンパク質分子を検出するためのアナライザーシステム（300）をさらに含み、該蛍光部分は蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約200個の光子を放出することができ、該レーザーは蛍光部分を含む直径約5ミクロン以上のスポットに集束され、該レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約3マイクロジュール以下である。一部の実施形態では、電磁放射線源301からの光線311は、顕微鏡対物レンズ315によって集束されてキャピラリーフローセル313内に1つのインタロゲーション空間314（図2A）を形成する。顕微鏡対物レンズは、一部の実施形態では、0.7、0.8、0.9、または1.0以上の開口数を有することができる。

20

30

【0163】

アナライザーシステムキットの一部の実施形態では、アナライザーはインタロゲーション空間を1つだけ含む。一部の実施形態では、電磁放射線源は、少なくとも約3、5、10、または20mWの出力を有するレーザーである。一部の実施形態では、蛍光部分は、蛍光分子を含む。一部の実施形態では、蛍光分子は、インドリウム環の3位炭素上の置換基が化学反応性基または共役物質を含む置換インドリウム環系を少なくとも1個含む色素分子などの色素分子である。一部の実施形態では、蛍光部分は、量子ドットである。一部の実施形態では、電磁放射線源は、発光ダイオードまたは連続波レーザーなどの連続波電磁放射線源である。一部の実施形態では、原動力は、圧力である。一部の実施形態では、検出器は、アバランシェフォトダイオード検出器である。一部の実施形態では、アナライザーは、前記インタロゲーション空間へとレーザー光線を屈折させ、前記刺激された色素分子を画像化するための共焦点光学配置を利用し（図12に示してある）、前記共焦点光学配置は、少なくとも約0.8の開口数を有する対物レンズを含む。一部の実施形態では、アナライザーは、複数の試料を自動的に採取して、試料容器と前記インタロゲーション空間との間の流体連通を提供することが可能な試料採取システムをさらに含む。一部の実施形態では、アナライザーシステムは、前記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み、前記回収システムは、前記試料の実質的にすべてを回収することが可能である。一部の実施形態では、キットはシステムの使用説明書をさらに含む。

40

【0164】

A. 装置 / システム

一態様では、本明細書に記載する方法は、試料中の単一分子を検出することが可能なア

50

ナライザーシステムを利用する。一実施形態では、アナライザーシステムは、蛍光標識された粒子の単一分子の検出が可能であり、該アナライザーシステムは、単一粒子がアナライザーシステムの試料採取システムに流体接続されているキャピラリーフローセル内に画定されるインタロゲーション空間内に存在する場合に、電磁放射線源による曝露に反応して励起された蛍光標識によって放出されるエネルギーを検出する。アナライザーシステムのさらなる実施形態では、単一粒子が、原動力によってキャピラリーフローセルのインタロゲーション空間を介して移動する。アナライザーシステムの別の実施形態では、自動試料採取システムが、アナライザーシステム中に試料を導入するためにアナライザーシステムに含まれていてもよい。アナライザーシステムの別の実施形態では、試料調製システムが、試料を調製するためにアナライザーシステムに含まれていてもよい。さらなる一実施形態では、アナライザーシステムは、分析が完了した後に少なくとも一部分の試料を回収するための試料回収システムを含んでいてもよい。

10

【0165】

一態様では、アナライザーシステムは、蛍光標識で標識された単一粒子を励起するための電磁放射線源からなる。一実施形態では、アナライザーシステムの電磁放射線源は、レーザーである。さらなる一実施形態では、電磁放射線源は、連続波レーザーである。

【0166】

典型的な一実施形態では、電磁放射線源は、標識がキャピラリーフローセルのインタロゲーション空間を通過するときに標識に結合している蛍光部分を励起する。一部の実施形態では、蛍光標識部分は1つ以上の蛍光色素分子を含む。一部の実施形態では、蛍光標識部分は量子ドットである。本明細書に記載するあらゆる蛍光部分を標識において用いることができる。

20

【0167】

標識がキャピラリーフローセル内に位置するインタロゲーション空間を通過するときに、標識は電磁放射線に曝露される。インタロゲーション空間は、典型的には、試料採取システムに流体接続されている。一部の実施形態では、アナライザーシステムを通過させて標識を前進させる原動力によって、標識がキャピラリーフローセルのインタロゲーション空間を通過する。インタロゲーション空間は、該インタロゲーション空間が電磁放射線源から放出される電磁放射線を受け取るように位置付けられている。一部の実施形態では、試料採取システムは、人間のオペレーターからの介入なしに複数の試料を採取することが可能な自動化試料採取システムである。

30

【0168】

標識は、インタロゲーション空間を通過し、電磁放射線源によって励起された場合に検出可能な量のエネルギーを放出する。一実施形態では、電磁放射線検出器は、インタロゲーション空間に作動可能に接続されている。電磁放射線検出器は、標識によって（標識の蛍光部分などによって）放出されるエネルギーを検出することが可能である。

【0169】

アナライザーシステムのさらなる一実施形態では、システムは、試料がアナライザーシステムによる分析のために部分的または完全に調製され得る試料調製機構をさらに含む。アナライザーシステムの一部の実施形態では、試料は、システムによって分析された後に廃棄される。他の実施形態では、アナライザーシステムは、試料回収機構により試料の少なくとも一部分、あるいはすべて、または実質的にすべてが分析後に回収され得る、試料回収機構をさらに含む。このような一実施形態では、試料を元の試料に戻すことができる。一部の実施形態では、試料マイクロタイタープレート上のマイクロタイターウェルに試料に戻すことができる。アナライザーシステムは、典型的には、さらに、検出されたシグナルの収集および報告をするためのデータ獲得システムからなる。

40

【0170】

B．単一粒子アナライザー

図1Aに示すように、本明細書にアナライザーシステム300の一実施形態を記載する。アナライザーシステム300は、電磁放射線源301、ミラー302、レンズ303、

50

キャピラリーフローセル 313、顕微鏡対物レンズ 305、開口部 306、検出器レンズ 307、検出器フィルター 308、単一光子検出器 309、および検出器に作動可能に接続されたプロセッサ 310を含む。

【0171】

動作中、電磁放射線源 301は、その出力 311がミラー 302の前部表面 312を反射するように整列されている。レンズ 303は、キャピラリーフローセル 313における単一のインタロゲーション空間（インタロゲーション空間 314の例示的な例は図 2A に示してある）上に光線 311を集束させる。顕微鏡対物レンズ 305は、試料の粒子から光を収集し、開口部 306上に光線の画像を形成する。開口部 306は、収集することができるキャピラリーフローセル 313のインタロゲーション空間において検体(specimen)によって放出される光の分画に影響を及ぼす。検出器レンズ 307は、開口部 306を通過する光を収集し、光が検出器フィルター 308を通過した後に検出器 309の有効領域上に光を集束させる。検出器フィルター 308は、光散乱または周辺光による異常なノイズシグナルを最小にする一方、粒子に結合している励起された蛍光部分によって放出されるシグナルを最大にする。プロセッサ 310は、本明細書に記載する方法に従って、粒子からの光シグナルを処理加工する。

10

【0172】

一実施形態では、顕微鏡対物レンズ 305は、高開口数顕微鏡対物レンズである。本明細書で用いられる「高開口数レンズ」は、0.6以上の開口数を有するレンズを含む。開口数は、対物レンズによって捕捉される高度に回折した画像形成光線の数の尺度である。より大きい開口数により、ますます多くの斜光が対物レンズに入り、それによってより高度に分解された画像を生成するのが可能になる。さらに、より大きい開口数では画像の輝度が増大する。高開口数レンズは様々な業者から市販されており、約 0.6以上の開口数を有するいずれのレンズもアナライザーシステムにおいて用いることができる。一部の実施形態では、レンズは、約 0.6から約 1.3の開口数を有する。一部の実施形態では、レンズは、約 0.6から約 1.0の開口数を有する。一部の実施形態では、レンズは、約 0.7から約 1.2の開口数を有する。一部の実施形態では、レンズは、約 0.7から約 1.0の開口数を有する。一部の実施形態では、レンズは、約 0.7から約 0.9の開口数を有する。一部の実施形態では、レンズは、約 0.8から約 1.3の開口数を有する。一部の実施形態では、レンズは、約 0.8から約 1.2の開口数を有する。一部の実施形態では、レンズは、約 0.8から約 1.0の開口数を有する。一部の実施形態では、レンズは、少なくとも約 0.6の開口数を有する。一部の実施形態では、レンズは、少なくとも約 0.7の開口数を有する。一部の実施形態では、レンズは、少なくとも約 0.8の開口数を有する。一部の実施形態では、レンズは、少なくとも約 0.9の開口数を有する。一部の実施形態では、レンズは、少なくとも約 1.0の開口数を有する。一部の実施形態では、顕微鏡対物レンズ 305の開口部は、約 1.25である。0.8の顕微鏡対物レンズ 305を用いる一実施形態では、Nikon 60X/0.8 NA Achromat lens (Nikon, Inc., USA)を用いることができる。

20

30

【0173】

一部の実施形態では、電磁放射線源 301は、可視スペクトルで発光するレーザーである。すべての実施形態では、レーザー波長が粒子に結合している蛍光標識を励起するのに十分な波長であるように設定するよう、電磁放射線源が設定される。一部の実施形態では、レーザーは、波長 639 nmの連続波レーザーである。他の実施形態では、レーザーは、波長 532 nmの連続波レーザーである。他の実施形態では、レーザーは、波長 422 nmの連続波レーザーである。他の実施形態では、レーザーは、波長 405 nmの連続波レーザーである。本発明の方法および組成物において用いるように蛍光部分を励起するのに好適な波長を有する任意の連続波レーザーを本発明の範囲から逸脱することなしに用いることができる。

40

【0174】

単一粒子アナライザーシステム 300において、各粒子が電磁放射線源の光線 311を

50

通過する際に粒子は励起状態に入る。粒子がその励起状態から緩和するときに、検出可能な光のバーストが放出される。励起 - 発光のサイクルは、各粒子が光線を通過するのに要する長さの時間に各粒子によって多数回繰り返され、アナライザーシステム 300 は、各粒子がインタロゲーション空間 314 を通過する際に各粒子について何万もの光子を検出することが可能になる。蛍光粒子によって放出される光子は、粒子標識複合体がインタロゲーション空間を通過する時間を示している時間遅延をもって検出器 309 (図 1 A) によって記録される。光子の強度は検出器 309 によって記録され、試料採取時間は自由に選択可能な時間チャンネル幅を有する均一かつ任意の時間セグメントであるビンに分けられる。各ビンに含まれるシグナル数を評価する。粒子がいつ存在するかを決定するために、統計学的分析方法を 1 つまたはいくつか組み合わせて使用する。このような方法は、アナライザーシステムのベースラインノイズを決定すること、および検出器からの偽陽性シグナルを取り除くために蛍光標識のシグナル強度をベースラインノイズを上回る統計学的レベルに設定することを含む。

10

【0175】

電磁放射線源 301 は、アナライザーシステム 300 のキャピラリーフローセル 313 に集束され、該キャピラリーフローセル 313 は試料システムに流体接続されている。インタロゲーション空間 314 を図 2 A に示す。図 1 A の連続波電磁放射線源 301 からの光線 311 は、キャピラリーフローセル 313 内の特定の深さに光学的に集束される。光線 311 は、キャピラリーフローセル 313 に対して垂直な角度で、試料が満たされているキャピラリーフローセル 313 に向けられている。光線 311 は、対象の粒子を標識するの用に用いられる特定の蛍光標識を励起するように選択される所定の波長で操作される。インタロゲーション空間 314 のサイズまたは体積は、光線 311 の直径と光線 311 が集束される深さとによって決定される。あるいは、インタロゲーション空間は、既知濃度のキャリブレーション試料をアナライザーシステムを通して実施することによって決定することができる。

20

【0176】

単一分子を試料濃度において検出する場合、単一分子の検出に必要とされる光線サイズおよび焦点の深さを設定し、それによってインタロゲーション空間 314 のサイズを画定する。インタロゲーション空間 314 は、好適な試料濃度で、観察がなされる各時間間隔の間にたった 1 個の粒子がインタロゲーション空間 314 に存在するように設定される。

30

【0177】

光線によって画定される検出インタロゲーション体積は、完全な球面形状ではなく、典型的には「ボータイ (bow-tie)」型であることが理解されよう。しかし、定義の目的では、インタロゲーション空間の「体積」は、本明細書では光線の集束スポットの直径に等しい直径の球によって包囲される体積と定義される。光線 311 の集束スポットは、本発明の範囲から逸脱せずに様々な直径を有することができる。一部の実施形態では、光線の集束スポットの直径は、約 1 から約 5、10、15、もしくは 20 ミクロン、または約 5 から約 10、15、もしくは 20 ミクロン、または約 10 から約 20 ミクロン、または約 10 から約 15 ミクロンである。一部の実施形態では、光線の集束スポットの直径は、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 ミクロンである。一部の実施形態では、光線の集束スポットの直径は、約 5 ミクロンである。一部の実施形態では、光線の集束スポットの直径は、約 10 ミクロンである。一部の実施形態では、光線の集束スポットの直径は、約 12 ミクロンである。一部の実施形態では、光線の集束スポットの直径は、約 13 ミクロンである。一部の実施形態では、光線の集束スポットの直径は、約 14 ミクロンである。一部の実施形態では、光線の集束スポットの直径は、約 15 ミクロンである。一部の実施形態では、光線の集束スポットの直径は、約 16 ミクロンである。一部の実施形態では、光線の集束スポットの直径は、約 17 ミクロンである。一部の実施形態では、光線の集束スポットの直径は、約 18 ミクロンである。一部の実施形態では、光線の集束スポットの直径は、約 19 ミクロンである。一部の実施形態では、光線の集束スポットの直径は、約 20 ミクロンである。

40

50

ンである。

【0178】

単一粒子アナライザーシステムの代替の一実施形態では、2つ以上の電磁放射線源を用いて、異なる波長の蛍光標識で標識された粒子を励起することができる。別の代替の一実施形態では、キャピラリーフローセル内にインタロゲーション空間を1つだけ用いることができる。別の代替の一実施形態では、多数の検出器を用いて、蛍光標識からの異なる放射波長を検出することができる。アナライザーシステムのこれらの代替の各実施形態に組み入れる説明図を図1Bに示す。これらの実施形態は、先行米国特許出願11/048660から参照によって組み入れられる。

【0179】

アナライザーシステム300の一部の実施形態では、アナライザーシステム300のキャピラリーフローセル313を通して粒子を移動させるのに原動力が必要である。一実施形態では、原動力は、圧力の形態であることができる。キャピラリーフローセルを通して粒子を移動させるのに用いられる圧力は、ポンプによって作り出すことができる。一部の実施形態では、SciVex, Inc. HPLCポンプを用いることができる。原動力としてポンプが用いられる一部の実施形態では、試料は、キャピラリーフローセルを1 μ L/分から約20 μ L/分、または約5 μ L/分から約20 μ L/分の速度で通過することができる。一部の実施形態では、試料は、キャピラリーフローセルを約5 μ L/分の速度で通過することができる。一部の実施形態では、試料は、キャピラリーフローセルを約10 μ L/分の速度で通過することができる。一部の実施形態では、試料は、キャピラリーフローセルを約15 μ L/分の速度で通過することができる。一部の実施形態では、試料は、キャピラリーフローセルを約20 μ L/分の速度で通過することができる。一部の実施形態では、アナライザーシステムを通して粒子を移動させるのに動電学的な力を用いることができる。このような方法は以前に開示されており、先行米国特許出願11/048660から参照によって組み入れられる。

【0180】

アナライザーシステム300の一態様では、アナライザーシステムの検出器309は、蛍光標識によって放出される光子を検出する。一実施形態では、光子の検出器は、フォトダイオードである。さらなる一実施形態では、検出器は、アバランシェフォトダイオード検出器である。一部の実施形態では、フォトダイオードは、190nmおよび1100nmの波長検出を有するシリコンフォトダイオードであることができる。ゲルマニウムフォトダイオードを用いる場合、検出される光の波長は400nmから1700nmの間である。他の実施形態では、インジウムガリウムヒ素フォトダイオードを用いる場合、フォトダイオードによって検出される光の波長は800nmと2600nmとの間である。硫化鉛フォトダイオードを検出器として用いる場合、検出される光の波長は1000nmと3500nmとの間である。

【0181】

一部の実施形態では、電磁放射線源301のオプティックス(optics)および検出器309のオプティックスは、従来の光学配置で配置される。このような配列では、電磁放射線源および検出器は異なる焦点面上に整列されている。図1Aおよび1Bに示すアナライザーシステムのレーザーおよび検出器のオプティックスの配置は、従来の光学的な配置である。

【0182】

一部の実施形態では、電磁放射線源のオプティックスおよび検出器のオプティックスは、共焦点光学配置で配置される。このような配置では、電磁放射線源301および検出器309は、同一の焦点面上に整列されている。共焦点配置ではアナライザーはより頑丈になるが、それは電磁放射線源301および検出器オプティックス309はアナライザーシステムを移動した場合に再配列する必要がないからである。この配置によってアナライザーの使用もより簡単になるが、それはこれによりアナライザーシステムの構成成分を再配列する必要がなくなるからである。アナライザー300(図1A)およびアナライザー3

10

20

30

40

50

5 5 (図 1 B) の共焦点配置をそれぞれ図 3 A および 3 B に示す。図 3 A は、電磁放射線源 3 0 1 からの光線 3 1 1 が顕微鏡対物レンズ 3 1 5 によって集束され、キャピラリーフローセル 3 1 3 内に 1 つのインタロゲーション空間 3 1 4 (図 2 A) を形成することを示している。レーザー光を反射するが蛍光光を通過させるダイクロイックミラー 3 1 6 を用いて、レーザー光から蛍光光を分離する。検出器の前面に位置するフィルター 3 1 7 は、検出器における任意の非蛍光性の光を除去する。一部の実施形態では、共焦点配置で構成されたアナライザーシステムは、2 つ以上のインタロゲーション空間を含むことができる。このような方法は以前に開示されており、先行米国特許出願 1 1 / 0 4 8 6 6 0 から参照によって組み入れられる。

【 0 1 8 3 】

レーザーは、ヘリウム - ネオンレーザーなどのチューナブル色素レーザーであることができる。レーザーは、6 3 2 . 8 n m の波長を放出するように設定することができる。あるいは、レーザーの波長は、5 4 3 . 5 n m または 1 5 2 3 n m の波長を放出するように設定することができる。あるいは、電磁レーザーは、アルゴンイオンレーザーであることができる。このような実施形態では、アルゴンイオンレーザーは、可視スペクトルの約 2 5 の異なる波長での連続ガスレーザーとして操作することができ、該波長は 4 0 8 . 9 と 6 8 6 . 1 n m との間に設定されるが、その最適性能は 4 8 8 と 5 1 4 . 5 n m との間に設定される。

【 0 1 8 4 】

1 . 電磁放射線源

アナライザーシステムの一部の実施形態では、化学発光標識を用いることができる。このような実施形態では、粒子を検出するための E M 放射線源を必ずしも利用しなくてもよい。別の一実施形態では、粒子の外因性の標識または内因性の特性は、蛍光標識または光散乱標識など、光相互作用標識または特性である。このような一実施形態では、E M 放射線源を用いて標識および / または粒子を照射する。蛍光標識を励起するための E M 放射線源が好ましい。

【 0 1 8 5 】

一部の実施形態では、アナライザーシステムは、電磁放射線源 3 0 1 からなる。本発明の範囲を逸脱せずに、任意の数の放射線源を任意の 1 つのアナライザーシステム 3 0 0 において用いることができる。多数の電磁放射線源が以前に開示されており、先行米国特許出願 1 1 / 0 4 8 6 6 0 から参照によって組み入れられる。一部の実施形態では、すべての連続波電磁 (E M) 放射線源が、同じ波長の電磁放射線を放出する。他の実施形態では、異なる供給源が異なる波長の E M 放射線を放出する。

【 0 1 8 6 】

一実施形態では、E M 放射線源 3 0 1 、 3 5 1 、 3 5 2 は、2 0 0 n m と 1 0 0 0 n m との間の波長を生成する連続波レーザーである。このような E M 放射線源は、小型で耐久性があり、かつ比較的安価であるという利点を有する。さらに、一般的に、それらは他の光源よりも大きな蛍光シグナルを生成する能力がある。好適な連続波 E M 放射線源の特定の例には、限定するものではないが、アルゴン、クリプトン、ヘリウム - ネオン、ヘリウム - カドミウム型のレーザー、ならびにチューナブルダイオードレーザー (赤色から赤外領域) が含まれ、各々は周波数を 2 倍にする実行可能性がある。レーザーは、シャッターなどの照射を妨害するための付属の電子装置または機械的装置なしに連続のイルミネーションを提供する。連続波レーザーを用いる一実施形態では、3 m W の電磁放射線源は、蛍光標識を励起するのに十分なエネルギーであることができる。このようなエネルギー出力の連続波レーザーからの光線の直径は、2 から 5 μ m の間であることができる。3 m W に曝露するための粒子のレーザー光線への曝露時間は、約 1 m 秒の間であることができる。代替の実施形態では、レーザー光線への曝露時間は、約 5 0 0 μ 秒以下であることができる。代替の一実施形態では、曝露時間は、約 1 0 0 μ 秒以下であることができる。代替の一実施形態では、曝露時間は、約 5 0 μ 秒以下であることができる。代替の一実施形態では、曝露時間は、約 1 0 μ 秒以下であることができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 7 】

L E D は、費用が低く信頼性の高い別の照射源である。高輝度 L E D ならびに高吸収性断面および高量子収量を有する色素における最近の進歩によって、L E D の単一粒子検出への適用可能性が支持されている。このようなレーザーは、単独で、あるいは水銀灯、基本的なアーク灯、ハロゲンランプ、アーク放電、プラズマ放電、発光ダイオード、またはこれらの組合せなどの他の光源と組み合わせて使用することができる。

【 0 1 8 8 】

他の実施形態では、E M 放射線源は、パルス波レーザーの形態であることができる。このような実施形態では、レーザーのパルスサイズは重要なファクターである。このような実施形態では、サイズ、集光スポット、およびレーザーによって放出される全エネルギーは重要であり、蛍光標識を励起することができるほど十分なエネルギーでなければならない。パルスレーザーを用いる場合は、より長い持続時間のパルスが必要とされ得る。一部の実施形態では、2 ナノ秒のレーザーパルスを用いることができる。一部の実施形態では、5 ナノ秒のレーザーパルスを用いることができる。一部の実施形態では、2 ナノ秒から 5 ナノ秒の間のパルスを用いることができる。

10

【 0 1 8 9 】

最適のレーザー強度は、単一色素の光退色の特徴およびインタロゲーション空間を横切るのに必要とされる時間の長さ（粒子の速度、複数用いられる場合のインタロゲーション空間間の距離、およびインタロゲーション空間のサイズを含む）に依存する。最大のシグナルを得るためには、高パーセント値の色素の光退色をもたらさない最高強度で試料を照射するのが望ましい。好ましい強度は、粒子がインタロゲーション空間を横切った時間までに退色する色素が 5 % 以下となる強度である。

20

【 0 1 9 0 】

レーザーのパワーは、刺激される必要がある色素分子の種類、および色素分子が刺激される時間の長さ、および / または色素分子がキャピラリーフローセルを通過する速度に応じて設定される。レーザーのパワーは、エネルギーが光線によって送達される速度と定義し、ジュール / 秒またはワットの単位で測定する。レーザーの出力が大きいほど、レーザーが粒子を照射する時間が短くてもよい一方、粒子が空間を通過する間にインタロゲーション空間に一定量のエネルギーが提供されることが理解されよう。したがって一部の実施形態では、レーザー出力と照射時間との組合せは、照射時間の間にインタロゲーション空間が受け取る全エネルギーが約 0 . 1、0 . 5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、または 100 マイクロジュールより大きくなるものである。一部の実施形態では、レーザー出力と照射時間との組合せは、照射時間の間にインタロゲーション空間が受け取る全エネルギーが約 0 . 5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、または 110 マイクロジュール未満となるものである。一部の実施形態では、レーザー出力と照射時間との組合せは、照射時間の間にインタロゲーション空間が受け取る全エネルギーが約 0 . 1 と 100 マイクロジュールとの間となるものである。一部の実施形態では、レーザー出力と照射時間との組合せは、照射時間の間にインタロゲーション空間が受け取る全エネルギーが約 1 と 100 マイクロジュールとの間となるものである。一部の実施形態では、レーザー出力と照射時間との組合せは、照射時間の間にインタロゲーション空間が受け取る全エネルギーが約 1 と 50 マイクロジュールとの間となるものである。一部の実施形態では、レーザー出力と照射時間との組合せは、照射時間の間にインタロゲーション空間が受け取る全エネルギーが約 2 と 50 マイクロジュールとの間となるものである。一部の実施形態では、レーザー出力と照射時間との組合せは、照射時間の間にインタロゲーション空間が受け取る全エネルギーが約 3 と 60 マイクロジュールとの間となるものである。一部の実施形態では、レーザー出力と照射時間との組合せは、照射時間の間にインタロゲーション空間が受け取る全エネルギーが約 3 と 50 マイクロジュールとの間となるものである。一部の実施形態では、レーザー出力と照射時間との組合せは、照射時間の間にイン

30

40

50

【 0 1 9 1 】

【 0 1 9 2 】

レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約 1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、150、300、350、400、450、500、600、700、800、900、ま 50

たは1000マイクロ秒以上に設定することができる。レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、150、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1000、1500、または2000マイクロ秒以下に設定することができる。レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約1と1000マイクロ秒の間に設定することができる。レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約5と500マイクロ秒の間に設定することができる。レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約5と100マイクロ秒の間に設定することができる。レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約10と100マイクロ秒の間に設定することができる。レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約10と50マイクロ秒の間に設定することができる。レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約10と20マイクロ秒の間に設定することができる。レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約5と50マイクロ秒の間に設定することができる。レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約1マイクロ秒と100マイクロ秒の間に設定することができる。一部の実施形態では、レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約1マイクロ秒である。一部の実施形態では、レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約5マイクロ秒である。一部の実施形態では、レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約10マイクロ秒である。一部の実施形態では、レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約25マイクロ秒である。一部の実施形態では、レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約50マイクロ秒である。一部の実施形態では、レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約100マイクロ秒である。一部の実施形態では、レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約250マイクロ秒である。一部の実施形態では、レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約500マイクロ秒である。一部の実施形態では、レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、約1000マイクロ秒である。

10

20

30

40

50

【0193】

例えば、レーザーがインタロゲーション空間を照射する時間は、3 mW、4 mW、5 mW、または5 mW超の出力を提供するレーザーで、1ミリ秒、250マイクロ秒、100マイクロ秒、50マイクロ秒、25マイクロ秒、または10マイクロ秒に設定することができる。一部の実施形態では、3 mWの出力を提供するレーザーで標識を照射し、約1000マイクロ秒の間標識を照射する。他の実施形態では、約20 mW以下の出力を提供するレーザーで、1000ミリ秒未満の間標識を照射する。他の実施形態では、20 mWのレーザー出力で、約250マイクロ秒以下の間標識を照射する。一部の実施形態では、約5 mWのレーザー出力で、約1000マイクロ秒以下の間標識を照射する。

【0194】

2. キャピラリーフローセル

キャピラリーフローセルは、試料システムに流体接続される。一実施形態では、アナライザーシステムのインタロゲーション空間314は、対応する光線311の横断面面積および検出器309の視野内の光線のセグメントによって決定される。アナライザーシステムの一実施形態では、インタロゲーション空間314は、約0.01と500 pLとの間、または約0.01 pLと100 pLとの間、または約0.01 pLと10 pLとの間、または約0.01 pLと1 pLとの間、または約0.01 pLと0.5 pLとの間、または約0.02 pLと約300 pLとの間、または約0.02 pLと約50 pLとの間、または約0.02 pLと約5 pLとの間、または約0.02 pLと約0.5 pLとの間、または約0.02 pLと約2 pLとの間、または約0.05 pLと約50 pLとの間、または約0.05 pLと約0.5 pLとの間、または約0.05 pLと約5 pLとの間、または約0.05 pLと約0.2 pLとの間、または約0.1 pLと約25 pLとの間の本明細書で定義された体積を有する。一部の実施形態では、インタロゲーション

空間 3 1 4 は、約 0 . 0 1 p L と 1 p L との間の体積を有する。一部の実施形態では、インタロゲーション空間 3 1 4 は、約 0 . 0 2 p L と約 5 p L との間の体積を有する。一部の実施形態では、インタロゲーション空間 3 1 4 は、約 0 . 0 2 p L と約 0 . 5 p L との間の体積を有する。一部の実施形態では、インタロゲーション空間 3 1 4 は、約 0 . 0 5 p L と約 0 . 2 p L との間の体積を有する。一部の実施形態では、インタロゲーション空間 3 1 4 は、約 0 . 1 p L の体積を有する。他の有用なインタロゲーション空間の体積は、本明細書に記載する通りである。当業者であれば、インタロゲーション空間 3 1 4 はアナライザーの最大性能のために選択することができることを理解すべきである。非常に小さいインタロゲーション空間はバックグラウンドノイズを最小にすることが示されているが、大きなインタロゲーション空間は低濃度の試料を妥当な時間で分析することができるという利点を有する。2つのインタロゲーション空間 3 7 0 および 3 7 1 を用いる実施形態では、単一のインタロゲーション空間 3 1 4 について本明細書に記載するものなどの体積を用いることができる。

10

【 0 1 9 5 】

本発明の一実施形態では、インタロゲーション空間は、約 1 0 0 0 フェムトモル (f M) から約 1 ゼプトモル (z M) までの範囲の濃度の粒子が検出できるほど十分に大きい。本発明の一実施形態では、インタロゲーション空間は、約 1 0 0 0 f M から約 1 アトモル (a M) までの範囲の濃度の粒子の検出ができるほど十分に大きい。本発明の一実施形態では、インタロゲーション空間は、約 1 0 f M から約 1 アトモル (a M) までの範囲の濃度の粒子の検出ができるほど十分に大きい。多くの場合において、大きなインタロゲーション空間は、さらなる前濃縮装置または技術なしに、約 1 f M 未満の濃度の粒子の検出を可能にする。当業者であれば、最も適切なインタロゲーション空間のサイズは、検出すべき粒子の輝度、バックグラウンドシグナルのレベル、および分析すべき試料の濃度に依存することを理解するであろう。

20

【 0 1 9 6 】

インタロゲーション空間 3 1 4 のサイズは、アナライザーのオブティックスを調節することによって制限することができる。一実施形態では、光線 3 1 1 の直径を調節して、インタロゲーション空間 3 1 4 の体積を変化させることができる。別の一実施形態では、検出器 3 0 9 の視野を変化させることができる。したがって、インタロゲーション空間 3 1 4 内で単一粒子が照射および検出されるように放射線源 3 0 1 および検出器 3 0 9 を調節することができる。別の一実施形態では、検出器 3 0 9 の視野を決定する開口部 3 0 6 (図 1 A) の幅は変えることができる。この構成により、ほぼリアルタイムでインタロゲーション空間を変更して多かれ少なかれ濃縮された試料の穴埋めをすることができ、これによりインタロゲーション空間内に同時に 2 つ以上の粒子が存在する確率を確実に低くする。2 つ以上のインタロゲーション空間である 3 7 0 および 3 7 1 に対して同様の変更を行ってもよい。

30

【 0 1 9 7 】

別の一実施形態では、インタロゲーション空間は、実際の試料を試験する前にキャピラリーフローセルを通過する既知濃度のキャリブレーション試料を使用することによって画定することができる。試料がキャピラリーフローセルを通過するときたった 1 個の単一粒子がキャリブレーション試料において 1 回で検出される場合、焦点の深さと電磁放射線源の光線の直径とによりキャピラリーフローセルにおけるインタロゲーション空間のサイズが決定される。

40

【 0 1 9 8 】

インタロゲーション空間に対する物理的制約は、固体の壁によっても提供することができる。一実施形態では、壁は、試料液体がキャピラリー内に含まれる場合には、フローセル 3 1 3 (図 2 A) の 1 つ以上の壁である。一実施形態では、セルはガラスでできているが、約 2 0 0 から約 1 0 0 0 n m 以上の範囲の光に対して透明である他の物質、例えば、石英、融解石英 (fused silica)、およびテフロン (登録商標)、ナイロン、プラスチック (例えば、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、およびポリエチレン) などの有機材料また

50

はこれらの任意の組合せを、本発明の範囲から逸脱することなしに用いてもよい。他の横断面形状（例えば、四角形、円柱状）を、本発明の範囲から逸脱することに用いることができるが、一実施形態では、キャピラリーフローセル 313 は正方形の横断面を有する。別の実施形態では、インタロゲーション空間は、チップ（図示せず）中にエッチングされているチャンネル（図示せず）によって少なくとも部分的に画定してもよい。同様の検討事項が、2つのインタロゲーション空間が用いられる実施形態に適用される（図2Bにおける370および371）。

【0199】

インタロゲーション空間は液体に浸されている。一実施形態では、液体は水性である。他の実施形態では、液体は、非水性であるか、水性および非水性液体の組合せである。さらに、液体が、pH調節剤、イオン性組成物、または可溶性マクロ粒子もしくはポリマーもしくはゲルなどのふるい分け剤（sieving agent）を含んでいてもよい。液体の接続を一時的に中断するために、バルブまたは他の装置がインタロゲーション空間間に存在してもよいことが企図される。一時的に中断されたインタロゲーション空間は、液体によって接続されるとみなす。

10

【0200】

本発明の別の実施形態では、インタロゲーション空間は、シースフロー（sheath flow）とも呼ばれる、希釈液体積内の試料材料の層流（laminar flow）のサイズによって制約されるフローセル 313 内に存在する単一のインタロゲーション空間である。これらおよび他の実施形態では、インタロゲーション空間は、シースフロー単独によりあるいは照射源の寸法または検出器の視野と組み合わせることで画定されることができる。シースフローは多くの方法で形作ることができ、これには以下が含まれる：試料材料が同心性の層流の内側材料であり、外部は希釈液体積である；希釈液体積が試料体積の片側にある；希釈液体積が試料材料の2つの側にある；希釈液体積は試料材料の複数の側にあるが、試料材料を完全に取り囲まない；希釈液体積が試料材料を完全に取り囲む；希釈液体積が試料材料を同心円状に完全に取り囲む；試料材料が非連続的な一連の液滴の内部材料であり、希釈液体積は試料材料の各液滴を完全に取り囲む。

20

【0201】

一部の実施形態では、本発明の単一分子検出器は、インタロゲーション空間を1つだけ含む。一部の実施形態では、多数のインタロゲーション空間が用いられる。多数のインタロゲーション空間は以前に開示されており、米国特許出願 11/048660 から参照によって組み入れられる。当業者であれば、いくつかの場合において、アナライザーは2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、または6つ超の区別されるインタロゲーション空間を含むことを理解されよう。

30

【0202】

3. 原動力

アナライザーシステムの一実施形態では、粒子は、原動力によりインタロゲーション空間を通過して移動する。一部の実施形態では、粒子を移動させるための原動力は、圧力である。一部の実施形態では、圧力は、ポンプ、空気圧源、真空源、遠心機、またはこれらの組合せによって供給される。一部の実施形態では、粒子を移動させるための原動力は、動電学的な力である。原動力としての動電学的力の使用は、先行出願において以前に開示されており、米国特許出願 11/048660 から参照によって組み入れられる。

40

【0203】

一実施形態では、キャピラリーフローセルのインタロゲーション空間を通過して粒子を移動させるための原動力として圧力を用いることができる。さらなる一実施形態では、ポンプにより、圧力が供給して試料を移動させる。好適なポンプは当技術分野で既知である。一実施形態では、Scivax, Inc. によって製造されたものなど、HPLCアプリケーション用に製造されたポンプを原動力として用いることができる。他の実施形態では、より小さい体積の試料にポンプを用いる場合に、微小流体（microfluidics）の適用のために製造されたポンプを用いることができる。これらのポンプは米国特許第 50945

50

94号、第5730187号、第6033628号、および第6533553号に記載されており、これらはナノリットルまたはピコリットル範囲の液体体積にポンプを用いることができる装置を開示している。試料と接触することになるポンプ内の材料すべてが、ポリエーテルエーテルケトン（PEEK）、融解石英、またはサファイアなどの高不活性材料で作られていることが好ましい。

【0204】

キャピラリーフローセルを通して試料を移動させ、分析のために試料をインタロゲーション空間を通して押し進めるため、原動力が必要である。試料が通過した後にキャピラリーフローセルを通してフラッシング試料（flushing sample）を押し進めるため、原動力がやはり必要とされる。試料の回収をする場合、試料回収容器中に試料を押し戻すのに、原動力がやはり必要とされる。標準のポンプは、様々なサイズがあり、予測される試料サイズおよび流れの要件に適合させるために好適なサイズを選択することができる。一部の実施形態では、試料の分析用およびシステムのフラッシング用に別々のポンプが用いられる。分析用ポンプの容量は、約0.000001mLから約10mL、または約0.001mLから約1mL、または約0.01mLから約0.2mL、または約0.005、0.01、0.05、0.1、または0.5mLであってよい。フラッシュポンプは、分析用ポンプより容量が大きくてもよい。フラッシュポンプの体積は、約0.01mLから約20mL、または約0.1mLから約10mL、または約0.1mLから約2mL、または約0.05、0.1、0.5、1、5、または10mLであってよい。これらのポンプのサイズは例示にすぎず、当業者であれば、ポンプのサイズは、用途、試料のサイズ、ポンプの使用を施す液体の粘度、管（tubing）寸法、流速、温度、および当技術分野で周知である他の要因に従って選択することができることを理解するであろう。一部の実施形態では、システムのポンプは、マイクロプロセッサで非常に正確に制御するのが容易であるステッパーモータによって駆動される。

10

20

【0205】

好ましい実施形態では、特殊なチェックバルブで流れの方向を制御しながらフラッシュポンプおよび分析用ポンプを連続して用いる。配管は、分析用ポンプが最大量の試料を吸い上げるときに試料がポンプ自体に到達しないように設計されている。これは、管の体積が分析用ポンプのストローク体積（stroke volume）を超えるように分析用ポンプと分析用キャピラリーとの間の管のIDおよび長さを選択することによって達成される。

30

【0206】

4. 検出器

一実施形態では、電磁放射線に曝露した後に蛍光標識によって放出される光（例えば、紫外、可視、または赤外範囲の光）を検出する。検出器309（図1A）または複数の検出器（364、365、図1B）は、蛍光部分からの光子のバーストの振幅および持続時間を捕捉し、さらに光子のバーストの振幅および持続時間を電気シグナルに変換することが可能である。CCDカメラ、ビデオ入力モジュールカメラ、およびストリークカメラなどの検出装置を用いて、連続シグナルで画像を生成することができる。別の一実施形態では、ボロメーター、フォトダイオード、フォトダイオードアレイ、アバランシェフォトダイオード、および連続のシグナルを生成する光電子増倍管などの装置を用いることができる。前述の検出器の任意の組合せも用いることができる。一実施形態では、光子を検出するためにアバランシェフォトダイオードを用いる。

40

【0207】

インタロゲーション空間314（図2A）とその対応する検出器309（図1A）との間に特定の光学オプティックスを用いて、放射波長、放射強度、バーストサイズ、バースト継続時間、および蛍光偏光を含む放出された電磁放射線のいくつかの別個の特徴を検出することができる。一部の実施形態では、検出器309は、逆バイアスで用いられるフォトダイオードである。逆バイアスにおいて設定されたフォトダイオードは、通常、非常に高い抵抗を有する。適切な周波数の光がP/N接合を照らしたときに、この抵抗は低下する。それゆえ、逆バイアスのダイオードは、通って流れる電流をモニタリングすることに

50

よって検出器として用いることができる。この効果に基づく回路は、ゼロバイアスに基づく回路よりも光に対して感度が高い。

【0208】

アナライザーシステムの一実施形態では、フォトダイオードはアバランシェフォトダイオードであることができ、該アバランシェフォトダイオードは従来のフォトダイオードよりもずっと高い逆バイアスで操作することができ、したがって各々の光生成キャリアをアバランシェブレークダウンによって増大させて、フォトダイオード内に内部利得をもたらすことで、装置の有効な応答性（感度）を増大させる。フォトダイオードの選択は、蛍光標識した粒子によって放出されるエネルギーまたは放射波長によって決定される。一部の実施形態では、フォトダイオードは、190～1100nmの範囲のエネルギーを検出するシリコンフォトダイオードであり、別の一実施形態では、フォトダイオードは、800～1700nmの範囲のエネルギーを検出するゲルマニウムフォトダイオードであり、別の一実施形態では、フォトダイオードは、800～2600nmの範囲のエネルギーを検出するインジウムガリウムヒ素フォトダイオードであり、さらに別の実施形態では、フォトダイオードは、1000nm未満から3500nmの間の範囲のエネルギーを検出する硫化鉛フォトダイオードである。一部の実施形態では、アバランシェフォトダイオードは、400nmから1100nmの波長範囲のエネルギーを検出するように設計された単一光子の検出器である。単一光子検出器は市販されている（例えば、Perkin Elmer、Welllesley、MA）。

10

【0209】

一部の実施形態では、検出器は、300nmと1700nmとの間のエネルギーを検出するアバランシェフォトダイオード検出器である。一実施形態では、シリコンアバランシェフォトダイオードを用いて300nmと1100nmとの間の波長を検出することができる。インジウムガリウムヒ素フォトダイオードを用いて900nmと1700nmとの間の波長を検出することができる。一部の実施形態では、アナライザーシステムは、少なくとも1つの検出器を含むことができ；他の実施形態では、アナライザーシステムは、少なくとも2つの検出器を含むことができ、各検出器は特定の波長範囲の光エネルギーを検出するように選択し構成することができる。例えば、2つの別々の検出器を用いて、EM放射線源で励起した際に異なるスペクトルのエネルギーで光子を放出する異なる標識で標識付けされている粒子を検出することができる。一実施形態では、アナライザーシステムは、緑色色素（例えばAlexa546）によって放出されるものなどの450～700nmの範囲の蛍光エネルギーを検出することができる第1の検出器、および近赤外色素（例えばAlexa647）によって放出されるものなどの620～780nmの範囲の蛍光エネルギーを検出することができる第2の検出器を含むことができる。青色色素（例えばHoechst33342）によって放出されるものなどの400～600nmの範囲の蛍光エネルギーを検出するための検出器、および赤色色素（Alexa546およびCy3）によって放出されるものなどの560～700nmの範囲のエネルギーを検出するための検出器も用いることができる。

20

30

【0210】

2つ以上の検出器を含むシステムを用いて、異なるスペクトルで光を放出する2つ以上の標識で各々を標識付けした個々の粒子を検出することができる。例えば、2つの異なる検出器は、2つの異なる色素標識で標識付けされた抗体を検出することができる。あるいは、2つの検出器を含むアナライザーシステムを用いて異なるタイプの粒子を検出することができ、その各々のタイプを異なる色素分子であるいは2つ以上の色素分子の混合物で標識付けする。例えば、2つの異なる検出器を用いて、2つの異なるタンパク質を認識する2つの異なるタイプの抗体を検出することができ、その各々のタイプを異なる色素標識あるいは2つ以上の色素標識分子の混合物で標識付けする。2つ以上の色素標識分子の比率を変化させることにより、2つ以上の異なる粒子タイプを2つの検出器を用いて個々に検出することができる。3つ以上の検出器を本発明の範囲から逸脱せずに用いることができることが理解される。

40

50

【0211】

当業者であれば、フローセル内に1つ以上のインタロゲーション空間が画定されている各々のインタロゲーション空間に1つ以上の検出器を配置構成することができること、および各検出器が上記に列挙した放出された電磁放射線の特徴のいずれも検出するように配置構成することができることを理解すべきである。例えば多数のインタロゲーション空間に対する多数の検出器の使用は、先行の出願において以前に開示されており、米国特許出願11/048660から本明細書に参照によって組み入れられる。粒子を検出可能にするために該粒子を標識したら（あるいは粒子が該粒子を検出可能にする固有の特徴を有する場合は）、当技術分野で既知である任意の好適な検出の機構（例えば、CCDカメラ、ビデオ入力モジュールカメラ、ストリークカメラ、ボロメーター、フォトダイオード、フォトダイオードアレイ、アバランシェフォトダイオード、および連続のシグナルを生成する光増倍管、ならびにこれらの組合せ）を本発明の範囲から逸脱することなしに用いることができる。放射波長、放射強度、バーストサイズ、バースト持続時間、蛍光偏光、およびこれらの任意の組合せを含む電磁放射線の異なる特徴を検出することができる。

10

【0212】

C. 試料採取システム

さらなる実施形態では、アナライザーシステムは、アナライザーシステムに導入するための試料を調製するための試料採取システムを含むことができる。含まれる試料採取システムは、複数の試料を自動的に採取すること、および試料容器と第1のインタロゲーション空間との間の流体連通を提供することが可能である。

20

【0213】

一部の実施形態では、本発明のアナライザーシステムは、試料のアリコート进行分析のために単一粒子アナライザーに導入するための試料採取システムを含む。試料を導入することができる任意の機構を用いることができる。ポンプ、または液体を管へ押し入れる試料にかけられる圧力、または試料を試料採取管に導入するように働く任意の他の機構によって作り出されるいずれかの真空吸引を用いて、試料を吸い上げることができる。必ずしもではないが、一般的には、試料採取システムは既知の試料体積の試料を単一粒子アナライザーに導入するものであり、一粒子または複数の粒子の有無が検出される一部の実施形態では試料サイズを正確に知ることは重要ではない。好ましい実施形態では、試料採取システムは、単一の試料用または複数の試料用の自動化試料採取を提供する。既知体積の試料をシステムに導入する実施形態では、試料採取システムは、約0.0001、0.001、0.01、0.1、1、2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、500、1000、1500、または2000 μ lを超える分析用試料を提供する。一部の実施形態では、試料採取システムは、約2000、1000、500、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、5、2、1、0.1、0.01、または0.001 μ l未満の分析用の試料を提供する。一部の実施形態では、試料採取システムは、約0.01と1500 μ lとの間、または約0.1と1000 μ lとの間、または約1と500 μ lとの間、または約1と100 μ lとの間、または約1と50 μ lとの間、または約1と20 μ lとの間の分析用の試料を提供する。一部の実施形態では、試料採取システムは、約5 μ lと200 μ lとの間、または約5 μ lと約100 μ lとの間、または約5 μ lと50 μ lとの間の分析用試料を提供する。一部の実施形態では、試料採取システムは、約10 μ lと200 μ lとの間、または約10 μ lと100 μ lとの間、または約10 μ lと50 μ lとの間の分析用試料を提供する。一部の実施形態では、試料採取システムは、約0.5 μ lと約50 μ lとの間の分析用試料を提供する。

30

40

【0214】

一部の実施形態では、試料採取システムは、試料間で違っていてもよい試料サイズを提供する。これらの実施形態では、試料サイズは、本明細書に記載する試料サイズのいずれの1つであってもよく、所望する場合には試料毎または試料のセットで変化してもよい。

【0215】

50

試料採取システムの試料体積の正確さおよび試料間体積の精密度は、当面、分析に必要とされる。一部の実施形態では、採取体積の精密度は用いるポンプによって決定され、典型的には、試料体積の約 50、40、30、20、10、5、4、3、2、1、0.5、0.1、0.05、または 0.01 % 未満の CV によって表される。一部の実施形態では、試料採取システムの試料間の精密度は約 50、40、30、20、10、5、4、3、2、1、0.5、0.1、0.05、または 0.01 % 未満の CV によって表される。一部の実施形態では、試料採取システムのアッセイ内の精密度は、約 10、5、1、0.5、または 0.1 % 未満の CV によって表される。一部の実施形態では、試料採取システムのアッセイ内の精密度は、約 5 % 未満の CV を示す。一部の実施形態では、試料採取システムのアッセイ間の精密度は、約 10、5、または 1 % 未満の CV によって表される。一部の実施形態では、試料採取システムのアッセイ間の精密度は、約 5 % 未満の CV を示す。

10

【0216】

一部の実施形態では、試料採取システムは、試料のキャリーオーバーを低いものとし、試料間においてさらなる洗浄工程が必要とされないという点で有利である。したがって一部の実施形態では、試料のキャリーオーバーは、約 1、0.5、0.1、0.05、0.04、0.03、0.02、0.01、0.005、または 0.001 % 未満である。一部の実施形態では、試料のキャリーオーバーは、約 0.02 % 未満である。一部の実施形態では、試料のキャリーオーバーは、約 0.01 % 未満である。

20

【0217】

一部の実施形態では、試料採取装置は試料ループ (sample loop) を提供する。これらの実施形態では、多数の試料が連続的に管に引き入れられ、各々は緩衝液「プラグ (plug)」によって他のものから分離される。試料は、典型的には、間に (in between) フラッシングなく次々と読まれる。フラッシングは、ループの終わりに 1 回なされる。緩衝液「プラグ」が用いられる実施形態では、プラグは、緩衝液プラグをマイクロタイタープレートの別々のウェル中に排出して回収することができる。

30

【0218】

試料採取システムは、96 ウェルマイクロタイタープレート、好ましくは 384 ウェルプレートなどの標準のアッセイ設備との使用に適合させてもよい。一部の実施形態では、該システムは、96 ウェルプレートポジショナー、および試料管をウェル中におよびウェル外で浸すための機構、例えば X、Y、および Z 軸に沿った動きを与えるための機構を含む。一部の実施形態では、試料採取システムは、試験を開始した際に試料を貯蔵し取り出すことができる多数の試料採取管を提供する。一部の実施形態では、多数の管からのすべての試料を 1 つの検出器で分析する。他の実施形態では、多数の単一分子検出器が試料管に接続されていてもよい。試料採取システムによる試料採取前にプレートのウェル中の試料に対して行う操作を含む工程によって試料を調製することができ、あるいはアナライザーシステム内で試料を調製することができ、あるいは両方のある組合せで調製することができる。

40

【0219】

D. 試料調製システム

試料調製には、分析用の粗製試料の調製を必要とする工程が含まれる。これらの工程は、例示として、遠心分離、濾過、蒸留、クロマトグラフィーなどの分離工程；濃縮、細胞溶解、pH の変更、緩衝液の添加、希釈液の添加、試薬の添加、加熱もしくは冷却、標識の添加、標識の結合、照射による架橋、未結合標識の分離、妨害化合物の不活性化および/または除去、ならびに単一粒子アナライザーによる分析のために試料を調製するのに必要な任意の他の工程の 1 つ以上の工程を伴うことができる。一部の実施形態では、血液を処理して血漿または血清を分離する。さらなる標識化、未結合の標識の除去、および/または希釈工程を、血清または血漿の試料に対して行うこともできる。

50

【0220】

一部の実施形態では、アナライザーシステムは、単一粒子アナライザーによる分析の準

備が整った試料を提供するのに必要なプロセスのいくつかまたはすべてを行う試料調製システムを含む。このシステムは、試料を調製するために上記に列挙した工程の任意のものまたはすべてを行うことができる。一部の実施形態では、アナライザーシステムの試料調製システムにより、試料を部分的に処理加工する。したがって、一部の実施形態では、最初に、アナライザーシステム外で試料を部分的に処理加工してもよい。例えば、最初に試料を遠心分離してもよい。次いで、試料調製システムにより、アナライザー内で試料を部分的に処理加工してもよい。アナライザー内での処理加工には、試料の標識化、試料と緩衝液との混合、および当業者に既知であろう他の処理加工工程が含まれる。一部の実施形態では、血液試料をアナライザーシステム外で処理加工して血清または血漿の試料を提供し、これをアナライザーシステムに導入し、試料調製システムによってさらに処理加工して対象の粒子または複数の粒子を標識化し、任意選択により未結合の標識を除去する。他の実施形態では、試料の調製には、対象ではない粒子を除去するためあるいは試料の分析を妨害することができる粒子を除去するための試料の免疫除去 (immunodepletion) を含むことができる。さらに他の実施形態では、試料から、試料の分析を妨害することができる粒子を枯渇することができる。例えば、試料の調製は、対象の粒子を直接的または間接的に検出するための非ヒト抗体を用いるイムノアッセイを妨害することが知られている異好性抗体の枯渇 (depletion) を含むことができる。同様に、対象の粒子の測定を妨害する他のタンパク質を、妨害タンパク質を認識する抗体を用いて試料から除去することができる。

10

【0221】

20

一部の実施形態では、アッセイおよび分析の前に試料を固相抽出にかけることができる。例えば、cAMPについてアッセイする血清試料を、それが結合するc18カラムを用いて、まず固相抽出にかけることができる。プロテアーゼ、リパーゼ、およびホスファターゼなどの他のタンパク質をカラムから洗い流し、cAMPを溶出して、cAMPを分解することができるあるいはcAMPの測定を妨害することができるタンパク質を本質的になくす。固相抽出を用いて、アッセイの感度を低減することができる試料の塩基性マトリクスを除去することができる。さらに他の実施形態では、試料を乾燥または凍結乾燥し、粒子をオリジナルの試料の体積よりも小さい体積に可溶化することによって、試料に存在する対象の粒子を濃縮することができる。

【0222】

30

一部の実施形態では、アナライザーシステムは、血液試料、唾液試料、尿試料、脳脊髄液試料、リンパ試料、BAL試料、生検試料、法医学的試料、生物テロ試料などの完全な調製物など、システムで分析される試料の完全な調製を提供する試料調製システムを提供する。一部の実施形態では、アナライザーシステムは、試料調製のいくつかまたはすべてを提供する試料調製システムを提供する。一部の実施形態では、最初の試料は、アナライザーシステムによってさらに処理加工される血液試料である。一部の実施形態では、試料は、アナライザーシステムによってさらに処理加工される血清または血漿試料である。血清または血漿試料は、例えば対象の粒子または複数の粒子に結合する標識と接触させることによってさらに処理加工することができ、次いで、未結合の標識を除去してあるいは除去せずに試料を用いることができる。

40

【0223】

一部の実施形態では、試料調製は、分析システム外または分析システムの試料調製構成要素のいずれかにおいて96ウェルプレートなどの1つ以上のマイクロタイタープレート上で行う。当技術分野で周知であるように、試薬や緩衝液などのレザーバは、管または他の好適な構造によりプレートのウェルと断続的な流体連通にすることができる。96ウェルプレートまたは管中に試料を別々に調製することができる。試料の単離、標識の結合、および必要な場合には標識の分離の工程を1つのプレート上で行うことができる。一部の実施形態では、次いで調製粒子をプレートから放出し、試料分析システムに入れて試料採取するために試料を管に移動する。一部の実施形態では、試料調製のすべて工程を1つのプレート上で行い、分析システムはプレートから直接試料を得る。この実施形態は96ウ

50

エルプレートに関して記載してあるが、1つ以上の試料を入れるための試料の調製に好適な任意のベッセルを用いることができることが理解されよう。例えば、384ウェルまたは1536ウェルの標準のマイクロタイタープレートを用いることができる。より一般的には、一部の実施形態では、試料調製システムは、約5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、500、1000、5000、または10000を超える試料を保持し調製することが可能である。一部の実施形態では、多数のアナライザーシステムで分析するために多数の試料を採取することができる。したがって、一部の実施形態では、2つの試料、または約2、3、4、5、7、10、15、20、50、または100を超える試料を試料調製システムから採取し、多数の試料アナライザーシステム上で平行して実施する。

10

【0224】

微小流体システムは、試料調製のために、アナライザーシステムの一部である試料調製システムとして、特に、検出により少量の試料が必要であるほど十分に高濃度の粒子を含むことが疑われる試料に対して、用いてもよい。微小流体操作の原理および技術は当技術分野で既知である。米国特許第4979824号、第5770029号、第5755942号、第5746901号、第5681751号、第5658413号、第5653939号、第5653859号、第5645702号、第5605662号、第5571410号、第5543838号、第5480614号、第5716825号、第5603351号、第5858195号、第5863801号、第5955028号、第5989402号、第6041515号、第6071478号、第6355420号、第6495104号、第6386219号、第6606609号、第6802342号、第6749734号、第6623613号、第6554744号、第6361671号、第6143152号、第6132580号、第5274240号、第6689323号、第6783992号、第6537437号、第6599436号、第6811668号、および公開されているPCT特許出願WO9955461(A1)を参照されたい。試料は、単一または多数のアナライザーシステムでの使用のために連続してまたは平行して調製することができる。

20

【0225】

試料は緩衝液を含むことが好ましい。緩衝液は、アナライザーシステム外で試料と混合してもよく、あるいは試料調製機構によって提供してもよい。任意の好適な緩衝液を用いることができるが、好ましい緩衝液は、蛍光のバックグラウンドが低く、検出可能に標識された粒子に対して不活性であり、使用pHを維持することができ、原動力が動電学的である実施形態では電気泳動に好適なイオン強度を有するものである。緩衝液濃度は、約1から約200mMの範囲などの任意の好適な濃度であることができる。対象の分子の可溶性、機能、および検出可能性を付与する限り、任意の緩衝液系を用いることができる。ポンプ吸引(pumping)を用いる用途では、リン酸塩、グリシン、酢酸塩、クエン酸塩、アシデュレート(acidulate)、炭酸塩/炭酸水素塩、イミダゾール、トリエタノールアミン、グリシン、アミド、ホウ酸塩、MES、Bis-Tris、ADA、aces、PIPES、MOPSO、Bis-Tris Propane、BES、MOPS、TES、HEPES、DIPSO、MOBS、TAPSO、Trizma、HEPPSO、POP SO、TEA、EPPS、Tricine、Gly-Gly、Bicine、HEPBS、TAPS、AMPD、TABS、AMP SO、CHES、CAPSO、AMP、CAPS、およびCABSからなる群から緩衝液を選択するのが好ましい。緩衝液は、Gly-Gly、ピシン(bicine)、トリシン(tricine)、2-モルホリンエタンスルホン酸(MES)、4-モルホリンプロパンスルホン酸(MOPS)、および2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール塩酸塩(AMP)からなる群から選択することもできる。有用な緩衝液は、pH8.1の2mM Tris/ホウ酸であるが、Tris/グリシンおよびTris/HClも許容できる。他の緩衝液は本明細書に記載する通りである。

30

40

【0226】

電気泳動に有用な緩衝液は先行の出願に開示されており、米国特許出願11/0486

50

60 から本明細書に参照によって組み入れられる。

【0227】

E．試料回収

本発明のアナライザーおよび分析システムの実施形態の高度に有用な1つの特徴は、試料を消費せずに分析することができることである。このことは、試料材料が限られている場合に特に重要であり得る。試料を回収することにより、他の分析を行うことまたはそれを再分析をすることも可能になる。法廷使用、薬物スクリーニング、および臨床診断の用途など、試料サイズが限られている場合および/または試料を再分析することができることが望ましい場合での用途に対するこの特徴の利点は、当業者であれば明らかである。

【0228】

したがって、一部の実施形態では、本発明のアナライザーシステムは、分析後に試料を回収するための試料回収システムをさらに提供する。これらの実施形態では、該システムは、試料をアナライザーに引き入れ、分析し、次いで例えば同じ経路によって試料管などの試料ホルダーに戻す機構および方法を含む。試料は壊されることはなく、バルブまたは他の管のいずれにも入らないので、試料は汚染されないままである。さらに、試料経路における材料はすべて、PEEK、融解石英、またはサファイアなど、高度に不活性なので、試料経路からの汚染はほとんどない。ステッパーモータ制御ポンプ（特に、分析用ポンプ）を使用することにより、引き上げる（drawn up）体積および戻し出される体積を正確に制御できる。これにより、フラッシュ緩衝液による希釈があったとしても少々の希釈で、試料を完全にまたはほとんど完全に回収できる。したがって、一部の実施形態では、約50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または99.9%を超える試料が、分析後に回収される。一部の実施形態では、回収試料が希釈されていない。一部の実施形態では、回収された試料は、約1.5倍、1.4倍、1.3倍、1.2倍、1.1倍、1.05倍、1.01倍、1.005倍、または1.001倍未満希釈されている。

【0229】

試料を採取および/または回収するために、試料ベッセルからアナライザーへ液体試料を輸送するための任意の機構を用いることができる。一部の実施形態では、分析キャピラリーの入口端部は、試料容器（例えば試験管または試料ウェル）中に浸すことができあるいは廃棄容器の上に保持されることができる短い長さの管（例えばPEEK管）に結合している。前の試料を装置からきれいに取り除くためのフラッシュするのときは、フラッシュされた廃棄物を受け止めるための廃棄容器の上にこの管を配置する。試料を引き入れる場合は、管を試料ウェルまたは試験管に入れる。典型的には、試料を速やかに引き入れ、次いで試料内の粒子を観察しながらゆっくりと押し出す。あるいは、一部の実施形態では、引き入れサイクルの少なくとも一部の間に試料をゆっくりと引き入れ、ゆっくりと引き入れている間に試料を分析してもよい。この後に、試料を速やかに戻し、速やかにフラッシュすることができる。一部の実施形態では、内向き（引き入れ）および外向き（引き出し）サイクルの両方で試料を分析することができ、これにより少量の希釈試料などの統計値の計数および結果の確認などが改善される。試料を保存するのが望ましい場合は、元の同じ試料ウェルまたは別のものに試料を押し戻すことができる。試料の保存を望まない場合は、管を廃棄容器上に配置する。

【0230】

VI．分子の高感度分析を用いる方法

本発明のシステム、システムキット、および方法により、従前に測定された濃度よりもはるかに低い濃度での試料中の分子の測定が可能になる。本発明の高感度の機器、キット、および方法により、従前は検出感度の不足のために不可能であったマーカー（例えば生物学的マーカー）の確立が可能になる。

【0231】

生物学的状態の判定に使用される可能性はあっても、マーカーのより低い範囲が不明であるために現在実用されていない現在利用可能なマーカーが多数存在する。いくつかの場

10

20

30

40

50

合では、異常に高いマーカーレベルは現行の方法論によって検出可能であるが、通常の範囲は確立されていない。いくつかの場合では、正常範囲の上方部分のマーカーは検出可能であるが、正常範囲の下方部分または正常より下のレベルは検出可能ではない。いくつかの場合では、腫瘍に特異的なマーカーまたは感染マーカーなど、マーカーのいずれのレベルも生物学的状態の存在可能性を示し、検出感度の向上は早期診断にとって有利である。いくつかの場合では、多時点にわたるマーカー濃度の変化率または変化の欠如は最も有用な情報が提供するが、この分析方法は、典型的に最も治療可能な場合である病態の早期での試料採取時点におけるマーカーレベルを決定できない。多くの場合、複雑な試料処理および時間のかかる分析を必要とする方法など、臨床環境において実用的または有用でない厄介な方法の使用によってのみ、マーカーを臨床的に有用なレベルで検出することができる。

10

【0232】

さらに、現行の方法によって存在を検出するには依然として極めて困難または不可能なほど十分に低い濃度で存在する、生物学的状態の潜在的なマーカーがある。

【0233】

本発明の分析方法および組成物により、マーカーを以前は検出することが不可能であった濃度で生物学的状態についてのマーカーの検出を可能にする感度および精度レベルが提供され、したがって、このようなマーカーを確認マーカーまたは限定的なリサーチ環境にのみ有用なマーカーから診断、予診、治療指向、または臨床環境および/または臨床試験などの大規模な臨床環境に有用なその他のタイプのマーカーへと「再目的化」させることが可能になる。そのような方法は、例えば、そのようなマーカーの正常および異常な範囲の決定を可能にする。

20

【0234】

このように再目的化されたマーカーは、例えば、正常状態（正常範囲）の検出、応答者/非応答者（例えば、薬剤投与などの治療に対して）の検出；疾患または病気発生の早期検出（例えば、早期の状態における癌の検出、心虚血の早期検出）；病状期（例えば癌）；疾患モニタリング（例えば、糖尿病モニタリング、治療後の癌の再発に関するモニタリング）；疾患メカニズムの研究；および薬剤治療の毒性（例えば、心臓毒性（cardiotoxicity））などの治療毒性の研究のために使用することができる。

30

【0235】

A. 方法

したがって、本発明は、マーカーの高感度の検出のための方法および組成物、さらにマーカーの正常レベルおよび異常レベルに関する値を確立する方法を提供する。さらなる実施形態では、本発明は、マーカーに関して確立された値に基づく診断、予後診断、および/または治療選択の方法を提供する。本発明は、このような方法において使用される組成物、例えば超高感度のマーカー検出用の検出試薬も提供する。

【0236】

一部の実施形態では、本発明は、マーカーの単一分子の検出により（例えば、マーカーの単一分子に結合した標識を検出することにより）生物学的試料のマーカーの濃度を測定することによって第1の集団から得られる生物学的試料中のマーカーの濃度範囲を確立することにより、生物学的状態についてのマーカーを確立する方法を提供する。一部の実施形態では、マーカーは、ポリペプチドまたは小分子である。試料は、本明細書に記載された任意の試料タイプ、例えば血液、血漿、もしくは血清、または尿であってよい。

40

【0237】

この方法は、生物学的状態を示さない集団である第1の集団からの試料を利用することができる。生物学的状態が疾患状態の場合、第1の集団は、疾患を示さない集団、例えば「正常な」集団であってもよい。一部の実施形態では、該方法は、マーカーの単一分子の検出により生物学的試料のマーカーの濃度を測定することによって、第2の集団のメンバーが生物学的状態を示す第2の集団から得られた生物学的試料中のマーカーのレベル範囲の範囲を確立することをさらに含むことができる。一部の実施形態、例えば、クロスセクシ

50

ョン試験において、第1の集団および第2の集団は異なる。一部の実施形態では、第2の集団の少なくとも1つのメンバーは第1の集団のメンバーであるか、前記第1の集団の少なくとも1つのメンバーは第2の集団のメンバーである。一部の実施形態、例えば、長期試験において、第2の集団の実質的にすべてのメンバーは、生物学的状態（例えば、疾患または病状）を患った第1の集団のメンバーである。

【0238】

マーカーの単一分子の検出は、本明細書に記載された方法、例えば前記マーカーの検出限界が試料中の約1000、100、50、20、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、または0.001フェムトモル未満のマーカーであるマーカーの単一分子の検出による方法を用いて実施される。

10

【0239】

生物学的状態は、表現型の状態；生物に影響を及ぼす病態；発現状態；年齢；健康；病状；疾患；疾患過程；病状期；感染；毒性；または化学因子、環境因子、もしくは薬物因子に対する応答（例えば薬物応答フェノタイピング、薬物毒性フェノタイピング、または薬物効果フェノタイピングなど）であってもよい。

【0240】

一部の実施形態では、生物学的状態は、限定するものではないが、炎症、異常細胞増殖、および異常代謝状態などの病理状態である。一部の実施形態では、状態は疾患状態である。疾患状態には、限定するものではないが、癌、心血管疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、神経疾患、感染症、および妊娠関連障害が含まれる。一部の実施形態では、状態は病状期状態、例えば、癌の病状期状態である。

20

【0241】

この方法は、治療応答状態の判定にも使用できる。一部の実施形態では、治療は薬物治療である。応答は、治療効果または副作用（例えば有害作用）であり得る。治療効果のマーカーは、薬物によって治療された疾患または病態に基づく。有害作用のマーカーは、典型的には、薬物クラス、特定の構造、および作用および代謝の機序に基づく。一般的な有害作用は、薬物毒性である。一例は、マーカーである心筋トロポニンによりモニタリングできる心臓毒性である。一部の実施形態では、疾患状態の1つ以上のマーカーおよび薬物の1つ以上の有害作用の1つ以上のマーカーが、典型的には薬物を摂っている集団でモニタリングされる。間隔を置いて試料を採取し、試料中のマーカーのそれぞれの値を長期にわたり評価することができる。

30

【0242】

マーカーの単一分子の検出は、蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されたときに少なくとも約200個の光子を放出することができる蛍光部分を含む標識でマーカーを標識することを含むことができ、該レーザーは蛍光部分を含む直径約5ミクロン以上のスポットに集束され、該レーザーによってスポットに向けられる全エネルギーは約3マイクロジュール以下である。一部の実施形態では、蛍光部分は、少なくとも1つの置換インドリウム環系を含む分子を含み、該インドリウム環の3位炭素上の置換基は化学反応性基または共役物質を含む。一部の実施形態では、蛍光部分は、AlexaFluor 488、AlexaFluor 532、AlexaFluor 647、AlexaFluor 680、またはAlexaFluor 700からなる群から選択される色素を含むことができる。一部の実施形態では、該部分は、AlexaFluor 647を含む。一部の実施形態では、標識は、マーカーの結合相手、例えばポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体などの前記マーカーに特異的な抗体をさらに含む。種々のマーカーの結合相手が本明細書に記載されている。

40

【0243】

この方法は、第1の範囲または第1および第2の範囲に基づくマーカーの閾値レベルの確立をさらに含み、この場合、閾値レベルを上回るまたは下回るのレベルでの個体から得られる生物学的試料中のマーカーの存在は、個体における生物学的状態の存在可能性の増大を示す。正常集団について決定された閾値の例は、正常集団で99パーセントイル値超

50

の心筋トロポニンについての示唆された閾値である。実施例 3 を参照されたい。他の閾値レベルは、経験的に、すなわち、マーカーレベルならびにモニタリングされる生物学的状態の有無、重症度、進行の速度、後退の速度などに関する第 1 および第 2 の集団から得られるデータに基づいて決定することができる。最小値を下回ると試料中のマーカー濃度が生物学的状態の可能性の増大を示す該最小値および / または最大値を上回ると試料中のマーカーの濃度が生物学的状態の可能性増大を示す該最大値など、範囲のいずれかの端において閾値レベルを確立できることは理解されよう。一部の実施形態では、2 つ以上のマーカー濃度範囲が 2 つ以上の危険度レベルに対応する危険度階層化を作成することができる。2 つの集団から得られるデータおよびマーカーについて分析して、医師および他の医療専門家などによって使用されるための臨床的に関連する値を作成する方法は、当業界に周知である。

10

【0244】

いくつかの生物学的マーカーでは、いずれかのマーカーが多少なりとも存在すれば疾患または病態の指標となり、閾値は基本的にゼロである。一例は、前立腺除去後の癌再発をモニタリングするための前立腺特異的抗原 (PSA) の使用である。PSA は前立腺のみによって産生され、前立腺およびすべての癌が除去されたと考えられる場合には除去後の PSA はゼロである。PSA の出現は、いずれのレベルであっても、転移部位などにおける癌の再発の可能性を示すものである。したがって、そのような再発が生じた場合、検出方法の感度が高いほどより早く介入を行うことができる。

20

【0245】

値の変化、変化率、スパイク (spikes)、減少などがすべて生物学的状態の判定に有用な情報を提供できる一連の試料などでマーカー濃度の他の評価も行うことができる。さらに、2 つ以上のマーカーが生物学的状態に関する情報を提供することが見出される場合に、一群のマーカーを使用することができる。一群のマーカーを使用する場合、別個の試料 (例えば共通の試料のアリコート) で別個にあるいは多重式 (multiplexing) により同時にマーカーを測定することができる。一群のマーカーならびに多重式の例は、米国特許出願第 11 / 048660 号に提供されている。

【0246】

このようなマーカーおよび例えば正常状態および / または異常状態についての参照範囲を確立することにより、生物の生物学的状態の高感度で正確な判定が可能になる。したがって、一部の実施形態では、本発明は、生物の生物学的状態の有無を検出するための方法を提供し、この方法は、i) 生物から得られる生物学的試料中のマーカー濃度を測定する工程、この場合、前記マーカーは、マーカーの単一分子の検出により生物学的試料のマーカー濃度を測定することによって、第 1 の集団から得られた生物学的試料中のマーカーの濃度範囲を確立することにより確立されるマーカーである ; および ii) 前記生物中の前記マーカーの濃度に基づいて前記生物学的状態の有無を判定する工程を含む。

30

【0247】

一部の実施形態では、本発明は、生物の生物学的状態の有無を検出するための方法を提供し、この方法は、i) 前記生物から得られる複数の生物学的試料中のマーカー濃度を測定する工程、この場合、前記マーカーは、マーカーの単一分子の検出により生物学的試料のマーカー濃度を測定することによって、第 1 の集団から得られた生物学的試料中の前記マーカーの濃度範囲を確立することにより確立されるマーカーである ; および ii) 前記複数の試料における前記マーカーの前記濃度に基づいて前記生物学的状態の有無を判定する工程を含む。一部の実施形態では、試料は、異なるタイプ、例えば、異なる組織タイプの試料である。この場合、判定は、前記異なるタイプの試料中の前記マーカーの濃度の比較に基づく。より一般的には、試料は同じタイプのものであり、試料は間隔をあけて採取される。試料は本明細書に記載された任意の試料タイプ、例えば、血液、血漿、または血清 ; または尿であり得る。試料間の間隔は、複数分、複数時間、複数日、複数週、複数月、または複数年であり得る。急性臨床環境においては、間隔は、複数分または複数時間であり得る。個体のモニタリングを含む環境において、間隔は、複数日、複数週、複数月、

40

50

また複数年であり得る。

【0248】

多くの場合、有無が検出される生物学的状態は、疾患表現型である。したがって、一実施形態では、対象の表現型状態は、臨床診断される疾患状態である。このような疾患状態には、例えば、癌、心血管疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、神経疾患、呼吸器疾患、感染症、および妊娠関連障害が含まれる。

【0249】

癌表現型は、本発明の一部の態様に含まれる。本明細書で癌の例には、限定するものではないが、乳癌、皮膚癌、骨癌、前立腺癌、肝癌、肺癌、脳腫瘍、喉頭、胆嚢、脾臓、直腸、副甲状腺、甲状腺、副腎、神経組織、頭頸部、結腸、胃、気管支、腎臓の各癌、基底細胞癌、潰瘍型および乳頭型の扁平上皮癌、転移性皮膚癌、骨肉腫、ユーイング肉腫、*reticulum*細胞肉腫、骨髄腫、巨細胞腫、小細胞肺腫瘍、非小細胞肺癌胆石、ランゲルハウス島細胞腫、一次脳腫瘍、急性および慢性のリンパおよび顆粒球の腫瘍、毛様細胞腫瘍、アデノーマ、過形成、髄様癌、褐色細胞腫、粘膜神経腫、腸の神経節細胞腫、過形成角膜神経腫瘍、マルファン症候群様体質腫瘍、ウィルム腫瘍、精上皮腫、卵巣腫瘍、平滑筋腫瘍、子宮頸部異形成および*in situ*癌、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、軟部組織肉腫、悪性カルチノイド、局所皮膚病変、菌状息肉腫、横紋筋肉腫、カボジ肉腫、骨肉腫および他の肉腫、悪性高カルシウム血症、腎臓細胞腫瘍、真性赤血球増加症、腺癌、多形神経グリア芽細胞腫、白血病、リンパ腫、悪性黒色腫、類表皮癌ならびに他の癌腫および肉腫が含まれる。

10

20

【0250】

心血管疾患は、本発明の他の応用を含めることができる。心血管疾患の例には、限定するものではないが、うっ血性心不全、高血圧症、不整脈、アテローム性動脈硬化症、コレステロール、ウルフ - パーキンソン - ホワイト症候、QT延長症候群、狭心症、頻脈、徐脈、心房性細動、心室性細動、うっ血性心不全、心筋虚血症、心筋梗塞、心臓タンポナーデ、心筋炎、心膜炎、催不整脈性右室異形成、肥大型心筋症、ウィリアムス症候群、心臓弁膜症、心内膜炎、細菌性、肺閉塞症、大動脈弁狭窄症、レイノー病、レイノー病、コレステロール塞栓症、ワレンベルグ症候群、ヒッペル - リンダウ病、および末梢血管拡張症が含まれる。

【0251】

炎症性疾患および自己免疫疾患は、本発明の他の実施形態に含めることができる。炎症性疾患および自己免疫疾患の例には、限定するものではないが、慢性関節リウマチ、非特異的関節炎、喉頭の炎症性疾患、炎症性腸障害、乾癬、甲状腺機能低下症（例えば、橋本病）、大腸炎、I型糖尿病、骨盤内炎症性疾患、中枢神経系の炎症性疾患、側頭動脈炎、リウマチ性多発性筋痛、強直性脊椎炎、結節性多発動脈炎、ライター症候群、強皮症、全身性エリテマトーデスが含まれる。

30

【0252】

本発明の方法および組成物は、アデノウイルス、百日咳菌、クラジミア・ニューモニエ、トラコーマクラミジア、コレラトキシン、コレラトキシンβ、カンピロバクター・ジェジュニ、サイトメガロウイルス、ジフテリア毒素、エプスタイン - バーNA、エプスタイン - バーEA、エプスタイン - バーVCA、ヘリコバクターピロリ、B型肝炎ウイルス(HBV)コア、B型肝炎ウイルス(HBV)エンベロープ、B型肝炎ウイルス(HBV) *Surface* (A_y)、C型肝炎ウイルス(HCV)コア、C型肝炎ウイルス(HCV) NS3、C型肝炎ウイルス(HCV) NS4、C型肝炎ウイルス(HCV) NS5、A型肝炎、D型肝炎、E型肝炎ウイルス(HEV) *orf* 2 3KD、E型肝炎ウイルス(HEV) *orf* 2 6KD、E型肝炎ウイルス(HEV) *orf* 3 3KD、ヒト免疫不全ウイルス(HIV) - 1 p24、ヒト免疫不全ウイルス(HIV) - 1 gp41、ヒト免疫不全ウイルス(HIV) - 1 gp120、ヒト乳頭腫ウイルス(HPV)、単純疱疹ウイルスHSV - 1/2、単純疱疹ウイルスHSV - 1 gD、単純疱疹ウイルスHSV - 2 gG、ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV) - 1/2、インフルエンザA

40

50

型、インフルエンザ A 型 H 3 N 2、インフルエンザ B 型、リーシュマニア・ドノバニ、ライム病、耳下腺炎、M. ニューモニア (M. pneumoniae)、結核菌 (M. tuberculosis)、1 型パラインフルエンザウイルス、2 型パラインフルエンザウイルス、3 型パラインフルエンザウイルス、ポリオウイルス、RS ウイルス (RSV)、風疹、麻疹、ストレプトリシン O、テタヌストキシン、T. パリダム (T. pallidum) 15 k d、T. パリダム (T. pallidum) p 47、T. クルジ (T. cruzi)、トキソプラズマ、およびバリセラ・ゾーター (Varicella Zoater) のマーカーを含む、感染症のマーカーに関する研究情報も提供することができる。

【0253】

B. マーカーの例

本発明の機器、標識、および方法は、従前のレベルより 10 倍から 100 倍低いがあるいはより低いレベルでの例えば血清および尿中のマーカーについての範囲を確立するために用いられている。マーカーは、広範囲の生物学的状態、例えば、心疾患および心臓毒性 (トロポニン)、感染 (TREM-1)、炎症および他の病態 (LTE4、IL-6 および IL-8)、喘息 (LTE4)、癌 (Akt1、TGF- β 、Fas リガンド)、ならびに同種移植拒絶および変性疾患 (Fas リガンド) を示す。

【0254】

マーカーには、タンパク質マーカーおよび非タンパク質マーカーが含まれる。該マーカーは本明細書に簡単に記載されており、手順および結果は実施例に提供されている。

【0255】

1. 心臓損傷

心筋トロポニンは、現在、異常に高い量でのみ検出可能なマーカーの例である。心筋トロポニンは、多数の疾患および病態 (例えば急性心筋梗塞) における診断、予後診断、および治療方法の決定に有用な心臓損傷のマーカーである。さらに、心筋トロポニンは、治療 (例えば薬物治療) に起因する心臓毒性の有用なマーカーである。

【0256】

筋内のトロポニン複合体は、トロポニン I、C、および T からなる。トロポニン C は、1 つは心筋および遅筋 (slow-twitch muscle) から、1 つは速筋 (fast-twitch muscle) からの 2 つのアイソフォームとして存在し、事実上すべての横紋筋に見られるゆえに特定マーカーとしての使用は限られる。対照的に、トロポニン I および T は、遅筋、速筋、および心筋で異なるアイソフォームとして発現する。トロポニン I および T の特有の心筋のアイソフォームにより、骨格筋の他のトロポニンからそれらを免疫学的に識別することが可能である。したがって、心筋トロポニン I および T の血中への放出は、心筋に対する損傷を示しており、診断および予後診断のマーカーとしてのそれらの使用のためまたは治療の決定を助けるための基礎を提供する。

【0257】

心臓損傷について現在用いられているマーカーは、その臨床的な有用性が限定されているとの欠点を有している。心臓酵素アッセイは、心筋の損傷の有無を判定するための基礎を形成している。残念なことに、標準的なクレアチンキナーゼ-MB (CK-MB) アッセイは、胸部痛開始後 10 時間から 12 時間までに梗塞を取り除くことに信頼性がない。より早期の診断は、線維素溶解療法およびトリアージに関して非常に特別な利点を有するであろう。

【0258】

健康な個体の血液循環 (circulation) で見られるトロポニンのレベルは極めて低く、心臓特異的なトロポニンは心臓供給源以外からは生じないゆえに、トロポニンは心臓損傷の極めて高感度で特異的なマーカーである。心臓梗塞に加えて、他の多数の病態が心筋に損傷を引き起こす可能性があり、このような損傷の早期診断は臨床医にとって有用であることが示されるであろう。しかしながら、検出および定量化の現行の方法は、異常に高い濃度、例えば 0.1 ng/ml 以上のレベルに到達するまで、血中への心筋トロポニンの放出を検出するための十分な感度を有していない。

10

20

30

40

50

【0259】

したがって、本発明の方法および組成物は、心筋トロポニンの高感度の検出および定量化のための方法および組成物、ならびにこのような高感度の検出および定量化に基づく診断、予後診断、および/または治療決定のための組成物および方法を含む。心筋トロポニンIに関する標準曲線は、約1 pg/ml未満の検出限界で確立した(実施例1)。心筋トロポニンIのレベルを正常個体で確立し、正常の99パーセンタイルでの閾値を確立した(実施例3)。急性心筋梗塞を患った個体から得られた一連の試料を分析し、ベースラインからの偏差を含む心筋トロポニンIの濃度の時間経過を判定した(実施例4)。したがって、心筋トロポニンIは、臨床環境およびリサーチ環境で使用される診断および予後診断の情報を提供するためのレベルで本発明のシステムおよび方法によって検出することのできるマーカーの一例として役立つ。また、「Highly Sensitive System and Methods for Analysis of Troponin」の標題で本明細書の日付で出願された米国特許出願_____も参照されたい。これは参照として、本明細書にその全体が取り入れられる。

10

【0260】

2. 感染

TREM-1は、細菌または真菌感染のマーカーである。本発明のアッセイは、TREM-1が100 fMの濃度でルーチンで測定できることを示唆している。

【0261】

3. サイトカイン

多くのサイトカイン、ケモカイン、および成長因子の正常レベルは、主に、患者から得られる試料中に見られるレベルを下回るレベルを検出することが既存技術では不可能であるために、不明である。例えば、IL-10、TNF- α 、IL-4、IL-1 β 、IL-2、IL-12、およびIFN- γ は、臨床環境において実施されるルーチンアッセイによっては検出することができないが、一方、本発明のアナライザーシステムでは、これらおよび他のサイトカインのレベルを容易に決定することができる。サイトカインおよび成長因子のレベルを知ることは、癌、ならびに呼吸器疾患、感染症、および心血管疾患を含む種々の疾患の診断、予後、および治療で臨床医を助ける。臨床検体での正常状態および疾患状態をモニタリングする早期のサイトカイン検出は、血漿、血清、および尿などの試料ならびに他の体液試料を分析してより良好な展開医療(translational medicine)を提供する本発明のアナライザーシステムを用いて達成することができる。例えば、正常な濃度範囲が不明であるサイトカインのレベルを決定することにより、その後の病態および疾患の診断および治療で臨床医を助けることになる。骨形成タンパク質は、骨折、脊椎固定術、整形外科手術、および口腔手術について治療をモニタリングするのに有用であると考えられ；インターロイキン-10(IL-10)は、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、黒色腫、および卵巣癌を含む癌の存在の検出およびモニタリング、ならびに抗炎症療法、臓器移植、免疫不全症、および寄生虫感染症の効果の検出およびモニタリングに有用であると考えられ；インターロイキン-11(IL-11)は、乳癌などの癌の存在に関する検出およびモニタリングに有用であり；インターロイキン-11(IL-11)は、癌およびHIV感染に有用であり；炎症性サイトカインのTNF α は、単独で、あるいはIL-6と組み合わせて、敗血症、急性膵臓炎、結核、ならびにリウマチ様関節炎および狼瘡などの自己免疫疾患の良好な予測物質として使用することができる。

20

30

40

【0262】

あるいは、正常値および異常値のデータベースはすでに存在しているが、マーカーに関する個体の値が正常範囲内にあるかどうかを十分な感度で判定するための、ルーチンベースでの個体スクリーニングには現在の方法は実用的でない。例えば、試料中のIL-6濃度決定のための現在の多くの方法は約5 pg/mlの濃度までのIL-6のみを検出することができ、IL-6値の正常範囲は約1 pg/mlから約10 pg/mlであり、したがって、現在の方法で検出できるのは、正常範囲の上方部分におけるIL-6のみである。対照的に、本発明のアナライザーおよびアナライザーシステムは、約0.1 pg/ml

50

未満または正常範囲値の10分の1未満の濃度までのIL-6の検出を可能にする。定量化の下限(LLoQ)は約0.01pg/mlである。したがって、本発明のアナライザーおよびアナライザーシステムにより、IL-6などのバイオマーカーに関して、はるかににより広範でかつより微妙な違いのデータベースの作成が可能になり、正常範囲の内外両方のバイオマーカーのスクリーニングも可能になり、これにより早期検出が可能になる。

【0263】

したがって、本発明のアナライザーおよびアナライザーシステムにより、IL-6などのバイオマーカーに関して、はるかににより広範でかつより微妙な違いのデータベースの作成が可能になり、正常範囲の内外両方のバイオマーカーのスクリーニングも可能になり、これによりIL-6が関係している病態の早期検出が可能になる。IL-6関連障害には、限定するものではないが、敗血症、末梢動脈疾患、および慢性閉塞性肺疾患が含まれる。インターロイキン-6仲介炎症は、アテローム硬化性血管疾患ならびに骨粗しょう症およびII型糖尿病などの年齢関連障害の共通の原因因子および治療標的でもある。さらに、IL-6は、敗血症性ショックなどのさらなる疾患を診断するためにTNF α などの他のサイトカインと組み合わせて測定することができる。

10

【0264】

4. 炎症マーカー

炎症性疾患の早期発症の検出に有用であり得る他のサイトカインには、本明細書に記載された炎症のマーカーおよびマーカー群が含まれる。炎症性疾患の検出に使用できるサイトカインの例は、ロイコトリエン4(LTE₄)であり、これは、線維症や硬化症を含む炎症性疾患の状態を検出およびモニタリングするために使用できる喘息およびTGF β の早期マーカーであり得る。いくつかのマーカーは2つ以上の疾患を検出するために使用でき、例えばTGF β は癌の存在の検出にも使用できる。

20

【0265】

ロイコトリエンE₄

システニルロイコトリエン類(LTC₄、LTD₄、LTE₄)は、喘息の病因に重要な役割を果たしている。ロイコトリエン類は、肥満細胞、好酸球、および他の気道炎症細胞により産生され、血管透過性を増大させ、気管支平滑筋を収縮させ、気管支反応亢進を仲介する。LTC₄およびLTD₄の安定な代謝物である尿LTE₄のレベルは、健康な対照に比較して喘息を罹っている小児および成人で増加し、抗原による気管支攻撃後、アスピリン感受性喘息対象におけるアスピリンによる経口攻撃後、および運動誘発気管支痙攣中の喘息患者で増加する。喘息の病理におけるロイコトリエンの重要性は、ロイコトリエンの作用を遮断する薬剤による大規模な臨床試験においてさらに実証されている。例えば、1日1回経口摂取される強力なロイコトリエン受容体アンタゴニストであるモンテルカスト(montelukast)は、小児(2~14歳)および成人双方における喘息のコントロールを有意に改善し、運動誘発気管支狭窄を減弱させる。

30

【0266】

ロイコトリエン経路の活性化はLTE₄の尿レベルの増加を伴い、喘息の急性悪化は尿中のLTE₄レベル増加とその後の回復時における有意な減少とを伴う。空気流(airflow)の制限の程度は悪化期間および追跡(follow up)期間中の尿のLTE₄レベルと相関し、したがって、このことはロイコトリエン経路が急性喘息時に活性化されることを示している。さらに、LTC₄またはLTE₄の気管支狭窄用量の吸引によって用量に依存した形式で尿のLTE₄排泄が変化し、したがって、このことは尿のLTE₄が喘息患者の肺におけるスルフィドペプチドロイコトリエン合成のマーカーとして使用できることを示している。

40

【0267】

本発明の方法は、尿試料などの生物学的試料中のLTE₄の変化を検出するために使用することができる(実施例)。LTE₄のナノグラム下レベルの測定は、慢性または急性喘息患者の肺におけるスルフィドペプチドロイコトリエン合成の検出およびモニタリングのための参照として有用であり得る。

50

【 0 2 6 8 】

6 . T G F β

本発明の方法は、T G F β がマーカーである疾患の早期発症を検出するためにも実施することができる。T G F β 関連疾患の例には、線維性疾患が含まれる。線維症は、肺、腎臓、眼、心臓、肝臓、および皮膚に影響を及ぼす種々の慢性疾患における臓器不全に関連する罹患率および死亡率の原因である、瘢痕組織の過剰かつ永続的な形成に関する。T G F β は、慢性線維性作用の媒介物質としての役割について周知となっている。例えば、T G F β は、線維性肺疾患における線維芽細胞増殖および細胞間質蓄積の促進に関係している。T G F β の阻害は、肺の線維症を扱うための可能性のある治療法として提案されている。T G F β は、フィブロネクチンおよびI型コラーゲンならびにそれらの受容体を含む多くの細胞外マトリクス分子の合成を刺激するだけでなく、プロテアーゼおよびその阻害物質の発現に対する差動効果 (differential effects) によりマトリクスの分解を減少させて、細胞外基質の生成を強力に促進する。したがって、本発明のアナライザーシステムは、特発性肺血管線維症、糖尿病性腎症、糸球体硬化症およびI g A腎症 (原因が腎不全で透析および再移植が必要) を含む進行性腎症; 糖尿病性網膜症および進行型黄斑変性症 (眼の線維性疾患であって失明の原因となる); 肝硬変および胆道閉鎖 (肝線維症および肝不全の原因となる); シャガス病における進行性線維症に関連する心筋症; 肺線維症; および強皮症を含むがこれらに限定するものではない線維性疾患などに関連したT G F β の異常レベルを検出することができる。

10

【 0 2 6 9 】

20

T G F β は、前立腺癌、頸部癌、肺癌、およびホジキン疾患などの癌のマーカーでもある。肺癌に罹っている患者のT G F β 血漿レベルは、しばしば増加する。診断で血漿T G F β 1レベルの増加している患者では、放射線療法後の疾患の持続および疾患の再発の双方の検出においてこのレベルのモニタリングが有用であり得ることが示されている。

【 0 2 7 0 】

形質転換成長因子 - β (T G F - β) は、発達、ホメオスターシス、および組織修復に影響を及ぼす多能性成長因子である。さらに、T G F - β の発現増強が種々の悪性疾患で報告されており、腫瘍形成におけるこの成長因子の役割を示唆している。特に、骨肉腫の腫瘍間質における小血管の内皮層および血管周囲層におけるT G F - β の存在はこの成長因子の血管形成活性を示唆することが実証され、T G F - β アイソフォームの発現増強は骨肉腫の進行においてある役割を果たしていることが実証されている (K l o e n ら、C a n c e r、80:2230~9頁(1997))。T G F β は、細胞増殖を阻害することができる数少ない既知タンパク質の1つである。しかしながら、見解には異論があるが、一部の研究者は、乳癌などのいくつかのヒト悪性疾患はそれら自身の目的のためにT G F β を破壊すると信じている。理解されていない逆説では、これらの癌は、T G F β を作り、T G F β が進行転移および生存率低下のマーカーになるまでその発現を着実に増加させる。例えば、局所リンパ節および骨への前立腺癌の転移を有する男性では、血漿T G F β のレベルは著しく上昇する。転移の臨床的および病理的な証拠のない男性では、手術前の血漿T G F β レベルは、恐らく、前立腺全摘出術の時点で存在する潜在型転移性疾患 (occult metastatic disease) との関連性により、手術後の生化学的進行を強く予知するものである。

30

40

【 0 2 7 1 】

本発明の方法により検出される異常細胞増殖の他のマーカーとしては、A k t 1、F a s リガンド、およびI L - 6が含まれる。

【 0 2 7 2 】

癌の診断は、例えば現行の方法による実際の臨床環境では、不正確であるかあるいは検出可能になる前に高レベルに到達する必要がある腫瘍自体を可視化するなど、洗練されていない腫瘍増殖測定の使用に依存することが多い。検出時点で、腫瘍は、転移前に介入を見い出せないほど十分なサイズに増殖していることが多い。例えば、X線による肺癌の検出には直径 > 1 c m の腫瘍が必要であり、C T スキャンでは > 2 ~ 3 c m の腫瘍を必要と

50

する。あるいは、腫瘍増殖のバイオマーカーが使用できるが、ここでも、現行の臨床技術にアクセス可能なレベルでバイオマーカーが検出できる時間までに腫瘍が十分進行していることが多い。さらに、介入（例えば、腫瘍を収縮または除去するための手術、化学療法、または放射線）の後、さらなる介入が首尾よくいきそうにない時点まで残存している疾患が進行してしまうまでには、癌が再発したかどうかを判定するための十分な感度で腫瘍マーカーを測定することが不可能であることが多い。本発明のアナライザー、システム、および方法を用いて、例えば転移の可能性がより低いゆえに介入がより首尾よくいきそうな時点において腫瘍増殖の開始および腫瘍増殖の再起の双方を検出することが可能である。従前には示されなかったレベルで検出できる癌のマーカーには、上で開示されたマーカーが含まれる。診断用マーカーへと再目的化できるマーカー検出用のアッセイの例には上で検討した TGF β 、Akt1、Fasリガンド、および IL-6 が挙げられ、これらは実施例に示されている。

10

【0273】

7. Akt1

Akt1 は、v-akt マウス胸腺腫ウイルス発癌遺伝子ホモログ 1 であり、AKT1 遺伝子によってコードされるセリントレオニンタンパク質キナーゼである。Akt キナーゼは、アポトーシスの阻害および細胞増殖の促進を含む異なる細胞応答、血管形成、および腫瘍細胞の侵襲性に関係している。

【0274】

アポトーシス細胞死および非アポトーシス細胞死を阻害する能力について最も知られている Akt をモニタリングして、抗癌治療に対する腫瘍の応答を予測することができる。アポトーシス細胞死および非アポトーシス細胞死への影響を評価することにより腫瘍応答を予測することによって、抗癌治療の治療効果を増強させるためのより有効な方法を開発することが可能になるであろう。抗癌治療で誘導されるアポトーシスはミトコンドリアを介したアポトーシス誘導タンパク質と抗アポトーシスタンパク質との均衡によって調節され、アポトーシスに対する抵抗性は Akt 依存および Bcl-2 依存の経路によって媒介される。Bcl-2 は非アポトーシスの細胞死ならびにアポトーシスを部分的に阻害する一方、Akt は、いくつかの標的タンパク質を介してアポトーシス細胞死および非アポトーシス細胞死の双方を阻害する。薬物感受性は、抗癌治療における腫瘍応答全体に影響を及ぼし得るアポトーシス細胞死および非アポトーシス細胞死の蓄積に相関していると思われる。いくつかの重要な細胞死関連タンパク質の変調から腫瘍応答全体を予測することができることで、治療効果を改善するためのより有効な方法がもたらされ得る。

20

30

【0275】

Akt1 は、上皮細胞が線維芽細胞様タンパク質特性を獲得して細胞間接着の減少および運動性の増加を示す発達および発癌中の重要な過程である上皮間充織転移 (EMT) にも関与している。AKT は多くのヒト癌腫で活性化され、AKT によって駆動された EMT は組織侵襲および転移に必要な運動性を与えることができる。したがって、AKT 阻害に基づいた将来的な療法は、腫瘍細胞の侵襲および転移を制御することによって従来の治療を補うことができる。Akt はほとんどの黒色腫細胞系および異なる進行段階の腫瘍試料で構成的に (constitutively) 活性化され、AKT の活性化は侵襲 / 転移に関連する黒色腫細胞接着分子 (MecAM) の発現に繋がっており、今度はそれがヒト黒色腫による悪性疾患の獲得に強く関連している。Akt1 は膵臓癌でも活性化され、AKT 活性化はより高い組織学的腫瘍の進行度 (grade) に関連することが示されている。したがって、AKT 活性化は、重要な予後因子である腫瘍の進行度に関係している。Akt1 は前立腺癌でアップレギュレートされ、その発現は腫瘍の進行に相関している。したがって、Akt1 は、早期に癌の治療介入の標的になり得る。一部の実施形態では、本発明のアナライザーシステムは、Akt1 のレベルが約 100、50、または 25 pg/ml 未満のときに患者から得られた試料中 Akt1 の存在または濃度を判定することにより、癌の早期診断を提供するための方法を提供する。実施例 6 を参照されたい。

40

【0276】

50

8. Fas リガンド

CD95Lとしても知られるFas リガンド (FasL) は、TNFファミリーのメンバーであり、Fas (CD95) への結合を介してアポトーシスを誘導する。タンパク質は、2つの形態である膜FasLまたは可溶性FasLのいずれかで存在し、それぞれ45 kDaと26 kDaの分子量で移動する。FasLは、活性化されたリンパ球、ナチュラルキラー細胞および単球などの種々の細胞上に発現する。FasLとFasとの相互作用は、生理学的アポトーシス過程で重要な役割を果たしている。Fas-FasL系の機能不全は、末梢リンパ腫臓器における過形成を引き起こし、自己免疫疾患の進行および腫瘍形成を促進する。一般論としての可溶性アポトーシス因子のレベル、より具体的には治療計画によるそれらの変調についての限定的なデータがある。

10

【0277】

本発明のシステムおよび方法により、2.4 pg/mlの低さのFas リガンド濃度を検出することができる。したがって、一部の実施形態では、本発明のアナライザーシステムおよび方法は、異常レベルのアポトーシスなどの病態を同定するためにFas リガンドの検出を提供する。患者試料中のFasの測定を用いて、多嚢胞性卵巣症候群などの病態、精巣生殖細胞腫などの腫瘍、膀胱癌、肺癌、および小胞樹状突起細胞腫などの稀少な腫瘍を診断することができる。さらに、Fas リガンドのFas測定は、同種移植拒絶および変形性関節炎などの変性疾患を診断するのに用いることができる。したがって、一部の実施形態では、本発明のアナライザーシステムおよび方法は、Fas リガンド関連障害を罹っていることが疑われる患者から得られる試料中のFas リガンドの濃度を決定して疾患を診断するために用いることができ、あるいはFas リガンドの濃度を用いて、障害の治療を受けている患者でのFas リガンド関連障害の進行または状態をモニタリングすることができる。一部の実施形態では、アッセイは、約100、50、25、10、または5 pg/ml未満の濃度の試料中のFas リガンドレベルを決定することができる。実施例8を参照されたい。

20

【0278】

C. ビジネス方法

本発明は、生物における生物学的状態または病態の診断に使用できるマーカーを確立し、このようなマーカーに基づいた診断法を提供し、このような診断法を利用して診断法およびサービスを商品化/マーケティングするためのシステムおよび方法（ビジネス方法を含む）に関する。

30

【0279】

一実施形態では、本明細書におけるビジネス方法は、1つ以上のマーカーの単一分子の検出により生物学的試料中の前記1つ以上のマーカーの濃度を測定することによって第1の集団から得られた生物学的試料中の1つ以上のマーカーの濃度範囲を確立することを含む方法を用いて、1つ以上のマーカーを確立する工程と；上記の工程で同定された1つ以上のマーカーを例えば診断用製品で商品化する工程とを含む。同定されるバイオマーカーは、ポリペプチドまたは小分子であることが好ましい。このようなポリペプチドは従前に既知であっても、既知でなくてもよい。本明細書における診断用製品は、マーカー（例えばポリペプチド）に特異的に結合する1つ以上の抗体であってもよい。

40

【0280】

一実施形態では、本明細書におけるビジネス方法は、前記マーカーの単一分子の検出により生物学的試料のマーカーの濃度を測定することによって第1の集団から得られた生物学的試料中のマーカーの濃度範囲を確立することを含むシステムを用いて、1つ以上のマーカーを確立する工程と；生物が対象の生物学的状態または病態を有しているか否かを判定するための診断サービスを提供する工程とを含む。本明細書における診断サービスは、事業下でライセンス認可されているかまたは事業自体であるC L I A承認試験室により提供することができる。本明細書における診断サービスは、医療提供者、医療保険業者、または患者に直接提供することができる。したがって、本明細書におけるビジネス方法により、診断サービスまたは診断用製品の販売などから収益を得ることができる。

50

【0281】

本明細書におけるビジネス方法は、例えば、医療提供者、保険業者、または患者に対する診断サービスの提供も企図している。本明細書におけるビジネスは、サービス用の試験室に外注に出すことによるか、あるいはサービス用の試験室を設置すること（臨床実験改善修正法（CLIA）または他の監督承認の下で）により、診断サービスを提供することができる。次いで、このようなサービス用の試験室は、特定のマーカーまたはマーカーパターンが試料中にあるかを確認するために本明細書に開示された方法を実施することができる。

【0282】

1つ以上のマーカーは、ポリペプチドもしくは小分子または新規の化学物質である。

10

【0283】

キット

本発明はさらにキットを提供する。一部の実施形態では、キットは、前述のようなアナライザーシステムおよび標識を含む。本発明のキットは、適切なパッケージングで本明細書に記載にしたマーカーなどの分子の高感度検出に有用な1つ以上の組成物を含む。一部の実施形態では、本発明のキットは、本明細書に記載された標識を使用説明書、試薬、または他の構成要素などの他の構成要素とともに提供する。一部の実施形態では、キットは、消費者による使用前のアタッチメントため、別個の容器に抗体または蛍光部分などの標識を別個の構成要素として提供する。一部の実施形態では、本発明のキットは、マーカーなどの分子に特異的な結合相手の対（例えば抗体の対）を提供し、結合相手の少なくとも1つは本明細書に記載されたマーカーのための標識である。一部の実施形態では、抗体などの結合相手は別個の容器で提供される。一部の実施形態では、抗体などの結合相手は同一の容器で提供される。一部の実施形態では、抗体などの結合相手の1つは、マイクロタイタープレートまたは磁気ビーズなどの固体支持体上に固定される。これらの一部の実施形態では、抗体などの他の結合相手は本明細書に記載された蛍光部分によって標識される。

20

【0284】

キットの構成要素としての抗体などの結合相手、固体支持体、および蛍光標識は、本明細書に記載されたような任意の好適な構成要素であり得る。

【0285】

キットは、本発明の方法に有用な試薬、例えば、緩衝液および結合反応に用いられる他の試薬、洗浄液、アッセイが行われる機器を予め整調しておくための緩衝液または他の試薬、濾過剤用フィルター、および機器に試料を流すための溶出用緩衝液または他の試薬をさらに含む。

30

【0286】

キットは、本発明のアッセイに使用するための標準品などの1つ以上の標準品（例えば、高精製の組換えタンパク質のマーカーまたは種々の断片や複合体などの標準品など）を含むことができる。キットは、使用説明書をさらに含むことができる。

【0287】

以下の実施例は例示としてのみ提供し、残りの開示を限定する意図はない。

40

【0288】

別に明記しない限り、実施例における試料処理は、以下のパラメータを有する本明細書に記載された単一分子検出器（SMD）で分析した：レーザー：およそ2ミクロンのスポットサイズ（本明細書で画定した0.004 pLのインターロケーション空間）に集束させる波長639 nmの連続波亜ヒ酸ガリウムダイオードレーザー（Blue Sky Research、カリフォルニア州ミルピタス）；流速＝5マイクロリットル/分で100ミクロン平方IDおよび300ミクロン平方ODの溶融石英キャピラリーを通過させる；非共焦点配置のレンズ（例えば、図1Aを参照）；0.8開口数の集束レンズ（Olympus）；シリコンAPD検出器（Perkin Elmer、マサチューセッツ州ウォルサム）。

50

【実施例 1】

【0289】

バイオマーカーのサンドイッチアッセイ：心筋トロポニン I (cTnI)

アッセイ：このアッセイの目的は、ヒト血清中の心筋トロポニン I (cTnI) の存在を検出することであった。アッセイ様式は、マウスモノクローナル捕捉抗体およびヤギポリクローナル検出抗体に基づいた二工程 (two-step) サンドイッチイムノアッセイであった。10 マイクロリットルの試料を要した。アッセイの作用範囲は 0 ~ 900 pg/ml であり、1 ~ 3 pg/ml の検出が典型的な分析限界である。アッセイの完了には約 4 時間のベンチ時間 (bench time) を要した。

【0290】

材料：下記の手順において、以下の材料を用いた：アッセイプレート：Nunc Maxi sorp、製品 464718、384 ウェル、透明、モノクローナル抗体 BiosPacifific A34440228P、ロット番号 A0316 で受動コーティング (0.05 M の炭酸ナトリウム中 5 µg/ml、pH 9.6、室温で一晩)；PBS 中の 5% スクロース、1% BSA によりブロック、4℃ で保存。標準曲線には、ヒト心筋トロポニン (BiosPacifific カタログ番号 J34000352) を用いた。標準濃度用の希釈液は、内在性 cTnI を免疫除去したヒト血清であり、アリコートし、-20℃ で保存した。標準品の希釈は、96 ウェル、円錐形、ポリプロピレン (Nunc 製品番号 249944) 内で行った。以下の緩衝液および溶液を用いた：(a) アッセイ用緩衝液：1% の BSA および 0.1% の Triton X-100 を含む BBS；(b) 2 mg/ml のマウス IgG (Equittech Bio)；2 mg/ml のヤギ IgG (Equittech Bio)；および 2 mg/ml の MAK33poly、Roche #11939661 を含有するアッセイ用緩衝液中の受動ブロッキング溶液 (passive blocking solution)；(c) 検出用抗体 (Ab)；ヤギポリクローナル抗体をペプチド 3 に対してアフィニティー精製し (BiosPacifific G129C)、これを蛍光色素 AlexaFluor 647 で標識し、4℃ で保存；検出用抗体希釈液：50% のアッセイ用緩衝液、50% の受動ブロッキング溶液；洗浄用緩衝液：ホウ酸緩衝生理食塩水 Triton 緩衝液 (BBST) (1.0 M のホウ酸塩、15.0 M の塩化ナトリウム、10% の Triton X-100、pH 8.3)；溶出用緩衝液：4 M の尿素、0.02% の Triton X-100、および 0.001% の BSA を含む BBS。

【0291】

AlexaFluor 647 標識抗体の調製：まず、400 µL のカップリング用緩衝液 (0.1 M の NaHCO₃) 中に 100 µg の検出用抗体の G-129-C を溶解することによって、検出用抗体の G-129-C を AlexaFluor 647 に共役させた。次いで、抗体溶液を YM-30 フィルター内に移し、溶液およびフィルターを遠心分離に供することによって抗体溶液を 50 µl に濃縮した。次いで、400 µl のカップリング用緩衝液を加えることにより、YM-30 フィルターおよび抗体を 3 回洗浄した。50 µl をフィルターに加え、フィルターを逆位にし、5,000 × g で 1 分間遠心分離することにより、抗体を回収した。得られた抗体溶液は、1 ~ 2 µg/µl であった。20 µl の DMSO を AlexaFluor 647 の 1 つのバイアルに加えることにより、AlexaFluor 647 NHS エステルを再構成し、この溶液を最大 1 ヶ月間 -20℃ で保存した。3 µl の AlexaFluor 647 ストック溶液を抗体溶液に加え、次いでこれを混合し、暗所で 1 時間インキュベートした。1 時間後、抗体 AlexaFluor 647 溶液に 1 M の Tris 7.5 µl を加え、混合した。溶液を YM-30 により限外濾過して低分子量成分を除去した。AlexaFluor 647 に共役した抗体を含有する濃縮水の容量を PBS を加えることによって 200 ~ 400 µl に調整した。3 µl の 10% NaCN を溶液に加え、得られた溶液を Ultrafree 0.22 遠心分離ユニットに移し、12,000 × g で 2 分間回転させた。共役した抗体を含有する溶液を回収し、アッセイに用いた。

【0292】

手順：c T n I 標準品および試料の調製および分析：

標準曲線は以下の通りに作成した：c T n I のストックを標準希釈液へと連続希釈することにより、あるいは $1.2 \text{ pg/ml} \sim 4.3 \text{ pg/ml}$ の c T n I 濃度の範囲に達するように、作用標準品を調製した ($0 \sim 900 \text{ pg/ml}$)。

【0293】

$10 \mu\text{l}$ の受動ブロッキング溶液および $10 \mu\text{l}$ の標準品または試料を各ウェルに加えた。標準品は四つずつ (in quadruplicate) 実施した。プレートを A x y s e a l 密封フィルムで密封し、 3000 RPM で1分間遠心分離し、振とうさせながら 25°C で2時間インキュベートした。プレートを5回洗浄し、ローターが 3000 RPM に達するまで逆にした位置でペーパータオル上で遠心分離した。検出抗体の 1 nM 作用希釈液を調製し、 $20 \mu\text{l}$ の検出抗体を各ウェルに加えた。プレートを密封し、遠心分離し、振とうさせながらアッセイを 25°C で1時間インキュベートした。1ウェル当たり $30 \mu\text{l}$ の溶出用緩衝液を加え、プレートを密封し、アッセイを 25°C で $1/2$ 時間インキュベートした。プレートを分析前に 4°C で最大48時間保存するか、試料を直ちに分析した。

10

【0294】

分析では、1ウェル当たり $20 \mu\text{l}$ を $40 \mu\text{l}/\text{分}$ で捕捉し、 $5 \mu\text{l}$ を $5 \mu\text{l}/\text{分}$ で分析した。データは4シグマの閾値に基づいて分析した。手を加えていないシグナルと標準品濃度とをプロットした。低濃度範囲に対して線形適合を行い、完全標準曲線に対して非線形適合を行った。検出限界 (LOD) は、 $\text{LOD} = (3 \times \text{ゼロ標準偏差}) / \text{線形適合勾配}$ として算出した。試料の濃度を試料シグナルに適した等式 (線形または非線形) から決定した。

20

【0295】

アリコートのアナライザーにポンプ注入した。レーザー励起後に画定された空間においてたった1つの蛍光標識の発光が検出されるようにインタロゲーション体積を設定することによって、キャピラリーフローの間に個々に標識した抗体を測定した。各シグナルはデジタル事象を表しているが、この構成によって極めて高い分析感度が可能になる。蛍光シグナルの合計は、個々のデジタル事象の合計として判定される。計数された各分子は、数百から数千の D M C 事象 / 試料を有する陽性データポイントである。本発明の c T n I アッセイの検出限界は平均 + 3 SD 法によって決定した。

【0296】

30

結果：アッセイプロトコルを用いて四つずつ測定された典型的な c T n I 標準曲線に関するデータを表3に示す。

【0297】

【表 8】

表 3
c T n I に関する標準曲線

cTnI (pg/ml)	シグナル	標準偏差	% CV
0	233	25	10.8
1.5625	346	31	8.9
3.125	463	35	7.5
6.25	695	39	5.6
12.5	1137	61	5.3
25	1988	139	7.0
50	3654	174	4.8
100	5493	350	6.4
200	8264	267	3.2
400	9702	149	1.5
800	9976	50	0.5

10

20

【 0 2 9 8 】

アナライザーシステムの感度は 15 回の実施で試験され、表 4 に示されるように、サブ (sub) フェムトモル / l (f M) のレベルのキャリブレーターを検出することが決まって見出された。精度は、4 p g / m l および 12 p g / m l の c T n I で 10 % であった。

【 0 2 9 9 】

【表 9】

表 4
機器の感度

キャリブレーター (fM)	シグナルカウント	CV
0	11	
12	302	9
60	1341	8
300	4784	7

30

【 0 3 0 0 】

c T n I の濃度範囲に関する線形化標準曲線は、図 5 に示されている。

【 0 3 0 1 】

検出の分析限界 (L o D) は、15 の連続アッセイにより決定された。L o D は、0 標準品 + 3 S D (n = 4) アッセイ内測定値の平均である。平均 L o D は、1 . 7 p g / m l (範囲 0 . 4 ~ 2 . 8 p g / m l) であった。

40

【 0 3 0 2 】

試料の回収は、c T n I を免疫除去し、かつ、既知量の c T n I でスパイクした血清の試料を分析することによって判定した。表 5 は、3 日間にわたって分析したシステムによる試料回収に関するデータを示す。

【 0 3 0 3 】

【表 10】

表 5
試料回収

スパイク (pg/ml)	回収 (平均)	標準偏差	% CV
5	5.7	0.9	16
15	13.7	0.2	2
45	43	0.6	2
135	151	6.2	4

10

【0304】

アッセイの線形性は、c T n I でスパイクし、かつ、標準品希釈液で希釈したヒトプール血清において判定した。表 6 の結果は、希釈および対応する希釈液について予想されるシグナルの % を示している。

【0305】

【表 11】

表 6
アッセイ線形性

血清希釈	予想値, %
1:2	79
1:4	87
1:8	96

20

【0306】

これらのデータは、本発明のアナライザーシステムが、サブ(sub)-フェムトモルの濃度の c T n I について高感度のレーザー誘導イムノアッセイの実施を可能にすることを示している。

【実施例 2】

30

【0307】

T n I のサンドイッチビーズベースアッセイ

上記のアッセイでは、同じマイクロタイタープレート形式が用いられ、標的分子を固定するのにプラスチック表面が用いられている。単一粒子アナライザーシステムは、未結合物質からの結合物質の分離を達成するためにマイクロ粒子またはビーズを用いた溶液中で実施されるアッセイにも適合する。

【0308】

材料: My One Streptavidin C1 マイクロ粒子 (MPs) は、Dyna1 (650.01~03、10 mg/ml のストック) から得る。アッセイに使用される緩衝液には、10×ホウ酸緩衝生理食塩水 Triton 緩衝液 (BBST) (1.0 M のホウ酸、15.0 M の塩化ナトリウム、10% の Triton X-100、pH 8.3); アッセイ用緩衝液 (0.1 M の Tris (pH 8.1) 中の 2 mg/ml の正常ヤギ IgG、2 mg/ml の正常マウス IgG、および 0.2 mg/ml の MAB-33-IgG-ポリマー、0.025 M の EDTA、0.15 M の NaCl、0.1% の BSA、0.1% の Triton X-100、および 0.1% の NaN₃、4 で保存); および溶出用緩衝液 (4 M の尿素、0.02% の Triton X-100、および 0.001% の BSA を含む BBS、2~8 で保存) が含まれる。サンドイッチビーズベースのアッセイに使用される抗体には、Bio-Ab (IgG 1 個当たり 1~2 個のビオチンを含む A34650228P (BiosPacifc)) および Det-Ab (A647 に共役した G-129-C (BiosPacifc)、IgG 1 個当たり、2~4

40

50

個の蛍光体)。標準品は組換えヒト心筋トロポニンI (Bio s P a c i f i c、カタログ番号J 3 4 1 2 0 3 5 2)である。キャリブレーター希釈液は、30 mg / ml のT B S w E D T A 中のB S A である。

【0309】

マイクロ粒子コーティング：エッペンドルフ管内に100 μ l のM P s ストックを入れる。磁石を適用することで100 μ l のB B S T 洗浄用緩衝液でM P s を3回洗浄し、上澄み液を除去し、磁石を除去し、洗浄用緩衝液中に再懸濁する。洗浄後、M P s を100 μ l のアッセイ用緩衝液中に再懸濁し、15 μ g のB i o - A b を加える。次いで、混合物を継続的に混合しながら、室温で1時間インキュベートする。上記の通り1 ml の洗浄用緩衝液でM P s を5回洗浄する。洗浄後、M P s を15 ml のアッセイ用緩衝液中に再懸濁する(または4 の保存には100 μ l)。

10

【0310】

標準品および試料の調製：標準品をキャリブレーター希釈液で希釈し、適切な標準曲線を作成する(通常、200 pg / ml から0.1 pg / ml)。凍結した血清および血漿の試料を13 K r p m において室温で10分間遠心分離する必要がある。清澄な血清/血漿をなり得るペレットまたは浮遊物とならないように慎重に取り出し、新鮮な管に入れる。各標準品または試料50 μ l を適当なウェル内にピペットで入れる。

【0311】

捕捉標的：150 μ l のM P s (アッセイ用緩衝液+400 mM のN a C l の15 ml 中に再懸濁後)を各ウェルに加える。混合物を、J i t t e r B u g , 5 上において室温で1時間インキュベートする。

20

【0312】

洗浄および検出：プレートを磁石上に置き、すべてのM P s が磁石により捕捉されていることを確認後、上澄み液を除去する。プレートを磁石から取り外した後、250 μ l の洗浄用緩衝液を加える。次いでプレートを磁石上に置き、すべてのM P s が磁石により捕捉されていることを確認後、上澄み液を除去する。1ウェル当たり20 μ l のD e t - A b を加える(500 ng / ml へD e t - A b をアッセイ用緩衝液+400 mM のN a C l 中で希釈)。混合物を、J i t t e r B u g , 5 上において室温で30分間インキュベートする。

【0313】

30

洗浄および溶出：プレートを磁石上に置き、洗浄用緩衝液で3回洗浄する。すべてのM P s が磁石により捕捉されていることを確認後、上澄み液を除去し、250 μ l の洗浄用緩衝液を加える。洗浄後、試料を新しい96ウェルプレート内に移す。次いで新しいプレートを磁石上に置き、すべてのM P s が磁石により捕捉されていることを確認後、上澄み液を除去する。磁石からプレートを取り外した後、250 μ l の洗浄用緩衝液を加える。次いでプレートを磁石上に置き、すべてのM P s が磁石により捕捉されていることを確認後、上澄み液を除去する。次いで、20 μ l の溶出用緩衝液を加え、混合物を、J i t t e r B u g , 5 上において室温で30分間インキュベートする。

【0314】

40

M P s をろ過で取り除き、384ウェルプレートに移す：標準品および試料を、384ウェルアッセイプレートの上部に置いた384ウェルフィルタープレート内に移す。次いで、プレートをプレートローターを用いて3000 r p m で室温で遠心分離する。フィルタープレートを取り外し、好適なキャリブレーターを加える。プレートを被覆して、S M D で実施する準備をする。

【0315】

S M D : アリコートアナライザー内にポンプ注入する。レーザー励起後、画定された空間にたった1つの蛍光分子の発光が検出されるようにインターロゲーション体積を設定することによって、キャピラリーフローの間に個々に標識した抗体を測定する。各シグナルはデジタル事象を表しているが、この構成によって極めて高い分析感度が可能になる。蛍光シグナルの合計は、個々のデジタル事象の合計として判定される。計数された各分子

50

は、数百から数千のDMC事象/試料を有する陽性データポイントである。本発明のcTnIアッセイの検出限界は、平均+3SD法によって決定した。

【実施例3】

【0316】

正常非疾患対象集団におけるcTnIの濃度範囲

明らかに健康な対象（非疾患）88人から得た血清試料を用いて、ヒト血清中のcTnI濃度の参照範囲または正常範囲を確立した。実施例1に記載されたサンドイッチアッセイを行い、本発明の単一粒子アナライザーシステムを用いて上記のシグナルまたは事象の数を計数した。血清トロポニンIの濃度は、アナライザーによって検出されたシグナルを上記の標準曲線と関連させることによって決定した。アッセイはすべて四つずつ実施した。

10

【0317】

現在の欧州米国心臓病学学会（ESC/ACC）による推奨に従い、トロポニンアッセイは、ACS患者と虚血性心疾患に罹っていない患者との間を高い信頼性で識別するために10%未満のアッセイ不正確度（assay imprecision）（CV）により、かつ、心臓有害事象の危険度を層別化して、正常範囲の99パーセンタイルを正確に定量化しなければならない。TnIの生物学的閾値（カットオフ濃度）は7pg/mlのTnI濃度であることがアッセイによって示され、これは対応する10%のCVで99パーセンタイルにおいて確立される（図5）。10%CVレベルにおいて、精度プロファイルは4pg/mlおよび12pg/mlのTnI濃度を指している。

20

【0318】

さらに、アッセイは、米国国立標準技術研究所により提供されたトロポニンI標準品測定値と十分に相関している（図6）。

【0319】

本発明のアッセイは、ESC/ACCの要件を満たすのに十分に高感度かつ正確であり、Koerbinら（Ann Clin Biochem、42：19～23頁（2005））により記載されたアッセイと比較したときに心筋トロポニンIの最も感度が高いアッセイである。本発明のアッセイは、生物学的閾値範囲が111pg/ml～333pg/mlのcTnIであると決定されている現在利用できるアッセイよりも10～20倍高い感度を有する。

30

【実施例4】

【0320】

急性心筋梗塞（AMI）を患っている患者の血液循環内へのTnIの早期放出の検出
試験1：救急部（ED）において胸部痛を示した18人の患者から47個の試料を連続的に得た。これらの患者はすべて非ST上昇ECGを有し、AMIと診断された。18人の患者すべてから得た当初試料中のcTnIの濃度は、救急室へ入る時に市販のアッセイによって<350pg/ml（10%のカットポイント）と決定され、12人は<100pg/ml（99%）パーセンタイルであった。これらの試料は後に同じ市販アッセイを用いて試験され、cTnIについて試験陽性と判定された。実施例1および実施例3に記載される本発明のアッセイに従ってTnIについて同じ血清試料をアッセイし、その結果を市販アッセイを用いて得られた結果と比較した。

40

【0321】

患者が胸部痛を示した時点で血液を初めて採取し（試料1）、引き続き4～8時間の間隔で（12時間目で試料2；16時間目で試料3；24時間目で試料4；30時間目で試料5；36時間目で試料6；42時間目で試料7；および48時間目で試料8）採取した。本発明の方法および現行の市販の方法によって血清を分析し、得られた結果を図7に示す。本発明のアナライザーは患者が胸部痛を示した時点（試料1）でTnIを検出したが、市販のアッセイはずっと後の時点（36時間目での試料6）で初めてcTnIを検出した。試料3におけるTnIの濃度は、本発明のアナライザーを用いて確立した生物学的閾値レベル（7pg/ml、図5を参照）を超えており、試料3がTnIについて陽性であ

50

り、心臓事象の発生を示唆していることを示した。市販アッセイの生物学的閾値は、 11 pg/ml と 333 pg/ml との間にある。したがって試料3は、陽性心臓事象を示すとは考えられないことになる。

【0322】

本発明の方法および組成物は、患者から採取された最初の試料についての結果によって証明されるように、心筋トロポニンレベルに基づいた非常により早い診断および可能な介入を可能にする。最初の市販アッセイのcTnI値が 100 ng/ml と 350 ng/ml の間であった3つのケースでは、本発明の分析方法によつてはすべてがcTnI値について陽性であった（すなわち、 7 pg/ml 以上のcTnI）。最初の市販アッセイのcTnI値が 100 pg/ml 未満であった12のケースでは、5つのケースが本発明のアッセイによって心臓事象について陽性と判定された（すなわち、 7 pg/ml 以上のcTnI）。本発明のアッセイの使用を予測すると、入院試料が試験された際に現行の市販アッセイよりAMIケースが53%多く検出されたであろう。

10

【0323】

試験2：市販アッセイによる試験で陰性であった50の追加血清試料を本発明のアナライザーおよびアッセイを用いて試験した。その結果が図8に示されている。50の試料のうち、36は99%以内にあり、本発明のアッセイによって確立された正常範囲内であると決定された。しかし、市販の「正常」内または非疾患範囲にあると決定された残りの14の試料を試験すると、本発明により確立された生物学的閾値以上であった。

20

【0324】

したがって、本発明の高感度cTnIアッセイは、市販の技術によればcTnIの血清レベルが閾値を下回るの場合に患者における心筋損傷の検出を可能にする。本発明の高感度で正確なcTnIアッセイの使用により、AMIの検出を既存のcTnIアッセイによるよりも早く行うことが可能になり、それによって結果を改善するための適切な診断および早期の医療介入の機会が提供される。

【実施例5】

【0325】

ロイコトリエン E_4 (LTE $_4$)の検出

尿素検体などを用いるアッセイの予備アッセイとして、緩衝液中のロイコトリエン E_4 (LTE $_4$)を定量化するためのアッセイが開発されている。アッセイ形式は、一工程 (one-step) 単一抗体競合イムノアッセイとした。50マイクロリットルの試料を要した。このアッセイの典型的な作用範囲は $0 \sim 300 \text{ pg/ml}$ であり、典型的な検出限界は $2 \sim 3 \text{ pg/ml}$ ($0.1 \sim 0.15 \text{ pg}$ / 試料) であった。アッセイの完了には約4時間のベンチ時間を要した。

30

【0326】

下記の手順において、以下の材料を調製し使用した：Cayman Chemical Leukotriene E_4 (EIA Kit、カタログ番号520411) で提供されるマウス抗ウサギIgGをコーティングしたプレート；LTE $_4$ 標準品ストック（エタノール中 100 ng/ml での精製LTE $_4$ (Cayman Chemical Leukotriene E_4 EIA Kit、カタログ番号520411)）；90mlのナノ純水により1：10に希釈したアッセイ用緩衝液（ $10 \times$ EIA 緩衝液濃縮体 (Cayman Chemical Leukotriene E_4 EIA Kit、カタログ番号520411)）；標準品の希釈用緩衝液（3%のエタノール）；30mlのEIA 緩衝液で希釈した抗LTE $_4$ 抗体（ロイコトリエン E_4 EIA 抗血清 (Cayman Chemical Leukotriene E_4 EIA Kit、カタログ番号520411)）； $31 \mu\text{M}$ のストレプトアビジン - Alexa検出試薬ストック溶液（AlexaFluor（商標）647で標識したストレプトアビジン）；トレーサー（LTE $_4$ - ビオチン結合体）はアナライザーによる検出のために適合化した；1：40に希釈した洗浄用緩衝液（ $400 \times$ 濃縮物 (Cayman Chemical Leukotriene E_4 EIA Kit、カタログ番号520411)）；溶出用緩衝液（4M

40

50

の尿素、0.02%のTriton X-100、および0.001%のBSAを含むホウ酸緩衝生理食塩水、pH 8.3)。最も高感度のアッセイ条件を確認するために、トレーサー(tracer)のマトリクスおよび抗血清の濃度を試験した。

【0327】

標準曲線は以下の通り作成した：100 ng/mlのストックをアッセイ用緩衝液に連続希釈し、0.005 pg/mlと3000 pg/mlとの間の濃度範囲を達成することによって、作用標準品を調製した。アッセイプレートの1ウェル当たり50 µlの標準品(または試料)を加えた。標準品はすべて二つずつ実施した。トレーサーストックをアッセイ用緩衝液により1 pg/mlに希釈することにより、作用トレーサーを調製した。アッセイプレートの1ウェル当たり50 µlのトレーサー(または緩衝液)を加えた。100%のストック(キットの使用説明書に従って作製)をアッセイ用緩衝液に希釈することにより、10%の抗血清作用溶液を調製した。アッセイプレートの1ウェル当たり50 µlの抗血清(または緩衝液)を加えた；プレートを密封し、振とうさせながら25℃で一晩インキュベートした。作用ストレプトアビジン-Alexa検出試薬は、ストックをアッセイ用緩衝液で140 pMに希釈することによって調製した。各ウェルに、15 µlの検出用試薬を加え、プレートを振とうさせながら25℃で30分間インキュベートした。プレートを5回洗浄した。各ウェルに50 µlの溶出用緩衝液を加え、プレートを振とうさせながら25℃で1/2時間インキュベートした。プレートを直ちに使用するか、あるいは分析前に4℃で最大48時間保存した。

【0328】

20 µlをアナライザーに40 µl/分でポンプ注入し、5 µlの試料を5 µl/分で分析した。閾値 = 4シグマおよび0~8ミリ秒の間の相互相関を用いて、データファイルを分析した。標準品について、手を加えていないシグナルと濃度とをプロットし、低範囲の標準品には線形適合を用いた。一方、完全標準曲線については、非線形適合を用いた。検出限界は、LOD = 最大シグナルの80%として算出した(非標的対照)(B/B₀ = 80%における濃度)。試料の濃度は、試料のシグナルに適した等式(線形または非線形)から算出した。

【0329】

LTE4の競合曲線を図9に示す。LODは、80% B/B₀ = 1.5 pg/ml(およそ5 pM)と算出された。市販のキットを用いて実施されるLTE4アッセイは、少なくとも30 pg/mlの濃度で存在する場合にのみLTE4を検出することができる。

【0330】

したがって、アナライザーシステムは、LTE4のレベルを検出して喘息などのLTE4関連障害の存在を疾患発症時に示すためおよび疾患早期の治療介入の必要性について臨床医を注意喚起して臨床結果を改善するために使用することができる。

【実施例6】

【0331】

ヒトAkt1の検出

血清試料中の低レベルのAkt1を定量化するために、サンドイッチイムノアッセイが開発されている。標準曲線は、緩衝タンパク質溶液中に濃縮標準品を希釈することによって作成した。10マイクロリットル(µl)のアッセイ用緩衝液および10 µlの試料または標準品をAkt1に特異的な抗体でコーティングされた384ウェルプレートの各ウェルに加え、2時間インキュベートした。より具体的には、抗体841660(R&D Systems)をNunc Maxisorpプレートおよそ2.5マイクログラム/mlにコーティングした。プレートを洗浄し、AlexaFluor647、2~4蛍光体/IgGで標識された、Akt1に特異的な抗体であるAF1775(R&D Systems)を各ウェルに加えた。1時間のインキュベーション後、プレートを洗浄して未結合の検出抗体を除去した。結合した検出抗体を溶出し、アナライザー機器において測定した。

【0332】

下記のアッセイ手順において、以下の材料を用いた。コーティングされた384ウェルプレート；アッセイ用緩衝液；再懸濁用緩衝液；希釈用緩衝液；標準品希釈液；Akt1標準品；Akt1についての検出用抗体試薬；洗浄用緩衝液（10mMのホウ酸塩、150mMのNaCl、0.1%のTriton X-100、pH8.3）；溶出用緩衝液（0.02%のTriton X-100、および0.001%のBSAを含む4Mの尿素）、「7」に設定したマイクロプレートシェーカー、マイクロプレート洗浄機、プレート遠心分離機、Axyseal密封用フィルム、Axygen製品321-31-051、Nunc穴付き密封テープ、Nunc製品235306。

材料

提供試薬

捕捉抗体：841660（R&D Systems）、2.5マイクログラム/mlでNunc Maxisorpプレート（384ウェルプレート）上にコーティング

アッセイ用緩衝液

再懸濁用緩衝液

希釈用緩衝液

標準品希釈液

Akt1標準品

Akt1に対する検出用抗体試薬であるAF1775（R&D Systems）、AlexaFluor647（2～4の蛍光体/IgG）で標識

他の必要試薬

Triton X-100 洗浄用緩衝液（10mMのホウ酸塩、150mMのNaCl、0.1%のTriton X-100、pH8.3）

溶出用緩衝液（0.02%のTriton X-100および0.001%のBSAを含む4Mの尿素）

「7」に設定したマイクロプレートシェーカー

マイクロプレート洗浄機

プレート遠心分離機

Axyseal密封用フィルム

Axygen製品321-31-051

Nunc穴付き密封テープ、Nunc製品235306

手順

Akt1標準品の調製

0.5mlの再懸濁用緩衝液に標準品を再懸濁、最終濃度 = 170 ng/ml

希釈用緩衝液中、標準品を1：3に希釈 = 57 ng/ml

標準品希釈液中、標準品を1：19に希釈 = 3 ng/ml

標準品希釈液中、連続3倍希釈し、4.1 pg/mlとする

1ウェル当たり10μlのアッセイ用緩衝液を加える

1ウェル当たり10μlの標準品または試料を加える

Axyseal密封用フィルムでプレートを密封する

3000RPMで1分間回転させる

振とうさせながら、25℃で2時間インキュベートする

プレートを5回洗浄する

ペーパータオル上、逆位にしたプレートを3000RPMで1分間回転させる

1ウェル当たり20μlの検出用抗体試薬を加える

Axyseal密封用フィルムでプレートを密封する

ペーパータオル上、逆位にしたプレートを3000RPMで1分間回転させる

振とうさせながら25℃で2時間インキュベートする

プレートを5回洗浄する

ペーパータオル上、逆位にしたプレートを3000RPMで1分間回転させる

1ウェル当たり30μlの溶出用緩衝液を加える

3000RPMで1分間回転させる

Nunc穴付き密封テープで密封し、ローラーで密封を確実にする

振とうさせながら、25℃で1/2時間インキュベートする

プレートは、分析前、4℃で最大48時間保存できる

Zepetx機器で分析する

【0333】

Akt1標準品曲線を以下の通り作成した。4.1pg/mlから170ng/ml Akt1の間の範囲に達するようにAkt1標準品を調製した。各標準品希釈液（または試料）の10μlをアッセイプレートのウェルに加えた。プレートを密封し、振とうさせながら25℃で2時間インキュベートした。プレートを洗浄し、遠心分離乾燥させた。1ウェル当たり20μlの検出用抗体試薬を加え、振とうさせながら25℃で1時間インキュベートした。1ウェル当たり30μlの溶出用緩衝液を加え、振とうさせながら25℃で1/2時間インキュベートすることによって、抗体-Akt1複合体を破壊した。プレートを直ちに用いるか、または分析前に4℃で最大48時間保存した。溶出液をアナライザーにポンプ注入した。

10

【0334】

アッセイプロトコルを用いて四つずつ測定した典型的なAkt1標準曲線に関するデータは表14に示され、グラフ化したデータは図10に示されている。

【0335】

【表12】

20

表14
Akt1に関する標準曲線

Akt1標品濃度 (pg/ml)	平均シグナル	標準偏差	%CV
0	113	16	14
4.1	126	10	8
12.4	133	1	0
37	151	34	22
111	173	15	8
333	350	74	21
1000	733	136	19
3000	1822	243	13

30

【0336】

1000pg/mlの標準品の36の反復試験試料を用いて単一プレート上で試料をアッセイすることにより、アッセイ内精度を試験した。平均シグナルは、%CV=13で1822±243であった。36のゼロ標準品反復試験の平均シグナルに2つの標準偏差を加え、標準曲線から対応するAkt1濃度を算出することにより、アッセイの検出限界（LoD）を決定した。LoDは、25pg/mlと算出された。

40

【0337】

したがって、アナライザーシステムを用いて、Akt1のレベルを検出し、癌などのAkt1関連疾患の有無を判定することができる。

【実施例7】

【0338】

TGF-βの検出

血清中低レベルのTGFβを定量化するために、サンドイッチイムノアッセイが開発されている。標準曲線は、濃縮された標準品を緩衝タンパク質溶液中に希釈することによって作成した。10マイクロリットル（μl）のアッセイ用緩衝液および10μlの試料ま

50

たは標準品を TGF β に特異的な抗体でコーティングされた 384 ウェルプレートの各ウェルに加え、2 時間インキュベートした。プレートを洗浄し、TGF β に特異的な標識された検出用抗体を各ウェルに加えた。1 時間のインキュベーション後、プレートを洗浄して、未結合の検出用抗体を除去した。結合した検出用抗体を溶出させ、アナライザー機器で測定した。

【0339】

下記のアッセイ手順において、以下の材料を用いた。コーティングされた 384 ウェルプレート；アッセイ用緩衝液；標準品希釈液；TGF β 標準品の 10 μ g/ml のストック溶液；TGF β に対する検出用抗体試薬；Triton X-100 洗浄用緩衝液（10 mM のホウ酸、150 mM の NaCl、0.1% の Triton X-100、pH 8.3）；溶出用緩衝液（0.02% の Triton X-100、および 0.001% の BSA を含む 4 M の尿素）。

【0340】

TGF- β 標準曲線を以下の通り作成した。100 ng/ml から 4.1 pg/ml の間の範囲の TGF β に達するように TGF- β 標準品を調製した。10 μ l のアッセイ用緩衝液および 10 μ l の標準品または試料を各ウェルに加えた。プレートを密封し、振とうさせながら 25 で 2 時間インキュベートした。プレートを密封し、振とうさせながら、25 で 2 時間インキュベートした。プレートを洗浄し、遠心分離乾燥させた。1 ウェル当たり 20 μ l の検出用抗体試薬を加え、振とうさせながら 25 で 1 時間インキュベートした。1 ウェル当たり 30 μ l の溶出用緩衝液を加え、振とうさせながら 25 で 1 / 2 時間インキュベートすることによって、抗体-TGF- β 複合体を破壊した。プレートを直ちに用いるか、または分析前に 4 で最大 48 時間保存した。溶出液をアナライザーにポンプ注入した。

【0341】

アッセイプロトコルを用いて四つずつ測定した典型的な TGF- β 標準曲線に関するデータは表 15 に示され、グラフ化したデータは、図 11 に示されている。

【0342】

【表 13】

表 15
TGF- β に関する標準曲線

濃度 (pg/ml)	平均シグナル	標準偏差	%CV
0	1230	114	9
4	1190	68	6
12	1261	132	10
37	1170	158	14
111	1242	103	8
333	1364	135	10
1000	1939	100	5
3000	3604	497	14

【0343】

20 のゼロ標準品反復試験の平均シグナルに 2 つの標準偏差を加え、標準曲線から対応する TGF β 濃度を算出することにより、アッセイの検出限界（LoD）を決定した。LoD = 350 pg/ml。

【0344】

したがって、アナライザーシステムを用いて、TGF β のレベルを検出し、癌のなどの TGF β 関連疾患の有無を判定することができる。

【実施例 8】

【0345】

Fas リガンドの検出

血清中低レベルの Fas リガンドを定量化するためのサンドイッチイムノアッセイ。標準曲線は、緩衝タンパク質溶液中に濃縮標準品を希釈することによって作成した。10 マイクロリットル (μl) のアッセイ用緩衝液および 10 μl の試料または標準品を Fas リガンドに特異的な抗体でコーティングされた 384 ウェルプレートの各ウェルに加え、2 時間インキュベートした。プレートを洗浄し、Fas リガンドに特異的な標識された検出用抗体 20 μl を各ウェルに加えた。1 時間のインキュベーション後、プレートを洗浄して、未結合の検出用抗体を除去した。結合した検出用抗体を溶出させて、Zepet_x 機器において測定した。

10

【0346】

Fas リガンド標準曲線を以下の通り作成した。100 ng/ml から 4.1 pg/ml の間の範囲の Fas リガンドに達するように Fas リガンド標準品を調製した。10 μl のアッセイ用緩衝液および 10 μl の標準品または試料を各ウェルに加えた。プレートを密封し、振とうさせながら 25 ° で 2 時間インキュベートした。プレートを密封し、振とうさせながら 25 ° で 2 時間インキュベートした。プレートを洗浄し、遠心分離乾燥させた。1 ウェル当たり 20 μl の検出用抗体試薬を加え、振とうさせながら 25 ° で 1 時間インキュベートした。1 ウェル当たり 30 μl の溶出用緩衝液を加え、振とうさせながら 25 ° で 1 / 2 時間インキュベートすることによって、抗体 - Fas リガンド複合体を破壊した。プレートを直ちに用いるか、または分析前に 4 ° で最大 48 時間保存した。

20

【0347】

アッセイプロトコルを用いて四つずつ測定した典型的な Fas リガンド標準曲線に関するデータは表 16 に示されている。

【0348】

【表 14】

表 16

Fas リガンドに関する標準曲線

Fas リガンド標品濃度 (pg/ml)	平均シグナル	標準偏差	%CV
0	935	82	9
1.2	1007	44	4
3.4	1222	56	5
11	1587	70	4
33	2869	52	2
100	5939	141	2
300	9276	165	2
900	11086	75	1

30

3 つの標準品の 12 の複製試料を用いて単一プレート上で試料をアッセイすることにより、アッセイ内精度を試験した。3 つのポイントの各々に対する 12 の値の平均、標準曲線、および CV を表 17 に示す。

40

【0349】

【表 15】

表 17
F a s リガンドに関するアッセイ内精度

濃度 (pg/ml)	平均シグナル	標準偏差	%CV
11	1717	128	7
33	3031	262	9
100	6025	257	4

【0350】

10

20のゼロ標準品反復試験の平均シグナルに2つの標準偏差を加え、標準曲線から対応するF a s リガンド濃度を算出することにより、アッセイの検出限界 (L o D) を決定した。L o D は、2 . 4 p g / m l と算出された。

【0351】

したがって、本発明のアナライザーシステムにより、F a s リガンドのレベルを検出して、癌などのF a s リガンド関連疾患、同種移植拒絶、および骨関節炎などの変性疾患の存在を示すことができる。

【実施例9】

【0352】

20

バイオマーカーT R E M - 1のサンドイッチアッセイ

最近の報告により、細菌または真菌感染のバイオマーカーとしてのT R E M - 1が確立されている (例えば、Bouchonら (2000) J . Immunol . 164 : 4991 ~ 5 頁 ; Colonna (2003) Nat . Rev . Immunol . 3 : 445 ~ 53 頁 ; Gibotら (2004) N . Engl . J . Med . 350 : 451 ~ 8 頁 ; Gibotら (2004) Ann . Intern . Med . 141 : 9 ~ 15 頁を参照)。T R E M - 1のアッセイは、サンドイッチアッセイ形式を用いて開発されている (Sandwich Assay for Detection of Individual Molecules、米国特許仮出願60 / 624785)。T R E M - 1検出のためのアッセイ試薬は、市販されている (R & D Systems、ミネソタ州ミネアポリス)。アッセイは96ウェルプレートで行われる。捕捉抗体としてモノクローナル抗体を用い、検出用に他のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれかを用いた。検出用抗体は、AlexaFluor A647 (登録商標) で標識した。

30

【0353】

アッセイプロトコルは以下の通りであった：

- 1 . プレートを捕捉抗体でコーティングし、5回洗浄する。
- 2 . P B S 中1 % B S A、5 % のスクロースにおいて、ブロックする。
- 3 . 血清中で希釈した標的を加え、インキュベートし、5回洗浄する。
- 4 . 検出用抗体を加え、インキュベートし、5回洗浄する。
- 5 . 0 . 1 M のグリシン、p H 2 . 8 を加え、結合したアッセイ成分をプレートから放出させる。
- 6 . 処理用プレートから検出用プレートへ試料を移し、試料のp H を中性にし、単一粒子アナライザーシステム上で実施する。

40

【0354】

図13は、アッセイを用いて作成されたT R E M - 1の標準曲線を示す。アッセイは、100 ~ 1500フェムトモルの測定範囲で線形であった。最近、R & D SystemsからE L I S A アッセイが導入された。それらのE I S A アッセイについて報告された標準曲線は、60 ~ 4000 p g / m l の間である。この実施例は、標準曲線において100 f M (4 . 7 p g / m l) をルーチンで測定することができ、感度が10倍高い測定が可能になることが示唆している。さらに、ケモカイン、T細胞活性化因子、細胞接着分子、およびシグナル伝達分子に関する標準曲線を作成した (図15)。それらの結果は、

50

単一粒子アナライザーを用いる検体検出による検出が、E L I S A アッセイを用いる検出よりも、一致して10倍から100倍より高感度であることを示している。

【実施例10】

【0355】

バイオマーカーに関するサンドイッチアッセイ：血清中I L - 6およびI L - 8のレベル

アッセイ：本プロトコルでは、本発明の単一粒子アナライザーシステムを用いる、血清中の低レベルのI L - 6を定量化するためのサンドイッチイムノアッセイが記載される。濃縮された標準品を緩衝化タンパク質溶液に希釈することによって標準曲線を作成した。10マイクロリットル(μ l)のアッセイ用緩衝液および10 μ lの試料または標準品をI L - 6に特異的な抗体でコーティングされた384ウェルプレートの各ウェルに加え、2時間インキュベートした。プレートを洗浄し、I L - 6に特異的な標識された検出用抗体20 μ lを各ウェルに加えた。1時間のインキュベーション後、プレートを洗浄して、未結合の検出用抗体を除去した。結合した検出用抗体を溶出させて、単一粒子アナライザー機器で測定した。

【0356】

材料：下記の手順において、以下の材料を用いた。コーティングされた384ウェルプレート；アッセイ用緩衝液；標準品希釈液；I L - 6標準品の100ng/mlのストック溶液；A l e x a F l u o r 6 4 7色素で標識された、I L - 6についての検出用抗体(R & D S y s t e m s)；T r i t o n X - 1 0 0洗浄用緩衝液(10mMのホウ酸、150mMのNaCl、0.1%のT r i t o n X - 1 0 0、pH8.3)；溶出用緩衝液(0.02%のT r i t o n X - 1 0 0、および0.001%のBSAを含む4Mの尿素)；「7」に設定したマイクロプレートシェーカー；マイクロプレート洗浄液；プレート遠心分離機；A x y s e a l密封用フィルム、A x y g e n製品321-31-051；およびN u n c穴付き密封テープ、N u n c製品235306。

【0357】

手順：I L - 6標準品および試料の調製および分析

I L - 6に関する標準曲線を以下の通り調製した：100ng/mlのストック溶液を解凍し、0.14pg/mlの最低標準品濃度を有する濃度範囲を得るために、ストック溶液を連続6回の3倍希釈を行うことによって1：1000に希釈して標準品希釈液中100pg/mlとした。10 μ lのアッセイ用緩衝液および10 μ lの標準品または試料を、コーティングされた384ウェルプレートの各ウェルに加えた。プレートをA x y S e a l密封用フィルムで密封し、3000RPMで1分間遠心分離した。プレートを振とうさせながら、25で2時間インキュベートし；5回洗浄し；ペーパータオル上で逆位にしたまま3000RPMで1分間遠心分離した。20 μ lの検出用抗体試薬を各ウェルに加え；プレートをA x y S e a l密封用フィルムで密封し、3000RPMで1分間遠心分離した。アッセイプレートを振とうさせながら25で1時間インキュベートし、5回洗浄し、ペーパータオル上で逆位にしたまま3000RPMで1分間遠心分離した。30 μ lの溶出用緩衝液を各ウェルに加え；プレートをN u n穴付き密封テープで密封し、ローラーで密封を確実にした。アッセイプレートを3000RPMで1分間遠心分離し、振とうさせながら25で1/2時間インキュベートした。アッセイの分析を直ちに行った。あるいは、分析前にプレートを4で最大48時間保存した。

【0358】

32人の血液バンクドナーのE D T A処理全血から得た血清試料をI L - 6について分析した。

【0359】

結果：アッセイプロトコルを用いて四つずつ測定した典型的なI L - 6標準曲線に関するデータを表18に示す。

【0360】

【表 1 6】

表 1 8
I L - 6 に関する標準曲線

濃度 (pg/ml)	平均シグナル	標準偏差	CV
370	11035	206	2%
125	9983	207	2%
41	8522	95	1%
14	5023	108	2%
4.5	2577	124	5%
1.7	1178	114	10%
0.5	577	36	6%
0	106	15	14%

10

【 0 3 6 1】

I L - 6 の高範囲濃度および低範囲濃度の線形化標準曲線をそれぞれ図 1 5 A ~ B に示す。アッセイにより、0 . 5 p g / m l 未満での I L - 6 の検出が可能になる（図 1 4 A ~ B）。検出限界（L o D）は、0 . 0 6 p g / m l と算出された。ゼロ標準品反復試験の平均シグナルに 2 つの標準偏差を加え、標準曲線から対応する I L - 6 濃度を算出することにより、アッセイの検出限界（L o D）が決定された。この感度レベルは、0 . 5 p g / m l と 1 0 p g / m l との間の範囲にある正常レベルの I L - 6 の検出にも優れている。

20

【 0 3 6 2】

血液バンクドナーから得た血液試料の血清中の I L - 6 および I L - 8 を検出するためのアッセイを実施した。この分析の結果を図 1 4 C および D に示す。I L - 6 を 1 0 0 %（3 2 / 3 2）の試料で定量化した。I L - 6 の平均濃度は 2 . 3 p g / m l であり、濃度範囲は 0 . 2 p g / m l から > 2 6 p g / m l であった（図 1 4 C）。基本的には I L - 6 について記載された手順を用いて、I L - 8 についても同じ試料をアッセイした。I L - 8 標準品および I L - 8 に特異的な抗体を用いた。I L - 8 に関する標準曲線を確立し（図示せず）、試料中の I L - 8 濃度を決定するために使用した（図 1 4 D）。I L - 8 を 1 0 0 % の試料（3 2 / 3 2）で定量化した。I L - 8 の平均濃度は 7 . 3 p g / m l であり、濃度範囲は 1 . 2 p g / m l から > 2 6 p g / m l であった。

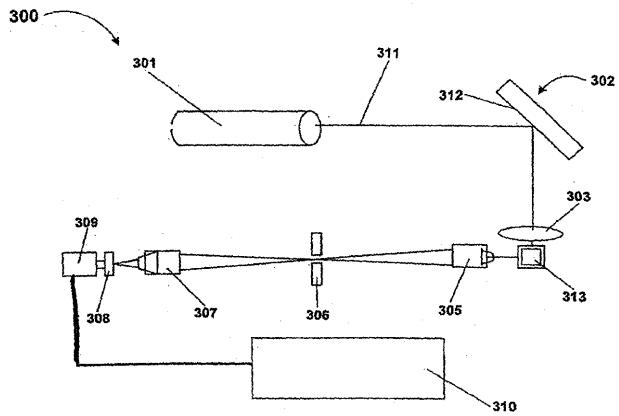
30

【 0 3 6 3】

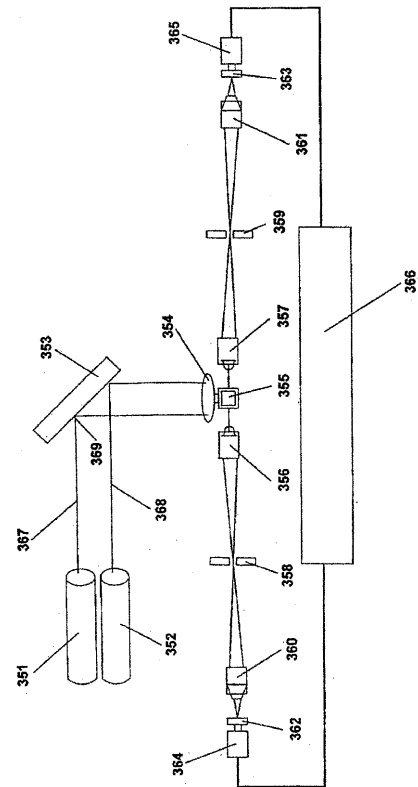
分子（デジタルシグナル）の計数から高濃度の分析物で生成する光子（アナログシグナル）の合計の検出へアナライザーの検出を切り替えることによって、低濃度および高濃度で I L - 6 または任意の対象の粒子の測定を行うことができる（図 1 4 A および B）。これは、図 1 4 E に一般的方法で示されている。単一粒子アナライザーは、6 l o g の拡張線形ダイナミックレンジを有する。試料中の粒子濃度を検出するためにダイナミックレンジを増大させることができることによって、正常レベル（低濃度範囲）および疾患レベル（高濃度範囲）の粒子濃度を決定することが可能になる。I L - 6 の正常レベルおよび疾患レベルの検出範囲を図 1 5 F に示す。

40

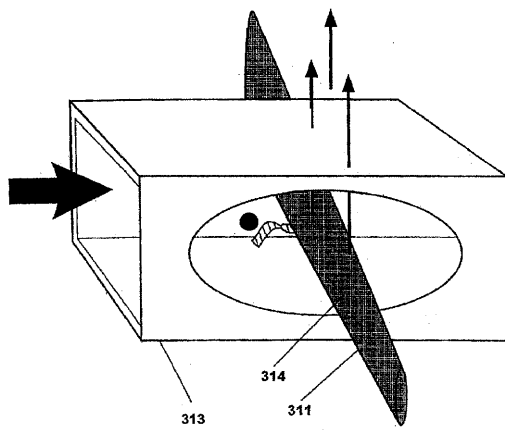
【図 1 A】



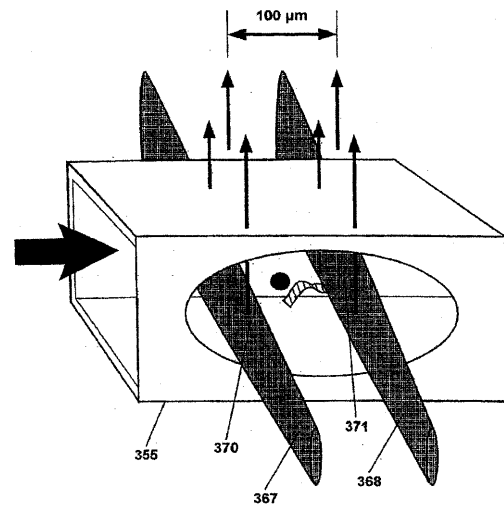
【図 1 B】



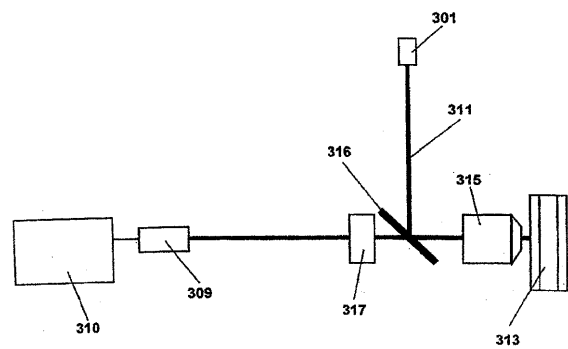
【図 2 A】



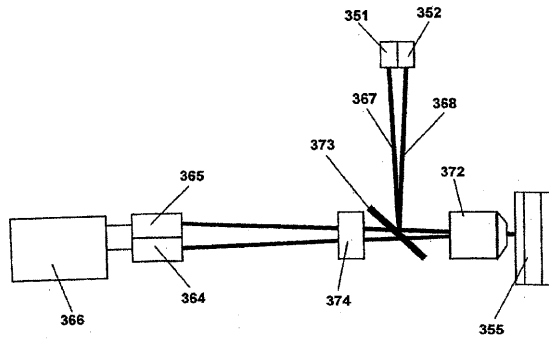
【図 2 B】



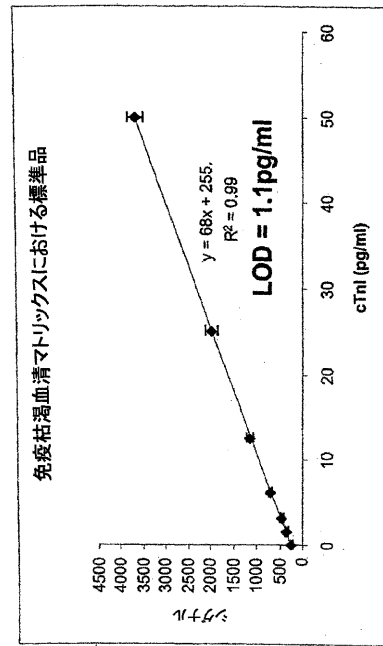
【図 3 A】



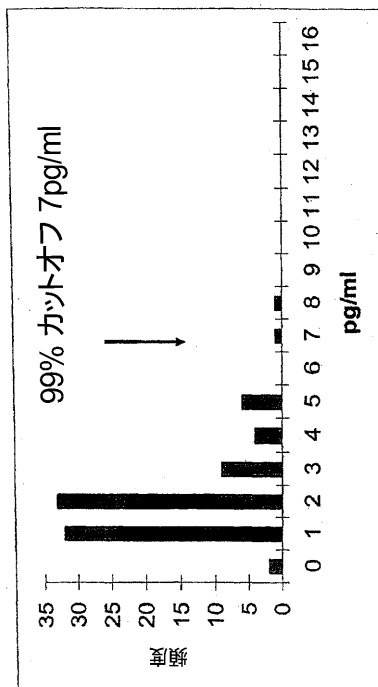
【図 3 B】



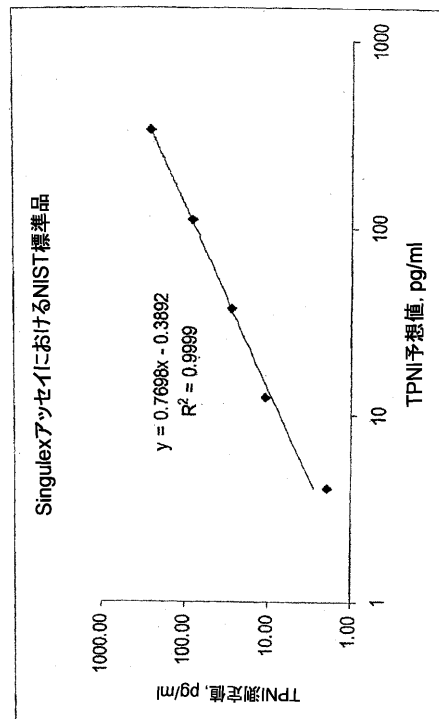
【図 4】



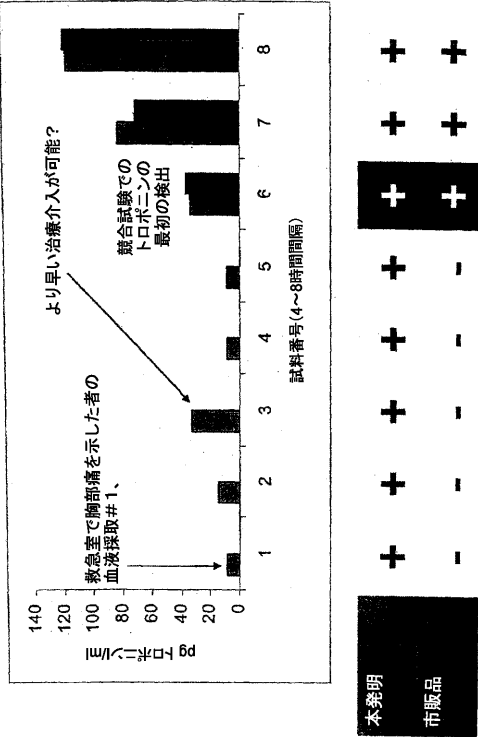
【図 5】



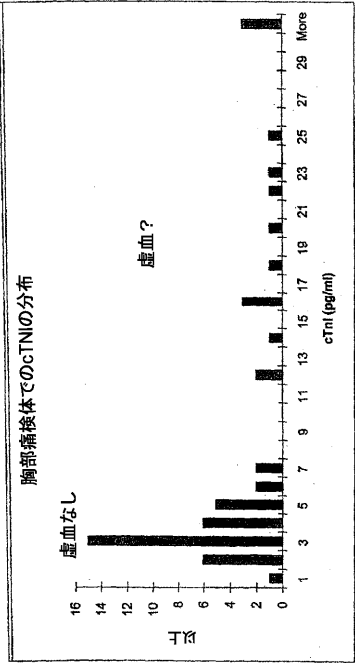
【図 6】



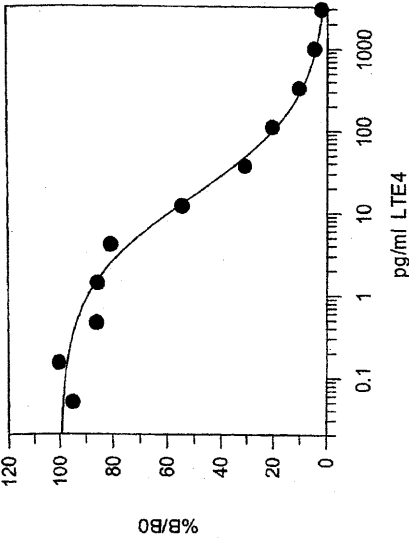
【図 7】



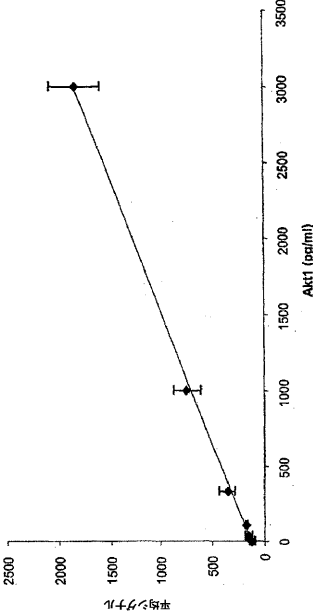
【図 8】



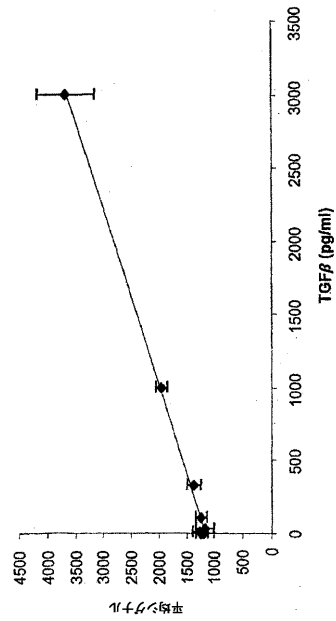
【図 9】



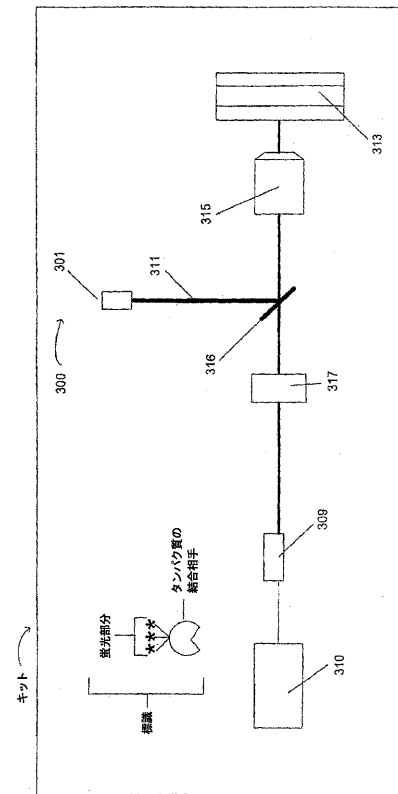
【図 10】



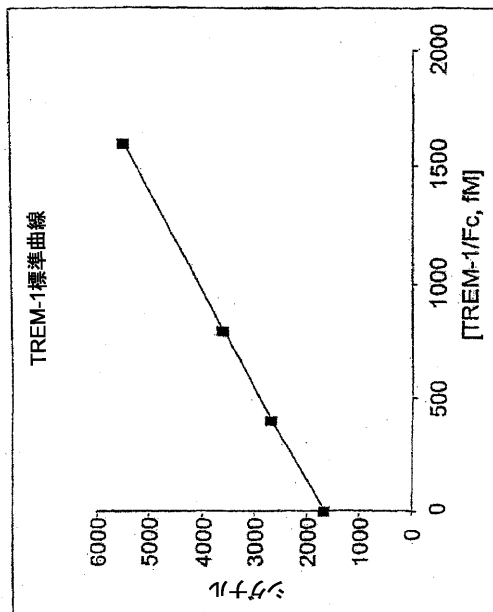
【図 1 1】



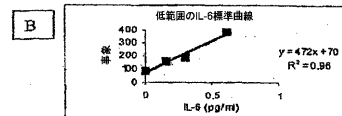
【図 1 2】



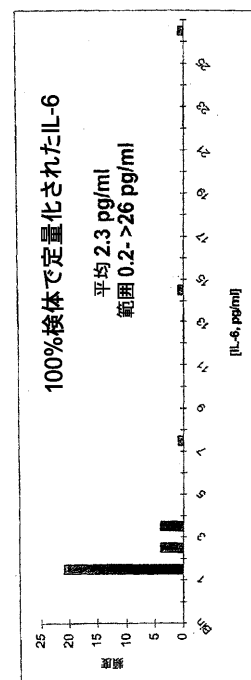
【図 1 3】



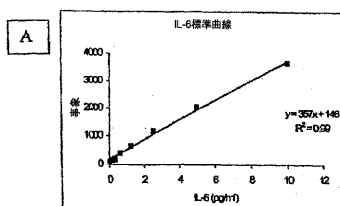
【図 1 4 B】



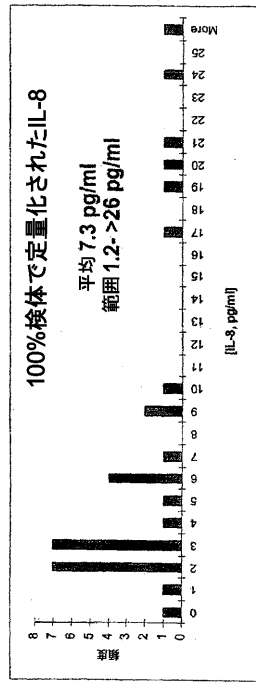
【図 1 4 C】



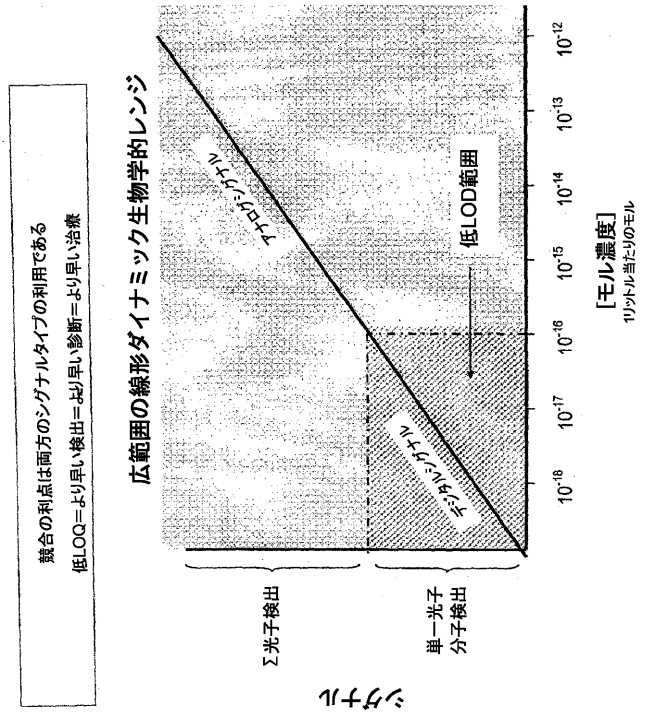
【図 1 4 A】



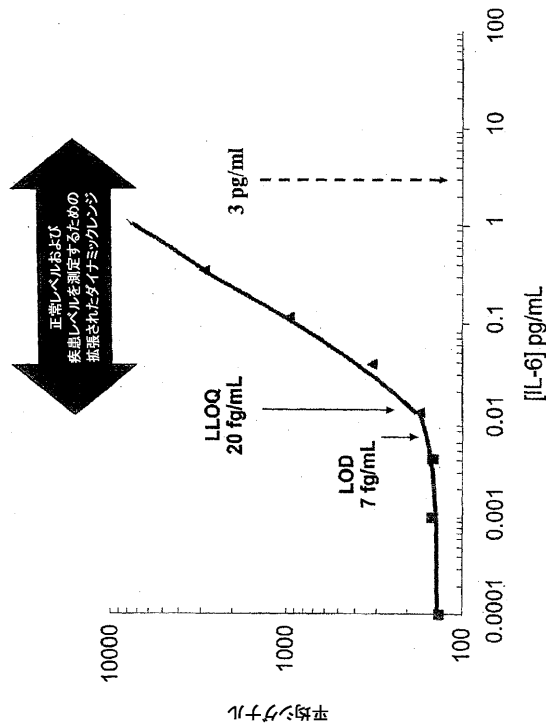
【図 14 D】



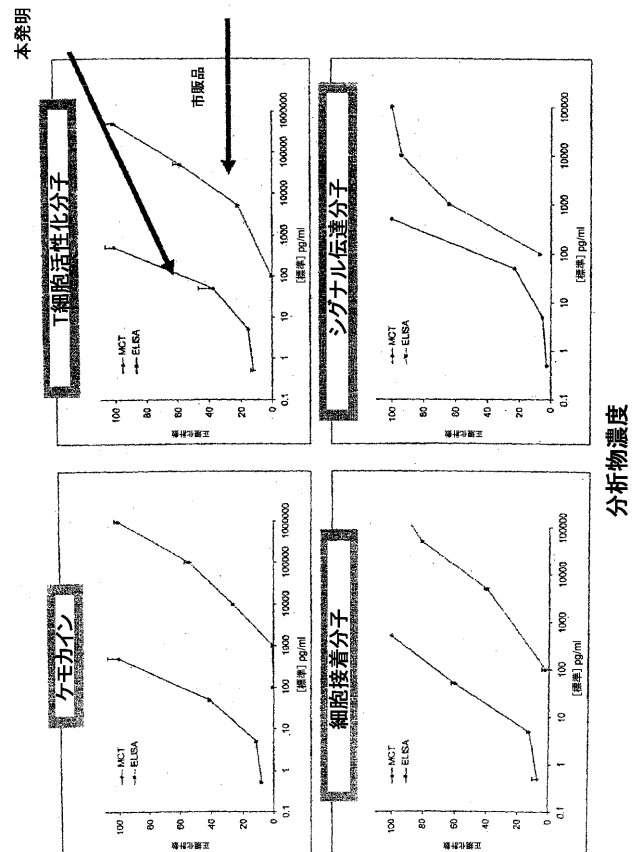
【図 14 E】



【図 14 F】



【図 15】



【手続補正書】

【提出日】平成26年10月28日(2014.10.28)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の分析物の存在又は量を決定するアナライザーであって、

(a) 電磁放射線源であって、当該電磁放射線源からの光線の集束スポットを備えるインタロゲーション空間を確定する電磁放射線を放出する電磁放射線と、

(b) 前記インタロゲーション空間に試料を通過させるためのキャピラリーフローセルと、

(c) 前記インタロゲーション空間に作動可能に接続された電磁放射線検出器であって、複数のピンの間、前記インタロゲーション空間から放出された光子を検出する電磁放射線検出器と、

(d) 前記電磁放射線検出器に作動可能に接続されたプロセッサであって、前記インタロゲーション空間におけるバックグラウンドシグナルに対応する光子閾値を決定し、当該閾値より大きい光子値を有するピンを特定することにより、前記複数のピンのうちの各ピンにおける、前記インタロゲーション空間中の分析物を備えるか、該分析物に対応する、光子を放出する種の存在を決定することにより、前記試料中の分析物の存在又は量を決定するプロセッサと、

を備えるアナライザー。

【請求項 2】

前記光子閾値が前記バックグラウンド光子レベルの関数である、請求項 1 に記載のアナライザー。

【請求項 3】

前記光子閾値が、前記バックグラウンド光子レベルを上回る固定数の標準偏差である、請求項 2 に記載のアナライザー。

【請求項 4】

分子の存在について「イエス」又は「ノー」であるか各ピンが分析されるよう、前記プロセッサが、光子閾値より大きい光子ピン計数を表す検出事象を単一分子と決定する、請求項 1 に記載のアナライザー。

【請求項 5】

前記電磁放射線源が 1 から 20 mW の出力を有するレーザーである、請求項 1 に記載のアナライザー。

【請求項 6】

前記インタロゲーション空間が、0.1 pL と 25 pL との間の体積を有する、請求項 1 に記載のアナライザー。

【請求項 7】

前記光子を放出する種が、電磁エネルギーで刺激されたときに光子を放出する標識を備え、当該標識は前記分析物に特異的な結合相手を備える、請求項 1 に記載のアナライザー。

。

【請求項 8】

前記標識が蛍光部分を更に備える、請求項 7 に記載のアナライザー。

【請求項 9】

ピンが 10 から 2000 マイクロ秒の間を有する、請求項 1 に記載のアナライザー。

【請求項 10】

前記電磁放射線源が連続波電磁放射線源である、請求項 1 に記載のアナライザー。

【請求項 1 1】

前記連続波電磁放射線源が発光ダイオード又は連続波レーザーである、請求項 1 0 に記載のアナライザー。

【請求項 1 2】

前記インタロゲーション空間と前記電磁放射線検出器との間に作動可能に接続された減衰器であって、前記インタロゲーション空間から放出された電磁放射線を受け取る減衰器を更に備え、

1 又は複数のピンで検出された光子の数が飽和閾値を超えたときに、前記プロセッサが、前記インタロゲーション空間からの電磁放射線を減衰させるよう、前記減衰器に指示を出力する、請求項 1 に記載のアナライザー。

【請求項 1 3】

前記プロセッサが、ピンあたりの光子の総数を測定することによって、前記試料における前記分析物の存在又は量を決定する、請求項 1 に記載のアナライザー。

【請求項 1 4】

前記インタロゲーション空間の横断面面積が、前記キャピラリーフローセルの横断面面積より小さい、請求項 1 に記載のアナライザー。

【請求項 1 5】

前記インタロゲーション空間を 1 つだけ含む、請求項 1 に記載のアナライザー。

【請求項 1 6】

前記インタロゲーション空間にレーザー光を屈折させ、刺激された色素分子を画像化するための共焦点光学配置を更に備え、当該共焦点光学配置は少なくとも 0.8 の開口数を有する対物レンズを備える、請求項 1 に記載のアナライザー。

【請求項 1 7】

各ピンの間に前記インタロゲーション空間が受け取る前記電磁放射線源からの全エネルギーが 1 から 10 マイクロジュールである、請求項 1 に記載のアナライザー。

【請求項 1 8】

前記キャピラリーフローセルに前記試料を通過させるための圧力源を更に備える、請求項 1 に記載のアナライザー。

【請求項 1 9】

前記圧力源が、毎分 1 から 20 マイクロリットルの速度で前記キャピラリーフローセルに前記試料を通過させる、請求項 1 8 に記載のアナライザー。

【請求項 2 0】

10 から 500 マイクロ秒の間、前記標識が前記電磁放射線に曝されるよう、前記圧力源が、前記インタロゲーション空間に前記種を通過させる、請求項 1 9 に記載のアナライザー。

【請求項 2 1】

前記電磁放射線源が、1000 マイクロ秒より短い間、蛍光部分を刺激する、請求項 1 に記載のアナライザー。

【請求項 2 2】

ピンの時間が、蛍光部分が前記インタロゲーション空間を通過する時間より長い、請求項 1 に記載のアナライザー。

【請求項 2 3】

複数の試料を自動的に採取し、試料容器と前記インタロゲーション空間の間の流体連通を提供することが可能な試料採取システムを更に備える、請求項 1 に記載のアナライザー。

【請求項 2 4】

アナライザーシステムであって、

請求項 1 ないし 2 1 のいずれか 1 項に記載のアナライザーと、

蛍光部分であって、当該蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺激されるときに少なくとも 200 個の光子を放出することができる蛍光部分と、

を備え、

前記レーザー光が、前記蛍光部分を含む直径約 5 ミクロン以上のスポットに集束され、
前記レーザーによって前記スポットに向けられる全エネルギーが 3 マイクロジュール以下である、

アナライザーシステム。

【請求項 25】

前記蛍光部分の光退色が低い、請求項 24 に記載のシステム。

【請求項 26】

試料中の特異的な結合物質を含む分析物の存在、不在、又は量を決定する方法であって、

前記試料を、前記分析物に特異的な捕捉物質と、蛍光標識された前記分析物に特異的な結合相手と、に接触させ、前記捕捉物質、前記分析物、及び前記標識された蛍光相手を備える複合体を形成させるステップであって、前記捕捉物質が固定化されているか、表面上に固定化されるものである、ステップと、

前記分析物と結合しなかった標識された結合相手を除去するステップと、

前記複合体から前記分析物又は前記標識された結合相手を放出して、分離した標識された結合相手を液中に移動させるステップと、

前記標識された結合相手をアナライザーの検出チャンネルに通すステップであって、前記検出チャンネルは光の少なくともいくつかの波長に対して実質的に透明な部分を備え、前記標識された結合相手がそこを流れ得るチャンネルを提供し、前記光は前記検出チャンネルの前記部分が実質的に透明となる範囲内の波長を有する、ステップと、

インタロゲーション空間を含む前記検出チャンネルの部分内に励起光としての前記光を集束させるステップであって、前記標識された結合相手が前記インタロゲーション空間に存在する場合は、前記光で前記標識された結合相手を励起させ、前記標識された結合相手から放出光を生成させる、ステップと、

区別された複数のピンにおいて、検出器で開口を通過した前記放出光を検出するステップであって、前記検出器が前記光を電気信号に変換する、ステップと、

前記検出器に作動可能に接続されたデータ分析システムによって、前記複数のピンからの前記電気信号を分析することにより、前記試料中の前記分析物の存在、不在、又は量を決定するステップであって、前記データ分析システムが、前記インタロゲーション空間のバックグラウンドシグナルに対応する光子閾値を決定し、前記閾値より大きい光子値を有するピンを特定することにより、前記複数のピンのうちの各ピンにおける、インタロゲーション空間中の前記分析物を備えるか、該分析物に対応する、光子を放出する種の存在を決定することにより、試料中の分析物の存在又は量を決定する、ステップと、

を含む方法。

【請求項 27】

前記光子閾値が前記バックグラウンド光子レベルの関数である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記光子閾値が、前記バックグラウンド光子レベルを上回る固定数の標準偏差である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

分子の存在について「イエス」又は「ノー」であるか各ピンが分析されるよう、光子閾値より大きい光子ピン計数を表す検出事象を単一分子と決定する、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

前記光の電磁放射線源が 1 から 20 mW の出力を有するレーザーである、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 31】

前記インタロゲーション空間が、0.1 pL と 25 pL との間の体積を有する、請求項

2 6 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記光子を放出する種が、電磁エネルギーで刺激されたときに光子を放出する標識を備え、当該標識は前記分析物に特異的な結合相手を備える、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記標識が蛍光部分を更に備える、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

ピンが 1 0 から 2 0 0 0 マイクロ秒の間を有する、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記光の電磁放射線源が連続波電磁放射線源である、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記連続波電磁放射線源が発光ダイオード又は連続波レーザーである、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記アナライザーが、前記インタロゲーション空間と前記検出器との間に作動可能に接続された減衰器であって、前記インタロゲーション空間から放出された電磁放射線を受け取る減衰器を更に備え、

1 又は複数のピンで検出された光子の数が飽和閾値を超えたときに、前記データ分析システムが、前記インタロゲーション空間からの電磁放射線を減衰させるよう、前記減衰器に指示を出力する、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記データ分析システムが、ピンあたりの光子の総数を測定することによって、前記試料における前記分析物の存在又は量を決定する、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記インタロゲーション空間の横断面面積が、前記キャピラリーフローセルの横断面面積より小さい、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記アナライザーが前記インタロゲーション空間を 1 つだけ含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記アナライザーが、前記インタロゲーション空間にレーザー光を屈折させ、刺激された色素分子を画像化するための共焦点光学配置を更に備え、当該共焦点光学配置は少なくとも 0 . 8 の開口数を有する対物レンズを備える、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 4 2】

各ピンの間に前記インタロゲーション空間が受け取る前記電磁放射線源からの全エネルギーが 1 から 1 0 マイクロジュールである、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記アナライザーが、前記検出チャンネルに前記試料を通過させるための圧力源を更に備える、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記圧力源が、毎分 1 から 2 0 マイクロリットルの速度で前記検出チャンネルに前記試料を通過させる、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

1 0 から 5 0 0 マイクロ秒の間、前記標識が前記電磁放射線に曝されるよう、前記圧力源が、前記インタロゲーション空間に前記種を通過させる、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記電磁放射線源が、1 0 0 0 マイクロ秒より短い間、蛍光部分を刺激する、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記標識が蛍光部分であって、当該蛍光部分の励起波長で発光するレーザーによって刺

激されたときに少なくとも 200 個の光子を放出することができる蛍光部分であり、

前記レーザー光が、前記蛍光部分を含む直径約 5 ミクロン以上のスポットに集束され、

前記レーザーによって前記スポットに向けられる全エネルギーが 3 マイクロジュール以下である、

請求項 26 に記載の方法。

【請求項 48】

前記蛍光部分の光退色が低い、請求項 47 に記載の方法。

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 15/14 (2006.01) G 0 1 N 15/14 D
C 0 9 K 11/06 (2006.01) C 0 9 K 11/06

(31) 優先権主張番号 60/861,498
 (32) 優先日 平成18年11月28日 (2006.11.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/872,986
 (32) 優先日 平成18年12月4日 (2006.12.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(72) 発明者 プスカシュ, ロバート
 アメリカ合衆国, ミズーリ州 6 3 0 2 1, マンチェスター, シャーウィック テラス 7 5 2
 (72) 発明者 トッド, ジョン
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 5 4 9, ラファイエット, オーチャード ロード 1 0
 9 6
 (72) 発明者 リビングストン, リチャード
 アメリカ合衆国, ミズーリ州 6 3 1 1 9, ウェブスター グローブス, フローレンス アベニュー
 ー 4 6 8
 (72) 発明者 ヘルド, ダグラス
 アメリカ合衆国, ミズーリ州 6 3 0 2 1, ボールウィン, ウェーザートン プレイス 1 2 1 9

F ターム (参考) 2G043 AA01 AA03 BA14 BA16 CA04 DA01 DA05 DA06 EA01 FA02
 FA07 GA02 GB02 HA01 KA01 KA02 KA03 KA09 LA01 NA11
 2G054 AA07 AB04 AB05 CA21 CB01 CE02 EA03 EB04 EB05 GA01
 GA02 GA03 GA04 GA05 GB02 GE03 GE10 JA06

【外国語明細書】
2015004691000001.pdf

专利名称(译)	用于敏感标记物分析和分子检测的方法和组合物		
公开(公告)号	JP2015004691A	公开(公告)日	2015-01-08
申请号	JP2014200798	申请日	2014-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	事情雷克斯公司		
申请(专利权)人(译)	事情雷克斯公司		
[标]发明人	ゴイックスフィリップ プスカシュロバート トッドジョン リビングストンリチャード ヘルドダグラス		
发明人	ゴイックス,フィリップ プスカシュ,ロバート トッド,ジョン リビングストン,リチャード ヘルド,ダグラス		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/53 G01N33/536 G01N33/543 G01N21/78 G01N15/14 C09K11/06		
CPC分类号	G01N33/6887 G01N15/06 G01N15/1459 G01N21/6428 G01N33/577 G01N33/582 G01N2015/0693 G01N2015/1006 G01N2015/1486 G01N2201/1247 G01N2201/12761 G01N2800/32 G01N2800/324 G01N2800/52 Y10T436/105831		
FI分类号	G01N21/64.F G01N33/53.D G01N33/536.D G01N33/543.597 G01N21/78.C G01N15/14.D C09K11/06		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/AA03 2G043/BA14 2G043/BA16 2G043/CA04 2G043/DA01 2G043/DA05 2G043/DA06 2G043/EA01 2G043/FA02 2G043/FA07 2G043/GA02 2G043/GB02 2G043/HA01 2G043/KA01 2G043/KA02 2G043/KA03 2G043/KA09 2G043/LA01 2G043/NA11 2G054/AA07 2G054/AB04 2G054/AB05 2G054/CA21 2G054/CB01 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/EB04 2G054/EB05 2G054/GA01 2G054/GA02 2G054/GA03 2G054/GA04 2G054/GA05 2G054/GB02 2G054/GE03 2G054/GE10 2G054/JA06		
优先权	60/789304 2006-04-04 US 60/793664 2006-04-19 US 60/808662 2006-05-26 US 60/861498 2006-11-28 US 60/872986 2006-12-04 US		
其他公开文献	JP6001028B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供该领域的进一步发展。[解决方案] 公开了用于灵敏检测分子的方法，试剂盒和组合物。这些方法 并且该成分在样品中的分子浓度为1飞摩尔，1原子或 这在确定以下级别时很有用。这些方法，试剂盒和组合物 无需稀释即可进行宽范围的浓度测定，例如7 log 要做。[选型图]图1A

